



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

***APLICACIÓN DE ENZIMAS EN LA OBTENCIÓN DE ACEITE  
DE GIRASOL CON SOLVENTES RENOVABLES:  
Impacto del procesamiento en la composición y calidad  
de aceites y harinas***

LUCIANA MARCELA RODRIGUEZ

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2019

# PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Ingeniería Química durante el periodo comprendido entre el 1 de Octubre de 2013 y 19 de febrero de 2019, bajo la dirección del Doctor Guillermo H. Crapiste y la Doctora Ethel E. Pérez.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el        /        /        , mereciendo la calificación de (                    )

**Dedicada:**

*A la memoria de mi abuelo Nino,*

*A mis padres que siempre creyeron en mí  
y nunca dejaron de apoyarme en mis decisiones y sueños*

*Gracias a ellos hoy soy la persona que soy...*

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) y la Universidad Nacional del Sur (UNS) y la Facultad de Ingeniería de Olavarría, de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA) por haberme permitido realizar mis estudios de doctorado.

A mi director de tesis, Dr. Guillermo Crapiste por su predisposición, por todo su apoyo y por el conocimiento brindado.

A mi co-directora de tesis, la Dra. Ethel Pérez por todo el apoyo brindado, por su paciencia, su humildad, por su compañerismo y por enseñarme a transitar este camino.

A Maria Belén Fernández, Susana Nolasco, Karina de Figueiredo e Isabel Riccobene de la Facultad de Ingeniería de Olavarría, por darme el empujoncito necesario para incursionar en el área de la investigación.

Al grupo de Alimentos de PLAPIQUI en general, ayudarme siempre que lo necesité, en especial a Maria Elena, Erica, Virginia, Liliana, Federico, Amalia y Camila.

A Clarisa, por ser incondicional no solo en lo profesional sino también en lo personal, amiga y consejera, siempre dando una palabra de aliento para ayudarme a seguir adelante en todos los aspectos de la vida, gracias tia Clari.

A los amigos cosechados a lo largo de estos cinco años, Clarita, Fer, Lily, Analía, May y Carito, con las cuales he compartido momentos invaluables.

A mis amigas y compañeras de oficina, Noe y Ana por ayudarme a hacer más ameno el día a día, por estar siempre, por compartir largas charlas, por sus consejos y por ayudarme a no bajar los brazos en cada tropiezo, gracias chicas!!.

A mis amigas incondicionales, Marce, Pato y Sol que a pesar de la distancia siempre estuvieron conmigo cada vez que lo necesité, por tener siempre una palabra para que siga confiando y por aceptarme tal cual soy.

A Carlitos, el amor de mi vida, por llegar en el momento indicado y por estar presente en cada paso que doy, acompañándome, haciéndome sentir siempre que puedo lograrlo y por hacerme feliz todos los días de mi vida.

## RESUMEN

Dada la importancia del aceite de girasol en el comercio nacional e internacional, surge la necesidad de realizar investigaciones para incentivar la incorporación de alternativas tecnológicas “amigables” con el medio ambiente que logren reducir las pérdidas y perfeccionar el procesamiento. El uso de enzimas en el proceso de extracción acuosa o la utilización de enzimas como tratamiento previo a la extracción alcohólica, pueden estar consideradas dentro de las “tecnologías limpias” y puede dar como resultado una mejor calidad de los productos, un aumento en la competitividad frente a otros aceites en crecimiento y una mejora de la rentabilidad, debido a que se podría eliminar algunas etapas del refinado.

Dentro de este marco se planteó como objetivo general de la presente tesis *estudiar el uso de enzimas en el proceso extractivo de aceite de collets de girasol, utilizando solventes no convencionales y la obtención de otros derivados a escala laboratorio, promoviendo el desarrollo de tecnologías alternativas*. Dentro de los objetivos específicos se pueden identificar dos grandes áreas en el uso de enzimas, por un lado se plantea su uso en la extracción acuosa de aceite de collets de girasol, estudiando variables operativas a través de diseño de experimentos para optimizar dicha extracción y por otro lado, el uso de enzimas como pre-tratamiento para la posterior extracción de aceite de collets de girasol con alcoholes de cadenas cortas como etanol e isopropanol.

En el *Capítulo 1* se presenta el complejo oleaginoso argentino y la relevancia del girasol en el mercado interno y externo. Se describe su localización en Argentina y sus productos, detallando la composición química del aceite, los subproductos y sus aplicaciones. Además, se realiza una breve reseña sobre la extracción de aceite con proceso convencional y no convencional, como la extracción acuosa, extracción asistida

por enzimas y extracción alcohólica. En el *Capítulo 2* se especifican los materiales y las técnicas analíticas utilizadas en el trabajo de tesis. A su vez, se detalla la caracterización de la materia prima principal utilizada y la caracterización de su aceite

En el *Capítulo 3* analiza la extracción acuosa y extracción acuosa-enzimática a través de un diseño de experimentos robusto para definir variables generales del proceso extractivo. El estudio se complementa con la optimización de la extracción acuosa-enzimática empleando un diseño de experimentos más amplio y detallado que incluye otras variables necesarias, su significancia y el efecto de las interacciones entre las mismas.

En el *Capítulo 4* se evalúa la extracción alcohólica con pretratamiento enzimático, utilizando como solventes alternativos etanol e isopropanol. Se analiza la eficiencia del proceso extractivo para ambos alcoholes y se compara con la extracción convencional con *n*-hexano. Además se realiza una caracterización de los aceites obtenidos según su contenido de fosfolípidos y tocoferoles.

Finalmente, en el *Capítulo 5*, se exponen las conclusiones generales y se proponen trabajos futuros continuando las líneas de investigación de esta tesis, en base a los conocimientos adquiridos.

**Palabras claves:** Collets, extracción, aceite de girasol, solvente alternativos, tratamiento enzimático.

# ABSTRACT

Given the importance of sunflower oil in national and international trade, there is a need to research for the incorporation of eco-friendly technological alternatives that reduce losses and improve processing. Use of enzymes in the aqueous extraction process or the use of enzymes as pre-treatment to alcoholic extraction, can be considered within the "clean technologies" and can result in a better quality products, an increase competitiveness compared with other growing oils and improvement in profitability, due to the fact that some stages of refining could be eliminated.

Within this framework, the overall objective of this thesis was aimed to study *the use of enzymes in the extractive oil process of sunflower collets, using non-conventional solvents and obtaining other derivatives at a laboratory scale, promoting the development of alternative technologies*. Among specific objectives, enzyme use in the aqueous extraction of oil from sunflower collets was considered, studying operational variables through the design of experiments to optimize performance and on the other hand, its use in the pre-treatment to oil extraction from sunflower collets with short-chain alcohols such as ethanol and isopropanol

Chapter 1 presents the Argentine oilseed complex and the relevance of sunflower in the internal and external market. Its location in Argentina and its products are described, detailing the chemical composition of the oil, the by-products and their applications. In addition, a brief review is made on the conventional and non conventional oil extraction process, such as aqueous extraction, enzyme-assisted extraction and alcoholic extraction. Chapter 2 specifies the materials and analytical techniques used in the thesis work. At the same time, the characterization of the main raw material used and the characterization of its oil are detailed.



In Chapter 3, it analyzes aqueous extraction and enzyme-aided aqueous extraction through a robust design of experiments to define general variables of the extractive process. The study is complemented with the optimization of the enzyme-aided aqueous extraction using a broader and more detailed design of experiments that includes other necessary variables, their significance and the effect of the interactions among them. In Chapter 4, alcohol extraction with enzymatic pretreatment is evaluated, using ethanol and isopropanol as alternative solvents. The efficiency of the extractive process for both alcohols is analyzed and compared with conventional extraction with *n*-hexane. In addition, a characterization of the oils obtained according to their content of phospholipids and tocopherols is carried out.

Finally, Chapter 5 presents overall conclusions and future studies are proposed continuing the research lines of this thesis, based on the knowledge acquired.

**Keywords:** Collets, enzyme-aided aqueous extraction, alcoholic extraction, sunflower oil, alternative solvent, enzymatic pretreatment.

# INDICE GENERAL

|   |               |
|---|---------------|
| <b>CAPÍTULO 1 .....</b>   | <b>1</b>      |
| INTRODUCCIÓN GENERAL .....  | 1             |
| <b>1.1. EL COMPLEJO OLEAGINOSO .....</b>  | <b>1</b>      |
| <b>1.2. EL GIRASOL .....</b>  | <b>6</b>      |
| 1.2.1. SEMILLA: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES .....                                     | 6             |
| 1.2.2. ACEITE: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES.....                                       | 8             |
| 1.2.3. PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS .....  | 11            |
| <b>1.3. PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE.....</b>                                   | <b>14</b>     |
| 1.3.1. PROCESO CONVENCIONAL.....  | 14            |
| 1.3.2. USOS.....  | 19            |
| 1.3.3. PROCESO DE EXTRACCION DE ACEITE CON SOLVENTES<br>ALTERNATIVOS.....           | 20            |
| 1.3.4. EXTRACCIÓN ACUOSA.....   | 22            |
| 1.3.5. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ENZIMAS .....  | 24            |
| 1.3.5.1. <i>Tipos de enzimas aplicadas a la extracción.....</i>                     | <i>27</i>     |
| 1.3.5.2. <i>Parámetros que afectan la eficiencia de la extracción enzimática ..</i> | <i>31</i>     |
| 1.3.6. EXTRACCIÓN ALCOHOLICA.....   | 34            |
| <b>1.4. PLANTEO Y DEFINICIÓN DE LA PROBLEMÁTICA .....</b>                           | <b>37</b>     |
| <b>1.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>39</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO 2 .....</b>   | <br><b>52</b> |
| <b>MATERIALES, MÉTODOS Y CARACTERIZACIÓN .....</b>                                  | <b>52</b>     |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                             | <b>52</b> |
| 2.1.1. MATERIA PRIMA Y REACTIVOS .....                            | 52        |
| 2.1.2. ENZIMA .....   | 53        |
| 2.1.2.1. <i>Determinación de la actividad enzimática</i> .....    | 54        |
| 2.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA Y PRODUCTOS .....      | 55        |
| 2.1.3.1. <i>Contenido de humedad y material volátil</i> .....     | 55        |
| 2.1.3.2. <i>Contenido de aceite</i> .....                         | 56        |
| 2.1.3.3. <i>Contenido de proteínas</i> .....                      | 56        |
| 2.1.3.4. <i>Contenido de fibra estructurales</i> .....            | 57        |
| 2.1.3.4.1. <i>Fibra detergente neutra (FDN)</i> .....             | 58        |
| 2.1.3.4.2. <i>Contenido de fibra detergente ácida (FDA)</i> ..... | 58        |
| 2.1.3.4.3. <i>Contenido de lignina</i> .....                      | 59        |
| 2.1.3.5. <i>Capacidad de absorción de agua (CAb)</i> .....        | 59        |
| 2.1.3.6. <i>Cuantificación de azúcares reductores</i> .....       | 60        |
| 2.1.3.7. <i>Cuantificación de proteínas solubles</i> .....        | 63        |
| 2.1.4. COMPONENTES MENORES EN EL ACEITE .....                     | 65        |
| 2.1.4.1. <i>Determinación del contenido de tocoferoles</i> .....  | 65        |
| 2.1.4.2. <i>Determinación del contenido de fosfolípidos</i> ..... | 67        |
| 2.1.4.3. <i>Determinación del contenido de ceras</i> .....        | 69        |
| 2.1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS.....       | 71        |
| <b>2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>                          | <b>71</b> |
| 2.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA .....                  | 71        |
| <b>2.3. CONCLUSIONES .....</b>                                    | <b>73</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.4 . REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>74</b> |
|---|-----------|

## **CAPÍTULO 3..... 76**

|  |    |
|--|----|
| EXTRACCIÓN ACUOSA ASISTIDA POR ENZIMAS ..... | 76 |
|--|----|

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| <b>3.1. INTRODUCCIÓN .....</b> | <b>77</b> |
|--------------------------------|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b> | <b>79</b> |
|--|-----------|

|   |    |
|---|----|
| 3.2.1. EXTRACCIÓN A ESCALA LABORATORIO..... | 79 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| 3.2.2. RENDIMIENTO DE ACEITE Y PROTEÍNA EXTRAÍDA ..... | 81 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3. AZÚCARES REDUCTORES EN LA FRACCIÓN LÍQUIDA ..... | 82 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| 3.2.4. EXTRACCIÓN A ESCALA PILOTO ..... | 83 |
|---|----|

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.3. SELECCIÓN DE CONDICIONES OPERATIVAS GENERALES .....</b> | <b>83</b> |
|---|-----------|

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 3.3.1. SELECCIÓN DE FACTORES ..... | 83 |
|------------------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| 3.3.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS: METOLOGÍA TAGUCHI ..... | 85 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| 3.3.3. EVALUACIÓN DE FUENTES DE VARIACIÓN ..... | 86 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| 3.3.4. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO ..... | 87 |
|---|----|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.4. RESULTADOS Y DICUSIÓN.....</b> | <b>88</b> |
|--|-----------|

|   |    |
|---|----|
| 3.4.1. EXTRACCIÓN ACUOSA VS EXTRACCIÓN ACUOSA<br>ENZIMÁTICA ..... | 88 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| 3.4.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES OPERATIVAS ..... | 95 |
|---|----|

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 3.4.3. VALIDACIÓN DEL MODELO ..... | 96 |
|------------------------------------|----|

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.5. CONCLUSIONES DE LA SELECCIÓN DE VARIABLES OPERATIVAS.....</b> | <b>95</b> |
|---|-----------|

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.6. DISEÑO DE EXPERIMENTOS AMPLIADO .....</b> | <b>96</b> |
|---|-----------|

|  |                |
|--|----------------|
| 3.6.1. SELECCIÓN DE FACTORES .....                           | 96             |
| 3.6.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS: CENTRAL COMPUESTO .....       | 97             |
| 3.6.3. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO.....             | 100            |
| 3.6.4. CARACTERIZACIÓN DE ACEITES .....                      | 101            |
| <b>3.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL DISEÑO AMPLIADO .....</b> | <b>101</b>     |
| 3.7.1. EXTRACCIÓN ACUOSA-ENZIMÁTICA .....                    | 101            |
| 3.7.2. MODELOS .....   | 102            |
| 3.7.3. ACEITE .....  | 105            |
| 3.7.4. PROTEÍNA LIBERADA .....                               | 109            |
| 3.7.5. OPTIMIZACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LOS MODELOS .....      | 112            |
| 3.7.6. AZÚCARES REDUCTORES .....                             | 116            |
| 3.7.7. EXTRACCIÓN A ESCALA PILOTO.....                       | 119            |
| 3.7.7.1. Caracterización de la fracción líquida.....         | 119            |
| 3.7.7.2. Caracterización del residuo sólido.....             | 120            |
| 3.7.7.3. Caracterización de los aceites.....                 | 120            |
| 3.7.7.3.1. Tocoferoles .....                                 | 120            |
| 3.7.7.3.2. Fosfolípidos.....                                 | 122            |
| 3.7.7.3.3. Ceras .....                                       | 124            |
| <b>3.6. CONCLUSIONES DEL DISEÑO AMPLIADO.....</b>            | <b>126</b>     |
| <b>3.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                  | <b>130</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO 4.....</b>                                   | <br><b>136</b> |

|  |            |
|--|------------|
| EXTRACCIÓN EXTRACCIÓN ALCOHOLICA CON PRETRATAMIENTO<br>ENZIMÁTICO.....               | 136        |
| <b>4.1. INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>136</b> |
| <b>4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>   | <b>139</b> |
| 4.2.1. ETAPA 1 .....   | 140        |
| 4.2.1.1. <i>Separación de las fracciones</i> .....                                   | 141        |
| 4.2.2. ETAPA 2 .....   | 143        |
| 4.2.3. ETAPA 3 .....   | 144        |
| 4.2.4. ETAPA 4 .....   | 144        |
| <b>4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>145</b> |
| 4.3.1. EFECTO DE LA HUMEDAD EN LA EXTRACCIÓN ETANÓLICA ...                           | 145        |
| 4.3.2. EFECTO DEL TIEMPO EN LA EXTRACCIÓN ETANÓLICA.....                             | 148        |
| 4.3.2.1. <i>Contenido de fosfolípidos en aceites a dos tiempos de extracción</i> ... | 151        |
| 4.3.3. EFECTO DEL TIPO DE ALCOHOL.....   | 154        |
| 4.3.4. EXTRACCIÓN BATCH CON ETANOL E ISOPROPANOL.....                                | 157        |
| 4.3.4.1. <i>Componentes minoritarios del aceite</i> .....                            | 162        |
| 4.3.4.1.1. Fosfolípidos.....   | 162        |
| 4.3.4.1.2. Tocoferoles .....   | 165        |
| 4.3.4.2. <i>Composición de las harinas residuales</i> .....                          | 167        |
| 4.3.4.2.1. Proteínas.....  | 167        |
| <b>4.4. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>169</b> |
| <b>4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>171</b> |
| <b>CAPÍTULO 5 .....</b>  | <b>179</b> |

|   |            |
|---|------------|
| CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJO PROPUESTO A FUTURO ..... | 179        |
| <b>5.1. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>                  | <b>179</b> |
| <b>5.2. TRABAJO PROPUESTO A FUTURO .....</b>              | <b>184</b> |

# INDICE DE TABLAS

## CAPÍTULO 1

|      |  |   |
|------|--|---|
| 1.1. | Composición de semillas y cáscara de girasol .....     | 7 |
| 1.2. | Composición promedio del aceite de girasol crudo ..... | 9 |

## CAPÍTULO 2

|      |   |    |
|------|---|----|
| 2.1. | Especificaciones de origen y características del complejo enzimático.....             | 53 |
| 2.2. | Recta de calibrado de glucosa .....   | 63 |
| 2.3. | Recta de calibrado de albúmina .....  | 65 |
| 2.4. | Recta de calibrado de tocoferoles .....   | 66 |
| 2.5. | Recta de calibrado de fosfolípidos.....   | 68 |
| 2.6. | Composición de fibras estructurales.....  | 72 |
| 2.7. | Composición de collets de girasol, referencias.....                                   | 72 |
| 2.8. | Componentes minoritarios del aceite extraído con n-hexano de collets de girasol ..... | 73 |

## CAPÍTULO 3

|      |   |    |
|------|---|----|
| 3.1. | Condiciones utilizadas en investigaciones anteriores para girasol ..... | 84 |
| 3.2. | Arreglo ortogonal L <sub>9</sub> .....                                  | 85 |
| 3.3. | Factores y niveles de experimentación .....                             | 86 |



|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| <b>3.4.</b>  | Porcentajes relativos de aceite extraído $Y_a$ en la extracción acuosa y acuosa-enzimática según el diseño TAGUCHI.....  | <b>89</b>  |
| <b>3.5.</b>  | Valores de $SR$ asociados al rendimiento porcentual relativo de aceite y contenido de azúcares.....  | <b>91</b>  |
| <b>3.6.</b>  | Respuesta promedio $M_{ij}$ de los factores de control en cada nivel para el rendimiento porcentual relativo de aceite.....  | <b>92</b>  |
| <b>3.7.</b>  | Respuesta promedio $M_{ij}$ de los factores de control en cada nivel para el contenido de azúcares.....  | <b>92</b>  |
| <b>3.8.</b>  | Test de validación del modelo .....  | <b>95</b>  |
| <b>3.9.</b>  | Factores con sus respectivos niveles de experimentación usados en el DCC para la extracción acuosa-enzimática .....  | <b>98</b>  |
| <b>3.10.</b> | Variables independientes codificadas y reales, con sus niveles de experimentación usados para el diseño central compuesto .....  | <b>99</b>  |
| <b>3.11.</b> | Rendimiento relativo porcentual de aceite y proteína liberada para los 29 experimentos realizados.....   | <b>101</b> |
| <b>3.12.</b> | Significancia de los coeficientes de regresión de los modelos polinomiales de segundo orden para el rendimiento relativo porcentual de aceite y rendimiento relativo porcentual de la proteína liberada en la fracción líquida. .... | <b>103</b> |
| <b>3.13.</b> | Pruebas de ajustes de los modelos polinomiales .....   | <b>104</b> |
| <b>3.14.</b> | Condiciones óptimas de las variables operativas de la EAE obtenidas con los modelos individuales y simultáneos de las respuestas rendimiento relativo de aceite y proteína soluble .....   | <b>114</b> |
| <b>3.15.</b> | Valores predichos y experimentales para el rendimiento porcentual relativo de aceite extraído y de proteína liberada en la fracción líquida .....  | <b>115</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>3.16.</b> Contenido de azúcares reductores en 100 mL de fase líquida para 29 experimento realizados.....  | <b>117</b> |
| <b>3.17.</b> Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para azúcares reductores. ....   | <b>118</b> |
| <b>3.18.</b> Extracción acuosa-ezimática a escala piloto .....   | <b>119</b> |
| <b>3.19.</b> Composición de tocoferoles del aceite obtenido de los collets y del residuo sólido.....   | <b>121</b> |
| <b>3.20.</b> Fosfolípidos totales y perfil del aceite extraído con n-hexano de los collets y de las harinas pre-tratadas .....                         | <b>123</b> |
| <b>3.21.</b> Perfil de ceras de aceite extraído de los collets de girasol y del residuo sólido obtenido luego de la extracción acuosa-enzimática ..... | <b>126</b> |

## **CAPÍTULO 4**

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.1.</b> Composición química del collets original y de los collets pre-tratados.....  | <b>139</b> |
| <b>4.2.</b> Porcentaje de material total extraído, la fracción lipídica y la eficiencia de la extracción de aceite, para los diferentes contenidos de humedad analizados ... | <b>146</b> |
| <b>4.3.</b> Eficiencia de la extracción etanólica de aceite y fracción lipídica en collets con y sin pre-tratamiento enzimático (humedad de 48% b.s.).....                   | <b>149</b> |
| <b>4.4.</b> Análisis de fosfolípidos en aceites obtenidos por extracción con etanol. ....  | <b>152</b> |
| <b>4.5.</b> Eficiencia de la extracción ( $E_a$ ) con isopropanol y etanol .....   | <b>154</b> |
| <b>4.6.</b> Material no lipídico ( $W_r$ ) de la extracción con etanol e isopropanol. ....   | <b>156</b> |
| <b>4.7.</b> Contenido de fosfolípidos totales y perfil para IPA y etanol en los tiempos de extracción analizados. ....   | <b>163</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.8. Composición de tocoferoles de los aceites obtenidos con extracción alcohólica a tres tiempos de extracción. ....</b> | <b>165</b> |
| <b>4.9. Contenido de proteínas en las harinas residuales para etanol e isopropanol a tres tiempos de extracción. ....</b>    | <b>168</b> |

# INDICE DE FIGURAS

## CAPÍTULO 1

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.1.  | Esquema del complejo oleaginoso.....   | 2  |
| 1.2.  | Mapa de la República Argentina donde se representan las zonas del cultivo de girasol ..... | 3  |
| 1.3   | Evolución del área sembrada de girasol en Argentina.....                                   | 4  |
| 1.4.  | Evolución de la producción total de girasol.....   | 4  |
| 1.5.  | Evolución de la producción de aceite de girasol en la última década .....                  | 5  |
| 1.6.  | Estructura de la semilla de girasol.....   | 6  |
| 1.7.  | Estructura general del oleosoma .....  | 8  |
| 1.8.  | Diagrama general de los componentes de la pared celular vegetal.....                       | 14 |
| 1.9.  | Diagrama de flujo de un proceso de extracción de aceite convencional ....                  | 15 |
| 1.10. | Fases formadas luego de la etapa de centrifugación para la recuperación del aceite .....   | 23 |

## CAPÍTULO 2

|      |                          |    |
|------|--------------------------|----|
| 2.1. | Collets de girasol ..... | 53 |
|------|--------------------------|----|

## CAPÍTULO 3

|      |   |    |
|------|---|----|
| 3.1. | Sistema de extracción <i>batch</i> y su esquema: $D_t$ : diámetro del recipiente, $D_a$ : diámetro de la hélice, $H$ : altura del líquido, $E$ : distancia de la hélice al fondo del recipiente ..... | 80 |
|------|---|----|

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| <b>3.2.</b>  | <b>Esquema general de la extracción acuosa y acuosa-enzimática .....</b>   | <b>81</b>  |
| <b>3.3.</b>  | <b>Extracción acuosa-enzimática a escala piloto. ....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>3.4.</b>  | <b>Efecto de la relación SR los factores de control para (A) rendimiento relativo porcentual de aceite y (B) contenido de azúcares liberados en la fracción líquida. ....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>3.5.</b>  | <b>Comparación entre las predicciones y los resultados experimentales para <math>Y_a</math> e <math>Y_p</math>.....</b>  | <b>105</b> |
| <b>3.6.</b>  | <b>Efecto individual de los diferentes factores para <math>Y_a</math> .....</b>  | <b>106</b> |
| <b>3.7.</b>  | <b>Representación tridimensional que muestra los efectos correlativos de: A) la relación enzima: sustrato y la temperatura, B) la relación enzima: sustrato y la velocidad de agitación y C) la temperatura y velocidad de agitación sobre el rendimiento relativo porcentual de aceite de extracción.....</b> | <b>107</b> |
| <b>3.8.</b>  | <b>Efecto individual de los diferentes factores para <math>Y_p</math> .....</b>  | <b>110</b> |
| <b>3.9.</b>  | <b>Representación 3D que muestran los efectos correlativos de (A) la relación enzima: sustrato vs. temperatura. (B) relación enzima: sustrato vs. velocidad de agitación. (C) temperatura vs. velocidad de agitación sobre el porcentaje de proteína liberada en la fracción líquida .....</b>                 | <b>112</b> |
| <b>3.10.</b> | <b>Representación 3D de las superficies de respuesta obtenida en la optimización simultánea de rendimiento porcentual relativo de aceite <math>Y_a</math> y contenido de proteína liberada en la fase acuosa <math>Y_p</math>, en función de la velocidad de agitación y la temperatura .....</b>              | <b>115</b> |
| <b>3.11.</b> | <b>Perfil de fosfolípidos luego de la extracción con <i>n</i>-hexano por Soxhlet (A) aceite de collets (B) aceite del residuo sólido.....</b>  | <b>124</b> |
| <b>3.12.</b> | <b>Perfil de ceras de aceite de collets de girasol.....</b>  | <b>125</b> |

## **CAPÍTULO 4**

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| <b>4.1.</b> | <b>Extracción alcohólica y separación de fases .....</b>  | <b>142</b> |
| <b>4.2.</b> | <b>Eficiencia de la extracción etanólica en collets de girasol sin y con pre-tratamiento enzimático .....</b>   | <b>150</b> |
| <b>4.3.</b> | <b>Eficiencia de la extracción de aceite de muestras pre-tratadas enzimáticamente en función del tiempo de extracción, utilizando IPA y etanol como solventes .....</b> | <b>158</b> |
| <b>4.4.</b> | <b>Fracción resto en función del tiempo, utilizando IPA y etanol como solvente.....</b>   | <b>162</b> |
| <b>4.5.</b> | <b>Harinas residuales obtenidas luego de la extracción alcohólica (A) Etanol- (B) Isopropanol.....</b>  | <b>168</b> |

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

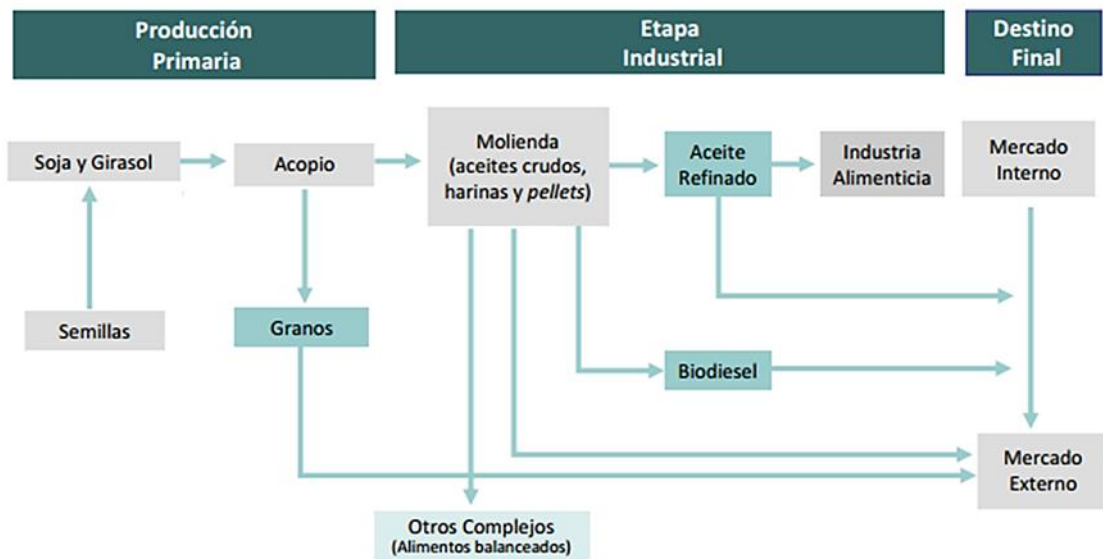
### 1.1. EL COMPLEJO OLEAGINOSO

El complejo oleaginoso comprende desde la producción de granos hasta su industrialización, que permite la obtención de aceites crudos y refinados, subproductos de la industria aceitera procesados (pellets) y biodiesel. Su importancia radica en la cantidad de hectáreas destinadas al cultivo, la alta eficiencia de la industria, los grandes volúmenes de exportación y la cantidad de destinos que alcanza (Marín y Pérez, 2011).

El complejo oleaginoso está subdividido en tres sectores: producción primaria, etapa industrial y destino final o comercial (Figura 1.1). El *sector primario* está integrado por los productores primarios, proveedores de insumos (semillas, fertilizantes, maquinarias, asistencia técnica, etc.) y acopiadores. Luego de la década del '90, se incorporaron nuevos actores a la producción primaria de oleaginosas como los “pools” de siembra y los fondos comunes de inversión. Estos surgieron ante la necesidad de lograr una mejor competitividad en los mercados internacionales mediante la explotación agraria a escala. Este es un sistema conformado por inversores, administradores, propietarios de campos y contratistas (Giancola *et.al.*, 2009). Por su parte, el *sector industrial*, lo integran las industrias molineras, aceiteras, alimenticias, de biocombustibles y otros complejos como el de alimentos balanceados, mientras que el *sector comercial o destino final* está conformado por el mercado interno (mayoristas,

minoristas, supermercados, otras industrias) y el mercado externo (*traders*, *brookers*, consumidores) (Añón, 2016).

La producción primaria es el sector más representativo del complejo oleaginoso, consolidado en los últimos años por los ya mencionados “pools” de siembra. El perfil del complejo oleaginoso está fuertemente orientado al mercado externo. Según informe técnico del INDEC (2017), el volumen de exportaciones en el 2017 aportó 32,4 % (U\$S 18,4 mil millones) del total vendido al exterior, generando el mayor ingreso de divisas de nuestra economía, por encima de la cadena automotriz y petroquímica (Marín y Pérez, 2011).



**Figura 1.1:** Esquema del complejo oleaginoso.

Fuente: Marín y Pérez (2011)

El principal cultivo del Complejo Oleaginoso lo constituye la soja, seguido por el de girasol, mientras que otros cultivos como los de cártamo, lino y colza/canola lo hacen en menor escala dentro de la producción a nivel nacional (Añón, 2016). La mayor parte de la producción primaria de soja (80 %) se destina a la industrialización y en el caso del girasol, casi la totalidad de la producción de semilla se destina a la elaboración de aceite. En la etapa industrial, de la molienda de soja y girasol se obtiene el aceite crudo



y como subproducto, las harinas proteicas para la alimentación animal. Con relación al aceite de girasol, la exportación representa alrededor del 30 % y el resto se refina, principalmente para consumo doméstico de aceite comestible y, en menor proporción, para uso industrial (margarinas, mayonesas, galletitas y otros alimentos) (Constanzó y Starti, 2017).

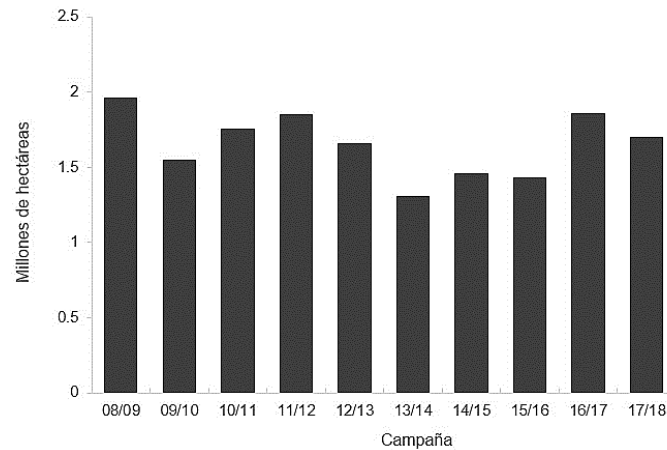
La Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR, 2018) ha definido ocho regiones en donde se cultiva girasol por sus condiciones agroeconómicas similares (Figura 1.2): sureste de la provincia de Buenos Aires (SE), suroeste de la provincia de Buenos Aires (SO), oeste de Buenos Aires Provincia (OBA), centro de la provincia de Buenos Aires (CBA), provincias de San Luis y La Pampa (SL-LP), argentina central, que comprende las provincias de Córdoba y Santa Fé (CENTRO), provincia de Entre Ríos (ER) y noreste de Argentina (NEA). La provincia de Buenos Aires concentra más de la mitad de la superficie sembrada de girasol (52 %), seguida por La Pampa (18 %), Santa Fe (10 %) y Chaco (10 %). En términos de producción, también Buenos Aires es la provincia más importante (representa el 68 %), siendo el resto explicado por La Pampa y Santa Fe.



**Figura 1.2:** Mapa de la República Argentina donde se representan las zonas del cultivo de girasol. Fuente: ASAGIR (2018)

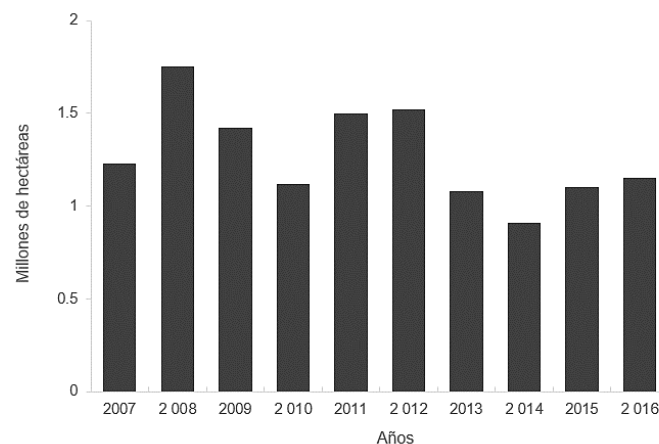
La evolución del área sembrada de girasol en Argentina desde la campaña 2008/2009 a 2017/2018 se muestra en la Figura 1.3. Las estadísticas nacionales

reportan que para la campaña 2017/2018 la siembra de girasol cubrió la totalidad del área estimada en 1,7 millones de hectáreas, registrando una leve caída respecto de la campaña anterior. Como se puede observar en la Figura 1.3, a lo largo de las diez campañas presentadas, el girasol presenta ciclos de caída y recuperación constantes (Sandoval, 2018).



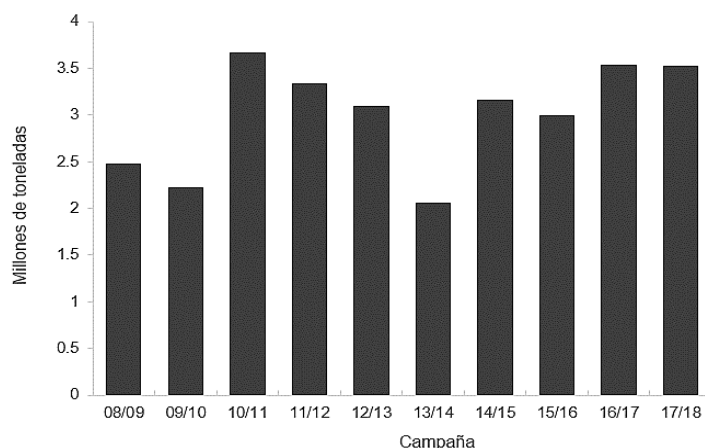
**Figura 1.3:** Evolución del área sembrada de girasol en Argentina.  
Fuente: Elaboración propia usando de MINAGRI

Del mismo modo se presenta la producción total de girasol en Argentina de las campañas 2008/2009 a 2017/2018 en la Figura 1.4. Se observa que la producción total de girasol se mantiene constante con respecto a la campaña anterior a pesar de la disminución del rendimiento en este periodo.



**Figura 1.4:** Evolución de la producción total de girasol.  
Fuente: Elaboración propia usando datos de MINAGRI

En términos de producción, Argentina ocupa el cuarto lugar respecto de aceite de girasol por detrás de Ucrania, Rusia y la Unión Europea. En contraste con otros aceites vegetales, alrededor del 90 % de la producción total, a nivel mundial, se utiliza para consumo humano y solo el 10 % se utiliza para biodiesel y aplicaciones industriales (Bolsa de Comercio de Rosario, 2018). La industria nacional de aceite de girasol procesa alrededor de 3,5 millones de toneladas de semilla por año para obtener más de 1,5 millones de toneladas de aceite crudo y una cantidad similar de pellets o harinas. Alrededor de dos tercios de la producción total sigue el proceso de la refinación, ya sea para consumo doméstico como para uso industrial. El tercio restante se dirige a la exportación. El total de consumo familiar, que incluye aceites de girasol puro y aceites mezcla (girasol con soja) en botella, alcanza los 478 millones de litros al año, es decir, un promedio de 10,9 litros por año por habitante (INDEC, 2017). La Figura 1.5 muestra la evolución de la producción de aceite de girasol en la última década.



**Figura 1.5:** Evolución de la producción de aceite de girasol en la última década.  
Fuente: Adaptación de base a datos de MINAGRI

Actualmente, se registran 46 plantas aceiteras en actividad en nuestro país, localizándose gran parte de ellas en Santa Fe (21) y en Buenos Aires (15), distribuyéndose el resto entre Córdoba (4), Entre Ríos (3) y La Pampa, Misiones y Santiago del Estero, con una planta cada una (INDEC, 2017). A nivel mundial, Argentina

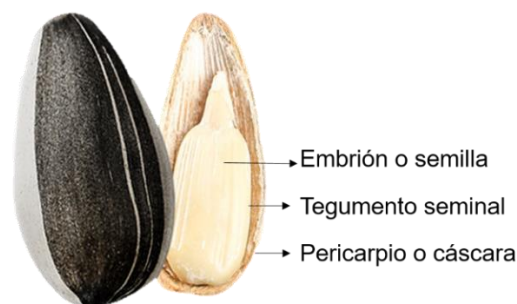
posee la segunda capacidad instalada en términos de molienda diaria y anual de granos oleaginosos y las plantas de mayor capacidad promedio (Añón, 2016).

## 1.2. EL GIRASOL

### 1.2.1. SEMILLA: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES

El girasol (*Helianthus annuus*) es una planta que pertenece a la familia de las compuestas (*Asteraceae*) y al género *Helianthus*. Es una planta anual que tiene una gran inflorescencia amarilla que consiste en una cabeza circular, o capítulo, con pequeñas flores que cuando son fecundadas desarrollan un fruto, llamado *aquenio* o *cipsela*, muy rico en aceite. Su nombre deriva de dos palabras griegas: *helios* que significa sol y *anthos*, flor, aludiendo a su movimiento heliotrópico de su inflorescencia (Melgarejo, 2003).

Comúnmente se emplea el término *semilla de girasol* para referirse al *aquenio*. De aquí en adelante y a pesar de la imprecisión, se utilizará el vocablo “semilla” para referirse al fruto. El aquenio se caracteriza por estar formado por un embrión o pepa (semilla propiamente dicha) cubierto por su tegumento seminal y por el pericarpio (o cáscara) (Figura 1.6). Un capítulo contiene al madurar entre 250 y 1500 aquenios (Melgarejo, 2003).



**Figura 1.6:** Estructura de la semilla de girasol

El embrión representa el 75-80 % del peso seco de la semilla, y en él se encuentran dos cotiledones en donde se almacenan las reservas de lípidos y proteína.

Por otra parte, el pericarpio representa el 20-25 % del peso seco de la semilla, y es principalmente de naturaleza lignocelulósica (González-Pérez y Vereijken, 2007). Su color puede ser gris, blanco castaño o negro y presentar estrías blancas, según la variedad.

Los componentes mayoritarios en las semillas de girasol son el aceite, las proteínas, las fibras y los carbohidratos, siendo los primeros dos los más importantes. La cáscara aporta principalmente fibra y compuestos fenólicos. Un análisis típico de la composición de las semillas y de las cáscaras se muestra en la Tabla 1.1. La variabilidad que presenta la composición se atribuye no sólo al genotipo sino también a diferencias de localización geográfica y condiciones ambientales durante el período de maduración. La variación entre cultivares se evidencian en diferencias en la proporción de pericarpio (cáscara) y en la concentración de aceite en la semilla. En general, los cultivares con granos de pericarpio negro presentan una mayor concentración de aceite que los de pericarpio estriado. La concentración de proteínas varía entre 15 y 19 %, correspondiendo los valores mayores a una menor concentración de aceite (Le Clef y Kemper, 2015).

**Tabla 1.1:** Composición de semillas y cáscara de girasol

|                                | <b>Semilla de girasol</b> | <b>Cáscara de girasol</b> |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Humedad (%)</b>             | 5,5 – 8,0                 | 7 – 11                    |
| <b>Aceite (%)</b>              | 45 – 55                   | 1,5 – 3,0                 |
| <b>Proteína (%)</b>            | 14 – 27                   | 4 – 6                     |
| <b>Fibra cruda (%)</b>         | 22 – 24                   | 50 – 60                   |
| <b>Hidratos de carbono (%)</b> | 18 – 26                   | 14 – 16                   |
| <b>Cenizas (%)</b>             | 3 – 4                     | 5 – 7                     |

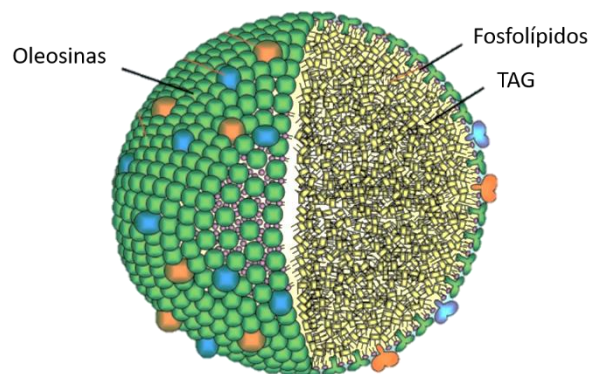
Fuente: Le Clef y Kemper (2015); Salgado, (2009); González-Pérez y Vereijken (2007)

Una buena comprensión de la materia prima, la estructura física, la composición química y la organización de los componentes a nivel macroscópico y molecular es importante para diseñar procesos eficientes de extracción.

### 1.2.2. ACEITE: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES

En las células de los cotiledones se hallan estructuras de reserva que almacenan la mayor parte de los lípidos y proteínas del grano, llamadas cuerpos lipídicos (CL) y cuerpos proteicos.

El *aceite* se almacena en forma de glóbulos rodeados por una capa no membranosa dentro de las células. Esos sistemas se llaman oleosomas, los cuales se forman cuando la estructura proteica particular, constituida por oleosinas, se une a la superficie de los glóbulos para formar una capa limitante. Los oleosomas están así constituidos por un núcleo de triglicéridos (TAG) rodeado por una monocapa de fosfolípidos en la que están conectadas las oleosinas (Figura 1.7). El objetivo de esta capa límite es prevenir la coalescencia de los oleosomas (Muniglia *et.al.*, 2014).



**Figura 1.7:** Estructura general del oleosoma.  
Fuente: Tzen, 2012

El aceite está compuesto principalmente por triglicéridos que están formados por tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol por uniones éster, y por otros compuestos minoritarios como fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, ceras y ácidos grasos libres, que pueden estar presentes en diferentes cantidades conformes las características y la calidad de la materia prima de origen (Velasco y Ruiz-Méndez, 2015).

En la Tabla 1.2 se presenta intervalos posibles de componentes menores presentes en un aceite crudo de girasol.

**Tabla 1.2:** Composición promedio del aceite de girasol crudo

| Componentes                       | g/kg          |
|-----------------------------------|---------------|
| <b>Fosfolípidos</b>               | 6 – 12        |
| <b>Ácidos grasos libres (AGL)</b> | 3,7 – 4,5     |
| <b>Fitoesteroles</b>              | 2,4 – 4,6     |
| <b>Tocoferoles</b>                | 0,403 – 0,935 |
| <b>Ceras</b>                      | 0,2 – 3,5     |
| <b>Carotenoides</b>               | 0,006 – 0,015 |

Fuente: Velasco y Ruiz-Méndez. (2015)

La alta proporción de ácidos grasos insaturados, como oleico y linoleico, le confieren una excelente calidad nutricional al aceite. Además completan el perfil de ácidos grasos el ácido palmítico (4-9 %), el ácido esteárico (1-7 %) y trazas de otros ácidos grasos, como mirístico, miristoléico, palmitoléico, araquídico y behénico. Dependiendo del contenido de ácidos oleico y linoleico se los suele clasificar al aceite en (Gupta, 2002, Melgarejo, 2003; Salas *et.al.*, 2015):

- tradicional o poliinsaturado, conteniendo 65-70 % de ácido linoleico,
- monoinsaturado o alto oleico, con más del 80 % de ácido oleico y sólo 5-9 % de ácido linoleico, y
- *mid*-oleico, como su nombre lo indica el contenido ácido oleico es intermedio entre los anteriores, 55–75 % ácido oleico y 15–35 % de ácido linoleico.

Otro de los componentes del aceite de girasol son los tocoferoles, los cuales son antioxidantes naturales. El tocoferol mayoritario es el  $\alpha$ -tocoferol que hace que el aceite sea resistente a la fotooxidación. El  $\gamma$ -tocoferol, proporciona estabilidad oxidativa frente a la autooxidación, está presente en el aceite solo a niveles bajos (Velasco y Ruiz-Méndez, 2015).

Los esteroides y ésteres de esteroles también son antioxidantes naturales, pero los estudios sobre estos compuestos han avanzado más en el área de la nutrición humana que en el de su propiedad antioxidante en el aceite.

Los fosfolípidos (también conocidos como fosfátidos) están presentes de forma natural en todas las semillas oleaginosas. Al igual que los tocoferoles y los ésteres de esterol, estos compuestos son solubles en aceite y se encuentran en él, luego de la extracción. El aceite de girasol tradicional contiene cuatro tipos de fosfátidos principales: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA). El contenido de fosfolípidos en un aceite completamente refinado debe ser bajo. El contenido de fosfolípidos en el aceite de girasol crudo varía entre 0,5% y 1%, donde alrededor de un 50 % del total son eliminados durante el proceso de extracción. El perfil de fosfolípidos de un aceite tradicional es aproximadamente: 2,2 % PA, 21,2 % PE, 27,9 % PI, y 48,7 % PC (Gordon Dorrell y Vick, 1997; Veldstra y Klere, 1993). La concentración de los fosfolípidos en el aceite depende del método de extracción que se utilice y del tipo procesamiento en el refinado (desgomado). Los aceites obtenidos mediante extracción con solvente presentan un contenido mayor de fosfolípidos que aquellos aceites obtenidos mediante prensado de las semillas, siendo generalmente más concentrados en PC y PE (Carelli *et al.*, 2002a).

Las ceras pueden estar presentes en el aceite de girasol, debido a que las mismas se encuentran en el pericarpio de las semillas y durante la extracción de aceite, las semillas solo presentan un descascarado parcial. Las ceras dan una apariencia turbia al aceite cuando está refrigerado y esto es indeseable para el aceite comestible (Carelli *et al.*, 2002b).

El aceite de girasol también presenta una proporción de *pigmentos* como carotenoides y clorofila. Los carotenoides imparten un tinte rojizo. La clorofila puede estar presente solo si las semillas fueron cosechadas antes de que estén completamente maduras o cuando se cosechan húmedas. Esta puede impartir una tonalidad verdosa al aceite. Los niveles de pigmentos se reducen durante las etapas de refinado (Gupta, 2002).



### 1.2.3. PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS

Las *proteínas* constituyen otro de los componentes principales de las semillas de girasol, que resultan atractivas por su amplia disponibilidad y representan entre el 20 % y el 40 %, de los componentes totales. En comparación con otras fuentes de proteínas vegetales, las semillas de girasol tienen escasos factores antinutricionales, como por ejemplo, inhibidores de proteasas, cianógenos, factores bociógenos, etc. (González-Pérez *et.al.*, 2007).

Alrededor del 87-99 % del nitrógeno en las semillas de girasol consiste en el nitrógeno de las proteínas intactas y entre el 1-13 % restante se origina a partir de péptidos, aminoácidos u otras sustancias nitrogenadas (Gassmann, 1983; Schwenke *et al.*, 1981).

Las proteínas del girasol consisten en gran parte en albúminas y globulinas (70-85 %). Estas constituyen proteínas de reserva y pueden clasificarse en base a su solubilidad, según lo propuso Osborne (1924). Las albúminas son solubles en agua, las globulinas insolubles en agua, pero solubles en soluciones salinas diluidas, las prolaminas solubles en alcoholes y las glutelinas solubles en soluciones alcalinas. Siguiendo esta clasificación, las proteínas mayoritarias en las semillas de girasol son globulinas y albúminas, representando el 40-90 % y 10-30 % del total de las proteínas, respectivamente (Gheyasuddin *et al.*, 1970; Prasad, 1990; Raymond *et al.*, 1995; Schwenke *et al.*, 1981). Algunos autores también han descrito la presencia de pequeñas cantidades de glutelinas y prolaminas (González-Pérez y Vereijken, 2007; Sripad y Rao, 1987). Las semillas de girasol también contienen otras proteínas que son las oleosinas; éstas, como se mencionó anteriormente, se localizan en la superficie externa de los cuerpos oleosos y previenen la coalescencia, gran parte de los cuerpos oleosos están cubiertas por ellas (Frandsen *et al.*, 2001). Las oleosinas representan entre el 2 y el 8 % de las proteínas de las semillas de girasol. Debido a su alta hidrofobicidad las oleosinas no se encuentran en la harina obtenida luego de la extracción de aceite (González-Pérez, 2015).

Hoy en día, la principal salida de mercado para la proteína de girasol se basa en la alimentación animal porque el crecimiento del girasol como fuente de proteína para el consumo humano ha sido limitado por los compuestos fenólicos presentes en las semillas. Los compuestos fenólicos son el grupo más grande de constituyentes de plantas capaces de interactuar con proteínas, afectando el sabor y el color en muchos productos alimenticios (Maga y Katz, 1978). Los primeros estudios atribuyeron el color oscuro de los concentrados de proteína que prepararon de las semillas de girasol a un compuesto llamado ácido heliantotánico en ese momento. Algunos años más tarde, este compuesto fue identificado como ácido clorogénico (CGA) y se determinó su estructura como un éster de ácido quínico (QA) y ácido cafeico (CA) (Velazco *et al.* 2015). El CGA puede entrecruzarse con las proteínas durante la extracción, lo que da como resultado la decoloración de la proteína final y la alteración de su funcionalidad y biodisponibilidad.

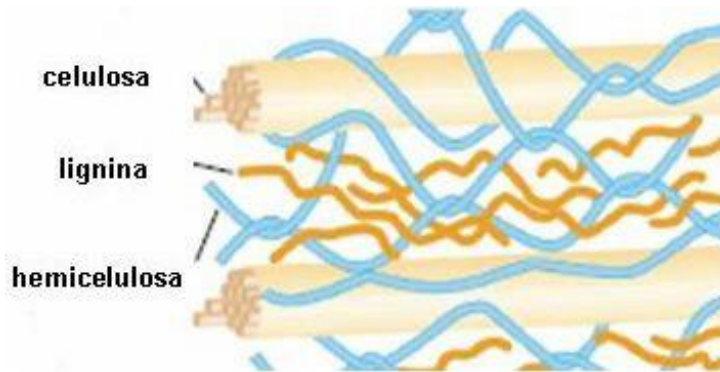
El contenido total de *carbohidratos* de los granos oscila en un rango entre 4 y 18 %. Una característica particular de los carbohidratos de semilla de girasol es el bajo contenido de almidón (0,42 %) en comparación con las semillas monocotiledóneas (Bau *et al.*, 1983). El análisis de la composición de azúcares en los granos revela que el girasol contiene una elevada cantidad de glucosa (46 %), seguido de arabinosa (16 %), ácidos urónicos (14 %) y galactosa (11 %) (González-Pérez *et al.*, 2002). Por otro lado la harina de girasol descascarada y desgrasada, contiene aproximadamente un 8 % de carbohidratos.

Las *fibras* representan alrededor de un 20 % de los componentes presentes en el grano de girasol. Las fibras estructurales están compuestas por polisacáridos como celulosa, hemicelulosa, lignina y sustancias pécticas. Estos componentes son más abundante en la cobertura de los granos y están constituyendo las paredes celulares primarias y secundarias de las células (Pérez *et al.*, 2007). Se sintetizan e hidrolizan naturalmente mediante enzimas específicas. La pared celular primaria está compuesta por cuatro tipos de polímeros dispuestos entre ellos. La celulosa, es un glucano lineal compuesto por monómeros de glucosa, este polímero es insoluble en agua. Las

cadena de celulosa se ensamblan en paralelo para formar miofibrillas. Las miofibrillas se enredan en una matriz amorfa compuesta esencialmente de hemicelulosa y compuestos pécticos. La hemicelulosa es una mezcla compleja de carbohidratos heterogéneos. Contiene hexosas (glucosa, manosa y galactosa), pentosas (arabinosa y xilosa), derivados metilados (ramnosa y fucosa) y ácidos (urónico y acético). Las hemicelulosas y las celulosas están unidas mediante puentes de hidrógeno. Las pectinas, son un conjunto de polisacáridos ricos en ácido galacturónico. Esas unidades se encuentran a veces con ramnosa (ramnogalacturonano). Las Glucoproteínas son polipéptidos que contienen uno o varios oligosacáridos de diversa complejidad unidos covalentemente a una proteína. El glúcido puede representar entre el 1 y el 70 % o más de la masa de la glucoproteína. Las paredes secundarias están compuesta un 45 % (m/m b.s.) de celulosa, hemicelulosa y pequeñas cantidades de compuestos pécticos. La mayoría de las paredes secundarias están compuestas en un 35 % de lignina (m/m b.s.). La lignina es un polímero fenilpropanoide complejo derivado principalmente de tres alcoholes denominados monolignoles. Es un componente crucial de la estructura de la pared celular, ya que preserva su integridad, imparte rigidez y resistencia a las plantas vasculares, permite el transporte de agua y solutos a través de los elementos traqueales en el sistema vascular y proporciona barreras físicas contra la invasión de fitopatógenos y otros contaminantes ambientales (Le Clef y Kemper, 2015; Muniglia *et.al.*, 2014).

La Figura 1.8 muestra un diagrama general de los componentes de la pared celular vegetal (Balam *et al.* 2006).

Las semillas de girasol también contienen una cantidad sustancial de *minerales*. Sin embargo, a menudo forman complejos con el ácido fítico, por lo tanto, los minerales en las semillas de girasol no están biológicamente disponibles (Salunkhe *et al.*, 1992).



**Figura 1.8:** Diagrama general de los componentes de la pared celular vegetal.

### 1.3. PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE

#### 1.3.1. PROCESO CONVENCIONAL

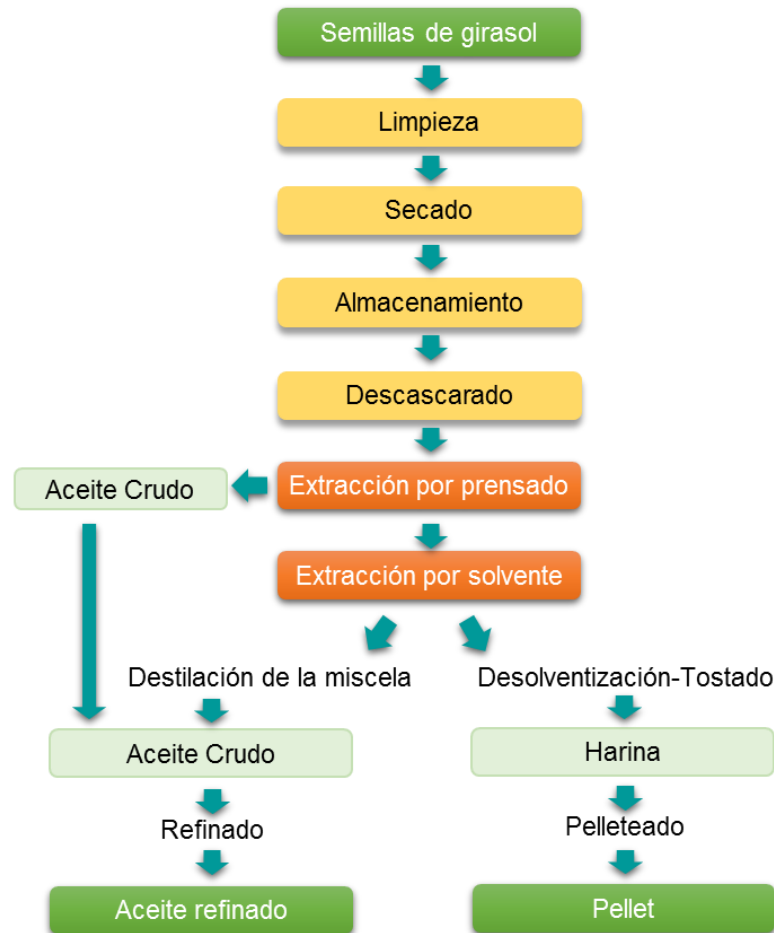
El proceso de obtención de aceite de las semillas de girasol se realiza industrialmente por prensado mecánico y posterior extracción con solventes orgánicos. Del prensado mecánico se obtiene una torta o expeller, que posee un 18-25 % de aceite. Dicho aceite será extraído con solventes orgánicos, mayoritariamente *n*-hexano (Danso-Boateng, 2011, Gupta, 2002; Lloyd y van Wyk, 2012). En un proceso convencional, se espera que la torta de salida, contenga menos del 1 % de aceite luego de la extracción con solvente.

Las etapas en el proceso convencional de extracción de aceite de girasol y la obtención de la harina proteica se detallan a continuación (Figura 1.9):

- *Limpieza*: elimina el material extraño que pueden generar obstrucciones o incendios a través de zarandas tamizadoras, separadores magnéticos y sistemas de aspiración. Los equipos para la eliminación de impurezas deben tener características no agresivas en la semilla para evitar que sufran algún tipo de deterioro para su posterior almacenamiento.

- *Secado*: el principal objetivo es reducir la humedad del grano para niveles seguros de almacenamiento, comercialización y/o la posterior extracción de aceite. El secado se puede realizar con aire natural o con aire caliente. Sin embargo la

temperatura que el grano adquiere en los procesos de secado, determinará si el mismo mantiene la calidad inicial (Rodríguez y Bartosik, 2005).



**Figura 1.9:** Diagrama de flujo de un proceso de extracción de aceite convencional.

- *Descascarado*: esta operación consiste en la remoción mecánica del pericarpio de las semillas a través de fuerza centrífuga y la separación posterior de la misma y de distintos materiales se realiza a través de zarandas y con aire a contracorriente. El alto contenido de ceras de la cáscara que podría transferirse al aceite durante la extracción es una de las principales razones para descascarar la semilla antes de la extracción. El contenido de ceras del aceite extraído de una semilla sin descascarar es aproximadamente cinco veces mayor que para los aceites extraídos de semillas descascaradas. Sin embargo una fracción de la cascara debe quedar, para facilitar la percolación del solvente durante la extracción (Grompone, 2011). En la industria

aceitera se trabaja con un 10-12 % aproximadamente de cáscara residual (de Figueiredo *et al.*, 2013). El contenido de humedad de la semilla es un parámetro relevante en el proceso de descascarado, ya que si bien un bajo contenido de humedad facilita la eliminación de la cáscara, por otro lado aumenta la cantidad y la composición de los finos.

- *Extracción por prensado*: se realiza a través de prensas hidráulicas o prensas de tornillo sin fin. Permite extraer la mayor cantidad de aceite proveniente de la semilla de girasol, aproximadamente un 65 % del total de aceite de la semilla. Luego del prensado se obtiene por un lado el aceite, que se denomina aceite crudo de prensa y se une a una corriente posterior del aceite extraído por solvente, dicho aceite ya se encuentra en condiciones para ser refinado; y por otro lado la torta o expeller, que representa el sólido extraído que aún contiene entre un 18-25 % del aceite total de la semilla original. La torta de prensa constituye el material que será utilizado para la posterior extracción por solvente.

- *Extrusión*: los extrusores se utilizan para formar cilindros porosos, que se conocen comúnmente como “collets”. Las semillas con alto contenido de aceite, como el girasol, el cártamo, el maní, la canola y la colza tienen demasiado aceite para producir escamas o collets. Por lo tanto, están pre-prensados para reducir el contenido de aceite de harina antes de la extracción con solvente. Los extrusores consisten en tornillos sin fin donde se puede inyectar agua o vapor en el flujo de productos. Esta transformación del producto mejora la eficiencia de extracción con solvente y el drenaje de la miscela (aceite + solvente) en el extractor. Este tipo de operación se realiza después del prensado, en granos con un alto contenido de aceite, ya que la extrusión solo puede realizarse si la torta posee entre un 18 y 25 % (Dunford, 2012).

- *Extracción por solvente*: se utiliza solventes no polares, como *n*-hexano, para remover el aceite restante que queda en la torta o expeller, quedando, aproximadamente, un 1-2 % del aceite total de la semilla original. Este tipo de extracción, utiliza un solvente que difunde a través de la matriz semi-permeable. Este proceso de

extracción es una combinación de varios mecanismos que incluyen lixiviación, lavado, difusión y diálisis. La lixiviación y el lavado retiran el aceite libre y de fácil acceso para el solvente. La difusión y la diálisis son procesos más lentos para extraer el aceite que no está fácilmente accesible. Luego las micelas son procesadas mediante destilación por vacío o evaporación a fin de obtener por un lado el aceite crudo y por otro, el solvente para ser reutilizado.

- *Desolventización*: tiene por finalidad retirar el solvente remanente de la harina por calentamiento y arrastre con vapor. La desolventización es la etapa del proceso de extracción que tiene mayor consumo energético, porque además de la energía utilizada para remover la torta, se necesita energía para calentar y así evaporar el solvente de la superficie de la torta. Cuando la torta sale del desolventizador, contiene menos del 0,01-0,05 % de solvente y su temperatura es cercana a los 100°C. Posteriormente se realiza un enfriamiento donde se logra obtener una harina con una temperatura menor a 38°C y con un contenido de humedad menor al 11 %.

- *Destilación*: la miscela que sale del extractor contiene aproximadamente un 25-35 % de aceite y un 65-75 % de disolvente. EL propósito del proceso de destilación es eliminar el solvente residual en el aceite. Esta operación se realiza a través de evaporadores que permiten recuperar el aceite y el solvente por dos líneas diferentes. A la salida del evaporador la miscela contiene un 92-98 % de aceite y 2-8 % de solvente residual. El solvente residual debe ser eliminado a través de la extracción por vacío con vapor sobrecalentado. El aceite en esta etapa sale con un 0,001-0,005 % de solvente y 0,1-0,3 % de humedad (dicha humedad puede ser eliminada en un secador a vacío para reducirla a 0,05-0,10 %, para el almacenamiento o el tránsito).

- *Refinado*: esta etapa produce un aceite comestible con las características deseadas por los consumidores, como sabor y olor suaves, aspecto limpio, color claro, estabilidad frente a la oxidación e idoneidad para freír. Las etapas del refinado son las que se detallan a continuación:

- *Neutralización química*: es un tratamiento acuoso con hidróxido de sodio para eliminar los ácidos grasos libres (AGL) presentes en el aceite crudo en formar jabones, que luego son separados del aceite por centrifugación.
  - *Blanqueado*: consiste en eliminar pigmentos del aceite. Para ello, se lo mezcla con un adsorbente que se separa posteriormente por filtración. Esta operación también elimina contaminantes particulados.
  - *Winterizado*: separa por enfriamiento las ceras cristalizables (entre 36 y 48 carbonos), ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos del aceite de girasol. El aceite se almacena entre 9 y 14 °C, con agitación continua, por un período de 10-12 h. Así, se logra un crecimiento lento de los cristales y controlado para conseguir un tamaño tan que puedan ser separados mediante filtración o centrifugación (Protocolo de calidad para aceites, 2015)
  - *Desodorizado*: elimina compuestos volátiles, principalmente aldehídos y cetonas, mediante un proceso de destilación con arrastre de vapor a bajas presiones (2-4 mbares) y altas temperaturas (220-240 °C). Además de mejorar la calidad del aceite, esta operación mantiene la estabilidad oxidativa por la remoción de ácidos grasos libres (AGL) remanentes (Velasco y Ruiz-Méndez, 2015).
- *Pelleteado*: puede realizarse de dos maneras, por un lado comenzar a producir el pellet a partir de una harina molida y por otro, el enfoque más reciente que es realizar el pelleteado a partir de la harina directamente salida de la desolventización (sin secar ni enfriar). Las condiciones requeridas para el molino de pellets son una temperatura de alrededor de 85 °C y una humedad de alrededor del 15 %, con gránulos flexibles. Para obtener estas condiciones, la harina debe procesarse a través de un acondicionador de paletas horizontal con vapor directo e indirecto. El granulador es un dispositivo que presiona la harina a través de orificios en una placa de matriz cilíndrica utilizando rodillos giratorios en su interior para formar gránulos densos. Después del granulador los pellets contienen aproximadamente 14 % de humedad y están a 85 °C y son algo frágil, por lo que deben transportarse a un enfriador. La mayoría de los molinos de pellets están



ubicados directamente sobre un enfriador de pellets vertical. El enfriador de pellets vertical utiliza aire ambiente forzado para enfriar simultáneamente los pellets, eliminar la humedad a través de efecto de enfriamiento por evaporación y dar a los pellets el tiempo necesario para volverse más firmes y menos friables (Le Clef y Kemper, 2015).

### 1.3.2.USOS

Como la mayoría de las oleaginosas, el girasol tiene una potencial utilidad para muchas industrias, dado que se pueden obtener diferentes productos a partir del aceite crudo, torta, cáscara o aceite refinado, incluyendo plásticos, lecitinas o agentes emulsionantes. La mejora genética y la aparición de nuevos procesos industriales hacen posible la implementación de estos usos potenciales (Salas *et. al.*, 2015). El producto más importante de la trituración de las semillas de girasol es el aceite. A partir de una tonelada de girasol se extrae un 41 % de aceite, 42 % de subproductos y 7 % de desperdicio. Por otra parte, el aceite de girasol es considerado de excelente calidad comestible por su elevado tenor de ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico). El aceite de girasol, ha sido por años del tipo “linoleico”, sin embargo las razones vinculadas al cuidado de la salud y la demanda de características especiales para usos industriales, impulsaron el desarrollo de los girasoles medio y alto oleico. Estos aceites se obtuvieron a través de mutación genética. El hecho de tener un mayor porcentaje de ácido oleico los hace menos susceptibles a cambios oxidativos durante la refinación, el almacenaje y las frituras, confiriéndole mayor estabilidad. En la actualidad, la industria alimentaria mundial prioriza el cuidado de la salud y está utilizando cada vez más aceites vegetales con alto contenido de ácidos grasos insaturados, favoreciendo las perspectivas de uso para el aceite de girasol alto oleico. Estos productos que están creciendo a nivel mundial son una oportunidad que se le abre a nuestro país para satisfacer una demanda creciente de un aceite diferenciado (Secretaría de Agroindustria, 2018)

El principal subproducto de la extracción de aceite es una harina proteica la cual se pelletiza para facilitar su transporte. El pellet de girasol es empleado principalmente para alimentación animal (Salgado, 2009). El elevado contenido de proteínas hace de la harina una fuente atractiva para el aislamiento de las mismas. La idoneidad para las aplicaciones alimentarias de las proteínas de harina de girasol depende principalmente del método de extracción de aceite. Debido a este proceso, las proteínas pueden estar desnaturalizadas en gran medida, lo que resulta en una harina con alto contenido de proteínas insolubles (González-Pérez y Vereijken, 2007). La desnaturalización de las proteínas puede ocurrir durante el acondicionamiento de las semillas, la extrusión (hasta 140 °C) y la desolventización / tostado. Por lo tanto, la salida principal de las proteínas de girasol es la alimentación animal. Otra aplicación menor de la proteína de girasol es por ejemplo, la fortificación de algunos alimentos, como suplementos para carne y leche, fórmulas infantiles, productos de panadería y pasta, etc. Las proteínas de girasol se han evaluado ampliamente como ingredientes alimentarios (Lusas, 1982, 1985; Sosulski, 1979). En comparación con las proteínas de leguminosas y otras semillas oleaginosas, se ha informado que las proteínas de girasol no contienen componentes antinutricionales, como los inhibidores de la proteasa, y su composición de aminoácidos cumple con el patrón de la FAO, excepto por la lisina (González-Pérez, 2003).

### 1.3.3. PROCESO DE EXTRACCION DE ACEITE CON SOLVENTES ALTERNATIVOS

La extracción por solvente es considerado un proceso de transferencia de masa entre una fase sólida (matriz sólida insoluble), una fase líquida ocluida dentro de los poros de las partículas y una miscela que se mueve a través del espacio entre dichas partículas (Cacace y Mazza, 2003). El éxito de un proceso de extracción de aceite industrial depende de qué tan rápido el componente es extraído por el solvente y en el equilibrio logrado en dicha fase.

El principal solvente utilizado a nivel industrial para la extracción de aceites vegetales, como se ha mencionado en secciones anteriores, es el *n*-hexano; la industria

utiliza generalmente una mezcla de isómeros (Bessa *et al.*, 2017). El *n*-hexano presenta varias ventajas, en particular su alta capacidad de solubilizar los componentes oleosos y su bajo punto de ebullición, lo que facilita la recuperación de solutos y el reciclaje de solventes (Le Clef y Kemper, 2015). La industria del aceite utiliza grandes volúmenes de solventes orgánicos, sin embargo dichos solventes, además de ser obtenido de una fuente no renovable, pueden contribuir a la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOC). La producción de VOC en el proceso convencional resulta preocupante ya que pueden reaccionar en la atmósfera con otros contaminantes para producir ozono y otros oxidantes fotoquímicos peligrosos tanto para la salud humana, como para los cultivos. Aunque el proceso convencional se caracteriza por la alta eficiencia de extracción y el bajo costo, la extracción por solvente involucra altas temperaturas durante la extracción y posterior destilación de la miscela que pueden tener efectos indeseables en la calidad del aceite, por ejemplo el deterioro oxidativo de ácidos grasos poliinsaturados y el desarrollo de rancidez. Además, las etapas posteriores de refinado de estos aceites, como desgomado, neutralización y blanqueo, dan lugar a pérdidas de componentes valiosos y a un posterior deterioro de la calidad de los aceites (Dominguez *et al.*, 1995b; Latif y Anwar, 2009; Rosenthal *et al.*, 1996). Por otra parte, la fracción proteica no es apta para consumo humano, por la presencia de solvente residual en la harina y el sabor amargo que presenta a causa de los compuestos fenólicos.

En los últimos años, se han realizado avances importantes en el desarrollo, la optimización y la aplicación de tecnologías limpias de extracción en la industria alimentaria, para reducir el impacto ambiental mediante la minimización de residuos, disminución del consumo energético y del tiempo de procesamiento, además de evitar riesgos para la salud mediante la sustitución de solventes tóxicos e inseguros. La combinación de técnicas avanzadas con solventes “Green” proporciona tiempos de extracción más cortos, menos uso de solvente y disminuye el consumo de energía, haciendo que un proceso de extracción general sea más ecológico (Dunford, 2012; Le Clef y Kemper, 2015; Lloyd y van Wyk, 2012).

Recientemente, la guía de selección de solvente CHEM21 (Prat *et al.*, 2016), basada en guías ya existentes, clasifica los solventes más comunes, en cuatro categorías: recomendados o preferidos, problemáticos, peligrosos y altamente peligrosos. El ranking fue desarrollado para promover el uso de los solventes recomendados, como etanol y agua. A pesar de que el *n*-hexano es un solvente permitido para la industria alimentaria por la FDA (Food and Drug Administration - Administración de Alimentos y medicamentos), éste está clasificado como solvente peligroso. Por lo tanto, mediante la búsqueda de un reemplazo para el *n*-hexano durante el proceso de extracción, el uso de solventes ecológicos se está convirtiendo en una prioridad para la industria alimentaria (Prat *et al.*, 2016).

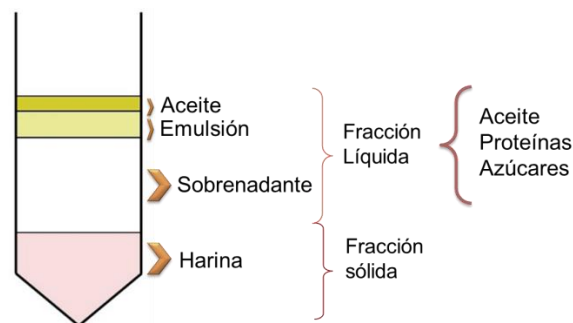
Los solventes de extracción alternativo, como algunos alcoholes, agua e incluso acetato de etilo, son fluidos de procesamiento más ecológicos para la separación de aceites de semillas oleaginosas y deberían probarse primero en nuevos métodos desarrollados para establecer posibles incompatibilidades en las condiciones de proceso (Toda *et al.*, 2016; Mat Yusoff *et al.*, 2015).

#### 1.3.4. EXTRACCIÓN ACUOSA

El proceso de extracción acuoso de aceite (AEP) es una alternativa y un método más ecológico de procesamiento para extraer el aceite de las semillas oleaginosas. Este proceso utiliza agua como medio de extracción. El agua fue sugerida originalmente en los años '50 como solvente alternativo en el proceso de extracción de aceite por su disponibilidad y seguridad. Además, se planteó la posibilidad de la recuperación simultánea de aceite y proteínas (concentrados proteicos o aislados proteicos), de elevada calidad y la eliminación de la etapa de recuperación del solvente (Rosenthal *et al.*, 1996).

La AEP utiliza un principio diferente a la extracción convencional, ya que está basado en la insolubilidad del aceite en el agua. En este caso, los componentes de la matriz solubles en agua se difunden en el medio, dejando paso al aceite que estaba

previamente ligado a la estructura original (Rosenthal *et al.*, 1996). La extracción se realiza en un sistema *batch*, con agitación constante, donde el aceite extraído se recoge por centrifugación y posteriormente es calentado para eliminar la humedad del mismo. Las operaciones unitarias que involucra la AEP son: molienda, separación sólido-líquido, centrifugación, demulsificación y secado. Estas operaciones pueden variar según el material oleaginoso. Durante la centrifugación se divide el extracto en una fase superior oleosa, una fase acuosa intermedia (sobrenadante) y una fase sólida en la parte inferior. Una parte del aceite se recupera en la fase superior y otra parte se recupera luego de romper la emulsión O/W (aceite/agua) en la fase acuosa donde se encuentra emulsionado con el agua (Campbell, 2010). Después de la separación de las fases, la mayor parte de las proteínas se pueden recuperar como concentrado en la fase sólida o como aislado en la fase acuosa, dependiendo del pH del medio de extracción. La Figura 1.10 muestra un esquema de la separación de las diferentes fases luego de la centrifugación.



**Figura 1.10:** Fases formadas luego de la etapa de centrifugación para la recuperación del aceite.

Este método ofrece algunas ventajas frente a los solventes orgánicos convencionales, una de ellas es la extracción simultánea de aceites y componentes solubles en agua (generalmente proteínas y carbohidratos). Además, el uso de agua como solvente de extracción posee otras ventajas, es más seguro y amigable con el medioambiente, lo cual conduce a operaciones más flexibles y seguras. Por otro lado el agua es económica, requiere condiciones operacionales leves y el aceite no necesita

ser sometido a un refinado posterior. Estos factores contribuyen a un menor consumo energético, menores costos de operación, menor inversión de capital y consecuentemente un menor costo de operación y de procesamiento. La extracción acuosa puede ser aplicada a una amplia variedad de materiales y el uso de condiciones operacionales más leves resulta en subproductos más valiosos, como harinas no tóxicas y agrega valor a las fibras y proteínas (Danso-Boateng, 2011; Rosenthal *et al.*, 1996).

Los rendimientos de la extracción son de alrededor del 40-50 % respecto del total de aceite presente en la matriz, si bien la eficiencia es baja, comparada con la extracción convencional, puede considerarse satisfactorio para los procesos no comerciales tradicionales. Sin embargo hay ciertas limitaciones en el proceso, ya que incluyen la necesidad de romper la emulsión que podría formarse, para separar las fases de aceite y agua y los costos de tratamiento de efluentes. Por otro lado la harina obtenida de la extracción rica en proteína, necesita un secado posterior ya que sale del proceso con un elevado contenido de humedad (Dunford, 2012).

Hace algunos años, este tipo de metodología ha sido aplicada en diferentes fuentes de aceite, como por ejemplo en maní y coco (Cater *et al.*, 1974), soja (Campbell, 2010; Campbell y Glatz, 2009; Kapchie *et al.*, 2008; Rosenthal *et al.*, 1998), semillas de colza (Embong y Jelen, 1977), semillas de girasol (Evon *et al.*, 2009; Hagenmaier, 1974), germen de trigo (Nikiforidis y Kiosseoglou, 2009) y harina de mostaza (Tabatabaei y Diosady, 2013), entre otros.

#### 1.3.5. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ENZIMAS

La extracción de aceite por solvente presenta como requisito previo la ruptura de la semilla para hacer la pared celular más porosa; se dice que la completa ruptura de la célula es necesaria para una rápida extracción por solvente. En un proceso convencional, como se mencionó anteriormente, la ruptura de la pared celular de las semillas se obtiene mediante operaciones unitarias como, laminado, cocción y trituración, dependiendo del tipo de matriz utilizada (Jung *et al.*, 2014).

En un proceso de extracción asistido por enzimas, son estas las que pueden provocar la ruptura de la pared celular incluso a nivel molecular. Debido a la efectividad de las enzimas para romper la pared celular, pueden actuar de forma sinérgica con otros solventes (denominados “Green”) o medios físicos en la extracción de aceites (Johnson, 1997).

Una definición de extracción puede abarcar el prensado y/o la extracción por solvente; a partir de ello se pueden considerar tres enfoques en el uso de enzimas. Estos pueden categorizarse en extracción por solvente asistido con enzimas, prensado asistido por enzimas y extracción acuosa asistida por enzimas. En todos estos procesos, el objetivo es el uso de enzimas para romper la estructura celular y aumentar el rendimiento de la extracción (Mat Yusoff *et al.*, 2016; Johnson, 1997).

Tanto en extracción por solvente como en el prensado asistido por enzimas, la reacción enzimática constituye un pre-tratamiento en el proceso. El pre-tratamiento enzimático requiere de condiciones de pH, temperatura y contenido de humedad adecuados, y la duración de la hidrólisis es determinada experimentalmente, según la matriz y la enzima utilizadas. Luego de la hidrólisis, el material es secado a la humedad deseada para realizar la extracción por solvente o el prensado convencional. La principal ventaja de estos dos procesos es el incremento de la recuperación de aceite. En el caso del uso de enzimas en la extracción con solventes, otra ventaja importante resulta la posible reducción de la cantidad de solvente utilizada durante la extracción. Mientras que en la extracción por prensado podría incluirse el uso de una temperatura inferior a la del proceso convencional proporcionando un aceite de mejor calidad. Por otro lado, etapas posteriores del refinado como el desgomado son mejorados. Dentro de las desventajas de ambos procesos, pueden incluirse los largos periodos de incubación y el costo de energía extra utilizada para los tratamientos de secado adicionales (Carr, 1997). El costo de la enzima, también podría ser considerado como una desventaja.

El pre-tratamiento enzimático antes del prensado mecánico para mejorar la extractabilidad del aceite se ha estudiado para el aceite de oliva de grado virgen, colza,

girasol y algodón utilizando mezclas de enzimas que contienen pectinasas, celulasas y hemicelulasas (Domínguez *et al.*, 1994). El pre-tratamiento enzimático seguido de la extracción con solvente ha sido informado para soja y girasol. Sin embargo estos estudios no investigan la posibilidad de lograr una alta recuperación de aceite en un tiempo más corto de extracción (Danso-Boateng, 2011).

La extracción acuosa asistida por enzimas constituye una extracción con un tratamiento enzimático en simultáneo, ya que la enzima es incorporada al medio de extracción. El uso de enzimas en una extracción acuosa, podría incrementar el rendimiento de aceite en la extracción. Este tipo de extracción, al igual que las otras dos mencionadas anteriormente, requiere de condiciones adecuadas de pH, temperatura, relación sólido: líquido y un tiempo de extracción. Luego de cumplido el tiempo de extracción, se realiza una centrifugación para separar el sólido del líquido y la fracción líquida se centrifuga nuevamente para separar el aceite.

En el procesamiento de extracción acuosa (AEP) o acuosa asistida por enzimas, una parte del aceite se libera como aceite libre y otra parte se encuentra emulsionada. El aceite emulsionado a menudo resulta difícil de separar debido a la estabilidad impartida por los componentes celulares interfacialmente activos que también se extraen durante el mismo proceso. Por lo tanto, es necesario considerar cuidadosamente las técnicas empleadas para separar el aceite, ya que el rendimiento final de la extracción y la calidad del aceite dependerán de manera crítica de la demulsificación.

Dentro de las ventajas de la extracción acuosa asistida por enzimas, se destaca que las harinas de extracción contienen menor cantidad de compuestos indeseables que son los que limitan el uso de la misma en formulaciones alimenticias. Por otro lado, la calidad del aceite también mejora en términos del contenido de fósforo, por lo cual el aceite puede ser refinado físicamente sin necesidad de realizar un desgomado. A su vez, el medio acuoso es mucho más seguro, económico y amigable con el medioambiente, permitiendo operaciones flexibles, menor consumo energético y menor inversión de capital.



Las posibles desventajas de este proceso de extracción son los bajos rendimientos y la separación del aceite emulsionado. Por otro lado, podrían considerarse como desventaja, los costos incluidos para el tratamiento de los efluentes liberados durante la extracción (agua con componentes solubles extraídos del material de extracción). Si bien, esto último constituye una desventaja, una forma de amortiguar dicho costo es incluyendo otras corrientes para la recuperación de los componentes solubles de los efluentes (Galanakis, 2012).

El potencial de las tecnologías de extracción asistida por enzimas parece evidente debido a las preocupaciones actuales sobre el medio ambiente y la salud, referidos al uso de disolventes orgánicos. Sin embargo, la adopción comercial de estas tecnologías solo se realizaría si se pueden obtener ventajas demostrables (en costo) sobre los procesos de extracción convencionales. Si bien el uso de enzimas aún está en estudio y se han obtenido avances considerables en la última década, los inconvenientes de la tecnología se deben a problemas que podrían superarse mediante esfuerzos de investigación concertados (Johnson, 1997).

#### *1.3.5.1. Tipos de enzimas aplicadas a la extracción*

El uso de enzimas imparte su propio beneficio de “amigable con el medio ambiente” o “*green*”. Diversos estudios sugieren que las enzimas pueden usarse para mejorar la producción de aceite en los procesos de extracción de semillas oleaginosas donde se utilicen solvente no convencionales y pueden, también, ser inmovilizadas para su recuperación y reutilización, lo que puede reducir el costo de procesamiento.

Las enzimas son moléculas biológicas que tienen la capacidad de catalizar reacciones químicas. A excepción de las ribozimas (ARN), todas las enzimas son de naturaleza proteica. Cada enzima posee sus características biológicas para catalizar dichas reacciones y se diferencian de los catalizadores químicos en tres puntos:

- Condiciones de reacción más suave (pH, temperatura, presión, etc.)
- Mayor especificidad de las reacciones

- Regulación de la reacción catalítica a través de parámetros externos como concentración de productos y sustratos, pH, temperatura, entre otros.

Para llegar a los compuestos de interés almacenados en las células vegetales, diversas barreras deben cruzarse, entre ellas: paredes celulares, extracelulares y oleosomas. Como se mencionó en la sección 1.2.3, cada una de esas paredes celulares está compuesta de determinados componentes organizados en una estructura compleja. Comúnmente, hay cuatro familias de enzimas que se utilizan para hidrolizar parte de los constituyentes de las paredes celulares vegetales: celulasas, hemicelulasas, pectinasas y proteasas.

Las *celulasas* hidrolizan la celulosa para liberar moléculas de celobiosa y glucosa cuando la hidrólisis está completa. Los mecanismos de acción de las celulasas no están completamente identificados. Zhang *et al.* (2010) consideraron que los mecanismos químicos más aceptados sobre la hidrólisis enzimática es el resultado de la acción sinérgica de tres tipos de enzimas: las endoglucanasas, exoglucanasas y glucosidasas. La acción de un conjunto de enzimas comienza con una hidrólisis primaria o de fase sólida, que se produce por las endo y exoglucanasas, que depolimerizan el sustrato y lo vuelven soluble. El factor limitante de esta hidrólisis es la concentración de estas enzimas. La hidrólisis secundaria o de fase líquida, implica esencialmente la hidrólisis de la celobiosa en glucosa por las glucosidasas, aunque estas también tienen la capacidad de hidrolizar otras moléculas solubles.

Las *hemicelulasas* hidrolizan la hemicelulosa produciendo azúcares simples u oligosacáridos. Esta estructura, es más compleja que la de celulosa por lo tanto requiere mayor actividad enzimática, debido a la gran variedad de hemicelulosas. Las enzimas en general son específicas para un tipo de enlaces, por lo que muchas de ellas están involucradas en la degradación de este componente (exo  $\beta$  1,4-anosidasa;  $\beta$  1,4-xilosidasa; endo  $\alpha$  1,5-arabinanasa;  $\beta$  galactosidasa; endo  $\beta$  1,4-mananasa;  $\alpha$  galactosidasa;  $\beta$  glucosidasa; feruloil esterasa;  $\alpha$  L - rabinofuranosidasa;  $\alpha$  glucuronidasa; acetilxilano esterasa; endo  $\beta$  1,4-xilanasa) (Jung *et al*, 2014).

Las *pectinasas* hidrolizan los diferentes tipos de pectinas, liberando ácidos urónicos. La biodegradación de las pectinas se realiza gracias a las pectinasas y específicamente endopoligalacturonasas, que solo actúan sobre unidades ácidas (no esterificadas). Las unidades esterificadas son degradadas por las metil pectina esterasas, que permiten adaptar el sustrato para reaccionar con la enzima anterior. En el caso de las pectinas altamente metiladas, solo las pectinliasas de origen bacteriano (no detectadas en las plantas) poseen la capacidad de hidrolizarlas (Jung *et al.*, 2014).

Las *proteasas* son capaces de hidrolizar proteínas que liberan péptidos, aminoácidos, etc. Para romper los enlaces utilizan una molécula de agua, por lo que suelen denominarse también hidrolasas (Jung *et al.*, 2014).

Las primeras tres enzimas citadas (celulasas, hemicelulasas y pectinasas) se pueden usar solas o en una mezcla; sin embargo, las proteasas tienen que actuar por separado por tres razones principales: ellas son capaces de hidrolizar las proteínas enzimáticas y por lo tanto de disminuir profundamente la actividad específica de mezcla hidrolítica de enzimas. Además, si son utilizadas para la extracción de aceite, los péptidos liberados por la acción de la proteasa, estabilizarían las emulsiones resultantes (Jung *et al.*, 2014)

Las enzimas se pueden utilizar como herramientas adicionales para procesos regulares con el fin de aumentar rendimientos de extracción al debilitar las paredes celulares vegetales, solubilizando los componentes estructurales de dicha pared.

La aplicación de enzimas en el proceso extractivo se ha convertido en una propuesta tecnológica destinada a reducir al mínimo el contenido residual de aceite en las harinas (Ramadan *et al.*, 2009, Rosenthal *et al.*, 1996) y resulta una tecnología en auge tanto en la industria de alimentos como en biotecnología.

Las enzimas parecen ser más eficientes en las mezclas que por separado, ya que muchas de ellas tienen un efecto sinérgico que mejoran la extracción comparado con su comportamiento individual.

Cuando las actividades enzimáticas son numerosas, los rendimientos de extracción son mejores, los efectos de una enzima promoverán la liberación de un sustrato favorable para otra enzima, esto se ha demostrado por ejemplo en algunos sustratos utilizando xilanasas y  $\beta$ -glucanasas. Cuando el medio de reacción contiene una gran cantidad de enzimas la liberación de aceite será mayor y más rápidamente lograda. Sin embargo la mezcla óptima dependerá de cada sustrato, debido a la variación entre especies. Para obtener una mejor comprensión del proceso y el posible papel de las enzimas, es esencial investigar la estructura de las matrices de las cuales se extraerá el aceite.

Los diversos antecedentes sobre el uso de enzimas en la extracción de aceite, han reportado extracciones acuosa-enzimáticas en granos de soja, utilizando proteasas (Rosenthal *et al.*, 2001; Moura *et al.* 2008; Chabrand *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2010; Campbell y Glatz, 2009). Otros autores como Dominguez *et al.* (1994) reportaron para el mismo grano, el uso de celulasas, proteasas y complejos multienzimáticos, como pre-tratamiento para una posterior extracción por solvente. Estudios sobre la extracción acuosa enzimática en semillas de girasol empleando complejos multienzimáticos y diferentes combinaciones entre proteasas, pectinasas y celulasas fueron reportados por Dominguez *et al.* (1995a), Sineiro *et al.* (1998) y Latif y Anwar (2009). Campbell *et al.* (2016) estudiaron el uso de proteasas y celulasas en extrusados de girasol, mientras que Pérez *et al.* (2013) y Danso-Boateng (2011) utilizaron enzimas en girasol como pre-tratamiento para una posterior extracción con solvente, pectinasas y un complejo multienzimático, respectivamente. El uso de proteasas en colza fue informado por Zhang *et al.* (2007).

Los antecedentes del uso de enzimas en extracción acuosa enzimática y como pre-tratamiento, también ha sido estudiado en otras matrices no oleaginosas como, semillas de melón, nueces, coco, semillas de sandía, sésamo, olivo, orujo de arándanos, entre otras (Muniglia *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2010; Latif y Anwar, 2011; Liu *et al.*, 2011; Najafian *et al.*, 2009; Nyam *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2012).

#### *1.3.5.2. Parámetros que afectan la eficiencia de la extracción enzimática*

El conocimiento de la teoría cinética enzimática básica es importante para comprender el mecanismo de reacción enzimática y para seleccionar métodos para analizar las reacciones. Varios factores pueden afectar la velocidad a la que avanzan las reacciones y la capacidad de la enzima de romper estructuras, entre ellos pueden describirse la temperatura, el pH, la concentración de enzimas, la concentración de sustrato y la presencia de inhibidores o activadores:

➤ pH: el valor del pH de la solución en la que las enzimas trabajan, ya sea para realizar un pre-tratamiento o una extracción en sí, depende del pH óptimo de cada una. Las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos, aminos, sulfhidrilos, imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener cargas eléctricas positivas, negativas o neutras. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. Este es considerado el pH óptimo de trabajo de una enzima. A pH distinto al óptimo la forma del sitio activo de las enzimas cambia de manera tal que no puede cumplir su función. Sin embargo la mayoría de las enzimas nombradas anteriormente, tienen su actividad máxima en el intervalo del punto isoelectrico de las proteínas el cual depende de la naturaleza de la semilla oleaginosa; dado que las proteínas son altamente insolubles en un intervalo de pH cercano al punto isoelectrico, la liberación de aceite puede inhibirse. Por esta razón muchos autores consideraron la posibilidad de usar mezclas enzimáticas que demuestran una alta actividad lejos del punto isoelectrico de las proteínas y se consideran efectivas en la extracción de aceite (Yusoff *et al.*, 2016).

➤ Fuerza iónica: la mayoría de las enzimas aceptan una fuerza iónica moderada, comúnmente entre 0,05 y 0,2M; solo las enzimas termófilas y halófilas prefieren mayores concentraciones (hasta 1M). Una fuerza iónica menor a la mencionada puede desestabilizar la estructura de la proteína. Los buffers sirven para ajustar el pH deseado durante ensayos enzimáticos y consisten en la combinación de un ácido débil y una

base fuerte. Cuanto más centrado el sistema, mayor será la capacidad para estabilizar el pH. La adición de componentes en una mezcla puede influir en el pH ajustado si no cuenta con una neutralización previa. La solución tampón (buffer) sin embargo, puede neutralizar cantidades bajas de componentes sin que el pH de la solución sea modificado. Debido a que cualquier desviación en el pH óptimo reduce drásticamente la actividad enzimática, tal efecto puede malinterpretarse como inhibición enzimática (Bisswanger, 2014).

➤ Temperatura: la temperatura constituye un parámetro importante, ya que la mayoría de las enzimas permanecen activa en un intervalo de temperatura estrecho. La temperatura óptima para las enzimas utilizadas en extracción oscila entre 40 °C y 55 °C. En la práctica se prefiere utilizar temperaturas lo más bajas posibles para obtener una actividad adecuada (Passos *et al.*, 2009).

La temperatura tendrá efectos sobre la materia prima, por ejemplo en la viscosidad del medio y en la eficiencia de la enzima. La materia prima a hidrolizar está compuesta mayoritariamente de polisacáridos. El comportamiento reológico de estos polímeros depende de la temperatura mientras están en agua. La pectina por ejemplo es soluble a bajas temperaturas pero tiene la capacidad de gelificar al enfriarse luego de un paso de calentamiento. Estas modificaciones pueden resultar problemáticas durante un proceso de calentamiento (Jung *et al.*, 2014).

La actividad catalítica de la enzima es mayor con el aumento de la temperatura. Sin embargo, dado que también son proteínas, la desnaturalización térmica es posible con un calentamiento, una modificación de estructura tridimensional, incluso una pequeña, podría detener la vinculación con el sustrato y así evitar la reacción química deseada. La temperatura de desnaturalización está globalmente relacionada con el organismo productor. En general, una enzima animal tiene una temperatura de desnaturalización de 40-45 °C, mientras que esta temperatura es más de 60-65 °C para enzimas producidas por microorganismos (Jung *et al.*, 2014).

➤ Relación sólido/líquido (materia prima/solvente): La relación semilla/ solvente se discute a menudo en la literatura; siempre es diferente dependiendo de la materia prima estudiada y si ésta ha sufrido algún tipo de proceso previo.

El agua utilizada en extracción acuosa-enzimática de aceite (EAE) no solo sirve como medio de extracción sino que también ingresa al material que contiene aceite y modifica su actividad de agua. El contenido de humedad resultante del material que contiene aceite puede ayudar a la reacción hidrolítica, la difusión y la movilidad de las enzimas y los productos (Dominguez *et al.*, 1995, Sineiro *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2006). Por otro lado, un contenido de humedad muy bajo da como resultado la formación de suspensiones espesas que pueden evitar que las enzimas penetren efectivamente en el sustrato (Zhang *et al.*, 2006). Sineiro *et al.* (1998) informaron que solo ciertas "áreas" en granos de girasol con bajo contenido de humedad fueron degradadas por enzimas. Aunque los materiales con mayor actividad acuosa demuestran una mayor eficiencia de extracción, la presencia de un contenido de humedad excesivo en el material que contiene aceite puede disminuir la concentración de enzimas y sustratos, y tener un efecto adverso en la extracción (Domínguez *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007). Por lo tanto, la selección del contenido de humedad apropiado es fundamental para el éxito de EAE.

➤ Relación enzima/semilla: La relación enzima:sustrato y el tiempo de hidrólisis son muy discutidos. Para encontrar una buena relación, es necesario tener en cuenta diferentes factores:

- Las enzimas tienen un costo al igual que la energía requerida en el proceso. Para ello es necesario definir la relación entre ambos, teniendo en cuenta la cantidad de enzima y el tiempo de hidrólisis.

- Rendimiento: otro factor económico. La reacción debe ser lo suficientemente efectiva para dar buenos rendimientos y calidad de las especies de interés.

- Microbiología: una mezcla de agua y materia orgánica es un ambiente favorable para el desarrollo de microorganismos. El tiempo total de hidrólisis debe tener en cuenta este factor.

- Calidad del producto: algunos productos pueden ser sensibles a la hidrólisis, la oxidación o la temperatura. La extracción durante demasiado tiempo puede afectar la calidad del aceite o, en algunos casos, la concentración de antioxidante que se busca extraer.

- Agitación: no afecta directamente a las enzimas o la materia prima. Sin embargo, es importante considerar este parámetro por varias razones:

- Debe garantizar una buena transferencia de calor para apoyar la acción de las enzimas.

- Debe permitir una buena transferencia de masa. Las enzimas deben estar presentes en todo volumen de reacción e interactuar con el sustrato en todo momento.

- Debe limitar el efecto de corte para evitar la emulsificación si la materia prima procesada contiene aceite.

#### 1.3.6. EXTRACCIÓN ALCOHOLICA

Los alcoholes han sido, durante mucho tiempo, solventes atractivos para el reemplazo de *n*-hexano en la extracción de aceite vegetales, ya que muchos estudios han demostrado la viabilidad técnica de emplear solventes alcohólicos como sustitutos del *n*-hexano en el proceso de extracción de aceite de diferentes matrices sólidas. Pero eventualmente los rendimientos de aceite y algunos aspectos económicos, favorecieron la selección del *n*-hexano (Capellini *et al.*, 2017, 2019; Castejón *et al.*, 2018).

A luz de esta nueva tendencia que conduce a una mayor protección ambiental y al desarrollo de una química ecológica, se han llevado a cabo varios estudios, tanto en laboratorio como a escala piloto, destinada a reemplazar el hexano con otros hidrocarburos (Conkerton *et al.*, 1995; Wan *et al.*, 1995a,b) o alcoholes (Abraham *et al.*, 1988; Hron *et al.*, 1994; Rittner, 1992; Sineiro *et al.*, 1998) como disolventes para



extracción de aceite. El isopropanol y el etanol son los alcoholes más prometedores para la extracción de aceite de la semilla de algodón (Abraham *et al.*, 1988; Hron *et al.*, 1994), semilla de girasol (Sineiro *et al.*, 1998) y soja (Baker y Sullivan, 1983; Rittner, 1992). Tir *et al.* (2012) reportaron al etanol e isopropanol como ejemplos de alcoholes de cadena corta, que se han propuesto como solventes alternativos debido a su alta disponibilidad, biorenovabilidad y baja toxicidad (Navarro *et al.*, 2016).

El etanol es un candidato digno de ser estudiado como solvente alternativo porque es barato y se puede producir por fermentación a partir de una gran variedad de materiales biológicos usando tecnología simple, y por lo tanto, es calificado como "natural" o "biorenovable". Además, aunque es inflamable, el etanol se reconoce como no tóxico y tiene menos riesgos de manejo que el *n*-hexano (Rittner, 1992). El uso de etanol como disolvente de extracción también evita eventuales problemas de toxicidad de las harinas obtenidas al final de la extracción, utilizadas como alimento para animales (Baümler *et al.*, 2016). Sin embargo, una de las desventajas que los alcoholes presentan, principalmente el etanol, es que la solubilidad de los lípidos está drásticamente afectada por el contenido de agua del solvente y la temperatura de extracción (Baümler *et al.*, 2016). En la década del '30, se discutió el uso de etanol anhidro como posible solvente para reemplazar el *n*-hexano, pero el principal problema era mantener el alcohol en ese estado. A medida que disminuye la concentración de etanol y aumenta el contenido de agua, la solubilidad del aceite se reduce significativamente en la mezcla. Sin embargo, la solubilidad del aceite en etanol al 95 % (mezcla azeotrópica) se puede llevar a un rango práctico operando a suficiente presión para llevar la temperatura a 90 °C, pero la capacidad de extraer compuestos no lipídicos aumenta (Hron *et al.*, 1982; Hron *et al.*, 1984; Sineiro *et al.*, 1996). Como los alcoholes son más polares que el *n*-hexano, tienden a extraer más compuestos que no sean triglicéridos, debido a su menor selectividad, los alcoholes pueden extraer conjuntamente, otros compuestos como fosfolípidos, polifenoles, pigmentos y azúcares solubles (Hron *et al.*, 1982; Hron *et al.*, 1984; Sineiro *et al.*, 1996). Después de la

extracción con etanol, y cuando la miscela se enfría, puede ser que parte del material extraído se vuelva insoluble (en etanol) y se separe como una emulsión.

Entre las ventajas de usar etanol como un sustituto de *n*-hexano, además de su seguridad operacional y baja toxicidad, permite la extracción de aceites de mejor calidad, con bajos niveles de ácidos grasos libres y también puede ser considerado porque elimina factores antinutricionales como el gossipol, las aflatoxinas y el ácido clorogénico (Toda *et al.*, 2016).

El etanol ha sido reportado como solvente alternativo para la extracción de aceite de semillas de jatrofa (Brossard-González *et al.*, 2010), collets de girasol (Baümler *et al.*, 2016), salvado de arroz (Bessa *et al.*, 2017; Capellini *et al.*, 2017), semillas de girasol (Cuevas *et al.*, 2009; Sineiro *et al.*, 1998), soja (Gandhi *et al.*, 2003), semillas de algodón (Hron *et al.*, 1994; Hron *et al.*, 1984), colza (Li *et al.*, 2014), palma (Jesus *et al.*, 2013) y nueces (Neto *et al.*, 2018).

El alcohol isopropílico (IPA), es considerado otro de los solventes alternativos que pueden ser utilizados como reemplazo del *n*-hexano en la industria del aceite. Además es un subproducto de la hidratación de propileno y se utiliza principalmente en la fabricación de acetona (Baker y Sullivan, 1983).

La dependencia de la temperatura en la solubilidad del aceite en IPA forma la base principal del proceso de extracción con isopropanol, ya que permite la recuperación del aceite por enfriamiento y separación de las fases en lugar de una destilación. La miscibilidad del IPA en agua confiere ciertas ventajas operativas, entre ellas que matrices con un alto contenido de humedad no resultan problemáticas y por lo tanto la migración del agua en el lecho de extracción tampoco. Por otro lado no se forman aglomerados en el proceso de desolventización y tostado (Seth *et al.*, 2007). Sin embargo, dentro de las desventajas que presenta este solvente, se encuentra el alto calor de vaporización del azeótropo y los altos costos de energía para la recuperación del mismo.

El isopropanol ha sido reportado como solvente alternativo para la extracción de aceite de soja (Harris *et al.*, 1947; Seth *et al.*, 2007), colza (Li *et al.*, 2014), salvado de arroz (Capellini *et al.*, 2017; Proctor y Bowen, 1996), germen de maíz (Navarro *et al.*, 2016) y semillas de algodón (Zhang *et al.*, 2002).

#### **1.4. PLANTEO Y DEFINICIÓN DE LA PROBLEMÁTICA**

La industria de extracción de aceite de oleaginosas utiliza grandes volúmenes de *n*-hexano y largos tiempos de extracción que causan problemas ambientales debido a las pérdidas directas de solventes orgánicos en la atmósfera; Por lo tanto, se necesitan alternativas “más limpias” que permitan el reemplazo de este solvente en la industria del aceite.

En los últimos años, se han realizado avances importantes en el desarrollo, la optimización y la aplicación de técnicas ecológicas en la industria de alimentos para reducir el impacto ambiental mediante la minimización de desechos, la reducción del consumo energético y de tiempo de procesamiento. Estos cambios han permitido evitar riesgos para la salud y mejorar el cuidado del medioambiente. Debido a los avances en la industria de alimentos en general con respecto al uso de tecnologías más amigables, resulta de interés, para la industria del aceite, el estudio de una combinación de técnicas de extracción avanzadas, utilizando solventes alternativos al *n*-hexano y tratamientos en las matrices oleaginosas, para proporcionar la posibilidad del uso tiempos de extracción más cortos, un menor consumo de solvente, una disminución en el consumo de energía, lo que haría posible un proceso de extracción más amigable con el medio ambiente.

En virtud de lo expuesto, los objetivos del presente trabajo de tesis doctoral, se detallan a continuación:

### **Objetivo general**

Estudiar el uso de enzimas en el proceso extractivo de aceite de collets de girasol, utilizando solventes no convencionales y la obtención de otros derivados, a escala laboratorio, promoviendo el desarrollo de tecnologías alternativas.

### **Objetivos específicos**

- Estudiar el efecto de las variables operativas generales para la extracción acuosa enzimática de collets de girasol, utilizando como factor de respuesta rendimiento de aceite y concentración de azúcares reductores.
- Desarrollar un diseño de experimentos para identificar la mejor condición de extracción acuosa enzimática, teniendo en cuentas variables definidas con el objetivo anterior y analizando otras relevantes para la extracción de aceite y proteínas.
- Extraer aceite de collets de girasol empleando etanol e isopropanol con y sin pre-tratamiento enzimático, para comparar los rendimientos de extracción.
- Realizar ensayos comparativos de la caracterización del aceite extraído de los collets de girasol, con muestras con pre-tratamiento enzimático, utilizando dos tipos de solventes alternativos: etanol e isopropanol.

## **1.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abraham, G., Hron, R., & Koltun, S. (1988). Modeling the solvent extraction of oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(1), 129-135.
- ASAGIR (2018). Asociación Argentina de Girasol. Disponible en: <http://www.asagir.org.ar/>. [Fecha de acceso: 22-11-2018]. [Fecha de acceso: 22-11-2018].
- Añón M. C. (2016) Análisis Tecnológicos y Prospectivos Sectoriales Complejo Oleaginoso Soja-Girasol. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Disponible en: <http://www.mincyt.gob.ar/estudios/analisis-tecnologicos-y-prospectivos-sectoriales-el-futuro-de-las-tecnologias-en-el-ano-2020-a-nivel-mundial-en-complejos-productivos-industriales-y-agroindustriales-9423>. [Fecha de acceso: 16-07-2018].
- Baker, E., & Sullivan, D. (1983). Development of a pilot-plant process for the extraction of soy flakes with aqueous isopropyl alcohol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(7), 1271-1277.
- Balam-Cocom, R. J., Duarte-Aranda, S., & Canché-Escamilla, G. (2006). Obtención y caracterización de materiales compuestos de fibras de la" piña. *Revista Mexicana de ingeniería química*, 5(1), 39-44.
- Bau H.M., Mohtadi Nia D.J., Mejean L. & Debry G. (1983). Preparation of colorless sunflower protein products: Effect of processing on physicochemical and nutritional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, , 60, 1141-1148.
- Bäumler, E. R., Carrín, M. E., & Carelli, A. A. (2016). Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 178, 190-197.
- Bessa, L. C. B. A., Ferreira, M. C., Rodrigues, C. E. C., Batista, E. A. C., & Meirelles, A. J. A. (2017). Simulation and process design of continuous countercurrent ethanolic extraction of rice bran oil. *Journal of Food Engineering*, 202, 99-113.

- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41-55.
- Brossard-González, C. O., Ferrari, R. A., Pighinelli, A. L., & Park, K. J. (2010). Evaluación preliminar del etanol anhidro como solvente en la extracción de aceite de semillas de jatrofa (*Jatropha curcas* L.). *Grasas y Aceites*, 61(3), 295-302.
- Bolsa de Comercio de Rosario (2018). Informe semanal. Disponible en: [https://www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/informativosemanal\\_noticias.aspx?pldNoticia=1313](https://www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/informativosemanal_noticias.aspx?pldNoticia=1313). [Fecha de acceso: 17-01-2019].
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379-389.
- Campbell, K. A., Vaca-Medina G., Glatz C.E & Pontalier P.Y. (2016). Parameters affecting enzyme-assisted aqueous extraction of extruded sunflower meal. *Food Chemistry*, 208, 246-251.
- Campbell, K. A. (2010). Protein and oil recoveries from enzyme-assisted aqueous extraction of soybeans and sunflower seed. Iowa State University, Iowa, EE.UU.
- Campbell, K. A., & Glatz, C. E. (2009). Mechanisms of aqueous extraction of soybean oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10904-10912.
- Capellini, M. C., Giacomini, V., Cuevas, M. S., & Rodrigues, C. E. C. (2017). Rice bran oil extraction using alcoholic solvents: Physicochemical characterization of oil and protein fraction functionality. *Industrial Crops and Products*, 104, 133-143.
- Capellini, M. C., Chiavoloni, L., Giacomini, V., & Rodrigues, C. E. C. (2019). Alcoholic extraction of sesame seed cake oil: Influence of the process conditions on the physicochemical characteristics of the oil and defatted meal proteins. *Journal of Food Engineering*, 240, 145-152.
- Carelli, A. A., Ceci, L. N., & Crapiste, G. H. (2002a). Phosphorus-to-phospholipid conversion factors for crude and degummed sunflower oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(12), 1177-1180.

- Carelli, A. A., Frizzera, L. M., Forbito, P. R., & Crapiste, G. H. (2002b). Wax composition of sunflower seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(8), 763-768.
- Carr, R.A. (1997). Capítulo 5. Oilseed processing. En: Wan P.J. & Wakelin P.J. (Eds.) *Technology and solvents for extracting oilseeds and nonpetroleum oils: The American Oil Chemists Society*.
- Castejón N., Luna P., & Señoráns F.J. (2018). Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and Green solvents. *Food Chemistry*, 244, 75–82.
- Cater, C. M., Rhee, K. C., Hagenmaier, R. D., & Mattil, K. F. (1974). Aqueous extraction—an alternative oilseed milling process. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51(4), 137-141.
- Chabrand, R. M., Kim, H.-J., Zhang, C., Glatz, C. E., & Jung, S. (2008). Destabilization of the emulsion formed during aqueous extraction of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(4), 383-390.
- CIARA (2018). Camara de la industria aceitera de la República Argentina. Disponible en: <http://www.ciara.com.ar/>. [Fecha de acceso: 22-11-2018]
- Conkerton, E., Wan, P., & Richard, O. (1995). Hexane and heptane as extraction solvents for cottonseed: a laboratory-scale study. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(8), 963-965.
- Constanzó, G. P., & Starti L. (2017) Subsecretaría de Programación Microeconómica, Secretaría de Política Económica. Ministerio de Hacienda. Presidencia de la Nación (2017). INFORMES DE CADENAS DE VALOR. Oleaginosa AÑO 2 - N° 29. Buenos Aires, Argentina, p.51. Disponible en [https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/2017/SSPMicro\\_Cadena\\_de\\_valor\\_Oleaginosa.pdf](https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/2017/SSPMicro_Cadena_de_valor_Oleaginosa.pdf). [Fecha de acceso: 22-12-2018]. [Fecha de acceso: 22-12-2018].

- Cuevas, M. S., Rodrigues, C. E. C., & Meirelles, A. J. A. (2009). Effect of solvent hydration and temperature in the deacidification process of sunflower oil using ethanol. *Journal of Food Engineering*, 95(2), 291-297.
- Danso-Boateng, E. (2011). Effect of enzyme and geat pretreatment on sunflower oil recovery using aqueous and hexane extractions. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 5.
- de Figueiredo, A., Rodríguez, L., Lindström, L., Riccobene, I., & Nolasco, S. (2013). Performance analysis of a dehulling system for safflower grains. *Industrial Crops and Products*, 43, 311-317.
- Dominguez, H. M., Núñez, J., & Lema, J. M. (1994). Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. *Food Chemistry*, 49, 271-286.
- Dominguez, H. M., Núñez, J., & Lema, J. M. (1995a). Enzyme-assisted hexane extraction of soya bean oil. *Food Chemistry*, 54, 223-231.
- Dominguez, H., Núñez, M., & Lema, J. (1995b). Aqueous processing of sunflower kernels with enzymatic technology. *Food Chemistry*, 53(4), 427-434.
- Dunford, N. T. (2012). Capítulo 4. Advancements in Oil and Oilseed Processing. En Dunford N.T. (Ed.) *Food and Industrial Bioproducts and Bioprocessing*. 115-144.
- Embong, M., & Jelen, P. (1977). Technical feasibility of aqueous extraction of rapeseed oil A laboratory study. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 10(4), 239-243.
- Evon, P., Vandenbossche, V., Pontalier, P. Y., & Rigal, L. (2009). Aqueous extraction of residual oil from sunflower press cake using a twin-screw extruder: feasibility study. *Industrial Crops and Products*, 29(2-3), 455-465.
- Frandsen, G. I., Mundy, J., & Tzen, J. T. (2001). Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiologia Plantarum*, 112(3), 301-307.



- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 68-87.
- Gandhi, A., Joshi, K., Jha, K., Parihar, V., Srivastav, D., Raghunadh, P., Kawalkar, J., Jain, S., & Tripathi, R. (2003). Studies on alternative solvents for the extraction of oil - I soybean. *International Journal of Food Science & Technology*, 38(3), 369-375.
- Gassmann, B. (1983). Preparation and application of vegetable proteins, especially proteins from sunflower seed, for human consumption. An approach. *Food/Nahrung*, 27(4), 351-369.
- Gheyasuddin, S., Cater, C., & Mattil, K. (1970). Whats new in proteins. 2. Preparation of a colorless sunflower protein isolate. *Food Technology*, 24(3), 242.
- Giancola S. I., Salvador M. L., Covacevich M. & Iturrioz G. (2009). Análisis de la cadena de soja en la Argentina. Proyecto específico 2742: Economía de las cadenas agroalimentarias y agroindustriales. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cadena\\_soja.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cadena_soja.pdf). [Fecha de acceso: 18-12-2018]
- González-Pérez, S. (2003). *Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins*. Wageningen University, The Netherlands.
- González-Pérez, S., & Vereijken, J. M. (2007). Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(12), 2173-2191.
- González-Pérez, S. (2015). Sunflower proteins. En Martínez-Force, E.; Dunford N. T. & Salas J. J. (Eds.), *Sunflower Chemistry, Production, Processing, and Utilization*. Urbana, IL: AOCS Press.
- Gordon Dorrell, D., & Vick, B. A. (1997). Properties and processing of oilseed sunflower. En *Sunflower Technology and Production* (sunflowertechno), 709-745.

- Grompone, M. A. (2011). Sunflower oil. En F. Shahidi (Ed.), *Bayley's Industrial Oil and Fat Products*: Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Gupta, M. K. (2002). Capítulo 5. Sunflower oil. En Gunstone, F. D (Ed.) *Vegetable Oils in Food Technology*. Blackwell Publisher.
- Hagenmaier, F. D. (1974). Aqueous processing of full-fat sunflower seeds: Yields of oil and protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51(10), 470-471.
- Harris, W., Bishop, F., Lyman, C., & Helpert, R. (1947). Isopropanol as a solvent for extraction of cottonseed oil: I. Preliminary investigations. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 24(11), 370-375.
- Hron, R., Kuk, M., Abraham, G., & Wan, P. (1994). Ethanol extraction of oil, gossypol and aflatoxin from cottonseed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(4), 417-421.
- Hron, R. J., Koltun, S. P., & Graci, A. V. (1982). Biorenewable solvents for vegetable oil extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59(9) 674-682.
- INDEC (2017). Informes Técnicos. Comercio exterior. Complejos exportadores Año 2017. Vol. 2, nº 38 ISSN 2545–6636. Instituto Nacional de Estadística y Censos. Disponible en:  
[https://www.indec.gob.ar/uploads/informesdeprensa/complejos\\_03\\_18.pdf](https://www.indec.gob.ar/uploads/informesdeprensa/complejos_03_18.pdf).  
[Fecha de acceso: 04-12-2018].
- Jesus, A. A., Almeida, L. C., Silva, E. A., Lucio Filho, C., Egues, S. M., Franceschi, E., Fortuny, M., Santos, A. F., Araujo, J., & Sousa, E. M. (2013). Extraction of palm oil using propane, ethanol and its mixtures as compressed solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 81, 245-253.
- Jiang, L., Hua, D., Wang, Z., & Xu, S. (2010). Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 233-238.
- Johnson, L. A. (1997). Capítulo 1. Theoretical, comparative, and historical analyse of alternative technologies for oilseeds extraction. En Wan P.J. & Wakelin P.J.

- (Eds.), *Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils*: The American Oil Chemists Society.
- Jung, S., Leite, J.M., de Moura, N., Campbell, K.A. & Johnson, L. A. (2012). Capítulo 16. Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Oilseeds. En Da-Wen Sun. *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry*. 477-518. CRC Press.
- Kapchie, V. N., Wei, D., Hauck, C., & Murphy, P. A. (2008). Enzyme-assisted aqueous extraction of oleosomes from soybeans (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1766–1771.
- Latif, S., & Anwar, F. (2009). Effect of aqueous enzymatic processes on sunflower oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(4), 393-400.
- Latif, S., & Anwar, F. (2011). Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. *Food Chemistry*, 125(2), 679-684.
- Le Clef, E., & Kemper, T. (2015). Sunflower Seed Preparation and Oil Extraction. En Martínez-Force, E.; Dunford N. T. & Salas J. J. (Eds.), *Sunflower Chemistry, Production, Processing, and Utilization*. Urbana, IL: AOCS Press.
- Li, Y., Fine, F., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., Carre, P., Pages, X., & Chemat, F. (2014). Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 242-251.
- Liu, S., Jiang, L., & Li, Y. (2011). Research of aqueous enzymatic extraction of watermelon seed oil of ultrasonic pretreatment assisted. *Procedia Engineering*, 15, 4949-4955.
- Lloyd, P.J., & van Wyk, J. (2012). Capítulo 1. Introduction extraction in food processing. En En Da-Wen Sun. *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry*. 1-24. CRC Press.
- Lusas, E. W. (1982). Production edible oil and protein from oilseeds by aqueous processing. *Oil Mill Gazet.*, 4, 28-34.
- Lusas, E. W. (1985). Sunflower seed protein. *New Protein Foods*, 5, 393-433.

- Maga, J. A., & Katz, I. (1978). Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 10(4), 323-372.
- Marín, A., & Pérez, C.G. (2011) "Complejo oleaginoso" Series Producción Regional por Complejos Productivos. Ministerio de Economía. Dirección de Información y Análisis Regional Sectorial .
- Mat Yusoff, M, Gordon, M. H., Ezech, O. & Niranjan, K. (2015). Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 41. 60-82
- Mat Yusoff, M., Gordon, M. H., Ezech, O., & Niranjan, K. (2016). Aqueous enzymatic extraction of *Moringa oleifera* oil. *Food Chemistry*, 211, 400-408.
- Melgarejo, M. 2003. Girasol. Usos. Semilla, aceite, pellets, nutrición. ASAGIR, Cuadernillo Informativo No. 4. pp. 32-33.
- Moura J.M.L.N. & Johnson L.A. (2009). Two stage countercurrent enzyme-assisted aqueous extraction processing of oil and protein from soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 86. 283-289.
- Muniglia, L., Claisse, N, Baudelet, P. H., & Ricochon G. (2014). Capítulo 8. Enzymatic Aqueous Extraction (EAE). En Chemat F. & Vian M. A. (Eds.) *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*. 167-206. RSC Publishing.
- Najafian, L., Ghodsvai, A., Khodaparast, M. H., & Diosady, L. (2009). Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food Research International*, 42(1), 171-175.
- Navarro, S. L., Capellini, M. C., Aracava, K. K., & Rodrigues, C. E. (2016). Corn germ-bran oils extracted with alcoholic solvents: Extraction yield, oil composition and evaluation of protein solubility of defatted meal. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 185-194.

- Neto, O. Z. S., Batista, E. A. C., & de Almeida Meirelles, A. J. (2018). The employment of ethanol as solvent to extract Brazil nut oil. *Journal of Cleaner Production*, 180, 866-875.
- Nikiforidis, C., & Kiosseoglou, V. (2009). Aqueous extraction of oil bodies from maize germ (*Zea mays*) and characterization of the resulting natural oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5591–5596.
- Nyam, K. L., Tan, C. P., Lai, O. M., Long, K., & Man, Y. B. C. (2009). Enzyme-assisted aqueous extraction of Kalahari melon seed oil: optimization using response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(12), 1235-1240.
- Osborne, T. (1924) En. The Vegetable Proteins. 2da. edición ed. Longmans y Green, Nueva York.
- Passos, C. P., Yilmaz, S., Silva, C. M., & Coimbra, M. A. (2009). Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry*, 115(1), 48-53. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.064
- Pérez, E., Crapiste, G., & Carelli, A. (2007). Some physical and morphological properties of wild sunflower seeds. *Biosystems Engineering*, 96(1), 41-45.
- Pérez, E. E., Fernández, M. B., Nolasco, S. M., & Crapiste, G. H. (2013). Effect of pectinase on the oil solvent extraction from different genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Food Engineering*, 117(3), 393-398.
- Prasad, D. T. (1990). Proteins of the phenolic extracted sunflower meal. 1. Simple method for removal of polyphenolic components and characteristics of salt soluble proteins. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 23(3), 229-235.
- Prat, D., Wells, A., Hayler, J., Sneddon, H., McElroy, C. R., Abou-Shehada, S., & Dunn, P. J. (2016). CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chemistry*, 18(1), 288-296.

- Proctor, A., & Bowen, D. (1996). Ambient-temperature extraction of rice bran oil with hexane and isopropanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(6), 811-813.
- Protocolo de calidad para aceite de girasol. Versión 18 (2015). Código SAA021. Ministerio de Agroindustria. Secretaria de Agregado de Valor. Subsecretaria de Alimentos y Bebidas. Disponible en: [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Sello/sistema\\_protocolos/SAA021\\_Aceite\\_Girasol.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Sello/sistema_protocolos/SAA021_Aceite_Girasol.pdf). [Fecha de acceso: 22/12/2018].
- Qian J.Q., Qin D.H., Xie X.M., & Zhou W.W. (2010). Study on enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybean. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 69, 860-865.
- Ramadan, M. F., & Moersel, J. T. (2009). Oil extractability from enzymatically treated goldenberry (*Physalis peruviana* L.) pomace: range of operational variables. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(3), 435-444.
- Raymond, J., Robin, J. M., & Azanza, J. L. (1995). 11 S seed storage proteins from *Helianthus* species (Compositae): Biochemical, size and charge heterogeneity. *Plant Systematics and Evolution*, 198(3-4), 195-208.
- Rittner, H. (1992). Extraction of vegetable oils with ethyl alcohol. *Oleagineux (France)*, 29-42.
- Rodríguez, J. C., & Bartosik, R. (2005). Secado de granos: Proyecto de Eficiencia de Cosecha y Postcosecha. Disponible en: <http://www.cosechaypostcosecha.org/>. [Fecha de acceso: 10-10-2018].
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., & Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 402-420.
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., & Niranjana, K. (1998). Simultaneous aqueous extraction of oil and protein from soybean: Mechanisms for process design. *Food and Bioprocess Technology*, 76(4), 224-230.

- Rosenthal, A., Pyle, D., Niranjana, K., Gilmour, S., & 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(6), 499-509.
- Salgado, P. (2009). *Proteínas de Girasol: aislamiento, caracterización y aplicación en la industria alimentaria*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.
- Salas J. J.; Bootello M. A. & Garcés R. (2015). Food uses of sunflower oils. En Martínez-Force, E.; Dunford N. T. & Salas J. J. (Eds.) , *Sunflower Chemistry, Production, Processing, and Utilization*. Urbana, IL: AOCS Press.
- Salunkhe, D. K., Adsule, R., Chavan, J., & Kadam, S. (1992). *World oilseeds*: Springer Science & Business Media.
- Sandoval L. (2018), Argentina: Oilseed and products annual. Report. United State Departament of Agriculture. Disponible en: <https://www.fas.usda.gov/data/argentina-oilseeds-and-products-annual-3>. [Fecha de acceso: 11-11-2018]
- Schwenke, K., Prahl, L., Rauschal, E., Gwiazda, S., Dabrowski, K., & Rutkowski, A. (1981). Functional properties of plant proteins. Part 2. Selected physicochemical properties of native and denatured protein isolates from faba beans, soybeans, and sunflower seed. *Food/Nahrung*, 25(1), 59-69.
- Secretaria de Agroindustria (2018). Ultimo acceso: Noviembre 2018. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/agroindustria>. [Fecha de acceso: 22-11-2018]
- Seth, S., Agrawal, Y. C., Ghosh, P. K., Jayas, D. S., & Singh, B. P. N. (2007). Oil extraction rates of soya bean using isopropyl alcohol as solvent. *Biosystems Engineering*, 97(2), 209-217.
- Sharma, A., Khare, S., & Gupta, M. (2002). Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(3), 215-218.

- Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M., & Lema, J. (1996). Ethanol extraction of polyphenols in an immersion extractor. Effect of pulsing flow. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(9), 1121-1125.
- Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., & Lema, J. M. (1998). Ethanol extraction of sunflower oil in a pulsing extractor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(6).
- Sosulski, F. (1979). Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(8), 711-715.
- Sripad, G., & Rao, M. N. (1987). Effect of methods to remove polyphenols from sunflower meal on the physicochemical properties of the proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(6), 962-967.
- Tabatabaei, S., & Diosady, L. L. (2013). Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow mustard flour. *Food Research International*, 52(2), 547-556.
- Tir, R., Dutta, P. C., & Badjah-Hadj-Ahmed, A. Y. (2012). Effect of the extraction solvent polarity on the sesame seeds oil composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(12), 1427-1438.
- Toda, T. A., Sawada, M. M., & Rodrigues, C. E. (2016). Kinetics of soybean oil extraction using ethanol as solvent: Experimental data and modeling. *Food and Bioprocess Processing*, 98, 1-10.
- Tzen, J. T. (2012). Integral proteins in plant oil bodies. *ISRN Botany*, 1-16
- Velasco, L., & Ruiz-Méndez, M. V. (2015). Capítulo 11- Sunflower Oil Minor Constituents. *Sunflower*. En Martínez-Force, E.; Dunford N. T. & Salas J. J. (Eds.) , *Sunflower Chemistry, Production, Processing, and Utilization*. Urbana, IL: AOCS Press.
- Veldstra, J., & Klere, H. (1993). Aceite de Girasol. *Aceites y Grasas*, 12, 32-38.



- Wan, P., Pakarinen, D., Hron Sr, R., Richard, O., & Conkerton, E. (1995a). Alternative hydrocarbon solvents for cottonseed extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(6), 653-659.
- Wan, P., Hron Sr, R., Dowd, M., Kuk, M., & Conkerton, E. (1995b). Alternative hydrocarbon solvents for cottonseed extraction: plant trials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(6), 661-664.
- Zhang, F., Rhee, K., & Koseoglu, S. (2002). Isopropyl alcohol extraction of cottonseed collets: efficiency and performance. *Journal of Food Lipids*, 9(2), 147-160.
- Zhang, S. B., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2006). Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(1), 97-105.
- Zhang, Y.-l., Li, S., Yin, C.-p., Jiang, D.-h., Yan, F.-f., & Xu, T. (2012). Response surface optimisation of aqueous enzymatic oil extraction from bayberry (*Myrica rubra*) kernels. *Food Chemistry*, 135(1), 304-308.

# CAPÍTULO 2

## MATERIALES, MÉTODOS Y CARACTERIZACIÓN

En el presente capítulo se detallan las técnicas analíticas empleadas a lo largo de la tesis. Además se incluyen la caracterización de la materia prima y la determinación de los componentes menores en el aceite, como tocoferoles, fosfolípidos y ceras.

### 2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1.1. MATERIA PRIMA Y REACTIVOS

El material utilizado para todas las experiencias fueron muestras de expandido de girasol, denominado “collets”. Este material se obtiene luego de la extracción por prensado, el cual se realiza en semillas que presentan un elevado contenido de aceite, como el girasol, cártamo, maní y canola, donde se extrae la mayor parte del aceite y posteriormente pasan a extrusores donde se realizan los expandidos (Figura 2.1). Los collets permiten un mejor flujo del disolvente y por lo tanto, mejor drenaje de la miscela (aceite + disolvente).

Las muestras de collets fueron provistas de la planta industrial de Oleaginosa Moreno Hermanos, localizada en la ciudad de Daireaux en la Provincia de Buenos Aires. Los mismos se almacenaron en cámara frigorífica a 4 °C en recipientes plásticos con tapa a rosca hasta su uso.



**Figura 2.1:** Collets de girasol

Los reactivos utilizados en las extracciones y métodos analíticos fueron grado analítico (J. T. Backer, Anedra, Dorwill, Merck, Cicarelli) mientras que aquellos usados en las técnicas cromatográficas fueron grado cromatográfico (UVE, J. T. Backer y Merck)

#### 2.1.2. ENZIMA

Los ensayos con tratamiento enzimático se realizaron con Viscozyme® L, un complejo enzimático con una amplia gama de carbohidrasas (arabinasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa y xilanasa). Este complejo fue provisto por Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) y sus características y propiedades, obtenidas a partir de sus especificaciones comerciales, se presentan en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Especificaciones de origen y características del complejo enzimático

|                         | <b>Complejo Enzimático</b>  |
|-------------------------|---|
| <b>Nombre Comercial</b> | Viscozyme® L  |
| <b>Aspecto Físico</b>   | Líquido amarronado  |
| <b>Origen</b>           | Fermentación sumergida de un microorganismo<br>Organismo productor: <i>Aspergillus aculeatus</i><br>Organismo donante: no declarado |
| <b>Actividad</b>        | 112 FBGU g <sup>-1</sup> *  |
| <b>pH</b>               | 3,3-5,8   |
| <b>Temperatura</b>      | 45-55 °C  |

\* FBGU = Unidades Fúngicas de Beta-Glucanasa. FBG es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de azúcares reductores (en equivalentes de glucosa) por minuto a partir de beta-glucano, a un pH de 4,8 y una temperatura de 50 °C.

#### ***2.1.2.1. Determinación de la actividad enzimática***

Los ensayos de actividad enzimática, se llevaron a cabo con buffer de citrato, de una fuerza iónica de 0,05 M y pH 4,8, utilizando como sustrato papel de filtro Whatman N °1 de 50 mg aproximados (1,0 x 6,0 cm) (Adney y Baker, 2008).

La preparación del buffer se realizó con ácido cítrico monohidratado (210 g), agua destilada (750 mL) y NaOH (50-60 g), se homogeneizó en vaso de precipitado con varilla de vidrio y se trasvasó a un matraz de litro, donde se llevó a volumen con agua destilada. Posteriormente se comprobó el pH y se ajustó a 4,8 si fuere necesario.

En tubos de ensayos, se añadió el sustrato y 1,0 mL de buffer citrato (el buffer debió saturar la tira de papel del filtro). Los tubos se colocaron en un baño de agua a 50 °C y se agregó en cada uno, 0,5 mL de la solución de enzima diluida apropiadamente en buffer citrato. La concentración de enzima utilizada, dependió de su tipo. Se debe contar con al menos dos diluciones de cada muestra de enzima. La dilución principal debe permitir la liberación de 2,0 mg de glucosa (cantidad absoluta), luego se debieron preparar dos diluciones posteriores, una más concentrada y otra más diluida. Dependiendo de la enzima, estos objetivos pueden ser difíciles de alcanzar y se deben realizar más diluciones adicionales. Una vez incorporada la cantidad de enzima adecuada en el tubo, se incubaron a 50 °C durante exactamente 60 minutos. Al final del período de incubación, se retiró cada tubo de ensayo del baño a 50 °C y se realizó la técnica de Nelson-Somogyi para determinar los azúcares por espectrofotometría, como se detalla en la sección 2.1.3.6.

Para realizar una medición adecuada, fue necesario realizar un blanco y un control de la enzima y del sustrato, los cuales se detallan a continuación:

- Blanco de reactivo: 1,5 mL de buffer citrato.
- Control de la enzima: 1,0 mL de buffer citrato + 0,5 mL de dilución enzimática (realizar un control para cada dilución probada).
- Control del sustrato: 1,5 mL de buffer citrato + sustrato (tira de papel de filtro).

La cantidad de FBGU se calculó como se presenta en la Ecuación (1):

$$FBGU = \frac{0,37}{[enzima]} \quad (1)$$

El numerador (0,37) en la ecuación se deriva del factor para convertir los 2,0 mg de "equivalentes de glucosa" generados en el ensayo a  $\mu$ moles (2,0/0,18016), del volumen de la enzima que se está probando y que se usó en el ensayo (0,5 mL) y el tiempo de incubación (60 minutos) requerido para la generación de los equivalentes reductores. La [enzima] representa la proporción de la solución enzimática original presente en la dilución de enzima colocada en los tubos de ensayos (dilución de la cual se agregan 0,5 mL a la mezcla de ensayo).

### 2.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA Y PRODUCTOS

La materia prima se caracterizó según su contenido de humedad, contenido de aceite, proteínas y se determinó el contenido de fibras estructurales como celulosa, hemicelulosa y lignina. A su vez, se determinó el contenido de azúcares reductores en los *collets* y capacidad de absorción de agua. También se mencionan otras técnicas analíticas realizadas en materiales obtenidos a lo largo de los capítulos, como la determinación del contenido de proteínas solubles.

En el aceite extraído se cuantificó el contenido de componentes minoritarios como tocoferoles, fosfolípidos y ceras.

A continuación se detallan las técnicas utilizadas. Cabe aclarar que los *collets* fueron acondicionados antes de los ensayos, triturándolos en molinillo de cuchilla horizontal. De aquí en más, denominaremos "muestra" a los *collets* triturados.

#### 2.1.3.1. Contenido de humedad y material volátil

El contenido de humedad se determinó según técnica IUPAC 1.121 (Paqueot y Hautfenne, 1992), por secado en estufa de vacío a 100 °C hasta peso constante.

#### **2.1.3.2. Contenido de aceite**

La extracción de aceite se llevó a cabo en un equipo Soxhlet, empleando como solvente, *n*-hexano grado comercial, siguiendo la norma IUPAC 1.122 (Paqueot *et al*, 1992). Se colocó la muestra (aproximadamente 10 gramos), en un cartucho de papel Whatman N°4. El proceso se llevó a cabo a la temperatura de ebullición del hexano a presión atmosférica durante 6 horas (aproximadamente 20 ciclos de extracción para asegurar que el contenido de aceite de la muestra sea menor al 1 %). Transcurrido ese tiempo, se procedió a separar el solvente del aceite mediante un evaporador rotatorio a una temperatura de 40 °C bajo vacío. Para remover posibles restos del solvente en el aceite extraído, éste fue expuesto a una corriente de nitrógeno hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas sea menor a 0,001 g.

El contenido de aceite fue expresado como porcentaje en muestra libre de humedad (Ecuación 2).

$$\% \text{ Aceite}_{(b.s.)} = \frac{\text{g Aceite}}{\text{g muestra seca}} * 100 \quad (2)$$

#### **2.1.3.3. Contenido de proteínas**

El contenido de proteína cruda se determinó utilizando el método de Kjeldahl (Helrick, 1990), empleando un digestor y destilador Büchi. La técnica se divide en tres partes, una digestión de la muestra, una destilación y por último una valoración para determinar la cantidad de nitrógeno en la muestra.

*Digestión:* un gramo de muestra desengrasada (tamaño de partícula de 1 mm) se colocó en el tubo digestor junto con 10 g de catalizador, el cual consistió en una mezcla al 7 % de CuSO<sub>4</sub> en K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Seguidamente, se añadieron 25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se procedió al calentamiento. Se preparó en forma paralela un blanco. Una vez que la solución se hubo aclarado, se prosiguió el calentamiento por otros 30 min, con lo cual se aseguró la completa oxidación de la materia orgánica. Se retiró y se dejó enfriar. Luego se agregaron 100 mL de agua.

*Destilación:* se preparó una solución de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  al 4 % a la que se añadió una solución indicadora de rojo de metilo y verde de bromocresol<sup>1</sup> en una proporción de 5 mL por litro de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  al 4 %. Se colocaron 50 mL de esta solución ácida preparada en un Erlenmeyer de 250 mL el que se situó a la salida del condensador para recoger el amonio destilado. Se añadió NaOH al 30 % a la muestra digerida para liberar el amonio, hasta que la solución tomó una coloración azul intensa. Esta coloración se debe a la formación de un complejo entre iones amonio y cobre e indica que la cantidad de NaOH fue suficiente para neutralizar el exceso de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

La destilación se detuvo cuando se recogieron aproximadamente 100 mL de destilado. Un tiempo de destilación típico es de 3-4 minutos con una potencia de vapor del 100 %

Luego, se tituló el destilado con HCl 0,1 con el fin de determinar el amonio absorbido por el  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{[(V_1 - V_b) * N_{\text{HCl}}] * 0,014}{W_1} * 100 \quad (3)$$

donde:

$V_1$ : volumen de HCl consumido en la titulación de la muestra (mL)

$V_b$ : volumen de HCl consumido en la titulación del blanco (mL)

$W_1$ : masa de la muestra, expresado en base seca (g)

$N_{\text{HCl}}$ : normalidad del ácido sulfúrico utilizado en la titulación

A fin de estimar el porcentaje de proteínas se multiplicó el % Nitrógeno por un factor  $F = 6,25$ .

#### **2.1.3.4. Contenido de fibra estructurales**

Se siguió el *método de Van Soest* para el análisis de las fibras estructurales (Van Soest *et al.*, 1991). Es un método de análisis más contemporáneo e intenta salvar los

---

<sup>1</sup> 0,02 g de rojo de metilo y 0,04 g verde de bromocresol de disueltos en 19 mL de alcohol y 1 mL de agua destilada.

inconvenientes surgidos al evaluar forrajes y alimentos fibrosos. El método de análisis separa la pared celular del contenido celular y sus componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina. Para tal fin, la técnica hace uso de detergentes ácidos (FDA) y neutros (FDN) (Helrick, 1990; Guiragossian *et al.*, 1977). Empleando un simple balance, se puede calcular el contenido de celulosa con la diferencia entre el valor de FDA y lignina, y el contenido de hemicelulosa entre el valor de FDN y FDA.

#### 2.1.3.4.1. Fibra detergente neutra (FDN)

La muestra desgrasada se colocó en un matraz de Erlenmeyer con cuello esmerilado junto con una solución neutra (pH 6,9 - 7). Se conectó a un refrigerante y se colocó sobre una placa calefactora y se dejó a ebullición durante una hora. Se filtró el contenido del Erlenmeyer a través de un crisol Gooch de porosidad N° 1. El residuo se enjuagó con agua destilada a 80 °C y finalmente con acetona. El crisol con su contenido se colocó en estufa a 105 °C durante una noche (Van Soest *et al.*, 1991). Se dejó enfriar, se pesó y se calculó el porcentaje de FDN como (Ecuación 4):

$$\%FDN = \frac{(W_2 - W_1)}{W_3} * 100 \quad (4)$$

donde,

$W_1$ : masa del crisol (g)

$W_2$ : masa del crisol del crisol más el residuo (g)

$W_3$ : masa de la muestra, expresa en base seca (g)

#### 2.1.3.4.2. Contenido de fibra detergente ácida (FDA)

Para la determinación del contenido de FDA se procedió de la misma manera que para la determinación del contenido de FDN (Van Soest *et al.*, 1991), modificando simplemente la etapa de lavado del residuo, donde se lavó con agua destilada a 80 °C, luego acetona y finalmente con hexano. El crisol con el contenido se colocó en estufa a 105 °C durante una noche. Se dejó enfriar y se pesó. Este residuo se reserva para



proseguir con la determinación de lignina. El porcentaje de fibra detergente ácida se calculó de la siguiente manera (Ecuación 5)

$$\%FDA = \frac{(W_2 - W_1)}{W_3} * 100 \quad (5)$$

Las variables son las que se indicaron en el punto 2.1.3.4.1

#### 2.1.3.4.3. Contenido de lignina

El residuo sólido de la determinación de fibra detergente ácida (FDA) se colocó en un crisol con una solución de ácido sulfúrico al 72 % fría (15 °C) y se agitó para desmenuzar los terrones. Se dejó que drene el ácido y se agitó. Después de tres horas, se filtró empleando vacío. Se enjuagó el residuo con el agua caliente hasta que el líquido estuviese libre de ácido. Se llevó el residuo a estufa 105 °C durante toda la noche y luego se llevó a mufla a 500 °C por tres horas. Se filtró, se pesó y se calculó el contenido de lignina como se muestra en la Ecuación (6):

$$\% Lignina = \frac{(W_2 - W_1)}{W_3} * 100 \quad (6)$$

Las variables se especificaron en el punto 2.1.3.4.1

#### 2.1.3.5. Capacidad de absorción de agua (CAb)

La capacidad de absorción de agua (CAb) se define como la cantidad de agua que una fuente de fibra es capaz de absorber cuando se la coloca en un exceso de agua. Esta propiedad es importante, por ejemplo cuando el material se somete a un proceso de extracción acuoso.

La capacidad de absorción de agua se realizó según método 88-04 propuesto por la AACC (Chen *et al.*, 1984). Inicialmente, se determinó la CAb aproximada. Para ello, se pesó 2 g de muestra (b.s.), se le adicionó agua destilada hasta la saturación (aproximadamente 35 mL) y se homogeneizó en un agitador tipo vórtex durante aproximadamente 1 minuto. Luego, se centrifugó a 2000xg durante 10 minutos, se retiró

el agua sobrenadante y se pesó la fase sólida. La CAb aproximada se calculó de la siguiente manera (Ecuación 7):

$$CAb_{aprox.} = \frac{(masa\ final - masa\ inicial)}{masa\ inicial} \quad (7)$$

Con el valor de la *CAb aprox.* se calculó el peso de la muestra, empleando la siguiente Ecuación (8):

$$Peso\ Muestra = \frac{15}{(CAb\ aprox + 1)} \quad (8)$$

Luego, se determinó la cantidad de agua necesaria para llevar a 15 g el peso de la muestra utilizada, restando a 15 el peso de la muestra determinada en la Ecuación 8. Para determinar la CAb, se le adicionó a la muestra 1,5 y 0,5 mL de agua destilada por encima y por debajo de la cantidad calculada como necesaria, se homogeneizó y se centrifugó a 2000xg por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se pesó.

Los gramos de agua absorbidos fueron calculados para obtener un promedio y La CAb se calculó de la siguiente manera (Ecuación 9):

$$CAb = \frac{\text{promedio de agua absorbida (g)}}{\text{peso de muestra (g)}} \quad (9)$$

#### 2.1.3.6. Cuantificación de azúcares reductores

- Acondicionamiento de la harina:

Los azúcares reductores debieron ser extraídos de las harinas para su determinación. Para ello se pesaron 10 g de cada una de las harinas y se las colocó en un erlenmeyer. Luego se añadió a cada una de las muestras, 125 mL de etanol al 50 % (v/v), previamente neutralizado con un g de CaCO<sub>3</sub>. Posteriormente se colocaron los erlenmeyers en un baño de agua por una hora a una temperatura de 83-87 °C, para evitar la evaporación del etanol, se colocó un pequeño embudo invertido en el cuello del

erlermeyer, modo de condensador. Se dejó enfriar y se centrifugó durante 15 minutos a 1500 rpm, se lavaron los residuos (sólidos) dos veces con 25-40 mL de etanol cada vez. Todos los líquidos obtenidos de los tres lavados (de cada muestra) fueron recuperados. A cada fracción líquida se procedió a la defecación con el agregado de acetato de sodio de plomo neutro (solución saturada), se agitó y se dejó reposar unos 15-20 minutos, luego se filtró con papel walkman N °4. A cada filtrado se le añadió  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidro para precipitar el plomo. Se filtró nuevamente cada muestra y se verificó si el plomo precipitó totalmente. Por último se llevó a volumen en un matraz de 250 mL.

La determinación de los azúcares reductores se realizó a partir de cada uno de los filtrados obtenidos, por espectrofotometría, utilizando la técnica de Nelson-Somogyi (Marais *et al.*, 1966) .

- Método de Nelson-Somogyi:

El fundamento de la técnica es la oxidación de los glúcidos reductores por el Reactivo de Nelson, en solución alcalina moderada, a temperatura de 100 °C durante 15 minutos. El complejo cúprico, en medio alcalino, es de color azul, pero en presencia del glúcido reacciona para formar  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Este precipitado rojizo, en frío y en medio ácido, reduce al Reactivo de Somogyi, formando productos de color verde azulado, la intensidad de color se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm.

La determinación de azúcares reductores se determinó utilizando los Reactivos de Nelson A, Nelson B y Somogyi y una solución patrón de glucosa (0,001 M) para la realización de la curva de calibrado. A continuación se detalla la composición de los reactivos mencionados.

El Reactivo de Nelson A fue preparado con carbonato de sodio anhidro (6,25 g), bicarbonato de sodio (5 g), tartrato de sodio y potasio (6,25 g), sulfato de sodio anhidro (36 g) y agua destilada, descarbonatada por ebullición (200 mL). Los primeros tres reactivos se disuelven en 175 mL de agua destilada, se agrega el tartrato y se completa hasta los 200 mL de agua.

El Reactivo de Nelson B se preparó con sulfato de cobre pentahidratado (4 g), sulfato de sodio anhidro (36 g), una gota de ácido sulfúrico concentrado y agua destilada (200 mL).

El Reactivo de Somogyi se preparó con molibdato de amonio (25 g) disuelto en 450 mL de agua, luego se incorporó ácido sulfúrico concentrado (21 mL) y posteriormente se incorporó el arseniato ácido de sodio (3 g), disuelto previamente en 25 mL de agua. Los tres reactivos preparados, se colocaron en botellas de vidrio color caramelo y se mantuvieron por 24 horas a 37 °C.

La curva de calibrado se realizó a partir de una solución patrón de glucosa 0,001 M. Se tomaron 0,1; 0,25; 0,5; 0,7 y 1 mL de la solución estándar, se colocaron en tubos de ensayo y se le añadió agua destilada hasta un volumen de 1 mL, posteriormente se le colocó 1 mL de reactivo de Nelson AB (preparado con 4 partes de Nelson A y una parte de Nelson B) y se llevaron a ebullición durante 15 minutos. Se retiraron, se dejaron enfriar y se les agregó 1 mL de reactivo de Somogyi y 7 mL de agua destilada a cada tubo. Luego se realizó la medición en un espectrofotómetro (Shimadzu Corporation UV-160A, UV-VIS). A continuación se presenta la recta de calibrado (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2:** Recta de calibrado de glucosa

| Nº | Glucosa (µg/mL) | Absorbancia | Recta de calibrado              |
|----|-----------------|-------------|---------------------------------|
| 1  | 18              | 0,102       | $Y = 5,6874x$<br>$R^2 = 0,9956$ |
| 2  | 45              | 0,320       |                                 |
| 3  | 90              | 0,530       |                                 |
| 4  | 126             | 0,726       |                                 |
| 5  | 180             | 1,045       |                                 |

La determinación de azúcares reductores en las muestras se realizó de la misma manera, tomando 1 mL de muestra y colocando los reactivos de la misma manera que para la recta de calibrado.

Los azúcares reductores se determinaron por la siguiente Ecuación (10):

$$\% \text{ Azúcares reductores} = \frac{[AzR]}{W} * f * 100 \quad (10)$$

[AzR] = µg de glucosa calculados a partir de la curva de calibrado.

*f* = factor de dilución de 1000

*W* = peso de la muestra en gramos, expresados en base seca.

- Acondicionamiento del sobrenadante:

Las fracciones líquidas obtenida durante los ensayos, además de azúcares liberados por hidrólisis enzimática, contiene otros componentes mayoritarios como aceite y proteínas, por lo tanto, el sobrenadante debió ser acondicionado previamente, para la determinación del contenido de azúcares reductores. El aceite fue separado con *n*-hexano en ampollas de decantación. Las proteínas fueron extraídas del líquido por precipitación con acetato de plomo neutro (solución saturada). Se agitó, se dejó descansar 15 minutos y se centrifugó. Se añadió suficiente Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro para precipitar todo el plomo presente, se centrifugó nuevamente y se verificó si todo el plomo precipitó. Luego del acondicionamiento, con el filtrado se procedió a realizar la técnica espectrofotométrica para determinar el contenido de azúcares reductores.

#### 2.1.3.7. Cuantificación de proteínas solubles

La cuantificación de la proteína de fracciones líquida obtenidas en los ensayos, se llevó a cabo por el método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) modificado por Peterson (1977).

El fundamento de esta técnica es la formación de un complejo coloreado con la proteína. El principio del método se basa en que ciertos aminoácidos como tirosina, triptófano y cisteína reaccionan en un medio alcalino con ácido fosfotungsténico y ácido molíbdico del reactivo de Folin (color amarillo) para dar un complejo incoloro que se puede reducir mediante una reacción lenta con fenol en un complejo de coloración azul

detectable por espectrofotometría entre 600 y 900 nm. Esta coloración se refuerza por el acomplejamiento de sulfato de cobre con los enlaces peptídicos de las proteínas.

Los reactivos utilizados fueron:

- Reactivo A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en NaOH 0,1 M (pesar 2 g de carbonato y adicionar 0,4 g de hidróxido de sodio y diluir a 100 mL con agua destilada)
- Reactivo B1:  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  al 1 % (1 g en 100 mL de agua destilada).
- Reactivo B2: tartrato sódico-potásico al 2 % (2 g en 100 mL de agua destilada).
- Reactivo C (Reactivo de Lowry): Se preparó, mezclando los reactivos: A, B1 y B2, en proporciones 50 : 0,5 : 0,5 (en volumen).
- Reactivo Folin-Ciocalteu: reactivo comercial diluido a 1:4 en agua, 10 mL de reactivo comercial y 40 mL de agua destilada (Biopack cod.0891.05)
- Solución patrón de albúmina de suero bovino (BSA) (concentración= 2mg/mL)

La técnica se realizó tomando 1 mL de sobrenadante y colocándolo en un tubo eEperdorf donde se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1N, se mezcló y se llevó a centrifuga refrigerada a 4 °C por 15 minutos. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se le agregó 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1N nuevamente. Este volumen (400  $\mu\text{L}$ ) se colocó en un tubo de precipitado donde se adicionaron 2 mL del Reactivo C (Lowry), se dejó 10 minutos reposar a temperatura ambiente y se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de Reactivo de Folin. Se dejó reposar por 30 minutos y se agitó antes de realizar la medición. La absorbancia se midió a 740 nm.

Se realizó una curva de calibrado con estándar de albúmina. Se tomaron 10; 20; 40; 80 y 120  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de Albúmica, se colocó en tubos de ensayos y a cada una de ellas NaOH de modo que el volumen final sea de 400  $\mu\text{L}$ . A este volumen se le adicionó el Reactivo de Lowry y el Folin en las mismas cantidades que para las muestras y con las mismas condiciones. Posteriormente se leyó la absorbancia a 750nm.

A continuación se presentan los resultados de la recta de calibrado (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3:** Recta de calibrado de albúmina

| Nº | Albúmina (µg/mL) | Absorbancia | Recta de calibrado               |
|----|------------------|-------------|----------------------------------|
| 1  | 50               | 0,126       | $Y = 0,00207x$<br>$R^2 = 0,9877$ |
| 2  | 100              | 0,233       |                                  |
| 3  | 200              | 0,442       |                                  |
| 4  | 300              | 0,592       |                                  |

#### 2.1.4. COMPONENTES MENORES EN EL ACEITE

##### 2.1.4.1. Determinación del contenido de tocoferoles

El contenido de tocoferoles se determinó por el método estándar externo, utilizando  $\alpha$ -tocoferol como referencia (AOCS, 2009).

La preparación de la muestra se realizó pesando 0,7-1,2 gramos de aceite en un matraz aforado de 10 mL y se llevó a volumen con fase móvil, homogeneizando la solución con ultrasonido. Los recipientes fueron envueltos en papel aluminio para protegerlos de la luz. Cada muestra se analizó por cromatografía líquida, para lo que se utilizó un equipo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Waters 600. La columna para la determinación debió ser acondicionada, circulando metanol durante 10 minutos a una velocidad de flujo de 1mL/min, luego diclorometano durante 10 minutos más, con el mismo flujo y por último n-hexano, en las mismas condiciones. Antes de las inyecciones se bombeó fase móvil durante media hora a 1mL/min.

La curva de calibrado se preparó con una solución patrón de  $\alpha$ -tocoferol con 10 mg diluidos en 100 mL de *n*-hexano. La concentración real de esta solución se determinó por espectrofotometría UV. Para ello se tomó una alícuota de 10 mL de la solución, se la colocó en un frasco color ámbar y se evaporó el solvente con una corriente de nitrógeno. Luego, se añadió 10 mL de metanol y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 292 nm en un espectrofotómetro UV (Shimadzu Corporation

UV-160A, UV-VIS). El valor obtenido se dividió por 0,0076, dando como resultado la concentración en µg/mL. A partir de la solución patrón se prepararon soluciones de diferentes concentraciones para realizar la curva. La Tabla 2.4 muestra la recta de calibrado. El intervalo donde se cumple la relación lineal con el detector de fluorescencia es 0,4-50 µg/mL.

**Tabla 2.4:** Recta de calibrado de tocoferoles

| Concentración (µg/mL) | Área  | Recta de calibración          |
|-----------------------|-------|-------------------------------|
| 9,88                  | 9298  | $Y = 1040x$<br>$R^2 = 0,9983$ |
| 18,11                 | 18829 |                               |
| 25,08                 | 26793 |                               |
| 36,23                 | 37251 |                               |
| 49,40                 | 51952 |                               |

Las condiciones de trabajo empleadas fueron las siguientes:

Columna: Lichrosorb SI-60, (250x4 mm), 5 µm de tamaño de partícula

Detector: Florescencia, λ 290 nm, λ de emisión: 330 nm

Fase móvil: Isopropanol:Hexano, 0,5:99,5 (v/v), filtrado y desgasificado.

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 10 µL

Procesador de datos: Empower 2

El contenido de tocoferoles presentes en el aceite, fue expresado en ppm y se calculó con la Ecuación (11):

$$\alpha - Toc = [\alpha - Toc] * \frac{V}{m} \quad (11)$$

Donde:

[α – Toc]: concentración de tocoferoles en ppm calculado a partir de la recta de calibrado.

V: volumen de la muestra en mL.

m: masa del aceite en gramos.



**2.1.4.2. Determinación del contenido de fosfolípidos**

Los fosfolípidos presentes en el aceite de collet de girasol se concentraron empleando cartuchos de extracción de fase sólida diol de 0,5 gramos (S.P.E). Se cuantificaron por el método del estándar externo mediante cromatografía líquida empleando detector UV (Carelli *et al.* 1997; AOCS, 2009).

Los cartuchos utilizados para la extracción de fosfolípidos, se acondicionaron mediante el pasaje de metanol (2 mL) cloroformo (2 mL) y *n*-hexano (4 mL), respetando el orden de agregado de los solventes. Los lípidos neutrales se extrajeron con 2,5 mL de cloroformo y fueron desechados. Los fosfolípidos fueron recogidos con 7 mL de una solución amoniacal con metanol (0,5 mL metanol en 100 mL de solución amoniacal al 25 %), en un recipiente de fondo cónico y subsecuentemente se eliminó el solvente bajo corriente de nitrógeno. Luego el concentrado se llevó a un volumen de 100  $\mu$ L con la fase móvil (fase empleada en el análisis cromatográfico).

La muestra se preparó pesando 1,25 g de aceite en matraz aforado de 5 mL y se llevó a volumen con cloroformo. De esta solución se tomó una alícuota correspondiente a 50-150 mg de aceite y se sembró en el cartucho, previamente acondicionado.

Los patrones de fosfolípidos utilizados para realizar las curvas de calibrado fueron: Fosfatidiletanolamina (PE- P-8193  $\geq$  98 %), Sal de sodio del ácido fosfatídico (AP- P-9511  $\geq$  98 %), Fosfatidilinositol (PI- P-6636  $\sim$ 50 %) y Fosfatidilcolina (PC- P-7443  $\geq$  98 %) de Sigma-Aldrich. Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones a partir de soluciones madres de cada fosfolípido, los cuales fueron pesados a la quinta cifra decimal y disueltos en fase móvil. Se tomaron alícuotas de cada solución madre, a fin de obtener disoluciones en el rango de 0,1 a 4 mg/mL. La Tabla 2.5 muestra las rectas de calibrado de cada patrón de fosfolípido.

**Tabla 2.5:** Recta de calibrado de fosfolípidos

| Fosfolípido | Area = $k * C$ (mg/mL) | R <sup>2</sup> |
|-------------|------------------------|----------------|
| PC          | 3,02x10 <sup>6</sup>   | 0,9913         |
| PE          | 2,94x10 <sup>6</sup>   | 0,9652         |
| PI          | 1,23x10 <sup>6</sup>   | 0,9824         |
| PA          | 1,19x10 <sup>6</sup>   | 0,9993         |

Los análisis cromatográficos se realizaron en un equipo HPLC Waters 600E (Waters Associates, Milford, MA, USA). El acondicionamiento de la columna requiere la estabilización de la línea de base. Para ello se hace circular fase móvil durante tres días con una velocidad de flujo de 0,2 mL/min. Las condiciones de trabajo empleadas fueron las siguientes:

- Columna: Nucleosil 50-5 (250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm, Macherey-Nagel)
- Detector UV: Water PDA 996 a 206 nm.
- Fase móvil: Hexano:Isopropanol:buffer acetato\*, 8:8:1 (v:v:v).
- Velocidad de flujo: 2 mL/min
- Volumen de inyección: 10 µL
- Procesador de datos: Empower 2

El contenido de fosfolípidos presentes en el aceite fue expresado como porcentaje en masa y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%PL = \frac{[PL]*V}{m} * 100 \quad (12)$$

donde:

[PL]: cantidad de fosfolípido en mg/mL determinado con la recta de calibración.

V: volumen de dilución en mL.

m: masa de la muestra colocada en el cartucho de extracción, expresada en mg.

#### **2.1.4.3. Determinación del contenido de ceras**

Las ceras se determinaron por el método de fraccionamiento del aceite al que se le ha añadido un patrón interno, mediante cromatografía de columna de gel de sílice hidratado, recuperación de la fracción eluída y análisis directo mediante cromatografía de gases de columna capilar (Carelli *et al.*, 2012).

Para desarrollar la cromatografía de columna de gel, se prepararon tres soluciones:

- *Solución I:* Esta solución fue utilizada para mejorar las condiciones del análisis cualitativo y la determinación de factores de respuesta. Se preparó pesando 10 mg de los estándares de C32 a C44 y se diluyeron con 10 mL de heptano (grado cromatográfico).
- *Solución II:* Esta solución fue empleada como estándar interno y se la añadió al aceite previamente a la cromatografía de columna. Se pesó 25 mg del estándar, laureato de araquidilo (Sigma L-0506 ~99 %) y se llevó a un volumen de 25 mL con *n*-hexano. De esta solución se tomaron 5mL y se llevó a 25 mL en matraz aforado.
- *Solución III:* Utilizada para visualizar la finalización de la elución de ceras en la cromatografía de columna. Se preparó una solución al 1 % en *n*-hexano del colorante Sudán I. El colorante Sudan I posee un frente de avance comprendido entre ceras y triglicéridos, que permitió visualizar la completa elución de las ceras.

El acondicionamiento de la sílica gel utilizada para la cromatografía de columna y para la elución se realizó llevando 15 g en cápsula de porcelana a 500 °C en mufla durante 4 horas. Luego se retiró, se dejó enfriar en desecador, se pesó y se le añadió el 2 % de su peso en agua, se agitó vigorosamente durante 15 minutos y se dejó en reposo por 12 horas antes de su uso.

La cromatografía de columna se llevó a cabo en una columna de vidrio de 15 mm de diámetro interior, 40 cm de longitud con robinete de teflón. En ella se colocaron aproximadamente 15-20 mL de *n*-hexano y se introdujo un tapón de algodón en el

extremo del robinete. Se suspendió 15 g de la sílica, previamente acondicionada, en *n*-hexano y se colocó en la columna con pequeños golpecitos para la eliminación de posibles burbujas de aire. La superficie de la sílica en la columna debió estar nivelada. Posteriormente se eluyeron 30 mL de *n*-hexano para eliminar posibles impurezas. Por otro lado se pesaron con exactitud 0,5 g de aceite, previamente calentado (a 80 °C, para disolver las posibles ceras precipitadas) y llevado nuevamente a temperatura ambiente. Se le añadió 500 µL de *Solución II* y una gota de *Solución III*. La muestra de aceite y acondicionada fue transferida a la columna con 2 mL de *n*-hexano. El disolvente se dejó fluir hasta que se situó en la fase absorbente de la columna. A continuación se inició la elución con *n*-hexano: éter etílico (98,5:1,5) libre de peróxidos, a una velocidad de flujo aproximado de 3 mL/min. Cuando la banda coloreada llegó a la parte inferior de la columna, el proceso de elución se consideró finalizado. El solvente de la solución eluída fue evaporado en evaporador rotatorio hasta un volumen de 2-3 mL, se trasvasó a un recipiente de base cónica y se llevó a sequedad en una corriente de nitrógeno y se le añadieron 500 µL de *n*-heptano.

Las condiciones de trabajo empleadas fueron las siguientes:

Cromatógrafo: Gas-Líquido, Clarus 580

Columna: HP-5, (15 m x 0,32 mm, espesor: 0,25 µm)

Detector: FID

Gas carrier: H<sub>2</sub> 3mL/min, presión en la cabeza de la columna: 8 psi

Inyector: "on-Column" (80-40 °C/min - 320)

Volumen de inyección: 2 µL

Programa de temperatura: 80 °C, 1'-20 °C/min hasta 240 °C, 5 °C/min hasta 325 °C 6 min, 20 °C/min hasta 340 °C, 27 min.

Procesador de datos: Total Chrom de PerkinElmer

### **2.1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS**

Las determinaciones analíticas sobre el aceite crudo fueron realizadas por triplicado, excepto las determinaciones cromatográficas (tocoferoles, fosfolípidos, y ceras) que se hicieron por duplicado, inyectando dos veces cada réplica en el cromatógrafo.

Los resultados se expresaron como valor medio  $\pm$  desvío estándar. Las diferencias entre los valores medios fueron consideradas significativas a valor  $p < 0,05$ , mediante ANOVA (Oneway Analysis of Variance), utilizando el ajuste del test de Tuckey calculado con el Software InfoStat, versión 2017, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (Di Renzo *et al.*, 2017)

Cabe aclarar que cuando se usa material desengrasado porque así lo requiere la técnica, como por ejemplo en el análisis de las proteínas y fibras estructurales, se aplica una corrección a fin de obtener un valor representativo de la muestra.

## **2.2. RESULTADOS Y DICUSIÓN**

La materia prima (collets de girasol) fue caracterizada según su contenido de humedad, aceite, proteína y fibras estructurales. Por otra parte, se determinó la composición de aceite de los collets, según su contenido de componentes menores, como tocoferoles, fosfolípidos y ceras.

### **2.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.**

Los collets presentaron un contenido de humedad de  $7,03 \pm 0,07$  %. El contenido de aceite fue de  $22,95 \pm 0,01$  %, este valor, se asimila a los obtenidos en la industria luego de la etapa de prensado, donde se extrae la mayor cantidad de aceite de las semillas (Dunford, 2012). El contenido de proteína bruta del collet fue de  $33,28 \pm 0,67$  %. El contenido de azúcares reductores fue de  $0,769 \pm 0,143$  %. La FDN fue de  $30,92 \pm 0,32$  % y la FDA de  $21,46 \pm 0,03$  %. Los porcentajes de celulosa, hemicelulosa fueron determinados por diferencias entre FDN y FDA y se presentan en la Tabla 2.6.

Todos los resultados de la composición, fueron expresados como porcentajes libres de humedad.

**Tabla 2.6:** Composición de fibras estructurales

| <b>Composición</b> | <b>% (b.s.)</b> |
|--------------------|-----------------|
| Celulosa           | 16,56 ± 0,05    |
| Hemicelulosa       | 9,47 ± 0,45     |
| Lignina            | 4,90 ± 0,16     |

En general, los resultados obtenidos presentan concordancia con los informados en estudios previos con collets de girasol realizados en el grupo de investigación (Tabla 2.7)

**Tabla 2.7:** Composición de collets de girasol, referencias.

| <b>Composición (%)</b>     | <b>Pérez et al. (2018)</b> | <b>Bäumler et al. (2016)</b> |
|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| <b>Aceite</b>              | 21,88 ± 0,32               | 22,8 ± 0,60                  |
| <b>Proteína bruta</b>      | 33,57 ± 0,30               | nd                           |
| <b>FDN</b>                 | 31,20 ± 0,54               | nd                           |
| <b>FDA</b>                 | 21,65 ± 0,17               | nd                           |
| <b>Azúcares reductores</b> | nd*                        | 0,42 ± 0,06                  |

\*No determinado

La capacidad de absorción de agua de los collets de girasol fue de 2,99 g agua/g collet, este resultado fue similar a los reportados para harina de soja (3,03 g/g), harina de canola (3,90 g/g) y harina de poroto (2,9 g/g) (Khattab y Arntfield, 2009; Narayana y Narasinga Rao, 1982). La capacidad de absorción de agua permitió definir la mínima relación sólido:líquido, utilizada para la extracción, asegurando una correcta agitación y una adecuada movilización de la enzima dentro del medio.

Los componentes minoritarios de los aceites fueron determinados por cromatografía como se mencionó más arriba. En la Tabla 2.8 se describe la composición del aceite en dichos componentes.

**Tabla 2.8:** Componentes minoritarios del aceite extraído con *n*-hexano de collets de girasol.

| COMPONENTES                |             |
|----------------------------|-------------|
| <b>Tocoferoles</b> (ppm)   | 510 ± 18    |
| <b>Fosfolípidos</b> (g/kg) | 4,62 ± 0,20 |
| <b>Ceras</b> (ppm)         | 1592 ± 110  |
| Ceras cristalizables (ppm) | 1228 ± 88   |

Estos valores fueron inferiores a los reportados por Pérez *et al.* (2018), para todos los componentes. Por otro lado, la composición de tocoferoles resultó similar a los reportados por Baümler *et al.* (2016), mientras que el contenido de ceras y fosfolípidos fueron considerablemente más bajos.

### 2.3. CONCLUSIONES

La caracterización de las muestras permitió aportar información sobre la composición de la matriz utilizada en las extracciones, respecto del contenido de aceite, contenido proteico, contenido de azúcares reductores y contenido de fibras estructurales, que resultaron ser los componentes mayoritarios de los collets de girasol. Los componentes mayoritarios en los collets, fueron concordantes a los informados previamente. Por otra parte, la caracterización del aceite de los collets permitió conocer la composición de componentes menores de las muestras.

Toda la información obtenida en la caracterización, será de utilidad para comparar los posibles cambios en la composición tanto de la matriz sólida como del aceite luego de los tratamientos y procesos realizados sobre la materia prima.

## **2.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Adney, B & Baker, J. (2008). Measurement of cellulase activities. Technical Report NREL/TP-510-42628. Laboratory Analytical Procedure (LAP).
- AOCS (2009). D. Firestone (Eds.). *Official Methods and Recommended Practices*, 6th. Edition, Champaign, Illinois, USA, AOCS Press.
- Bäumler, E. R., Carrín, M. E., & Carelli, A. A. (2016). Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 178, 190-197.
- Carelli, A.A., Bäumler, E.B. & Ceci, L.N. (2012). Improved method for the determination of wax esters in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114 (11), 1312-1319.
- Carelli, A.A., Brevedan, M.V. & Crapiste, G.H. (1997). Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74 (5), 511-514.
- Chen, J., Piva, M., & Labuza, T. (1984). Evaluation of water binding capacity (WBC) of food fiber sources. *Journal of Food Science*, 49(1), 59-63.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F, Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo C.W. (2017). InfoStat software version 2017, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Cordoba, Argentina.
- Dunford, N. T. (2012). *Food and industrial bioproducts and bioprocessing*. John Wiley & Sons.
- Guiragossian, V.Y., Van Scoyoc, S.W., & Auxtell, J.D. (1977). Chemical and biological methods for grain and forage sorghum. Department of Agronomy International Programs in Agriculture, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.
- Helrick, K. (1990). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists (AOAC).
- Khattab, R., & Arntfield, S. (2009). Functional properties of raw and processed canola meal. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6), 1119-1124.



- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Marais, J., De Wit, J., & Quicke, G. (1966). A critical examination of the Nelson-Somogyi method for the determination of reducing sugars. *Analytical Biochemistry*, 15(3), 373-381.
- Narayana, K., & Narasinga Rao, M. (1982). Functional properties of raw and heat processed winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) flour. *Journal of Food Science*, 47(5), 1534-1538.
- Paqueot, C., & Hautfenne, A. (1992) Section 1: Oleaginous seeds and fruits. En: *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). 7a ed. London: Blackwell Scientific. pag 13-16
- Pérez, E. E., Baümler, E.R., Crapiste, G.H. & Carelli, A.A. (2018). Effect of sunflower collets moisture on extraction yield and oil quality. *European Journal of Lipids Science and Technology*, 1-7.
- Peterson G.L. (1977). A Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 346-356.
- Van Soest, P. V., Robertson, J., & Lewis, B. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597.

# **CAPÍTULO 3**

## **EXTRACCIÓN ACUOSA ASISTIDA POR ENZIMAS**

En el presente capítulo se estudia la extracción acuosa asistida por enzimas de aceite de girasol a partir de collets. En primera instancia se propone la selección de variables operativas generales y el estudio del efecto de dichas variables a partir de un diseño de experimentos robusto. Posteriormente se propone un diseño de experimentos más amplio y detallado, incluyendo otras variables de proceso, con el fin de determinar su significancia e interacción entre las mismas. Las variables analizadas fueron: velocidad de agitación, temperatura, relación enzima: sustrato, tiempo de extracción y el efecto de sus interacciones. En dicho diseño de experimentos se plantean como variables de respuesta maximizar la extracción de aceite y minimizar el contenido de proteína liberada en la fracción líquida durante la extracción. Posteriormente se procede a determinar la combinación óptima de las condiciones de operación, mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) y se define un modelo optimizando ambas variables de respuesta, simultáneamente. A su vez se aporta información sobre la calidad del aceite luego del tratamiento en las condiciones óptimas.

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

Como se mencionó en el Capítulo I el interés por la extracción acuosa de aceite de semillas ha resurgido actualmente, debido a la intensificación en la búsqueda de tecnologías alternativas ambientalmente limpias. Al igual que otros solventes bio-renovables, el uso de agua como solvente de extracción resulta más económico y presenta diversas ventajas frente a la extracción con solventes convencionales, ya que podrían disminuir la contaminación ambiental, los costos de inversión y los requerimientos energéticos. Por otro lado, el proceso de extracción acuosa utiliza condiciones operativas más suaves que favorecen la producción de aceites y proteínas de mayor calidad y permite la recuperación simultánea de los mismos en la mayoría de las oleaginosas (Nyam *et al.*, 2009).

Debido a los bajos rendimientos obtenidos en la extracción acuosa, la aplicación de enzimas en este proceso extractivo de aceite se ha convertido en una propuesta tecnológica interesante destinada a reducir al mínimo el contenido de aceite de la materia prima (Ramadan y Moersel, 2009; Rosenthal *et al.*, 1996). La degradación de la pared celular de las semillas como resultado de un tratamiento enzimático exógeno permite la liberación más fácil de componentes contenidos en la matriz. Las células vegetales contienen aceite intracelular, por lo cual, el uso de enzimas en el proceso extractivo podría potenciar la extracción de aceite por acción hidrolítica de carbohidrasas y proteasas, que actúan sobre la pared celular, favoreciendo la liberación.

La extracción acuosa-enzimática (EAE) ha sido utilizada en varios granos como soja, semillas de melón, semillas enteras de sésamo, semillas de girasol enteras o molidas (0,75mm-1,00mm), harina de mostaza, colza, entre otros; en todos los casos se han obtenidos mayores rendimientos que con la extracción acuosa simplemente (Mat Yusoff *et al.*, 2015). El tipo de enzimas empleada depende de la composición celular y de la estructura del material oleaginoso (Mat Yusoff *et al.*, 2015). Latif y Anwar (2009) reportaron los mayores rendimientos en la extracción acuosa-enzimática de semillas de girasol con Viscozyme® L., un complejo multienzimático compuesto principalmente por

carbohidrasas. Si bien el conocimiento de las enzimas, su modo de acción y las condiciones para una actividad óptima son esenciales para un uso eficiente, las condiciones de proceso para obtener la máxima recuperación de aceite también resultan indispensables. En el proceso de extracción acuoso-enzimático, la acción de las enzimas no solo depende de factores como pH, temperatura, relación enzima: sustrato, tiempo de hidrólisis, velocidad de agitación y tamaño de partícula, sino también de las interacciones entre dichos factores. Para un mismo grano, la eficiencia enzimática puede ser diferente, según el estado de la matriz (molida, entera o extrusada) lo cual sumado al comportamiento de las variables afectará el rendimiento de la extracción (Perez *et al.*, 2013).

La calidad y la estabilidad tanto del aceite como de las harinas de extracción son los principales factores en la producción, aceptabilidad y comercialización de los productos de extracción. Estas propiedades dependen principalmente de la calidad de la semilla, los pre-tratamientos que reciben y de las condiciones de procesamiento para la extracción de aceite. La calidad del aceite puede estar influenciada por componentes menores tales como ácidos grasos libres, trazas de metales, tocoferoles, fosfolípidos y ceras (Brevedan *et al.*, 2000). Mientras que la calidad de la harina está dada por su elevado contenido de proteínas vegetales, de las cuales, las principales son las albúminas y las globulinas.

La extracción acuosa-enzimática de aceite a partir de semilla de girasol molida y descascarada total o parcialmente ha sido estudiada por varios autores. Dominguez *et al.* (1995) estudiaron la extracción acuosa de semilla de girasol descascarada (kernels con un contenido de aceite de 66 % b.s.) y tratada con una mezcla de celulasa y pectinasa, obteniendo recuperaciones del 40 % para el material sin tratar y del 50-70 % para el material tratado enzimáticamente. Sineiro *et al.* (1998) utilizaron semilla parcialmente descascarada (con un contenido de aceite del 53,4 % b.s.) obteniendo recuperaciones de 4 a 35,6 % dependiendo de las condiciones. Latif y Anwar (2009) utilizaron semilla descascarada y estudiaron el efecto de distintos tratamientos

enzimáticos, obteniendo rendimientos de 26,6 a 39,7 % (el máximo con Viscozyme L) comparado con 18,3 % para la extracción acuosa sin tratamiento y 45,5 % para la extracción con hexano. Danzo-Boateng (2011) también utilizó semilla descascarada y el complejo enzimático Viscozyme® L, reportando una recuperación del 61,5 % del aceite extraíble y un 28,8 % en el caso de extracción acuosa sin tratamiento enzimático.

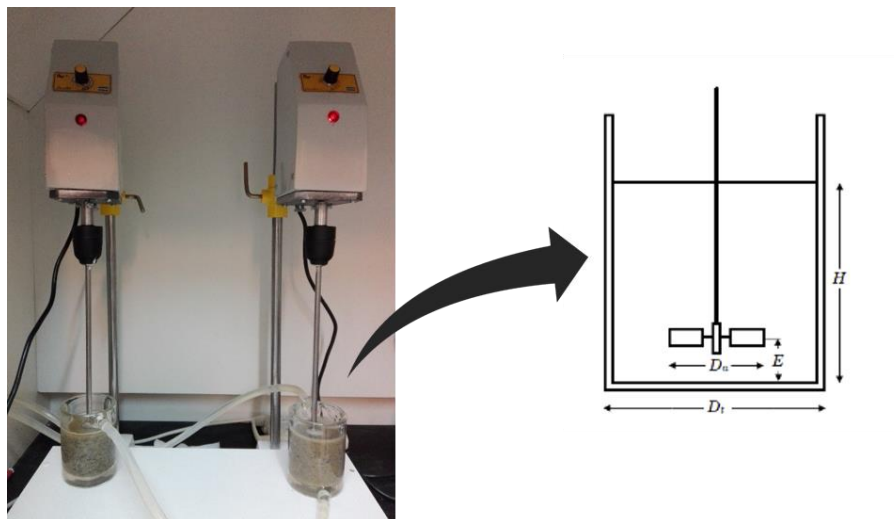
Por otra parte, la extracción acuosa enzimática de aceite a partir de collets de girasol no ha sido suficientemente estudiada. Solo Campbell *et al.* (2015) estudiaron la extracción acuosa a partir de harina de girasol sin descascarar y previamente extrusada (con un contenido de aceite de 20,6 % b.s.), tratadas con una proteasa y/o una celulasa y obtuvieron rendimientos en el rango 20-40 % para el aceite extraído y 54-85 % para la proteína solubilizada. Como se mencionó anteriormente, los collets constituyen una corriente industrial de semilla acondicionada, parcialmente descascarada, pretratada y sometida a extracción por prensado, que se alimenta al proceso de extracción por solvente. Considerando un contenido de aceite en la semilla del 48 % b.s., un descascarado parcial a la mitad del contenido inicial (22-25 %) y un contenido de aceite en los collets de 22-23 % b.s., se obtiene que alrededor del 75 % del aceite puede ser extraído por prensado. Este valor ya es superior a las recuperaciones obtenidas con extracción acuosa enzimática a partir de semillas, por lo que la combinación de ambos procesos puede dar mejores rendimientos. En consecuencia, resulta de interés considerar el uso de enzimas solo en la extracción por solvente, para permitir el reemplazo del *n*-hexano por otros disolventes amigables con el medioambiente.

## **3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **3.2.1. EXTRACCIÓN A ESCALA LABORATORIO**

Los ensayos de extracción se llevaron a cabo en recipientes de vidrio, con camisa calefaccionada mediante un baño de circulación de agua termostatzada y agitado con un impulsador a varilla tipo hélice montado verticalmente y centrado (Figura 3.1). Los parámetros geométricos del sistema fueron: diámetro del tanque (Dt),

6,7 cm; diámetro de la hélice ( $D_a$ ), 4 cm; altura del líquido ( $H$ ), 6,5 cm; distancia de la hélice al fondo del tanque ( $E$ ), 1,7 cm.

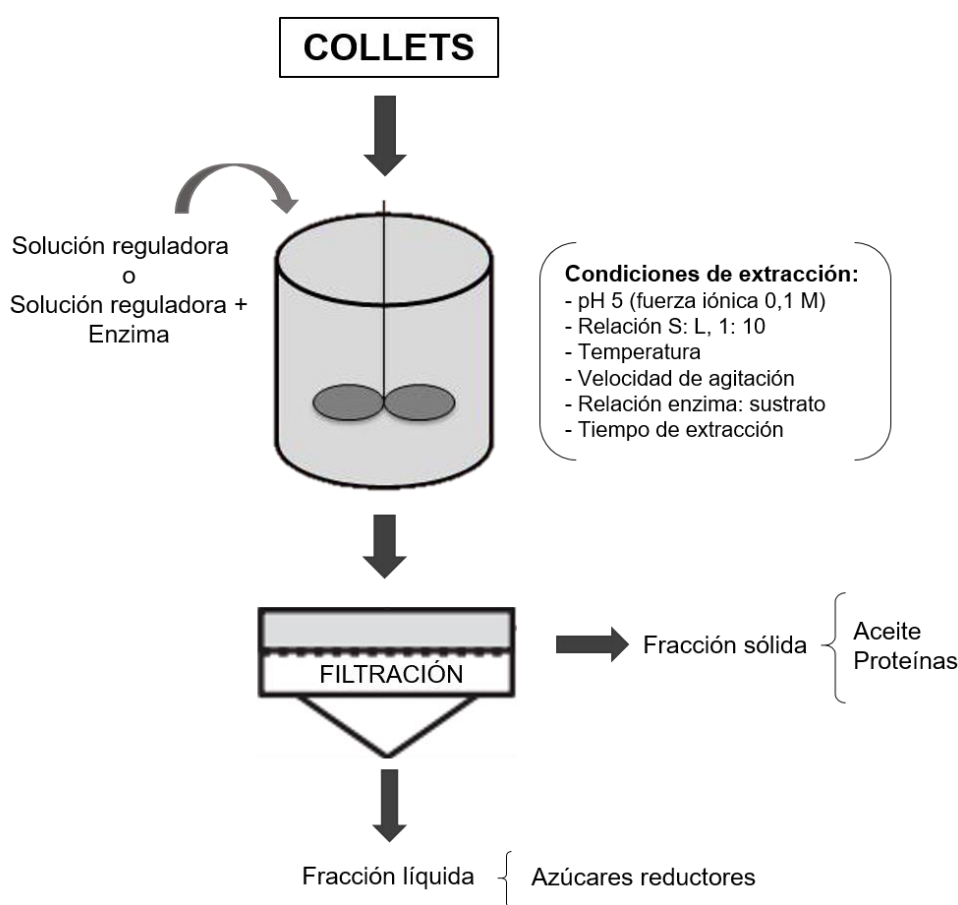


**Figura 3.1:** Sistema de extracción *batch* y su esquema:  $D_t$ : diámetro del recipiente,  $D_a$ : diámetro de la hélice,  $H$ : altura del líquido,  $E$ : distancia de la hélice al fondo del recipiente.

La solución reguladora (pH: 5-5.8; fuerza iónica 0,1 M) correspondiente a la utilizada en cada experiencia se colocó en los recipientes y se la llevó a la temperatura de extracción, antes del ensayo. Posteriormente se incorporaron los collets (muestra) y la enzima. Los collets fueron suspendidos en la solución reguladora, en una relación solución reguladora:sólido (L:S) de 10:1 (mL/g). La elección de esta relación estuvo supeditada a la capacidad de absorción de agua de la muestra (Capítulo 2, sección 2.1.3.5) y los valores sugeridos por la literatura consultada (Latif y Anwar, 2009). Mientras que la relación enzima:sustrato utilizada fue definida en cada ensayo, el valor de pH y la relación L:S se mantuvieron constantes en todos los experimentos. Tanto la muestra como la solución reguladora y la enzima fueron atemperadas a la temperatura de trabajo antes de ponerlas en contacto en cada experiencia.

El dispositivo que se describió anteriormente se empleó en todos los experimentos adecuando las condiciones operativas a las requeridas para cada caso.

Después del tiempo de extracción preestablecido, el sólido fue separado de la fase líquida por filtración bajo vacío, empleando un embudo Büchner, conteniendo papel de filtro Whatman N° 4. La fracción sólida se secó a 45 °C durante 8 horas en un horno de aire forzado y la fracción líquida se recogió y se refrigeró a 4 °C hasta su uso posterior. La Figura 3.2 muestra un esquema general de extracción, donde se detallan las condiciones de extracción que permanecieron constantes a lo largo de todas las experiencias mientras que las variables solo se mencionan en forma genérica.



**Figura 3.2:** Esquema general de la extracción acuosa y acuosa-enzimática

### 3.2.2. RENDIMIENTO DE ACEITE Y PROTEÍNA EXTRAÍDA

Las respuestas analizadas fueron porcentaje de aceite y proteína extraídos. El análisis se llevó a cabo en la fase sólida, y las cantidades extraídas de los componentes se calcularon a partir de la diferencia entre las cantidades originalmente presentes en

los collets y la cantidad restante en la fase sólida después de la extracción. La determinación se llevó a cabo en la fase sólida para disminuir el error experimental.

La relación de rendimiento de aceite y la relación de proteína liberada se expresaron como el porcentaje del componente extraído de la extracción acuosa-enzimática en relación con la cantidad total originalmente presente en los collets.

$$Y = \frac{(m_o - m_r)}{m_o} * 100 \quad (13)$$

donde:

$Y$ : rendimiento relativo porcentual,

$m_o$ : masa de aceite o proteína presente en el collet,

$m_r$ : masa de aceite o proteína remanente en el collet después del tratamiento.

Los valores del rendimiento relativo porcentual de aceite se expresa como  $Y_a$  y el rendimiento relativo porcentual de proteínas como  $Y_p$ .

### 3.2.3. AZÚCARES REDUCTORES EN LA FRACCIÓN LÍQUIDA

El contenido de azúcares reductores en la fase líquida fue determinado de acuerdo con el método de Somogyi-Nelson por espectrofotometría a 540 nm, utilizando D-glucosa como estándar (capítulo 2, sección 2.1.3.6) y fue expresado en mg por mL de fracción líquida.

El estudio de este componente en la fracción líquida podría ser considerado como parámetro de la actividad de la enzima frente al sustrato, considerando que cuanto mayor sea el contenido de azúcares en el líquido, el efecto de la enzima sobre las fibras estructurales, podría ser mayor.



### 3.2.4. EXTRACCIÓN A ESCALA PILOTO

Luego de determinar un punto óptimo durante el desarrollo de un diseño de experimentos ampliado, se decidió realizar una extracción a mayor escala, la cual se llevó a cabo en un reactor a escala piloto de 6 L de capacidad (Figura 3.3).

Los parámetros geométricos del sistema fueron: diámetro del tanque ( $D_t$ ), 25 cm; diámetro de la hélice ( $D_a$ ), 10 cm; altura del líquido ( $H$ ), 30 cm; distancia de la hélice al fondo del tanque ( $E$ ), 10 cm. El reactor al igual que los utilizados a escala laboratorio fueron termostatzados y con agitación constante.



**Figura 3.3:** Extracción acuosa-enzimática a escala piloto

## 3.3. SELECCIÓN DE CONDICIONES OPERATIVAS GENERALES

### 3.3.1. SELECCIÓN DE FACTORES

El rendimiento de la extracción acuosa-enzimática está influenciado por múltiples variables, la determinación de los efectos individuales y la combinación de los mismos son temas ya estudiados, sin embargo las condiciones mencionadas por los autores, presentan una amplia variabilidad. En la Tabla 3.1 se detallan las condiciones utilizadas en investigaciones anteriores para girasol.

Según los antecedentes mencionados y considerando otros estudios realizados en granos como soja, se decidió seleccionar las tres variables operativas más versátiles.

Dichas variables fueron: relación enzima:sustrato, tiempo de extracción y tipo de solución reguladora.

**Tabla 3.1:** Condiciones utilizadas en investigaciones anteriores para girasol.

| Referencia                     | E:S         | Velocidad de agitación | Temperatura | Solución reguladora | Tiempo de incubación |
|--------------------------------|-------------|------------------------|-------------|---------------------|----------------------|
| Dominguez <i>et al.</i> (1995) | 0,5 – 4 %   | 200 rpm                | 50 °C       | Agua, ajuste de pH  | 2- 3 h               |
| Sineiro <i>et al.</i> (1998)   | 0,5- 2 %    | 150 rpm                | 50 °C       | Citrato             | 1-3h                 |
| Campbell <i>et al.</i> (2016)  | 0,02-0,04 % | 160-300 rpm            | 50 °C       | Agua, ajuste de pH  | -                    |
| Danso-Boateng (2011)           | 10 %        | 150 rpm                | 50 °C       | Citrato             | 24 h                 |
| Latif y Anwar (2009)           | 0,5-2 %     | 120 rpm                | 45 °C       | Agua, ajuste de pH  | 2 h                  |
| Pérez <i>et.al.</i> (2013)     | 2 %         | 200 rpm                | 50 °C       | -                   | 2 h                  |
| Latif (2009)                   | 0,5-2,5 %   | -                      | -           | Agua, ajuste de pH  | 1-3 h                |

El tipo de solución reguladora fue seleccionado como variable ya que la mayoría de los antecedentes mencionados para semillas de girasol utilizan un ajuste de pH a lo largo de la incubación con NaOH o HCl cuando sea necesario, sin embargo la necesidad de mantener el pH constante es fundamental, ya que el mismo puede influir tanto en la fijación del sustrato como en la catálisis, en algunos casos también en la estabilidad y solubilidad del soluto (Rosenthal *et al.*, 1996; Tabatabaei y Diosady, 2013). Para esta variable se seleccionaron las tres soluciones reguladoras más utilizadas en extracción acuosa-enzimática para diferentes granos (Campbell, 2010; Li *et al.*, 2016; Moreau *et al.*, 2004) las cuales fueron citrato, fosfato y acetato. En el caso del tiempo y relación E:S, el intervalo seleccionado fue de 1 a 3 horas de extracción y 1:20 a 1:5, respectivamente, abarcando el intervalo más amplio posible de acuerdo con los antecedentes mencionados en la Tabla 3.1.

### 3.3.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS: METODOLOGÍA TAGUCHI

Se optó por utilizar la metodología TAGUCHI para determinar la combinación de los niveles de las variable seleccionadas, sin que las fuentes de variación (o ruido) no controladas puedan afectar el proceso (Montgomery, 1991; Pulido *et al.*, 2012). El principal objetivo de elegir un diseño robusto fue obtener la mejor respuesta en los experimentos, donde existen factores de ruidos (no controlables), cuyo efecto se pretende minimizar de forma indirecta. Para ello, se utilizó un diseño experimental L<sub>9</sub> de Resolución IV (Tabla 3.2.), esto indica que los factores no son confundidos entre sí ni tampoco con interacciones entre los mismos (Fernández *et al.*, 2014).

**Tabla 3.2:** Arreglo ortogonal L<sub>9</sub>

| N° de Experimento | Niveles de factores |   |   |   |
|-------------------|---------------------|---|---|---|
|                   | A                   | B | C | D |
| 1                 | 1                   | 1 | 1 | 1 |
| 2                 | 1                   | 2 | 2 | 2 |
| 3                 | 1                   | 3 | 3 | 3 |
| 4                 | 2                   | 1 | 2 | 3 |
| 5                 | 2                   | 2 | 3 | 1 |
| 6                 | 2                   | 3 | 1 | 2 |
| 7                 | 3                   | 1 | 3 | 2 |
| 8                 | 3                   | 2 | 1 | 3 |
| 9                 | 3                   | 3 | 2 | 1 |

El diseño requiere de nueve experimentos, con sus respectivos duplicados y aunque no tiene suficientes grados de libertad para estudiar las interacciones del sistema, requiere un bajo número de experimentos que permiten definir variables operacionales. Las interacciones entre factores, podrían ser analizadas solo si se utiliza una matriz ortogonal con un mayor número de experimentos, pero en este caso se reducirían las ventajas de la metodología.

Las variables fueron tipo de solución reguladora, relación enzima: collets (sustrato) y tiempo de extracción, a lo largo del texto serán mencionadas como factores.

Dichos factores fueron asignados en las columnas B, C y D para la matriz TAGUCHI, la columna A no fue considerada para obtener un diseño de Resolución IV. En la Tabla 3.3 se detallan los factores y niveles utilizados en el diseño de experimentos.

**Tabla 3.3:** Factores y niveles de experimentación.

| Niveles | Solución Reguladora (B) | Relación E:S (C) | Tiempo de extracción (h) (D) |
|---------|-------------------------|------------------|------------------------------|
| 1       | Acetato                 | 1:5              | 1                            |
| 2       | Citrato                 | 1:10             | 2                            |
| 3       | Fosfato                 | 1:20             | 3                            |

La extracción asistida por enzimas, se llevó a cabo con la combinación de factores descripta en el arreglo ortogonal  $L_9$ . En todas las experiencias se realizaron “blancos de enzima” en las mismas condiciones de reacción que en la extracción acuosa-enzimática agregando el mismo volumen de buffer sin enzima. Estas extracciones fueron consideradas como extracción acuosa.

### 3.3.3. EVALUACIÓN DE FUENTES DE VARIACIÓN

La metodología utilizada propuesta por TAGUCHI fue el estadístico señal-ruido (SR) que se calcula en cada combinación de factores (Montgomery, 1991; Pulido *et al.*, 2012). El término “señal” representa el valor deseado o valor medio para las respuestas y el término “ruido” representa el valor no deseado (que puede ser interno o externo a cada experimento). La combinación más robusta entre los niveles de los factores controlables es aquella que puede maximizar el estadístico señal-ruido (SR). El tipo de característica elegida fue una respuesta de “cuanto más grande es mejor”, definida por el estadístico.

El valor de SR para cada experimento se analizó como cualquier variable de respuesta, donde el valor de SR se obtuvo con la ecuación 14:

$$SR = -10 * \log \left[ \frac{\sum_{k=1}^n 1/X_{k^2}}{n} \right] \quad (14)$$

donde

$SR$ : relación Señal-ruido

$X_k$ : respuesta obtenida experimentalmente

$n$  : número de mediciones para cada experimento

$k$  : número de repeticiones

El uso del logaritmo en la ecuación tiene que ver con minimizar la posibilidad de efectos de interacción entre los factores. La multiplicación por 10 permite trabajar en una escala más grande y el signo antecesor se escoge de acuerdo a si la necesidad es maximizar o no el valor estadístico para obtener operaciones más robustas (Pulido *et al.*, 2012).

Debido a la sugerencia de un modelo de “no interacciones”, el efecto de cada factor analizado  $i$  (factor) en  $SR$  puede ser encontrado comparando las respuestas promedio ( $M_{ij}$ ), obtenidas a diferentes niveles ( $j$ ):

$$M_{ij} = \frac{\sum SR_{ij}}{\sum j} \quad (15)$$

Las respuestas promedios ( $M_{ij}$ ) fueron analizadas con ANOVA y Test de Tuckey en todos los casos. A partir de ello y basado en la característica “cuanto más grande es mejor” mencionada previamente, se eligió el valor más alto de  $SR$  para los factores que resultaron significativos en el análisis de varianza.

#### 3.3.4. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO

La optimización del modelo se realizó con el cálculo de la respuesta predicha ( $SR_{pr}$ ) basado en la respuesta promedio global ( $\overline{SR}$ ) y las respuestas promedio ( $M_{ij}$ ) de cada factor significativo, considerando como se mencionó previamente, la característica

“mientras más grande es mejor”. Cuando los tres factores están en su menor nivel la respuesta predicha ( $SR_{pr}$ ) se calcula según la Ecuación (16):

$$SR_{pr} = \overline{SR} + (M_{B1} - \overline{SR}) + (M_{C1} - \overline{SR}) + (M_{D1} - \overline{SR}) + error \quad (16)$$

El valor de  $\overline{SR}$  surge de la media global del diseño y es la respuesta promedio global de los nueve ensayos llevados a cabo. El valor de  $\overline{SR}$  se obtuvo del promedio de todos los valores de ( $M_{ij}$ ). La Ecuación 16 representa el modelo predicho.

Para validar el modelo se realizó un experimento adicional (experimento N °10), se decodificó  $SR_{pr}$  y se comparó con el óptimo obtenido en el experimento N °10. Si el modelo concuerda con el resultado experimental, la suposición de “no interacciones” puede ser considerada correcta.

### **3.4. RESULTADOS Y DICUSIÓN**

#### **3.4.1 EXTRACCIÓN ACUOSA VS EXTRACCIÓN ACUOSA ENZIMÁTICA**

La extracción acuosa-enzimática se realizó según el diseño propuesto (Tabla 3.2). La Tabla 3.4 muestra los resultados obtenidos experimentalmente, para extracción acuosa y extracción acuosa-enzimática. En ella se puede observar la diferencia entre ambos procesos según la combinación de niveles de experimentación propuestos por el diseño  $L_9$  de TAGUCHI (Tablas 3.2. y 3.3).

Los resultados de la extracción acuosa, presentaron rendimientos muy bajos y del mismo orden para los nueve experimentos, con una variación de un 2,74 % (b.s) entre el valor mínimo y el máximo. Sin embargo, presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p < 0,001$ ). Estos valores son muy pequeños en comparación a los rendimientos reportados para extracción acuosa a partir de semillas de girasol, entre 20 y 40 % dependiendo del material y de las condiciones (Danso-Boateng, 2011; Dominguez *et al.*, 1995; Sineiro *et al.*, 1998). Pero los resultados no son comparables

debido a la mayor disponibilidad y extractabilidad del aceite presente en la semilla, mientras que los collets retienen la fracción de aceite no extraído por prensado.

La extracción acuosa-enzimática para los nueve experimentos realizados, resultó más eficiente que la extracción acuosa sin el uso de enzimas, entre 2 y 3 veces mayor, de modo que el tratamiento enzimático mejora significativamente la extracción. Aun así, los rendimientos obtenidos en ambos casos resultaron ser muy bajos comparados con una extracción convencional con *n*-hexano (94-97 %). Esto puede ser explicado por la polaridad del solvente, ya que cuando se utiliza *n*-hexano como solvente, éste se difunde por la matriz para solubilizar el aceite formando una miscela. En el caso de la extracción acuosa, el aceite no puede ser solubilizado en el agua, sino que el agua solubiliza otros componentes que difunden en el medio para permitir el pasaje del aceite (Rosenthal *et al.*, 1996). Este mecanismo indirecto de extracción, resulta menos eficiente.

**Tabla 3.4:** Porcentajes relativos de aceite extraído ( $Y_a$ ) en la extracción acuosa y acuosa-enzimática según el diseño TAGUCHI.

| N° Experimento | $Y_a$                      |                           |
|----------------|----------------------------|---------------------------|
|                | Acuosa                     | Acuosa-enzimática         |
| 1              | 3,87 ± 0,12 <sup>bc</sup>  | 10,21 ± 0,02 <sup>b</sup> |
| 2              | 4,31 ± 0,08 <sup>cd</sup>  | 10,72 ± 0,01 <sup>b</sup> |
| 3              | 2,94 ± 0,26 <sup>ab</sup>  | 10,12 ± 0,16 <sup>b</sup> |
| 4              | 2,74 ± 0,09 <sup>a</sup>   | 8,49 ± 0,64 <sup>a</sup>  |
| 5              | 3,38 ± 0,26 <sup>abc</sup> | 13,95 ± 0,08 <sup>c</sup> |
| 6              | 2,53 ± 0,30 <sup>a</sup>   | 12,55 ± 0,06 <sup>c</sup> |
| 7              | 2,91 ± 0,00 <sup>ab</sup>  | 9,42 ± 0,89 <sup>ab</sup> |
| 8              | 3,45 ± 0,52 <sup>abc</sup> | 8,25 ± 0,01 <sup>a</sup>  |
| 9              | 5,27 ± 0,00 <sup>d</sup>   | 9,72 ± 0,13 <sup>ab</sup> |

Valores para el mismo factor en la misma columna seguido de misma letra no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por el Test de Tuckey.

Estos rendimientos son también más bajos que los publicados para una extracción acuosa-enzimática de harina de girasol previamente extrusada (Campbell *et*

*et al.*, 2016), aunque debe tenerse en cuenta que en este caso también se utilizó una proteasa para solubilizar y recuperar las proteínas.

Además, hay otros factores no considerados que pueden afectar o limitar la acción de las enzimas, reduciendo la eficiencia del tratamiento enzimático. Uno de ellos es el tamaño de partícula, ya que una reducción del mismo permite un tratamiento y una extracción más eficientes. En estudios con semillas de girasol se han utilizado tamaños de partícula relativamente pequeños, menores a 0,75 mm (Dominguez *et al.*, 1995) o en el rango 0,75-1 mm (Danso-Boateng, 2011; Sineiro *et al.*, 1998) por considerarlos óptimos para favorecer la acción enzimática y la difusión del solvente en la extracción. La harina que forma los collets tiene un tamaño de partícula mayor, en el rango 1 a 3 mm, y un promedio de 1,8 mm.

Otro factor es la presencia de cáscara en los collets. La cáscara tiene un bajo contenido de aceite (menor al 5 %) y un contenido muy alto de fibra compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina; pero puede tener adherida parte de la pepa. Para semilla de girasol parcialmente descascarada Sineiro *et al.* (1998) obtuvieron rendimientos inferiores a los reportados en un estudio previo para semilla sin cáscara (Dominguez *et al.*, 1995). Esto puede ser atribuido en parte a la alta lignificación de la cáscara que limita el contacto de la enzima con el sustrato, y además el complejo lignina-celulosa puede actuar como agente inactivante (Sineiro *et al.*, 1998).

Finalmente, otro factor puede ser el efecto del tratamiento térmico y el prensado industrial previo sobre la estructura de los collets. Se ha observado que tanto los tratamientos térmicos (Danso-Boateng, 2011) como la extrusión en caliente (Campbell *et al.*, 2016) producen una disrupción de la estructura celular de los cotiledones, así como desnaturalización de los cuerpos proteicos, liberando los cuerpos lipídicos (de modo que el aceite se encuentra en gotas ocluidas dentro de las células dañadas y en los espacios vacíos de la estructura celular) y haciendo la estructura más permeable al solvente. Teniendo en cuenta que el tratamiento enzimático causa efectos similares, en estos casos su efecto puede ser más reducido. De hecho, Danso-Boateng (2011) no



obtuvo mejores rendimientos cuando combinó pretratamiento térmico y tratamiento enzimático en la extracción acuosa a partir de semilla de girasol. En cambio, Campbell *et al.* (2016) reportaron un efecto importante del tratamiento enzimático sobre la extracción acuosa en harina de girasol sometida previamente a extrusión en caliente.

### 3.4.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES OPERATIVAS

Las condiciones óptimas de cada factor se determinaron utilizando como respuesta los valores de *SR* para cada experimento. En la Tabla 3.5 se muestran los valores de *SR* calculados utilizando la Ecuación (14) presentada en la Sección 3.3.3, asociados con el rendimiento porcentual relativo de aceite y el contenido de azúcares obtenido en cada ensayo, de acuerdo al diseño experimental propuesto.

**Tabla 3.5:** Valores de *SR* asociados al rendimiento porcentual relativo de aceite y contenido de azúcares.

| Experimento | Señal-Ruido |                       |
|-------------|-------------|-----------------------|
|             | $Y_a$       | Contenido de azúcares |
| 1           | 20,18       | 27,52                 |
| 2           | 20,61       | 25,99                 |
| 3           | 20,20       | 19,79                 |
| 4           | 19,01       | 25,58                 |
| 5           | 22,85       | 20,04                 |
| 6           | 21,95       | 19,89                 |
| 7           | 20,04       | 19,82                 |
| 8           | 18,33       | 26,75                 |
| 9           | 19,83       | 18,31                 |

A partir de los valores de señal ruido, se calculó la respuesta promedio ( $M_{ij}$ ) para realizar los análisis de varianza. Se presenta a continuación un ejemplo de cálculo para el factor B (Solución reguladora citrato) al nivel 2 en la respuesta rendimiento de aceite, utilizando la Ecuación (15), donde  $M_{ij}$  se obtuvo de los valores de *SR* de los

experimentos E2, E5 y E8 (en los tres casos se utilizó buffer citrato, con una relación E:S y un tiempo de 1:10-2 h; 1:20-1 h y 1:5-3 h, respectivamente).

$$M_{C2} = \frac{20,61+22,85+18,33}{3} = 20,59$$

En las Tablas 3.6 y 3.7 se muestran las respuestas promedio de los parámetros obtenida en los diferentes niveles. Como se mencionó previamente, un valor elevado de SR indica una mejor respuesta, de esta manera se puede determinar la combinación óptima de los niveles de los factores de control, considerando solo los factores significativos obtenidos a partir del análisis de varianza.

**Tabla 3.6:** Respuesta promedio ( $M_{ij}$ ) de los factores de control en cada nivel para el rendimiento porcentual relativo de aceite

| <b>Nivel</b> | <b>B</b>           | <b>C</b>                  | <b>D</b>                  |
|--------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>1</b>     | 19,74 <sup>a</sup> | 20,15 <sup>a</sup>        | <b>20,96 <sup>a</sup></b> |
| <b>2</b>     | 20,59 <sup>a</sup> | 19,81 <sup>b</sup>        | 20,87 <sup>a</sup>        |
| <b>3</b>     | 20,66 <sup>a</sup> | <b>21,03 <sup>c</sup></b> | 19,17 <sup>b</sup>        |

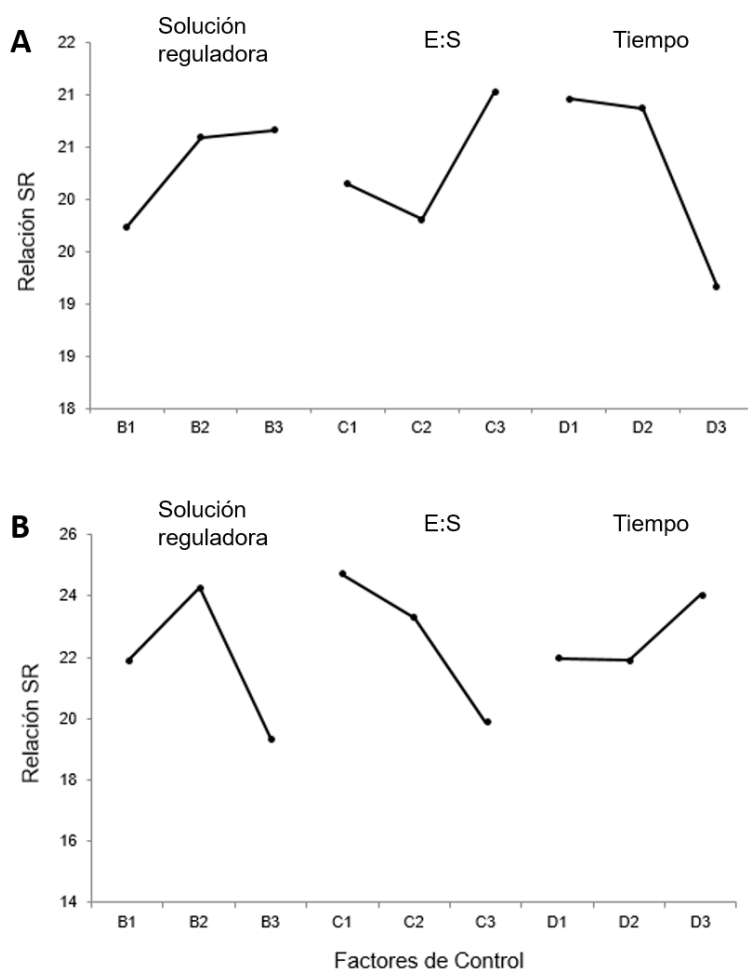
Valores para el mismo factor en la misma columna seguido de misma letra no son significativamente diferentes ( $p<0.05$ ) por el Test de Tuckey.

**Tabla 3.7:** Respuesta promedio ( $M_{ij}$ ) de los factores de control en cada nivel para el contenido de azúcares.

| <b>Niveles</b> | <b>B</b>                  | <b>C</b>                  | <b>D</b>           |
|----------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|
| <b>1</b>       | 21,88 <sup>a</sup>        | <b>24,72 <sup>a</sup></b> | 21,96 <sup>a</sup> |
| <b>2</b>       | <b>24,26 <sup>b</sup></b> | 23,29 <sup>b</sup>        | 21,90 <sup>a</sup> |
| <b>3</b>       | 19,33 <sup>c</sup>        | 19,88 <sup>c</sup>        | 24,04 <sup>a</sup> |

Valores para el mismo factor en la misma columna seguido de misma letra no son significativamente diferentes ( $p<0.05$ ) por el Test de Tuckey.

Los datos mostrados en las Tablas 3.6 y 3.7 de los efectos de los tres factores de control con sus niveles correspondientes se muestran en la Figura 3.4 A y B.



**Figura 3.4:** Efecto de la relación SR los factores de control para (A) rendimiento relativo porcentual de aceite y (B) contenido de azúcares liberados en la fracción líquida.

Cuando se analizó el rendimiento de aceite se observó que la relación enzima:sustrato 1:20 en el menor tiempo de extracción (1 hora), presentó la mejor respuesta ( $p < 0,0001$ ) en ambos casos. Esta combinación se consideró la óptima en el intervalo de factores estudiados. El factor buffer no resultó significativo ( $p = 0,064$ ), este efecto se puede observar en la variación mínima de los valores de SR presentados en la Tabla 3.6 y sugiere que el factor B no afecta la extracción de aceite.

Según la optimización del diseño de experimentos, se observó que la menor concentración de enzima en el medio de extracción fue el óptimo para obtener un mayor rendimiento de aceite. Para semillas de girasol utilizando Viscozyme® L. en la extracción

acuosa asistida por enzimas, se informó que a valores superiores al 1 % la eficiencia de la enzima disminuyó y consideran que dicha disminución podría estar dada por la naturaleza de la pared celular de las semillas oleaginosas en general, la cual resulta un sustrato complejo que se degrada más fácilmente por una mezcla de enzimas que con enzimas puras (Latif, 2009). Por lo tanto, el complejo multienzimático podría actuar sobre varios sustratos y la concentración de producto podría inhibir la reacción o el grado de saturación de la enzima con sustrato disminuir por el agotamiento del mismo. Estas variables podrían explicar la mejor extracción con la concentración de enzima más baja y a un menor tiempo de extracción.

Considerando el tiempo de extracción, Dominguez *et al.* (1994), reportaron que tiempos entre 0,33-2 horas, son suficientes para promover un aumento significativo en el rendimiento de aceite. Por otro lado Latif (2009) informó que para una extracción acuosa-enzimática en semillas de girasol, la extracción de aceite aumenta significativamente hasta 1,5 horas. Algunos autores reportaron que con tiempos prolongados de extracción se forman emulsiones más estables que evitan la separación de aceite de la fracción líquida (Latif y Anwar, 2009; Rosenthal *et al.*, 1996). Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo, con respecto al uso de tiempos cortos de extracción.

La mejor respuesta para el contenido de azúcares reductores en la fracción líquida se observó con solución reguladora citrato y con una relación enzima: sustrato de 1:5 ( $p < 0,0001$ ). Para esta respuesta, el tiempo de extracción resultó no significativo ( $p = 0,1211$ ), esto podría indicar que el contenido de azúcares reductores no resulta afectado por el factor tiempo, en el intervalo de tiempo analizado.

Dado que la respuesta de mayor relevancia en este capítulo es el rendimiento de aceite, los factores para realizar la validación del modelo fueron seleccionados teniendo en cuenta solamente esa respuesta, cuyos factores significativos fueron relación E:S y tiempo.

### 3.6.2. VALIDACIÓN DEL MODELO

El experimento adicional (Experimento N°10) para validar el modelo se realizó con una relación enzima: sustrato 1:20 (m:vol) durante 1 hora. El factor B puede ser tratado como error ya que no resultó significativo. La Tabla 3.8 presenta los valores predichos, obtenidos utilizando  $SR_{pr}$ , y los obtenidos experimentalmente del rendimiento relativo porcentual ( $Y_a$ ) de aceite extraído y el contenido de azúcares liberado en la fase acuosa.

**Tabla 3.8:** Test de validación del modelo

|                           | $Y_a$        | Contenido de azúcares |
|---------------------------|--------------|-----------------------|
| <b>Test de validación</b> | 13,52 ± 0,81 | 15,80 ± 0,73          |
| <b>Valor predicho</b>     | 12,56        | 10,10                 |

El error relativo entre el valor predicho y el valor observado experimentalmente para el rendimiento porcentual de aceite fue de 7,1 %. Esto indicaría que no habría interacción entre los factores en las condiciones mencionadas. Por otra parte, el error relativo para el contenido de azúcares liberados en la fracción líquida fue superior al 30 %, lo que podría indicar posibles interacciones entre los factores analizados.

### 3.5. CONCLUSIONES DE LA SELECCIÓN DE VARIABLES OPERATIVAS

Esta parte del trabajo permitió brindar información sobre factores generales que pudieran afectar la extracción acuosa enzimática, sin considerar el efecto de las interacciones de dichos factores. Además aportó información de las diferencias entre extracción acuosa y acuosa enzimática en el rendimiento de extracción de aceite.

El rendimiento relativo porcentual de aceite para la extracción acuosa en el intervalo de tiempo analizados y con los diferentes tipos de buffers no superó el 5,27 %. Si bien se presentaron diferencias significativas en la extracción acuosa entre los experimentos realizados, aun así la capacidad extractiva del agua resultó muy baja. En

la comparación realizada entre la extracción acuosa y la acuosa-enzimática se determinó que en la segunda los rendimientos fueron mayores, del orden del 10 %. Los bajos rendimientos relativos se puede explicar parcialmente en términos de ciertas características de los collets, como el tamaño de partícula de la harina y el contenido de cáscara y el efecto de los procesos previos a los que fue sometida la semilla de girasol, como el pretratamiento térmico y la extracción de la mayor parte del aceite por prensado. A partir de esto se puede suponer que el uso de enzimas en la extracción acuosa podría optimizarse, mejorando el rendimiento de aceite.

El modelo de “no interacción” propuesto por TAGÜCHI, podría ser eficiente para analizar el rendimiento de aceite de la extracción acuosa-enzimática, en las condiciones definidas. La selección de experimento óptimo fue utilizando una relación E:S de 1:20 (m: vol) durante 1 hora, obteniéndose un 13,52 % (b.s.) de aceite en la extracción. Sin embargo dicho modelo no predice adecuadamente la respuesta del contenido de azúcares reductores en la fase líquida, esto podría indicar que las interacciones entre los factores deberían tenerse en cuenta.

A partir de los resultados obtenidos, se pudieron definir parámetros generales para la realización de una extracción acuosa-enzimática con un diseño de experimentos más detallado y analizando variables más específicas.

### **3.6. DISEÑO DE EXPERIMENTOS AMPLIADO**

#### **3.6.1. SELECCIÓN DE FACTORES**

En la metodología de TAGUCHI se definió una relación E:S (1:20) y un tiempo de extracción (1h) como la mejor opción de trabajo para lograr la mayor extracción de aceite. Debido a que en ese diseño no se consideraron las interacciones entre los factores mencionados, se decidió realizar un diseño de experimentos más amplio y detallado.

Los factores considerados en este diseño fueron: velocidad de agitación, tiempo de extracción, relación enzima:sustrato y temperatura. La velocidad de agitación fue incorporada por los antecedentes mencionados, teniendo en cuenta que algunos autores informaron que resulta significativa para la extracción acuosa-enzimática en un intervalo de 120-300 rpm. La temperatura fue seleccionada según el intervalo considerado como el óptimo de trabajo para Viscozyme® L. En la metodología de trabajo también se incorporaron los factores tiempo y relación enzima:sustrato. Si bien estos dos factores fueron los factores significativos en el diseño anterior, en el mismo no se tenían en cuentas las interacciones entre los mismos, por lo tanto resultó de interés considerarlos nuevamente para definir la condición óptima del proceso de extracción.

En este diseño se decidió buscar la mejor combinación de factores para maximizar la extracción de aceite y, por otro lado, minimizar la cantidad de proteínas liberada en la fracción sólida, y de esta manera asegurar la obtención de un residuo sólido rico en proteínas.

### 3.6.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS: CENTRAL COMPUESTO

El estudio de las variables operativas se basó en la aplicación de Metodología de Superficie de Respuesta combinada con un diseño central compuesto, ya que esta metodología experimental es utilizada frecuentemente en el desarrollo de procesos alimentarios ya que combina un diseño central compuesto (DCC) y la Metodología de superficie de respuesta (MSR) para examinar exhaustivamente diversos parámetros con un tiempo experimental mínimo, determinando los factores más relevantes y sus intervalos de influencia, así como las interacciones entre los factores (Corzo *et al.*, 2008; de Figueiredo *et al.*, 2013; Myers *et al.*, 2009; Pulido *et al.*, 2012). El diseño central compuesto es el diseño más utilizado en la etapa de búsqueda de segundo orden debido a su gran flexibilidad.

Los factores seleccionados para el diseño como se mencionó previamente, fueron: velocidad de agitación (A), temperatura (B), relación enzima:sustrato (C) y

tiempo de extracción (D), expresados en revoluciones por minutos (rpm), grado centígrado (°C), porcentaje (%) y minutos (min), respectivamente.

El intervalo utilizado para cada factor se detalla en la Tabla 3.9.

**Tabla 3.9:** Factores con sus respectivos niveles de experimentación usados en el DCC para la extracción acuosa-enzimática.

| Factores                     | Niveles   |      |     |      | $\alpha$ |
|------------------------------|-----------|------|-----|------|----------|
|                              | $-\alpha$ |      |     |      |          |
|                              | -1,66     | -1   | 0   | 1    | 1,66     |
| Velocidad de agitación (rpm) | 86        | 120  | 170 | 220  | 253      |
| Temperatura (°C)             | 42        | 45   | 50  | 55   | 58       |
| Relación enzima:sustrato (%) | 0,17      | 0,50 | 1   | 1,50 | 1,8      |
| Tiempo de extracción (min)   | 40        | 60   | 90  | 120  | 140      |

La matriz de ensayos para determinar la combinación de los factores fue generada por STATGRAPHICS software Centurion XV (Statgraphics Centurion, 2009). El resultado indicó 29 ensayos aleatorios que se realizaron por duplicado. De los 29 ensayos experimentales, 16 correspondieron a puntos factoriales, 8 a puntos axiales y 5 a puntos centrales. Los puntos centrales permiten estimar el error experimental y una medida de falta de ajuste. Los puntos axiales añadidos al diseño factorial proporcionan una estimación de la curvatura del modelo, el  $\alpha$  (alfa) determinado por el programa estadístico fue de 1,66 (Tabla 3.9). Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se ejecutaron en orden aleatorio.

Las variables independientes fueron codificadas por STATGRAPHICS software Centurion XV (Statgraphics Centurion, 2009). Dicho programa, se utilizó para realizar el análisis estadístico de los resultados, desarrollar modelos de regresión múltiple asignando valores codificados a los diferentes factores y predecir las condiciones del proceso. Los factores fueron codificados de acuerdo con la Ecuación (17):



$$X_i = \frac{x_i - \bar{x}}{d_i/2} * i \quad (17)$$

donde  $x_i$  es el valor variable en unidades reales,  $X_i$  es el valor adimensional del factor  $i$ ,  $\bar{x}$  es la media del valor más alto y más bajo de  $x_i$ , y  $d_i$  es la diferencia entre el valor más alto y más bajo de  $x_i$  (de Figueiredo *et al.*, 2015).

La Tabla 3.10 muestra los factores codificados y reales, con sus niveles de experimentación usados para el diseño central compuesto.

**Tabla 3.10:** Variables independientes codificadas y reales, con sus niveles de experimentación usados para el diseño central compuesto.

| Nº | Variables codificadas |       |       |       | Variables reales |    |      |     |
|----|-----------------------|-------|-------|-------|------------------|----|------|-----|
|    | Vel. Agit             | T     | E:S   | t'    | Vel. Agit        | T  | E:S  | t'  |
| 1  | -1                    | -1    | -1    | -1    | 120              | 45 | 0,5  | 60  |
| 2  | 1                     | -1    | -1    | -1    | 220              | 45 | 0,5  | 60  |
| 3  | -1                    | 1     | -1    | -1    | 120              | 55 | 0,5  | 60  |
| 4  | 1                     | 1     | -1    | -1    | 220              | 55 | 0,5  | 60  |
| 5  | -1                    | -1    | 1     | -1    | 120              | 45 | 1,5  | 60  |
| 6  | 1                     | -1    | 1     | -1    | 220              | 45 | 1,5  | 60  |
| 7  | -1                    | 1     | 1     | -1    | 120              | 55 | 1,5  | 60  |
| 8  | 1                     | 1     | 1     | -1    | 220              | 55 | 1,5  | 60  |
| 9  | -1                    | -1    | -1    | 1     | 120              | 45 | 0,5  | 120 |
| 10 | 1                     | -1    | -1    | 1     | 220              | 45 | 0,5  | 120 |
| 11 | -1                    | 1     | -1    | 1     | 120              | 55 | 0,5  | 120 |
| 12 | 1                     | 1     | -1    | 1     | 220              | 55 | 0,5  | 120 |
| 13 | -1                    | -1    | 1     | 1     | 120              | 45 | 1,5  | 120 |
| 14 | 1                     | -1    | 1     | 1     | 220              | 45 | 1,5  | 120 |
| 15 | -1                    | 1     | 1     | 1     | 120              | 55 | 1,5  | 120 |
| 16 | 1                     | 1     | 1     | 1     | 220              | 55 | 1,5  | 120 |
| 17 | -1,66                 | 0     | 0     | 0     | 86               | 50 | 1    | 90  |
| 18 | 1,66                  | 0     | 0     | 0     | 253              | 50 | 1    | 90  |
| 19 | 0                     | -1,66 | 0     | 0     | 170              | 42 | 1    | 90  |
| 20 | 0                     | 1,66  | 0     | 0     | 170              | 58 | 1    | 90  |
| 21 | 0                     | 0     | -1,66 | 0     | 170              | 50 | 0,17 | 90  |
| 22 | 0                     | 0     | 1,66  | 0     | 170              | 50 | 1,8  | 90  |
| 23 | 0                     | 0     | 0     | -1,66 | 170              | 50 | 1    | 40  |
| 24 | 0                     | 0     | 0     | 1,66  | 170              | 50 | 1    | 140 |
| 25 | 0                     | 0     | 0     | 0     | 170              | 50 | 1    | 90  |
| 26 | 0                     | 0     | 0     | 0     | 170              | 50 | 1    | 90  |
| 27 | 0                     | 0     | 0     | 0     | 170              | 50 | 1    | 90  |
| 28 | 0                     | 0     | 0     | 0     | 170              | 50 | 1    | 90  |
| 29 | 0                     | 0     | 0     | 0     | 170              | 50 | 1    | 90  |

**Vel.Agit:** velocidad de agitación (rpm) - **T:** temperatura (°C) - **E:S:** relación enzima:sustrato (%) – **t':** tiempo de extracción (minutos).

### 3.6.3. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO

El aspecto de *optimización* está formado por algunas técnicas matemáticas que sirven para que, dado un modelo ajustado, se explore a fin de obtener información sobre el punto óptimo. El *punto óptimo* implica que es la mejor combinación posible en toda la región de operación. El problema es encontrar la combinación de las variables que da por resultado el *rendimiento óptimo del proceso*.

La optimización simultánea de las variables de respuesta ( $Y_a$  y  $Y_p$ ) se llevó a cabo utilizando la función de deseabilidad. Un alto valor de deseabilidad indica las mejores combinaciones de factores para optimizar el sistema estudiado. El método Deseabilidad fue originalmente propuesto por Harrington (1965) y luego mejorado por Derringer y Suich (1980) y Derringer (1994). Consiste en definir una función en el espacio factorial que estima la deseabilidad global (DG) del producto en cada punto; de esta manera, convierte el problema de optimización multivariable (en este caso con dos variables de respuesta) en un problema de optimización univariable (Pulido *et al.*, 2012). La deseabilidad global requiere que todas las respuestas ( $Y$ ) estén en la misma escala, y esto se logra transformando cada respuesta predicha  $\hat{Y}_i(x)$  en un valor de deseabilidad individual  $d_i(x)$  que cae en el intervalo  $[0, 1]$ . De esta manera,  $d_i(x)$  mide la variable del punto  $x$ . Una vez calculadas las deseabilidades individuales sobre el punto  $x$ , la deseabilidad global de  $x$  es definida por la media geométrica ponderada (Ecuación 18):

$$DG_{(x)} = (d_1^{w_1} * d_2^{w_2} \dots d_m^{w_m})^{1/\sum w_i} \quad (18)$$

donde los pesos  $w_i$  son constantes que permiten balancear la importancia relativa de cada variable; mientras más grande es el peso dado a una variable con respecto a las restantes, más grande será la exigencia para que el punto óptimo global beneficie a tal variable.

La función deseabilidad se desarrolló para los criterios de maximizar  $Y_a$  y minimizar  $Y_p$ , ya que el objetivo en este trabajo fue maximizar la extracción de aceite y que la mayor cantidad de proteína quede retenida en el sólido.

La validación del modelo se llevó a cabo mediante la realización de un punto experimental adicional en las condiciones determinadas por la optimización simultánea donde se analizaron ambas respuestas (rendimiento relativo porcentual de aceite y proteína en la fracción líquida). Los valores experimentales obtenidos se realizaron por triplicado y fueron comparados con los valores predichos obtenidos por el modelo final.

#### **3.6.4. CARACTERIZACIÓN DE ACEITES**

Luego de la extracción acuosa-enzimática, se extrajo el aceite residual del residuo sólido y se caracterizó según su contenido de tocoferoles, fosfolípidos y ceras como se detallaron en el Capítulo 2 (sección 2.1.4.1., 3.1.4.2. y 2.1.4.3.). Los resultados fueron comparados con los valores de componentes minoritarios del aceite de la muestra de collets original, es decir previos a la extracción. Además se determinó el contenido de proteínas de los collets y del residuo sólido luego de la extracción acuosa-enzimática (capítulo 2, sección 2.1.3.3).

### **3.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL DISEÑO AMPLIADO**

#### **3.7.1 EXTRACCIÓN ACUOSA-ENZIMÁTICA**

El diseño de experimentos planteado con 29 ensayos presentaron los siguientes rendimientos porcentuales relativos de aceite  $Y_a$  y proteína  $Y_p$  (Tabla 3.11):

**Tabla 3.11:** Rendimiento relativo porcentual de aceite y proteínas para los 29 experimentos realizados.

| N° experimentos | $Y_a$ | $Y_p$ | N° experimentos | $Y_a$ | $Y_p$ |
|-----------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
| 1               | 11,52 | 6,49  | 16              | 10,19 | 12,79 |
| 2               | 10,36 | 11,17 | 17              | 7,45  | 6,05  |
| 3               | 3,15  | 5,95  | 18              | 12,01 | 8,48  |
| 4               | 11,13 | 7,21  | 19              | 25,18 | 6,28  |
| 5               | 5,13  | 5,02  | 20              | 12,77 | 8,40  |
| 6               | 17,27 | 5,95  | 21              | 8,74  | 6,04  |
| 7               | 9,19  | 7,95  | 22              | 9,78  | 7,15  |
| 8               | 11,53 | 10,15 | 23              | 10,86 | 8,75  |
| 9               | 11,09 | 5,80  | 24              | 8,10  | 9,31  |
| 10              | 10,91 | 4,68  | 25              | 12,61 | 9,98  |
| 11              | 9,93  | 7,22  | 26              | 7,89  | 6,77  |
| 12              | 8,92  | 7,88  | 27              | 10,57 | 8,24  |
| 13              | 13,72 | 6,37  | 28              | 10,48 | 7,75  |
| 14              | 15,12 | 7,73  | 29              | 11,35 | 6,95  |
| 15              | 5,78  | 11,15 |                 |       |       |

### 3.7.2. MODELOS

Sobre la base de los resultados experimentales del diseño central compuesto y del análisis de regresión, se estableció una ecuación polinómica de segundo orden para estimar la relación entre las variables de respuestas y los factores o variables de procesamiento. El comportamiento de los modelos puede ser expresado con la siguiente ecuación general (Ecuación 19):

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 \quad (19)$$

donde  $Y_i$  representa una de las respuestas predichas,  $\beta_0$  es una constante, los  $X_i$  representan los valores codificados de las cuatro variables independientes (velocidad de agitación, temperatura, relación enzima:sustrato y tiempo de extracción) y los coeficientes  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$ , representan el término lineal, cuadrático y las interacciones, respectivamente. Los coeficientes se presentaron en términos de factores codificados y

el tamaño podría estar directamente relacionado con el cambio observado en la respuesta, permitiendo la posibilidad de comparar entre los coeficientes y en consecuencia, describir la importancia de cada factor en la respuesta. La Tabla 3.12 presenta los coeficientes de los modelos individuales para las dos variables de respuestas analizadas y su nivel de significancia representado por el valor p.

**Tabla 3.12:** Significancia de los coeficientes de regresión de los modelos polinomiales de segundo orden para el rendimiento relativo porcentual de aceite y rendimiento relativo porcentual de la proteína liberada en la fracción líquida.

|                                  | $Y_a$       |         | $Y_p$       |         |
|----------------------------------|-------------|---------|-------------|---------|
|                                  | Coeficiente | Valor p | Coeficiente | Valor p |
| Constante $\beta_0$              | 11,105      | 0,000   | 7,856       | 0,000   |
| Vel. agitación ( $\beta_1$ )     | 1.557       | 0,0235  | 0,727       | 0,0090  |
| Temperatura ( $\beta_2$ )        | -2,134      | 0,0036  | 0,958       | 0,0013  |
| Enzima:sustrato ( $\beta_3$ )    | 0,588       | 0,3533  | 0,584       | 0,0290  |
| Tiempo extrac. ( $\beta_4$ )     | 0,084       | 0,8933  | 0,217       | 0,3821  |
| Vel. agitación ( $\beta_1^2$ )   | -0,882      | 0,2458  | -0,154      | 0,5961  |
| Temperatura ( $\beta_2^2$ )      | 2,473       | 0,0043  | -0,127      | 0,6624  |
| Enzima:sustrato ( $\beta_3^2$ )  | -1,052      | 0,1702  | -0,398      | 0,1849  |
| Tiempo extrac. ( $\beta_4^2$ )   | -0,972      | 0,2028  | 0,486       | 0,1100  |
| Interacción 1*2 ( $\beta_{14}$ ) | 0,095       | 0,1641  | -0,006      | 0,1641  |
| Interacción 1*3 ( $\beta_{14}$ ) | 0,916       | 0,2178  | 0,041       | 0,8860  |
| Interacción 1*4 ( $\beta_{14}$ ) | -1,043      | 0,1641  | -0,408      | 0,1645  |
| Interacción 2*3 ( $\beta_{23}$ ) | -0,238      | 0,7430  | 1,053       | 0,0020  |
| Interacción 2*4 ( $\beta_{24}$ ) | -0,421      | 0,5625  | 0,739       | 0,0188  |
| Interacción 3*4 ( $\beta_{34}$ ) | -0,188      | 0,7956  | 0,888       | 0,0065  |

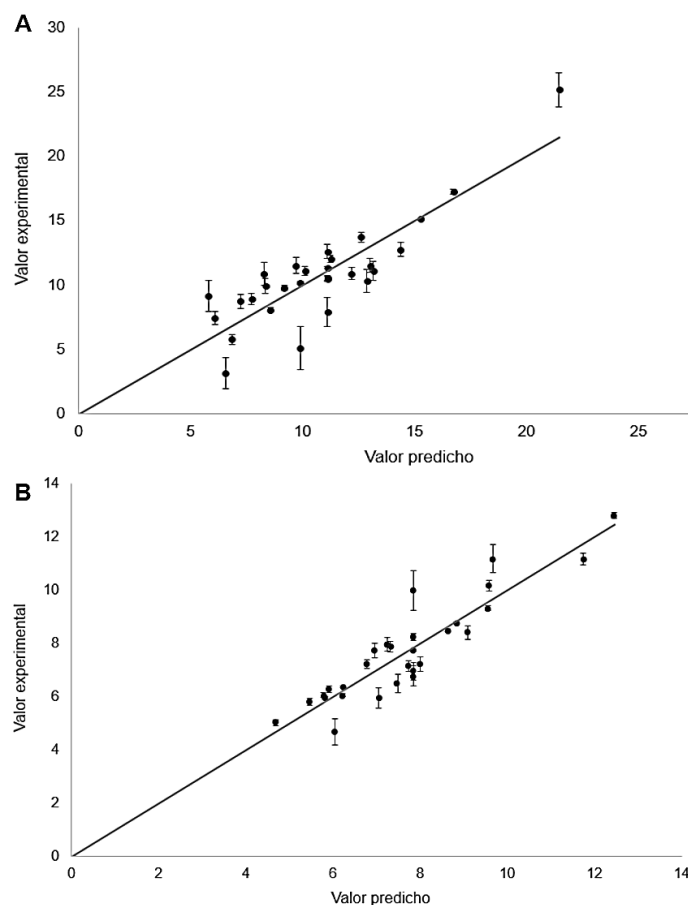
Ambos modelos son válidos en el dominio experimental seleccionado. Los valores p de los modelos fueron inferiores a 0,001, indicando que los mismos resultaron significativos en este dominio experimental. El análisis de regresión mostró que los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) fueron satisfactorios para validar la predicción de los

modelos. Si bien los coeficientes de determinación fueron relativamente bajos, eso no siempre resulta en una baja calidad del modelo (Dolhalit *et al.*, 2016). La validez de los modelos y la calidad de los mismos fueron verificadas a través de otras pruebas como la falta de ajuste y el Test de Durbin-Watson (DW) (Pulido *et al.*, 2012). La falta de ajuste resultó no significativa en ambos casos y el Test Durbin-Watson mostró que no hay autocorrelación en los residuos en un nivel de significación del 5 %. La Tabla 3.13 muestra los valores del coeficiente de determinación, falta de ajuste y Test de Durbin-Watson. Por otra parte, se verificó que las variables de respuestas se distribuyeron normalmente, con varianza constante y que las mediciones tenían independencia entre sí.

**Tabla 3.13:** Pruebas de ajustes de los modelos polinomiales.

|  | $Y_a$   | $Y_p$   |
|--|---------|---------|
| <b>Falta de ajuste</b>                                 | 0,1926  | 0,2399  |
| <b>Coeficiente de determinación (<math>R^2</math>)</b> | 0,7346  | 0,8349  |
| <b>Test Durbin-Watson (<math>p = 0,6018</math>)</b>    | 2,16361 | 2,59246 |

Las predicciones de los modelos polinomiales y los resultados experimentales (Figura 3.5) presentaron una buena concordancia en su comparación, con menores errores para los rendimientos relativos de proteína  $Y_p$  que para aceite  $Y_a$ . Las mayores desviaciones porcentuales se dieron para los experimentos 3, 5 y 9 en el caso de  $Y_a$  y para los experimentos 10 y 25 en el caso de  $Y_p$ .

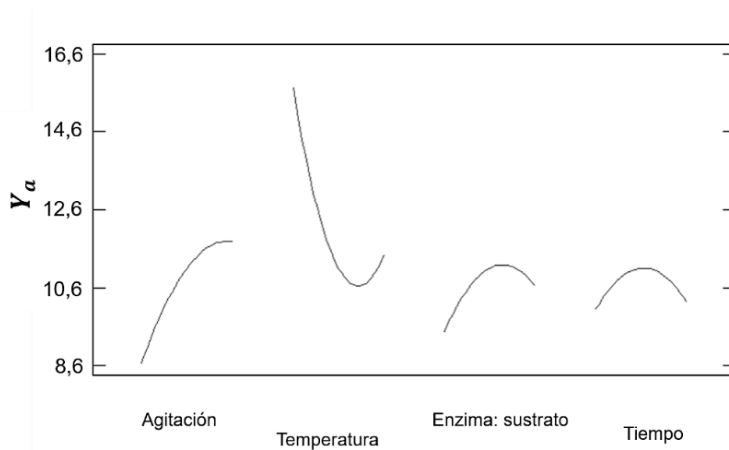


**Figura 3.5:** Comparación entre las predicciones y los resultados experimentales para  $Y_a$  (A) e  $Y_p$  (B).

### 3.7.3. ACEITE

Los factores de mayor significancia para el rendimiento relativo porcentual de aceite fueron temperatura y velocidad de agitación. La temperatura tuvo un efecto negativo en la cantidad de aceite extraído ( $p < 0,05$ ), este comportamiento indica que a medida que la temperatura aumenta,  $Y_a$  resulta menor. Tal comportamiento no se observó con otros factores, ya que los demás factores presentaron un efecto positivo para dicha respuesta. La tasa de contribución de los factores analizados, obtenida a partir del valor de  $p$  fue la siguiente: temperatura > velocidad de agitación > relación enzima:sustrato > tiempo de extracción.

La Figura 3.6 muestra de forma esquemática el comportamiento individual de cada factor, frente a la respuesta analizada para los puntos factorial.



**Figura 3.6:** Efecto individual de los diferentes factores para  $Y_a$

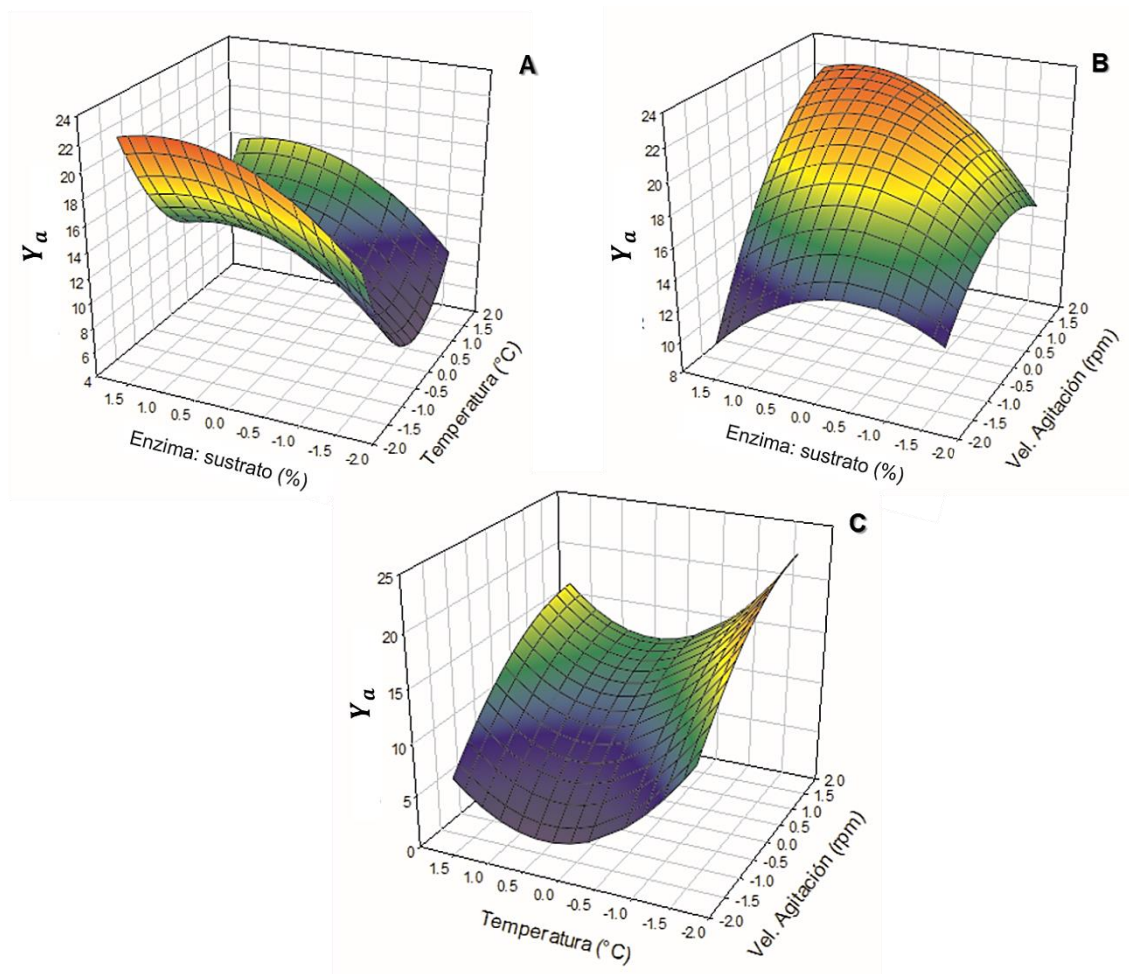
Las diferentes combinaciones de factores definidas por el diseño de experimentos dieron un valor máximo de rendimiento relativo porcentual de aceite extraído de 21,46 %, mientras que el valor mínimo fue de 5,80 %. Las condiciones que maximizaron la respuesta, fueron las siguientes: velocidad de agitación 246 rpm, temperatura 42 °C, relación enzima: sustrato 1,46 % y tiempo de extracción 67 min, que correspondió a un  $Y_a$  predicho de 23,02.

La Figura 3.7-A muestra el efecto de la temperatura y de la relación enzima:sustrato, en el intervalo experimental estudiado, considerando los demás factores en su punto óptimo (246 rpm y 67 minutos). En la figura se distingue que el factor temperatura presenta una curvatura dada por el coeficiente cuadrático, donde la menor extracción se observa a una temperatura intermedia y la máxima extracción a las temperaturas más bajas. Mientras que la variación en  $Y_a$  con respecto a la relación enzima:sustrato es de menor magnitud relativa debido a que el factor presentó una menor significancia para el modelo de  $Y_a$ .

En la Figura 3.7-B se observa un efecto marcado de la velocidad de agitación sobre  $Y_a$ , a medida que el factor aumenta, el rendimiento es mayor; mientras que el efecto de la relación enzima:sustrato es menor y con un máximo intermedio. La Figura 3.7-C, presenta los dos factores más significativos para el rendimiento de aceite. En ella se puede observar el notable efecto de los dos factores frente al rendimiento de



extracción, a mayor velocidad de agitación y menor temperatura el rendimiento relativo porcentual de aceite se hace máximo. Además se puede observar en la figura que el efecto de la velocidad de agitación es aproximadamente lineal y el efecto de la temperatura presenta una leve curvatura dada por el coeficiente cuadrático de dicho factor. Por otra parte, el tiempo no fue considerado en las gráficas por ser el factor con menor significancia en el modelo.



**Figura 3.7:** Representación tridimensional que muestra los efectos correlativos de: A) la relación enzima:sustrato y la temperatura, B) la relación enzima:sustrato y la velocidad de agitación y C) la temperatura y velocidad de agitación sobre el rendimiento relativo porcentual de aceite de extracción.

Según estudios reportados por Campbell *et al.* (2016), quienes realizaron una extracción acuosa-enzimática sobre extrusado de girasol, la velocidad de agitación también fue significativa y con un efecto positivo en el rendimiento de aceite, alcanzando la mayor extracción a 350 rpm, valor superior al obtenido en este trabajo, aunque los dispositivos de agitación no son exacta mente comparables. La velocidad de agitación resulta importante en la extracción acuosa-enzimática ya que el aceite es inmiscible con el solvente (agua) y la extracción aumenta cuando el aceite atrapado dentro de las células rotas se puede emulsionar en gotas más pequeñas y móviles mediante fuerzas turbulentas en el medio de extracción. Sin embargo, el resultado es la formación de una emulsión de aceite en la fase acuosa más estable difícil de separar (Mat Yusoff *et al.*, 2016). Además, el uso de velocidades de agitación más altas conduce a un mayor consumo y costo de energía.

Latif y Anwar (2009) informaron la temperatura de extracción más alta para las semillas de girasol con Viscozyme® L. a 45 °C. Además, Passos *et al.* (2009) informaron una temperatura óptima de 40 °C para extracción de aceite de semillas de uvas, donde se utilizó un complejo multienzimático. Sharma *et al.* (2002), por otra parte, reportaron una temperatura óptima de 40 °C en extracción acuosa de aceite de maní asistida por proteasas. Estos resultados se encuentran en concordancia con el valor de temperatura óptima obtenida en este trabajo. Los autores mencionados concluyeron, además, que las temperaturas superiores a 50 °C no mejoran la extracción de aceite (Latif y Anwar, 2009; Passos *et al.*, 2009).

Latif, (2009) reportó una concentración de Viscozyme® L. utilizada en semillas de girasol del 1 %. Como se mencionó previamente, la naturaleza de la pared celular de las semillas oleaginosas, es un sustrato complejo, que puede ser degradada con mayor facilidad por una mezcla de enzimas, esto puede mejorar el rendimiento de aceite a medida que aumenta la concentración, sin embargo el efecto no es lineal sino que puede reducirse considerablemente la eficiencia de la enzima a concentraciones superiores e inferiores a 1 %. Si bien el comportamiento de la enzima resultó acorde al presentado

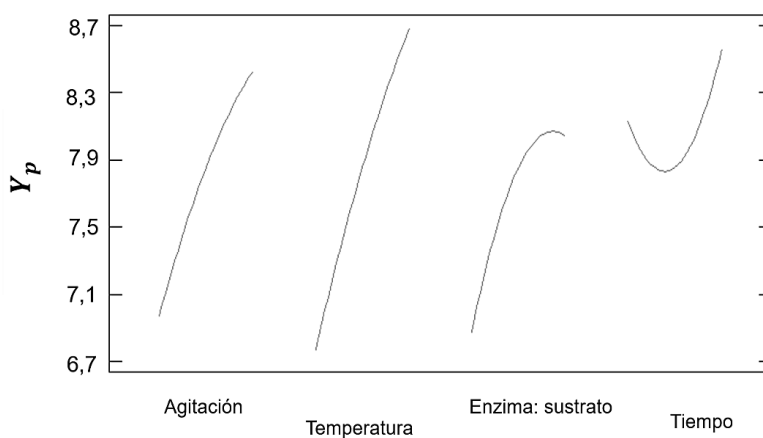
en este trabajo, la concentración óptima informada por Latif (2009) se encuentra por debajo del óptimo obtenido en el presente trabajo. En cambio, Domínguez *et al.* (1995) estudiaron el efecto de la concentración de enzima en la extracción de aceite de semillas de girasol, reportando una concentración óptima de 2 %, con mezclas de celulasas. Jiang *et al.* (2010), informaron una concentración óptima de enzima de 1,5 % durante la extracción acuosa-enzimática de aceite de maní utilizando complejos enzimáticos; observando que a partir de este valor la reacción comenzó a ser más lenta y el rendimiento de aceite no se vio incrementado, atribuyendo dicho efecto a la saturación del sustrato. Este valor resultó similar al obtenido en el presente trabajo.

#### 3.7.4. PROTEÍNA LIBERADA

Al finalizar la extracción acuosa asistida por enzimas, se pretende retener la mayor cantidad de proteínas en el residuo sólido, a fin de mantener esta fracción rica en proteínas para su utilización en alimentación animal o para la obtención de derivados proteicos

Las variables que afectaron significativamente el rendimiento porcentual relativo de proteína liberada en la fracción líquida fueron: velocidad de agitación, temperatura y relación enzima:sustrato, con un nivel de significancia inferior al 5 % (Tabla 3.12). El tiempo no resultó una variable significativa ( $p = 0,3821$ ). Resultados similares fueron reportados por Guan y Yao (2008) quienes no encontraron diferencias significativas en el factor tiempo durante la extracción de proteínas de avena en un intervalo de 30 a 150 minutos. Las cuatro variables tienen un efecto positivo en el rendimiento porcentual relativo de proteína en la fracción líquida. La tasa de contribución de los factores analizados obtenida a partir del valor  $p$  fue la siguiente: temperatura > velocidad de agitación > relación enzima:sustrato > tiempo. Por otro lado, las interacciones entre la relación enzima:sustrato y la temperatura y el tiempo tuvieron un efecto sinérgico altamente significativo ( $p < 0,01$ ) mientras que el resto de las interacciones fueron menos significativos desde el punto de vista estadístico ( $p < 0,05$ ).

La Figura 3.8 muestra el comportamiento individual de cada factor frente a la respuesta analizada para los puntos factoriales.



**Figura 3.8:** Efecto individual de los diferentes factores para  $Y_p$

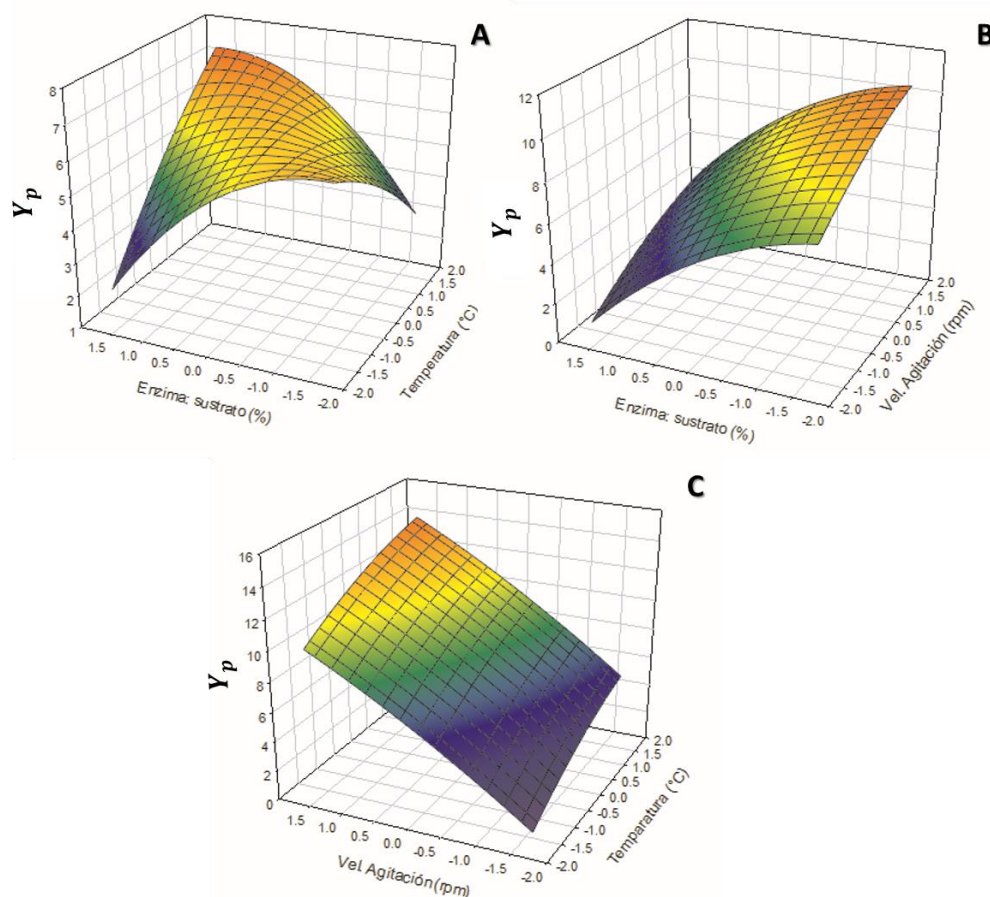
La cantidad máxima de proteína liberada en la fase líquida, según el diseño de experimentos fue de 12,46 % mientras que la mínima fue de 4,69 %. Según el modelo obtenido para proteínas, las condiciones que minimizaron la respuesta fueron las siguientes: velocidad de agitación 86 rpm, temperatura 42 °C, relación enzima:sustrato 1,8 % y tiempo de extracción 70 min, que correspondió a un  $Y_p$  predicho de 1,09 %.

La solubilidad de las proteínas del girasol es afectada por el pH del medio, fundamentalmente debido a su naturaleza anfotérica ácido-base, presentando una solubilidad máxima a pH muy ácido (pH = 2-3) o pH muy alcalino (pH = 9-11) y una mínima solubilidad en la proximidad de su punto isoeléctrico (pH = 4-5) (Dominguez *et al.*, 1995; Guan y Yao, 2008; Rosenthal *et al.*, 2001; Salgado, 2009; Sineiro *et al.*, 1998), esto podría ser una de las causas de la baja extracción de proteínas, favorable para el objetivo de este trabajo.

La Figura 3.9-A, muestra la correlación entre temperatura y relación enzima:sustrato, donde se observa el mínimo  $Y_p$  cuando E:S aumenta y la temperatura disminuye. Sin embargo, el efecto contrario se observa en el otro extremo de la superficie de respuesta. Este efecto podría deberse a que la interacción entre estos dos factores presentó el coeficiente más elevado del modelo (1,053) y resultó ser la

interacción más significativa (0,002), por lo que podría cambiar la tendencia cuando uno de los factores resulte negativo. Las Figuras 3.9-B y 3.9-C, que muestran la correlación entre velocidad de agitación y relación enzima:sustrato y velocidad de agitación y temperatura respectivamente, se caracterizan por no presentar curvaturas, debido a que los coeficientes cuadráticos no fueron significativos. La Figura 3.8-B muestra que a medida que la velocidad de agitación y la relación enzima:sustrato disminuye, la liberación de proteína disminuye. La Figura 3.8-C por su parte, muestra que a medida que la velocidad de agitación y la temperatura disminuyen, la cantidad de proteína liberada en la fase líquida también resulta más baja. El factor tiempo no fue considerado en las figuras por ser el factor con menor significancia en el modelo.

Guan y Yao (2008) informaron a la temperatura como la variable más significativa para la extracción de proteína de avena con Viscozyme® L.; ellos encontraron una máxima extracción a 44 °C en un intervalo de temperatura estudiado entre 35 y 55 °C y consideraron que temperaturas inferiores o superiores a ella tendrían un efecto negativo en la extracción de proteínas. Por su parte, Ansharullah y Chesterman (1997) obtuvieron para la extracción de proteínas de salvado de arroz con pre-tratamiento enzimático, una temperatura óptima de extracción de 50 °C con Viscozyme® L., obteniendo menores rendimientos a medida que la temperatura desciende. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares a los descritos por los autores mencionados. Por su parte, Jiang *et al.* (2010) obtuvieron una extracción máxima de proteína hidrolizada de maní con proteasas a una relación enzima:sustrato de 1,5 % e informaron que con concentraciones superiores no se logró un efecto positivo sobre la liberación de proteínas en la fase líquida. Por lo tanto estos resultados podrían resultar concordantes con los informados en el presente trabajo.



**Figura 3.9:** Representación 3D que muestran los efectos correlativos de (A) la relación enzima:sustrato vs. temperatura. (B) relación enzima:sustrato vs. velocidad de agitación. (C) velocidad de agitación vs. temperatura sobre el porcentaje de proteína liberada en la fracción líquida.

### 3.7.5. OPTIMIZACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LOS MODELOS

Las condiciones de extracción óptimas finales se determinaron analizando ambas respuestas en conjunto (rendimiento relativo porcentual de aceite y rendimiento relativo porcentual de proteínas), esto fue definido como “optimización simultánea”. La optimización simultánea puede realizarse de forma correcta si los modelos individuales presentados fueron modelos jerárquicos, es decir, que por cada interacción o término cuadrático en el modelo, éste también incluyó los términos más simples que se pueden formar con los factores involucrados. También fue necesario verificar que cada modelo cumpla con los supuestos tradicionales de normalidad, varianza constante e

independencia de los datos entre sí. Para llevar a cabo la optimización simultánea fue necesario realizar optimización de los modelos individuales de cada respuesta (sección 3.7.3 y 3.7.4). El problema de una optimización simultánea radica en que, por lo general, las combinaciones de factores, no son las mismas que en los modelos individuales. Esto hace necesario buscar una solución compromiso, donde todas las variables tengan un nivel satisfactorio. Esa solución compromiso se denomina óptimo simultáneo. En muchos casos, la optimización simultánea para mejorar dos respuestas en conjunto puede tener un efecto opuesto de una sobre la otra, lo que dificulta la selección de niveles de factores independientes que optimicen ambas respuestas simultáneamente (Pulido *et al.*, 2012).

La optimización simultánea analítica se realizó aplicando la función deseabilidad global (DG) del producto en cada punto. De esta forma, se convirtió el problema de optimización multivariado en un problema de optimización univariado, donde se maximizó el valor de DG para obtener el punto óptimo buscado. Al aplicar la metodología de la función de deseabilidad, las condiciones óptimas se obtuvieron con un valor de deseabilidad igual a 0,939. Por lo tanto, en estas condiciones, la combinación óptima de factores para optimizar ambas respuestas simultáneamente fue a 249 rpm, con una relación enzima:sustrato de 1,72 %, a 42 °C de temperatura, durante 52 min.

La Tabla 3.14 presenta los valores reales de los factores obtenidos en la optimización individual de cada respuesta ( $Y_a$  y  $Y_p$ ) y la optimización simultánea. En la tabla se observa que el único factor coincidente en las tres optimizaciones es el factor temperatura, donde el valor óptimo en todos los casos fue de 42 °C. Por otra parte, el valor óptimo de velocidad de agitación de los modelos individuales presentados fueron totalmente opuestos y la optimización simultánea adoptó un valor cercano al del modelo individual de  $Y_a$ . Esto puede explicarse porque mientras mayor peso tiene el factor con respecto a una u otra respuesta, mayor será la exigencia para que el punto óptimo global beneficie a tal respuesta (Pulido *et al.*, 2012). La optimización simultánea resultó en un valor alto para la relación enzima:sustrato y una valor bajo de tiempos de extracción, en

concordancia con los valores obtenidos para las optimizaciones individuales (Tabla 3.12).

**Tabla 3.14:** Condiciones óptimas de las variables operativas de la EAE obtenidas con los modelos individuales y simultáneos de las respuestas rendimiento relativo de aceite y proteína soluble.

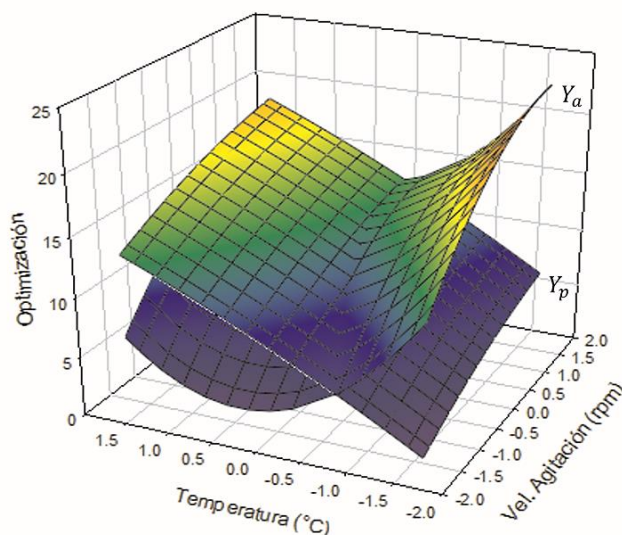
| Factor                              | Optimización individual |       | Optimización simultánea |
|-------------------------------------|-------------------------|-------|-------------------------|
|                                     | $Y_a$                   | $Y_p$ |                         |
| <b>Velocidad de agitación</b> (rpm) | 246,5                   | 86    | 249                     |
| <b>Temperatura</b> (°C)             | 42                      | 42,35 | 42                      |
| <b>Relación E:S</b> (%)             | 1,46                    | 1,8   | 1,72                    |
| <b>Tiempo de extracción</b> (min)   | 66,6                    | 79,5  | 52                      |

La Figura 3.10 presenta las superficies de ambas respuestas ( $Y_a$  y  $Y_p$ ) en la misma región experimental, en función de la temperatura y la velocidad de agitación, ya que ambos factores resultaron significativos en los modelos independientes. La figura muestra el valor óptimo de las respuestas en la zona donde las superficies se cruzan, no coincidiendo con las respuestas individuales.

La validación del modelo se realizó con un experimento adicional (N °30) por duplicado en las condiciones operativas obtenidas en la optimización simultánea (249 rpm, relación enzima:sustrato 1,72 %, a 42 °C durante 52 min). La Tabla 3.15 muestra los valores predichos y los observados en el experimento adicional.

La prueba de Tuckey mostró que no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores predichos y los observados tanto en  $Y_a$  como en  $Y_p$  (Tabla 3.15). Se observa que, en las condiciones obtenidas con la optimización simultánea, los rendimientos relativos de aceite extraído y proteína liberada predichas por MSR fueron comparables a los obtenidos experimentalmente.





**Figura 3.10:** Representación 3D de las superficies de respuesta obtenida en la optimización simultánea de rendimiento porcentual relativo de aceite  $Y_a$  y contenido de proteína liberada en la fase acuosa  $Y_p$ , en función de la velocidad de agitación y la temperatura.

**Tabla 3.15:** Valores predichos y experimentales para el rendimiento porcentual relativo de aceite extraído y de proteína liberada en la fracción líquida.

|                            | $Y_a$                     | $Y_p$                    |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Valor Predicho</b>      | 22,07 <sup>a</sup>        | 5,66 <sup>a</sup>        |
| <b>Valor experimental*</b> | 22,30 ± 0,14 <sup>a</sup> | 5,34 ± 0,02 <sup>a</sup> |

\*Promedio ± desvío estándar de los diferentes experimentos.

Valores para la misma columna seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) por el Test de Tuckey.

Algunos autores han informado el uso de superficie de respuesta para optimizar factores que pueden influir en la extracción acuosa-enzimática. Zhang *et al.* (2012) informó una optimización de cuatro factores, relación solido:líquido, (1:4-1:6), concentración de enzima (2-4 %) tiempo de extracción (4-6 h) y temperatura (35-55 °C) para mejorar el rendimiento de aceite de *Myrica rubra* utilizando proteasas y celulasas, donde el factor no significativo resultó ser temperatura, sin embargo la interacción de dicho factor con otros, presentó significancia. Los valores óptimos obtenidos fueron: temperatura 51,6 °C, concentración de enzima 3,17 %, relación S:L 1:5 y 4 h de incubación. Nyam *et al.* (2009) utilizaron MSR para aumentar el rendimiento de aceite

de semillas de melón con dos tipos de proteasas, donde los factores analizados fueron concentración de enzima (2-5 %), pH (5-9), temperatura (40-60 °C) y tiempo de incubación (12-36 h), siendo el tiempo el factor más significativo para ambas enzimas. La optimización de dichos factores dio como resultado un mayor rendimiento de aceite con una concentración de enzima de 2,5 %, pH 7, temperatura 58 °C y un tiempo de incubación de 12 y 36 h según la enzima utilizada. Por otra parte, Guan y Yao (2008), utilizaron MSR para la extracción de proteínas de salvado de avena utilizando Viscozyme® L., donde optimizaron cuatro factores, concentración de enzima (6-30 FBG), pH (3-5), tiempo de extracción (0,5-2,5 h) y temperatura (35-55 °C). De acuerdo a los resultados presentados, observaron que solo el factor pH resultó no significativo en el intervalo analizado. La optimización de los factores dio como resultado una concentración de enzima de 30 FBG, pH 4,6, tiempo 2,8 h y una temperatura de 44 °C. Si bien algunos de los factores mencionados fueron estudiados en este trabajo, no se realizaron comparaciones de la optimización debido a que tanto los materiales como los intervalos de estudio resultaron diferentes.

Los antecedentes mencionados reflejan que la superficie de respuesta es ampliamente utilizada en la EAE, tanto para optimizar una respuesta como para determinar el comportamiento de factores y la interacción entre los mismos, que puedan influir en la extracción acuosa-enzimática. Sin embargo, no se han encontrado antecedentes donde se optimicen conjuntamente dos variables de respuesta.

#### 3.7.6. AZÚCARES REDUCTORES

Otro componente importante de la fracción líquida, después de la extracción acuosa-enzimática, fueron los azúcares. La cantidad de azúcares reductores liberados en la fracción líquida se consideró como un producto de la hidrólisis de las fibras presentes en el sustrato por acción enzimática. Por lo tanto, el contenido de azúcares reductores podría emplearse como un parámetro de la degradación en la estructura de la pared celular que permite la liberación del aceite de la matriz del collet (Sineiro *et al.*,

1998). Sin embargo, esta es una medida relativa ya que parte de los azúcares pueden quedar retenidos en la matriz sólida.

El contenido de azúcares reductores fue determinado experimentalmente según el diseño propuesto (Tabla 3.16)

**Tabla 3.16:** Contenido de azúcares reductores en 100 mL de fase líquida para los 29 experimentos realizados.

| N° experimentos | % Azúcares reductores | N° experimentos | % Azúcares reductores |
|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| 1               | 2,184                 | 16              | 5,275                 |
| 2               | 1,519                 | 17              | 5,704                 |
| 3               | 4,937                 | 18              | 3,919                 |
| 4               | 5,141                 | 19              | 3,318                 |
| 5               | 5,971                 | 20              | 4,025                 |
| 6               | 3,297                 | 21              | 5,472                 |
| 7               | 2,368                 | 22              | 2,405                 |
| 8               | 2,627                 | 23              | 2,500                 |
| 9               | 4,888                 | 24              | 5,331                 |
| 10              | 5,570                 | 25              | 4,077                 |
| 11              | 5,176                 | 26              | 3,228                 |
| 12              | 2,817                 | 27              | 5,001                 |
| 13              | 1,936                 | 28              | 5,563                 |
| 14              | 5,760                 | 29              | 3,677                 |
| 15              | 4,754                 |                 |                       |

A partir de ello, se desarrolló un modelo polinomial de segundo orden que podría predecir el comportamiento de dicha respuesta. La Tabla 3.17 muestra los coeficientes de regresión del modelo. El valor p del modelo fue inferior a 0,001, lo que indica que el modelo es significativo para el análisis de los azúcares reductores, y válido en el dominio experimental seleccionado.

De acuerdo con el análisis de varianza, la temperatura y el tiempo de extracción afectaron significativamente el contenido de azúcares reductores en la fracción líquida ( $p < 0,05$ ), mientras que la relación enzima:sustrato fue menos influyente en el

comportamiento de dicha respuesta ( $p = 0,10$ ). La velocidad de agitación resultó menos significativa en esta respuesta en el intervalo estudiado.

**Tabla 3.17:** Coeficientes de regresión del modelo polinomial de segundo orden para azúcares reductores.

|                                  | Azúcares Reductores |         |
|----------------------------------|---------------------|---------|
|                                  | Coeficiente         | Valor p |
| Constante $\beta_0$              | 4,699               | 0,00    |
| Vel. agitación ( $\beta_1$ )     | -0,247              | 0,19    |
| Temperatura ( $\beta_2$ )        | 0,364               | 0,05    |
| Enzima: sustrato ( $\beta_3$ )   | -0,110              | 0,10    |
| Tiempo extrac. ( $\beta_4$ )     | 0,367               | 0,03    |
| Vel. agitación ( $\beta_1^2$ )   | 0,389               | 0,23    |
| Temperatura ( $\beta_2^2$ )      | -0,370              | 0,23    |
| Enzima: sustrato ( $\beta_3^2$ ) | 0,081               | 0,53    |
| Tiempo extrac. ( $\beta_4^2$ )   | -0,613              | 0,03    |
| Interacción 1*2 ( $\beta_{12}$ ) | 0,205               | 0,57    |
| Interacción 1*3 ( $\beta_{13}$ ) | -0,215              | 0,30    |
| Interacción 1*4 ( $\beta_{14}$ ) | 0,217               | 0,35    |
| Interacción 2*3 ( $\beta_{23}$ ) | -0,366              | 0,83    |
| Interacción 2*4 ( $\beta_{24}$ ) | 0,289               | 0,30    |
| Interacción 3*4 ( $\beta_{34}$ ) | -0,359              | 0,33    |

Sin embargo, el modelo obtenido no predice razonablemente los resultados experimentales por lo que no puede ser utilizado para analizar en más detalle el comportamiento individual de cada factor. Además, algunas tendencias no son consistentes con los resultados obtenidos para la recuperación relativa de aceite y proteína.

### 3.7.7. EXTRACCIÓN A ESCALA PILOTO

#### 3.7.7.1. Caracterización de la fracción líquida

Luego de la extracción acuosa-enzimática a escala piloto realizada en las condiciones del punto óptimo obtenido en el punto anterior, la fase líquida se caracterizó según contenido de aceite, proteínas y azúcares reductores. A partir de esta caracterización se evaluaron los rendimientos de extracción  $Y_a$  e  $Y_p$ . Los resultados se presentan en la Tabla 3.18.

**Tabla 3.18:** Extracción acuosa-enzimática a escala piloto.

| Variable                              |              |
|---------------------------------------|--------------|
| <b>Proteína (<math>Y_p</math>)</b>    | 2,13 ± 0,04  |
| <b>Azúcares reductores (mg/100mL)</b> | 4,40 ± 0,54  |
| <b>Aceite (<math>Y_a</math>)</b>      | 14,15 ± 0,06 |

Cuando se compararon los valores mostrados en la Tabla 3.18 con los obtenidos en una escala menor se observó que todos los componentes presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). El rendimiento porcentual relativo de aceite extraído en fracción líquida fue de 14,12 % mientras que a escala laboratorio se obtuvo un rendimiento relativo porcentual de 22,30 %. Por otra parte el contenido de azúcares reductores resultó el doble que los obtenidos a escala laboratorio (2,81 mg/100 mL). En el caso de las proteínas, el rendimiento relativo porcentual a escala piloto se redujo a la mitad del rendimiento porcentual relativo de proteína liberada a escala laboratorio (5,34 %).

Estos resultados indican que el proceso estudiado no puede ser escalado en forma directa ya que no se alcanza la extracción óptima, por lo que sería necesario realizar un estudio experimental adicional en el equipo piloto aumentando la velocidad de agitación y el tiempo de extracción para obtener las mejores condiciones. De todas formas, el aceite y/o el residuo sólido obtenidos fueron analizados para evaluar el efecto del proceso sobre la calidad del aceite.

### **3.7.7.2. Caracterización del residuo sólido**

El residuo sólido fue caracterizado según el contenido de azúcares, contenido de proteínas y contenido de aceite. El contenido de proteínas luego de la extracción fue de 33,25 % (g de proteína/ 100g de collets b.s.), superior al obtenido a una escala menor (32,81 % (g proteína/ 100 g de collets b.s.)) y en concordancia con el análisis de la fase líquida. El contenido de azúcares reductores en el sólido fue de  $36,90 \pm 0,20$  mg/g (mg de azúcares reductores/g collets b.s.), mientras que el collets original utilizado para todas las determinaciones presentó un contenido de azúcares reductores de  $7,59 \pm 0,14$  mg/g (mg de azúcares reductores/ g collets original b.s.). Esto podría indicar como las enzimas actuaron sobre las fibras presentes en la matriz.

Por otra parte, el contenido de aceite fue de 17,90 % (g aceite/ g de collets inicial b.s.). Como se expresó anteriormente se redujo en aproximadamente un 22 % del total de aceite presente en los collets, por lo que el residuo sólido obtenido luego de la EAE presentó un elevado contenido de aceite que debe ser extraído. Por esta razón se optó por realizar una extracción de aceite convencional por método Soxhlet, con *n*-hexano y analizar la composición de los mismos, para estudiar el efecto que pudo haber tenido la extracción acuosa-enzimática sobre el aceite residual del sólido. Cabe destacar que el residuo sólido obtenido luego de la extracción acuosa-enzimática puede ser mencionado también en el texto como collets pre-tratados.

### **3.7.7.3. Caracterización de los aceites**

La caracterización de los aceites extraídos de los collets y del residuo sólido de la extracción EAE se realizó según su contenido en componentes minoritarios como: tocoferoles, fosfolípidos, y ceras.

#### **3.7.7.3.1. Tocoferoles**

Los tocoferoles, como se mencionó previamente, son los principales compuestos con actividad antioxidante en los aceites, donde tienen un efecto importante

en sus propiedades nutricionales y tecnológicas. El aceite crudo de girasol tiene un contenido relativamente alto de tocoferoles, predominando el  $\alpha$ -tocoferol, lo que hace que el aceite de girasol sea la fuente más rica de vitamina E entre los aceites vegetales de importancia comercial. El contenido de tocoferoles de las semillas es el resultado de factores genéticos y ambientales, así como de sus interacciones (Velasco *et al.*, 2010). Esto explica la gran variación del contenido de tocoferol en aceite crudo de girasol reportado en la literatura, con valores que varían en un intervalo de 389 a 1873 ppm (Dolde *et al.*, 1999; Nolasco *et al.*, 2004; Velasco y Ruiz-Méndez, 2015).

La Tabla 3.19 muestra los resultados obtenidos para el contenido de tocoferoles en el aceite extraído de los collets de girasol (materia prima) y del residuo sólido de la EAE. Los valores obtenidos en los dos casos, resultaron similares a los reportados en bibliografía para aceites de semillas y collets de girasol (Baümle *et al.*, 2016; Dijkstra, 2015; Fisk *et al.*, 2006; Grompone, 2011; Nolasco *et al.*, 2004).

**Tabla 3.19:** Composición de tocoferoles del aceite obtenido de los collets y del residuo sólido de la EAE

|                                  | <b>Collets</b>             | <b>Residuo sólido</b>      |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Tocoferoles Totales</b> (ppm) | 510 $\pm$ 18 <sup>a</sup>  | 414 $\pm$ 13 <sup>b</sup>  |
| $\alpha$ tocoferol (%)           | 94 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>  | 92 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>  |
| $\beta$ tocoferol (%)            | 1,5 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup> | 1,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup> |
| $\beta$ tocotrienol (%)          | 4,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup> | 6,5 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup> |

\*Valores para el mismo componente en la misma fila seguido de letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por el Test de Tuckey.

Los aceites analizados presentaron principalmente  $\alpha$ -tocoferol, con porcentajes relativamente pequeños de  $\beta$ -tocoferol y  $\beta$ -tocotrienol. El aceite obtenido del residuo sólido luego de la extracción acuosa-enzimática, presentó un contenido de tocoferoles totales menor que el aceite de los collets, disminuyendo en un 19 %. La disminución se debió principalmente al  $\alpha$ -tocoferol (tocoferol mayoritario). Como se puede observar en

la tabla, el perfil se mantuvo relativamente estable entre una muestra y otra. Latif (2009) informó una disminución en  $\alpha$ -tocoferol, presentando una tendencia similar a la observada en este estudio, para aceites de semillas de girasol tratadas enzimáticamente con Viscozyme® L. Por otra parte, Pérez *et al.* (2013) reportaron también una disminución en tocoferoles totales en muestras de girasol tratadas enzimáticamente con pectinasa, lo cual lo atribuye a cambios en el oxígeno, la luz, el pH y los efectos de la temperatura, ya que los tocoferoles son sensibles a estos efectos.

#### 3.7.7.3.2. Fosfolípidos

El contenido de fosfolípidos en el aceite de girasol crudo varía de 5,9 a 12 g/kg y los aceites obtenidos por extracción con solvente generalmente tienen un mayor contenido de fosfolípidos que los obtenidos por prensado (Brevedan *et al.*, 2002; Carelli *et al.*, 1997; Lamas *et al.*, 2014). Los principales fosfolípidos en el aceite de girasol son fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA). La mayoría de estos fosfolípidos son hidratables y se pueden eliminar del aceite crudo mediante un proceso de desgomado con agua. Los fosfolípidos no hidratables, principalmente sales de calcio y magnesio de PA y lisoPA, glicerofosfatos y fosfatos inorgánicos permanecen en el aceite después del desgomado con agua. También se puede obtener un desgomado más eficiente por tratamiento ácido, donde la hidratación de estos compuestos se incrementa mediante la adición de ácido fosfórico o ácido cítrico.

El contenido de fosfolípidos totales y su perfil se detallan en la Tabla 3.20.

Como se mencionó en el Capítulo 1 los valores de contenido de fosfolípidos para el aceite de collets son inferiores a los reportados por algunos autores para aceite de semillas de girasol.

El aceite obtenido del residuo sólido podría ser considerado como parcialmente desgomado, ya que el contenido es de alrededor de 2 g de fosfolípidos totales por kg de aceite (Brevedan *et al.*, 2002, Lamas *et al.*, 2014). En el aceite del residuo sólido



obtenido luego de la EAE, se observó que el contenido de fosfolípidos se redujo considerablemente en un 55 %. Este resultado se encuentra en concordancia con algunos autores que informaron que los procesos acuosos-enzimáticos facilitan la eliminación de fosfolípidos hidratables del aceite (Christensen, 1991; Latif, 2009). La Figura 3.11 muestra el perfil de fosfolípidos de aceite de los collets y del residuo sólido (A y B, respectivamente). En la figura mencionada, se puede observar la disminución de las áreas de cada fosfolípido (análisis realizado en iguales cantidades de aceite y condiciones, para que puedan ser comparables las áreas).

**Tabla 3.20:** Fosfolípidos totales y perfil del aceite extraído con *n*-hexano de los collets y del residuo sólido obtenido luego de la EAE.

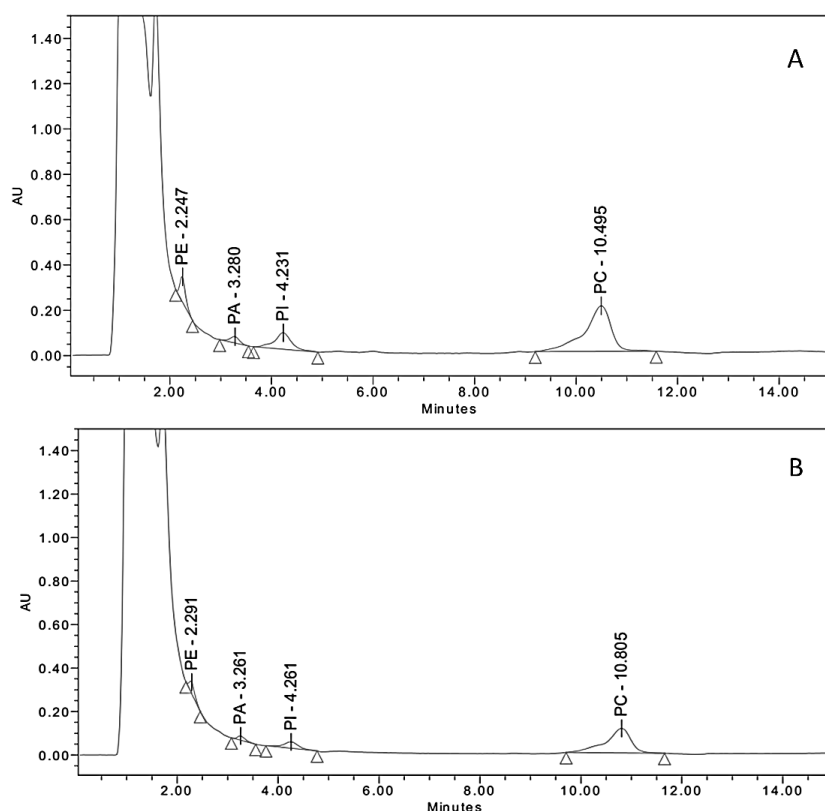
|   | <b>Collets</b>            | <b>Residuo sólido</b>     |
|---|---------------------------|---------------------------|
| <b>Fosfolípidos Totales (g/kg Aceite)</b> | 4,62 ± 0,20 <sup>a</sup>  | 2,08 ± 0,05 <sup>b</sup>  |
| <b>PC (%)</b>                             | 55,84 ± 1,31 <sup>a</sup> | 61,55 ± 0,72 <sup>b</sup> |
| <b>PI (%)</b>                             | 30,83 ± 1,19 <sup>a</sup> | 24,01 ± 0,69 <sup>b</sup> |
| <b>PE (%)</b>                             | 6,56 ± 0,10 <sup>a</sup>  | 6,36 ± 0,043 <sup>a</sup> |
| <b>PA (%)</b>                             | 6,77 ± 0,23 <sup>a</sup>  | 8,08 ± 0,02 <sup>b</sup>  |

Valores para el mismo componente en la misma fila seguido de letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por el Test de Tuckey.

Dentro del perfil (Tabla 3.20) se observaron diferencias significativas entre los aceites obtenidos del residuo sólido y los obtenidos de collets y se contempla que solo el PE no presentó diferencias significativas en el perfil, mientras que PC, PI y PA se vieron modificados.

Sin embargo, cuando se analizó el contenido de fosfolípidos en g/kg de aceite, se observó que los cuatro fosfolípidos analizados se redujeron, correspondiendo la mayor reducción al PI (65 %), esto podría atribuirse a que el PI existe como un complejo con potasio o magnesio y debido a su grupo inositol hidrofílico puede ser totalmente hidratable (Lamas *et al.*, 2014). Por otro lado, el PA presentó la menor reducción (46 %). Si bien este último forma parte de los fosfolípidos no hidratables, el PA existe como

ácido parcialmente dissociado combinado con un ion metálico formando un complejo, si este ion es monovalente el PA resulta hidratable, por lo tanto debido a la complejidad de la matriz podría suceder que parte del PA se encuentra acomplejado con un ion monovalente, por lo que pudo ser extraído en la fase acuosa durante el proceso de extracción acuoso-enzimático.



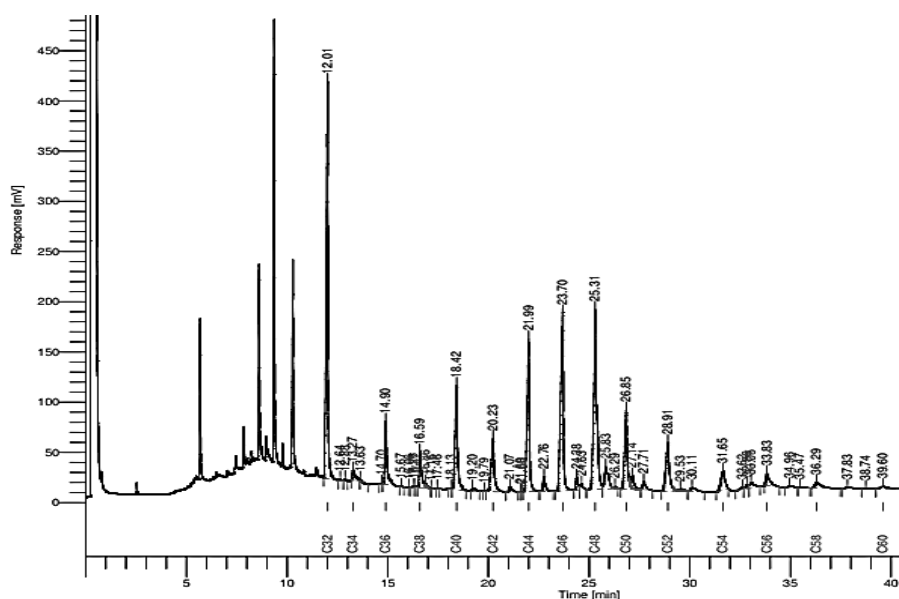
**Figura 3.11:** Perfil de fosfolípidos luego de la extracción con *n*-hexano por Soxhlet  
(A) aceite de collets (B) aceite del residuo sólido

### 3.7.7.3.3. Ceras

Las ceras del aceite de girasol son alcoholes (C18 a C28) esterificados con ácidos grasos saturados de cadenas largas (C20 a C22) (Belitz *et al.*, 1999). Se encuentran naturalmente en las semillas de girasol y residen principalmente en la cáscara, solo el 17 % se localiza en la pepa (Perez *et al.*, 2001). Si bien, antes de la extracción se realiza un descascarado parcial donde el contenido de ceras puede reducirse, el aceite debe ser descerado o winterizado para eliminar el residuo, ya que las ceras le confieren turbidez al aceite. El contenido de ceras en el aceite puede

cambiar de acuerdo con la variedad de semilla, su origen y conservación, el porcentaje de cascara eliminada, la temperatura y la tecnología utilizadas en los pasos de procesamiento a través de los cuales se obtuvo el aceite.

La Figura 3.12 muestra un cromatograma del perfil de ceras para el aceite de collets extraído con *n*-hexano.



**Figura 3.12:** Perfil de ceras de aceite de collets de girasol.

La Tabla 3.21 muestra el contenido y el perfil de ceras de aceite extraído de los collets de girasol y del residuo sólido obtenido luego de la extracción acuosa-enzimática.

El contenido total de ceras no presentó variación entre los aceites analizados a partir de ello, podría considerarse que el tratamiento enzimático y la extracción acuosa no provocan algún efecto sobre contenido de ceras en el aceite residual. Las ceras cristalizables no fueron estadísticamente significativas a pesar de la variación del perfil ( $p > 0,05$ ).

Dijkstra (2015) reportó para aceite de semillas de girasol un rango de ceras entre 600-3500 ppm, acorde con lo informado por Martini *et al.*, (2000). Según Carelli *et al.* (2002) el contenido total de ceras puede variar entre 200 y 3500 ppm en peso para los aceites de girasol crudos y puede ser tan alto como 600 ppm en peso para los aceites

de girasol refinados. Pérez *et al.* (2018) determinaron contenidos de ceras totales que variaron entre 808 y 1118 ppm para muestras de collets de girasol, de las cuales alrededor del 67-70 % son ceras cristalizables. Si bien estos valores resultaron más bajos que los obtenidos en el presente trabajo, el perfil resultó similar.

**Tabla 3.21:** Perfil de ceras de aceite extraído de los collets de girasol y del residuo sólido obtenido luego de la extracción acuosa-enzimática.

| Perfil                      | Collet                    | Residuo sólido            |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>C36</b>                  | 4,56 ± 0,26 <sup>a</sup>  | 5,15 ± 0,19 <sup>a</sup>  |
| <b>C38</b>                  | 3,04 ± 0,81 <sup>a</sup>  | 3,62 ± 0,07 <sup>a</sup>  |
| <b>C40</b>                  | 8,78 ± 0,64 <sup>a</sup>  | 9,67 ± 0,53 <sup>a</sup>  |
| <b>C42</b>                  | 6,41 ± 0,65 <sup>a</sup>  | 6,58 ± 0,41 <sup>a</sup>  |
| <b>C44</b>                  | 15,59 ± 1,06 <sup>a</sup> | 14,18 ± 0,87 <sup>a</sup> |
| <b>C46</b>                  | 20,48 ± 1,24 <sup>a</sup> | 18,41 ± 0,96 <sup>b</sup> |
| <b>C48</b>                  | 22,39 ± 1,08 <sup>a</sup> | 20,65 ± 0,50 <sup>b</sup> |
| <b>C50</b>                  | 9,05 ± 0,04 <sup>a</sup>  | 8,64 ± 0,02 <sup>b</sup>  |
| <b>C52</b>                  | 1,06 ± 0,35 <sup>a</sup>  | 6,68 ± 0,37 <sup>b</sup>  |
| <b>C54</b>                  | 3,96 ± 0,18 <sup>a</sup>  | 3,36 ± 0,27 <sup>a</sup>  |
| <b>C56</b>                  | 2,25 ± 0,21 <sup>a</sup>  | 2,09 ± 0,24 <sup>a</sup>  |
| <b>C58</b>                  | 1,39 ± 0,05 <sup>a</sup>  | 1,34 ± 0,07 <sup>a</sup>  |
| <b>C60</b>                  | 0,86 ± 0,02 <sup>a</sup>  | 0,85 ± 0,09 <sup>a</sup>  |
| <b>Ceras Totales (ppm)</b>  | 1592 ± 110 <sup>a</sup>   | 1514 ± 37 <sup>a</sup>    |
| <b>Cristalizables (ppm)</b> | 1228 ± 88 <sup>a</sup>    | 1177 ± 31 <sup>a</sup>    |

\*Valores para el mismo componente en la misma fila seguido de letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por el Test de Tuckey.

### 3.8. CONCLUSIONES DEL DISEÑO AMPLIADO

En el presente trabajo, se realizó un estudio más detallado sobre los factores de control que pudieran afectar la extracción acuosa-enzimática (velocidad de agitación, temperatura, relación enzima: sustrato y tiempo de extracción), a su vez se estudió el efecto de las interacciones entre dichos factores y se realizó una optimización simultánea de los mismos para mejorar el rendimiento de aceite y disminuir el contenido de proteínas solubles en la fracción líquida.

Los modelos polinomiales individuales de segundo orden fueron obtenidos para predecir las respuestas  $Y_a$  (rendimiento porcentual relativo de aceite) e  $Y_p$  (rendimiento porcentual relativo de proteína liberada en el líquido). Ambos modelos fueron válidos en el dominio experimental seleccionado y fueron necesarios para realizar la optimización simultánea.

El  $Y_a$  fue afectado en forma significativa mayoritariamente por los factores velocidad de agitación y temperatura, mientras que  $Y_p$  se vio afectada, además, por la relación enzima:sustrato ( $p < 0.05$ ). Las optimizaciones individuales dieron para ambos casos una temperatura óptima de 42 °C, valores altos para la relación enzima:sustrato y valores bajos de tiempos de extracción. En cambio, los valores óptimos de velocidad de agitación fueron totalmente opuestos, siendo el mayor para maximizar  $Y_a$  y el menor para minimizar  $Y_p$ .

La metodología de superficie de respuesta se utilizó para predecir los modelos de cada respuesta individual y realizar su optimización. La función deseabilidad fue utilizada para predecir la optimización simultánea a partir de los modelos individuales. Las condiciones predichas obtenidas por la optimización simultánea fueron: 1,72 % de relación enzima:sustrato, velocidad de agitación 249 rpm, temperatura 42 °C y 52 minutos de tiempo de extracción. La optimización simultánea permite predecir adecuadamente tanto el rendimiento porcentual relativo de aceite extraído como el rendimiento relativo porcentual de proteína liberada en la fase líquida.

Luego de estudiar la extracción acuosa-enzimática a escala laboratorio, se realizó la misma extracción con los factores optimizados a escala piloto. Se observó que los rendimientos relativos porcentuales de aceite y proteína liberada en la fracción líquida disminuyeron en comparación con los valores obtenidos a escala laboratorio. Del mismo modo se realizó el análisis de los azúcares reductores obtenidos en la fracción líquida, resultando mayor que el valor observado a escala laboratorio. Estos resultados indican que el proceso estudiado no puede ser escalado en forma directa ya que no se

alcanza la extracción óptima, por lo que sería necesario realizar un estudio experimental adicional en el equipo piloto aumentando la velocidad de agitación y el tiempo de extracción.

Con el objetivo de estudiar el efecto del proceso sobre la calidad del aceite se realizó una extracción con *n*-hexano del aceite residual en el sólido luego de la extracción acuosa-enzimática, se analizó su composición y se comparó con la composición original del aceite del collets de girasol (materia prima). Se observó que el aceite obtenido del residuo sólido presentó diferencias significativas en la cantidad de tocoferoles totales con respecto al aceite extraído del collet, siendo la misma un 19 % menor, debido principalmente a una disminución en el  $\alpha$ -tocoferol. Por otra parte, el contenido de fosfolípidos totales se encuentra dentro de los valores reportados en bibliografía para aceites desgomados y presentó diferencias significativas entre el aceite extraído de los collets y el del residuo sólido, con una reducción del 55 %. Cuando se analizó el perfil de fosfolípidos, se observaron diferencias significativas en PI, PC y PA, mientras que PE permaneció constante. Con respecto al contenido de ceras totales, se encuentra dentro de los rangos hallados para girasol, en ambas muestras de aceites y no presentaron diferencias significativas entre ellas. Los principales componentes de las ceras fueron esteres de átomos de carbono entre 44 y 48, en ambos casos. Por lo tanto, podría considerarse que el tratamiento enzimático no afecta el contenido de ceras del aceite, luego de la extracción con *n*-hexano.

En base a lo expuesto, se podría considerar que el aceite obtenido del residuo sólido con *n*-hexano presentó diferencias en componentes menores, debido a que posee un contenido de fosfolípidos de 2,08 g/kg, favorable para la industria y por otro lado si bien el contenido de  $\alpha$ -tocoferol se vio disminuido en un 19 %, el contenido total se encuentra en los rangos hallados para aceites crudos de girasol.

La extracción acuosa asistida por enzimas a partir de collets de girasol brinda rendimientos máximos de alrededor del 22 %. Si se suma a lo extraído en la etapa de extracción por prensado da rendimientos del orden del 80 % del aceite extraíble

presente originalmente en la semilla. Esto muestra que, en general, la combinación prensado - extracción acuosa enzimática es más eficiente que la extracción acuosa enzimática directa a partir de las semillas de girasol. Sin embargo, estos rendimientos todavía son muy bajos en comparación con los obtenidos por extracción con hexano, por lo que esta tecnología no puede ser competitiva a nivel comercial. Por esta razón, es conveniente explorar la utilización de otros solventes alternativos al agua, como los alcoholes, para esta etapa.

### **3.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ansharullah, J. A. H & Chesterman, C. F. (1997). Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 74, 141-146.
- Bäumler, E. R., Carrín, M. E., & Carelli, A. A. (2016). Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 178, 190-197.
- Belitz, H., Grosch, W., & Schieberle, P. (1999). *Food Chemistry*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- Brevedan, M. I. V., Carelli, A. A., & Crapiste, G. H. (2000). Changes in composition and quality of sunflower oils during extraction and degumming. *Grasas y Aceites*, 51(6), 417-423.
- Campbell, K. A., Vaca-Medina G., Glatz C.E & Pontalier P.Y. (2016). Parameters affecting enzyme-assisted aqueous extraction of extruded sunflower meal. *Food Chemistry*, 208, 246-251.
- Campbell, K. A. (2010). *Protein and oil recoveries from enzyme-assisted aqueous extraction of soybeans and sunflower seed*. Iowa State University, Iowa, EE.UU.
- Christensen, F. M. (1991). Extraction by aqueous enzymatic processes. *Inform. 2*: 984.
- Corzo, O., Bracho, N., Vásquez, A., & Pereira, A. (2008). Optimization of a thin layer drying process for coroba slices. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 372-380.
- Danso-Boateng, E. (2011). Effect of enzyme and heat pretreatment on sunflower oil recovery using aqueous and hexane extractions. *Engineering Technology*, 80, 839-845.
- de Figueiredo, A. K., Rodriguez, L. M., Fernandez, M., Riccobene, I. C., & Nolasco, S. M. (2015). Loss of lipid material during the dehulling of oilseeds with different structural characteristics. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7934-7943.



- de Figueiredo, A. K., Rodríguez, L. M., Lindström, L. I., Riccobene, I. C., & Nolasco, S. M. (2013). Performance analysis of a dehulling system for safflower grains. *Industrial Crops and Products*, 43, 311-317.
- Derringer, G. C. (1990). "A balancing act: Optimizing a product's properties", *Quality Progress*, junio de 1994.
- Derringer, G. C. y R. Suich (1980). "Simultaneous optimization of several responses". *Journal of Quality Technology*, 12, 214-219.
- Dijkstra, A. J. (2015). Oil Refining. En E. Martínez-Force (Ed.), *Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*. Elsevier.
- Dolhalit, M. L., Salam, S. N. A., Mutalib, A. A., & Yusoff, M. S. B. (2016). En Baharom F., Yusof Y., Mohd H. Puteh N. (Eds.), *Critical Analysis in Proposing Persuasive Multimedia Model of Truancy Awareness (PMTA)*.
- Dolde, D., Vlahakis, C., & Hazebroek, J. (1999). Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition, and temperature during development. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (3), 349-355.
- Dominguez, H., Nunez, M., & Lema, J. (1994). Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. *Food Chemistry*, 49 (3), 271-286.
- Dominguez, H., Nunez, M., & Lema, J. (1995). Aqueous processing of sunflower kernels with enzymatic technology. *Food Chemistry*, 53, 427-434.
- Fernández, M. B., Burnet, M. A., Perez, E. E., Crapiste, G. H., & Nolasco, S. M. (2014). Taguchi's methodology for determining optimum operating conditions in hydrothermal pretreatments applied to canola seeds. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 92(7), 1239-1246.
- Fisk, I. D., White, D. A., Carvalho, A., & Gray, D. A. (2006). Tocopherol—an intrinsic component of sunflower seed oil bodies. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(4) 341-344.
- Grompone, M. A. (2011). Sunflower oil. En F. Shahidi (Ed.), *Bayley's Industrial Oil and Fat Products*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

- Guan, X., & Yao, H. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106(1), 345-351.  
doi: 10.1016/j.foodchem.2007.05.041
- Harrington, E. (1965). The desirability function. *Industrial Quality Control* 21, 494-498.
- Jiang, L., Hua, D., Wang, Z., & Xu, S. (2010). Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 233-238.
- Lamas, D. L., Crapiste, G. H., & Constenla, D. T. (2014). Changes in quality and composition of sunflower oil during enzymatic degumming process. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 71-76.
- Latif, S. (2009). *Analytical investigations to compare the enzyme-assisted extraction of vegetable oils with conventional methods* (Tesis Doctoral). Department of Chemistry & Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Agriculture, Pakistán.
- Latif, S., & Anwar, F. (2009). Effect of aqueous enzymatic processes on sunflower oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(4), 393-400.
- Li, P., Gasmalla, M. A. A., Liu, J., Zhang, W., Yang, R., & Aboagarib, E. A. A. (2016). Characterization and demulsification of cream emulsion from aqueous extraction of peanut. *Journal of Food Engineering* 185, 62-71.
- Moreau, R. A., Johnston, D. B., Powell, M. J., & Hicks K. B. (2004). A comparison of commercial enzymes for the aqueous enzymatic extraction of corn oil from corn germ. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(11) 1071-1075.
- Marangoni, A. G. (2003). *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*. John Wiley & Sons.
- Martini, S., & An, M. (2000). Determination of wax concentration in sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(10), 1087-1093.
- Mat Yusoff, M. M., Gordon, M. H., & Niranjana, K. (2015). Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 60-82.

- Mat Yusoff, M., Gordon, M. H., Ezeh, O., & Niranjana, K. (2016). Aqueous enzymatic extraction of Moringa oleifera oil. *Food Chemistry*, 211, 400-408.
- Montgomery D.C. (1991), Diseño y Análisis de experimentos. Edit Limusa Wiley. p. 369.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2009). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments (Wiley Series in Probability and Statistics): Wiley, New York.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Macmillan.
- Nolasco, S. M., Aguirrezábal, L. A. N., & Crapiste, G. H. (2004). Tocopherol oil concentration in field-grown sunflower is accounted for by oil weight per seed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(11) 1045-1051
- Nyam, K. L., Tan, C. P., Lai, O. M., Long, K., & Man, Y. B. C. (2009). Enzyme-assisted aqueous extraction of Kalahari melon seed oil: optimization using response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(12), 1235-1240.
- Passos, C. P., Yilmaz, S., Silva, C. M., & Coimbra, M. A. (2009). Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry*, 115(1), 48-53.
- Perez, E. E., Fernández, M. B., Nolasco, S. M., & Crapiste, G. H. (2013). Effect of pectinase on the oil solvent extraction from different genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Food Engineering*, 117(3), 393-398.
- Pérez E. E., Bäumler E.R., Crapiste G.H. & Carelli, A:A. (2018). Effect of sunflower collets moisture on extraction yield and oil quality. *European Journal of lipids science and technology*, 1-7.
- Pulido, H. G., De La Vara Salazar, R., González, P. G., Martínez, C. T., & Pérez, M. D. C. T. (2012). *Análisis y Diseño de Experimentos*. McGraw-Hill.

- Ramadan, M. F., & Moersel, J. T. (2009). Oil extractability from enzymatically treated goldenberry (*Physalis peruviana* L.) pomace: range of operational variables. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(3), 435-444.
- Rosenthal, A., Pyle, D., & Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(6), 402-420.
- Rosenthal, A., Pyle, D., Niranjana, K., Gilmour, S., & 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(6), 499-509.
- Salgado, P. (2009). *Proteínas de Girasol: aislamiento, caracterización y aplicación en la industria alimentaria* (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Sharma, A., Khare, S., & Gupta, M. (2002). Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(3), 215-218.
- Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M., & Lema, J. (1998). Optimization of the enzymatic treatment during aqueous oil extraction from sunflower seeds. *Food Chemistry*, 61(4), 467-474.
- Statgraphics Centurion, X. (2009). Statpoint technologies. *INC. version*, 16, 17.
- Tabatabaei, S., & Diosady, L. L. (2013). Aqueous and enzymatic extraction processes for the production of food-grade proteins and industrial oil from dehulled yellow mustard flour. *Food Research International*, 52(2), 547-556.
- Velasco, L., Del Moral, L., Pérez-Vich, B., & Fernández-Martínez, J. M. (2010). Selection for contrasting seed tocopherol content in sunflower seeds. *The Journal of Agricultural Science*, 148(4), 393-400.
- Velasco, L., & Ruiz-Méndez, M. V. (2015). Sunflower Oil Minor Constituents. En Martínez-Force, E (Ed.), *Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*. Elsevier (pp. 297-329).

Zhang, Y.I., Li, S., Yin, C.P., Jiang, D.-H., Yan, F.F., & Xu, T. (2012). Response surface optimisation of aqueous enzymatic oil extraction from bayberry (*Myrica rubra*) kernels. *Food Chemistry*, 135(1), 304-308.

# **CAPÍTULO 4**

## **EXTRACCIÓN ALCOHOLICA**

### **CON PRE-TRATAMIENTO ENZIMÁTICO**

En el presente capítulo se estudia el uso de la enzima Viscozyme® L como pretratamiento a la extracción de aceite de girasol con etanol e isopropanol. Se analizó la eficiencia del proceso extractivo en comparación con la extracción convencional con *n*-hexano y se caracterizaron los aceites obtenidos según su contenido de fosfolípidos y tocoferoles.

#### **4.1. INTRODUCCIÓN**

Desde la década del '40 el etanol ha sido estudiado como posible sustituto del *n*-hexano en la extracción de aceites vegetales. Su bajo costo y la tecnología simple para su producción mediante la fermentación de una gran variedad de materiales biológicos, lo convierten en un solvente considerado como biorenovable. El etanol es menos inflamable y tiene baja toxicidad, por lo que su manipulación es menos riesgosa que el *n*-hexano y no deja residuos nocivos en las harinas residuales de extracción destinadas a alimentación animal (Baümler *et al.*, 2017; Ferreira-Dias *et al.*, 2003; Sangaletti-Gerhard *et al.*, 2014). Como desventaja, la solubilidad de los lípidos en etanol se ve afectada drásticamente

por el contenido de agua, tanto en la materia prima como en la mezcla solvente, y por la temperatura de extracción (Rao y Arnold, 1956). La elevada solubilidad de los alcoholes en el agua da como resultado la transferencia de humedad desde las semillas al solvente, reduciendo la eficiencia de extracción (Rao y Arnold, 1957). A temperatura ambiente, el aceite es parcialmente miscible en el alcohol. El incremento de la temperatura mejora la solubilidad de los lípidos en el solvente y por ende, mejora su extracción. Por el contrario, una disminución de la temperatura por debajo de la temperatura ambiente provoca una separación de fases y permite una fácil recuperación de la fase oleosa después del proceso de extracción. La demanda energética de esta recuperación es menor que la requerida en la etapa de desolventización convencional (Capellini *et al.*, 2019; Johnson y Lusas, 1983; Oliveira *et al.*, 2012).

El etanol permite la obtención de aceites y harinas de mejor calidad ya que reduce los niveles de ácidos grasos libres, además permite la eliminación de factores antinutricionales como el gossipol, las aflatoxinas y el ácido clorogénico (Hron Sr *et al.*, 1982; Toda *et al.*, 2016). Más allá de la buena calidad del aceite extraído, los estudios reportan que el etanol, debido a su menor selectividad hacia los triglicéridos, extrae junto con el aceite una mayor cantidad de azúcares, fosfolípidos, pigmentos, ceras y otros compuestos (Johnson *et al.*, 1983; Toda *et al.*, 2016; Bäumler *et al.* 2017).

Por otra parte, se ha estudiado el uso del isopropanol para la extracción de aceite de soja (Baker y Sullivan, 1983; Gandhi *et al.*, 2003; Lusas *et al.*, 1991; Seth *et al.*, 2007; Seth *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 1982), girasol (Gallegos-Infante *et al.*, 2007), semilla de algodón (Abraham *et al.*, 1988; Harris *et al.*, 1947; Kuk y Hron, 1998; Zhang *et al.*, 2002) y salvado de arroz (Proctor y Bowen, 1996), entre otros. Al igual que el etanol constituye una alternativa interesante para el reemplazo de *n*-hexano en la extracción de aceite.

La extracción con isopropanol también produce aceites y harinas de mayor calidad que la extracción convencional. Los aceites requieren menos etapas de refinado y la etapa de tostado de las harinas resulta simplificada. Por otro lado la extracción con isopropanol consume menos energía, es menos tóxico y presenta un punto de inflamación mayor comparado con el *n*-hexano, por lo cual el proceso extractivo resulta más seguro (Baker y Sullivan, 1983).

La dependencia de la solubilidad del aceite en isopropanol con la temperatura forma la base del proceso de extracción, ya que difiere del proceso con *n*-hexano principalmente en la recuperación de aceite de la miscela, que se realiza por enfriamiento y separación de fases en lugar de por destilación. Abraham *et al.* (1988) informaron que una mayor miscibilidad del aceite en isopropanol reduce la proporción de disolvente utilizado en comparación con el *n*-hexano o el etanol. La miscibilidad en agua del isopropanol confiere ciertas ventajas operativas; en el caso de la soja las láminas (flakes) de alto contenido de humedad se extraen satisfactoriamente (Singh *et al.*, 2004), y no se producen aglomeraciones en la etapa de desolventización y tostado.

El uso de alcoholes en la extracción de aceite de semillas y collets de girasol ha sido estudiado previamente en algunos pocos trabajos. Sineiro *et al.* (1998) estudiaron el efecto tipo de flujo en un extractor de laboratorio sobre la extracción etanólica de aceite a partir de semillas de girasol parcialmente descascaradas, informando rendimientos del 41,6 y 50,3 % para flujo continuo y pulsante respectivamente. Gallegos-Infante *et al.* (2007) analizaron la calidad del aceite obtenido de tres variedades de semillas de girasol descascaradas utilizando *n*-hexano e isopropanol como solventes para la extracción en Soxhlet y la refinación en miscela. Baümler *et al.* (2016) investigaron la extracción etanólica en Soxhlet a partir de collets, obteniendo rendimientos finales similares a los correspondientes a hexano pero en tiempos muy grandes, y modelaron la cinética de extracción en un equipo batch. En un trabajo posterior (Baümler *et al.*, 2017)



analizaron la difusión de tocoferoles, fosfolípidos y azúcares durante esta extracción.

La información aún es relativamente escasa y no se han informado antecedentes en el uso de etanol e isopropanol en collets de girasol tratados enzimáticamente. Por lo expuesto, resulta de interés comparar la eficiencia de la extracción de aceite con los dos alcoholes propuestos (etanol e isopropanol), en el residuo sólido obtenido luego de la extracción acuosa-enzimática.

#### **4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

Los experimentos se realizaron en cuatro etapas. En las tres primeras etapas se empleó un extractor Soxhlet en tanto que en la cuarta un sistema de extracción batch. Las extracciones y el análisis de cada muestra se realizaron por triplicado.

Los materiales utilizados fueron los collets originales y el residuo sólido obtenido luego de la extracción acuosa-enzimática (denominado de aquí en adelante como collets tratados o collets pre-tratados, para diferenciarlo de los collets sin tratamiento enzimático). La composición de los mismos se presenta en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1:** Composición química del collets original y de los collets pretratados

|                               | <b>Collet original</b> | <b>Collet pre-tratado</b> |
|-------------------------------|------------------------|---------------------------|
| <b>Humedad</b> (% b.s.)       | 7,03 ± 0,07            | 7,52 ± 0,13               |
| <b>Aceite</b> (% b.s.)        | 22,95 ± 0,01           | 19,74 ± 0,19              |
| <b>Proteínas</b><br>(%b.s.d)* | 40,69 ± 0,67           | 38,70 ± 0,60              |

\*base seca desgrasada

La primera etapa tuvo como objetivo analizar el efecto del contenido de humedad del material sobre la recuperación de aceite. Para ello, se sometieron a

extracción collets de girasol acondicionados a distintos contenidos de humedad (en el rango 6-65 %) durante 6 h utilizando etanol.

La segunda etapa tuvo por finalidad analizar el efecto del tratamiento enzimático en función del tiempo de extracción de aceite. Para lo cual, se acondicionaron los collets originales y los collets pre-tratados al contenido de humedad seleccionado a partir de los resultados de la etapa 1 y, posteriormente, fueron sometidos a extracción con etanol durante distintos tiempos en el intervalo de 1 a 6 horas. En la tercera etapa se comparó la capacidad extractiva del etanol y del isopropanol para la recuperación del aceite de los collets tratados enzimáticamente a dos tiempos diferentes.

Finalmente, en la última etapa la extracción se realizó en un sistema batch a escala laboratorio empleando tanto etanol como alcohol isopropílico. Las condiciones operativas se detallan en las secciones siguientes.

#### ***4.2.1. Etapa 1***

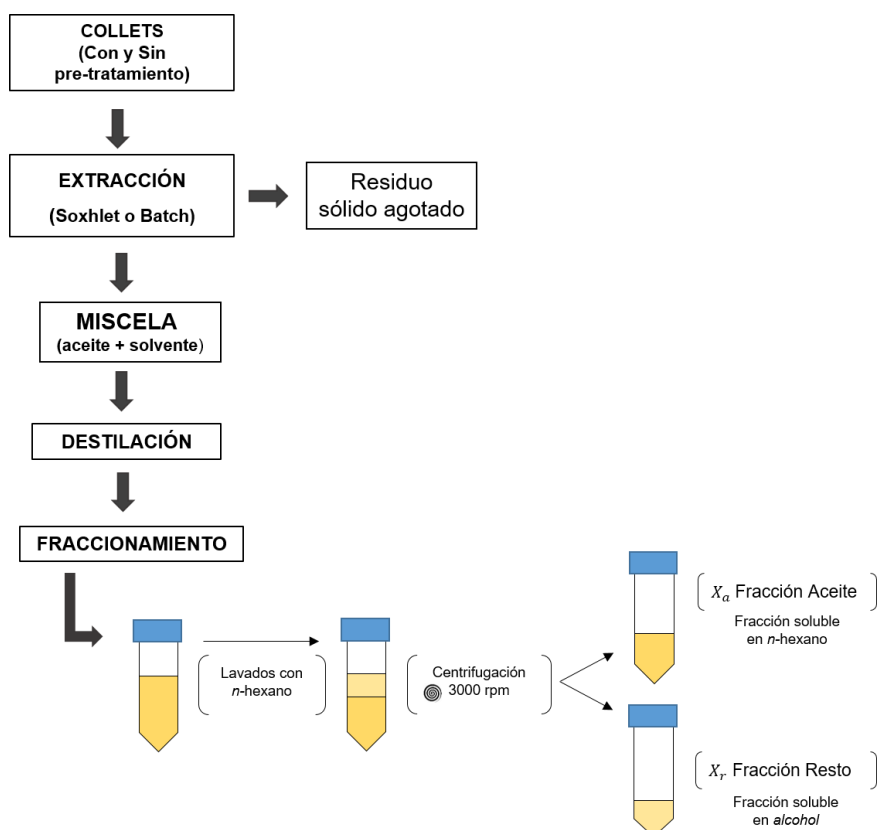
Se seleccionó un rango de contenidos de humedad comprendidos entre el valor inicial de los collets (ver Sección 2.2.1) y un valor superior al de salida del tratamiento acuoso-enzimático. Los collets con 7 % de humedad inicial se acondicionaron a 12, 25, 40 y 65 % (b.s.) de humedad mediante pulverización con cantidades precalculadas de agua destilada. Luego, se mezclaron completamente y se sellaron en recipientes de polietileno cerrados con tapones de rosca. Finalmente, las muestras se mantuvieron en un refrigerador a 4 °C durante al menos 48 horas para permitir una distribución homogénea de la humedad. El contenido de humedad se determinó mediante una balanza analítica infrarroja OHAUS (Modelo MB 45) utilizando una temperatura de 105 °C. Se llevaron a cabo tres réplicas para estimar la variabilidad inherente de la determinación. Para cada experimento, la muestra requerida se sacó del refrigerador y se permitió que alcance la temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas.

La extracción se llevó a cabo en un equipo Soxhlet, siguiendo la metodología de la norma IUPAC 1.122 (IUPAC, 1992), empleando etanol al 96 % m/v (composición azeotrópica) como solvente. Cabe aclarar que se utilizó la composición azeotrópica debido al costo de un solvente etanólico absoluto y a la funcionalidad del mismo a nivel industrial para su escalado, teniendo en cuenta que se requiere una etapa de recuperación de solvente. La extracción se realizó a la temperatura de ebullición del etanol (78,2 °C) durante 6 h. Luego de finalizada la extracción se evaporó el solvente en un evaporador rotatorio a 50 °C bajo vacío, hasta reducir el volumen de etanol en un 90 % aproximadamente.

#### *4.2.1.1. Separación de las fracciones*

Con el objetivo de cuantificar la fracción lipídica correspondiente al total del material extractable con etanol se procedió a la separación fraccionaria por solvente. Un esquema del procedimiento se muestra en la Figura 4.1.

Luego de reducir el volumen de la mezcla (material extraído + solvente) obtenida, se trasvasó a un tubo Falcon y se le añadieron aproximadamente 10 mL de *n*-hexano, se agitó y se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm. Se obtuvieron dos fases separadas con nitidez: una superior, en donde se encuentran los compuestos solubles en *n*-hexano, y que denominaremos *fase lipídica* y otra inferior, en donde se solubilizan compuestos en etanol, como fosfolípidos, polifenoles, pigmentos, azúcares solubles, etc. y a la que llamaremos *resto*. La fase lipídica fue retirada con pipeta Pasteur y colocada en frasco de color caramelo, de 15 mL, previamente tarados. Este procedimiento se repitió reiteradas veces hasta no percibir coloración en la fase superior (3-5 extracciones) y las alícuotas fueron juntadas. Entre un procedimiento y otro se eliminó el hexano con corriente de nitrógeno. Luego cada fracción se llevó hasta peso constante por arrastre del solvente con corriente de nitrógeno.



**Figura 4.1:** Extracción alcohólica y separación de fases

A su vez, la fracción etanólica fue recogida en frasco color caramelo de 30 mL y separado el etanol mediante una corriente de nitrógeno hasta peso constante.

Se cuantificó gravimétricamente (Balanza Sartorius CP2245, precisión 0,0001) la fracción lipídica y del resto. La cantidad de material extractable (*MET*) con etanol se calculó como:

$$MET = m_a + m_r \quad (20)$$

donde:

$m_a$ : masa de los compuestos solubles en hexano,

$m_r$ : masa de los compuestos solubles en etanol,

Así, el rendimiento de extracción alcohólica ( $Y_{MET}$ ) se expresó como:

$$Y_{MET} = \frac{\text{masa de material extractable}}{\text{masa de collet seco}} * 100 \quad (21)$$

A su vez, se calculó la fracción de componentes lipídicos, o *fracción de aceite* ( $W_a$ ), como:

$$W_a = \frac{\text{masa aceite en el material extractable}}{\text{masa de material extractable}} \quad (22)$$

y la fracción de *resto* ( $W_r$ ) por diferencia,

$$W_r = 1 - x_a \quad (23)$$

Se estimó la *eficiencia de la extracción* ( $E_a$ ) con etanol con respecto a la extracción con hexano por método Soxhlet como:

$$E_a = \frac{m_a}{m_{ao}} * 100 \quad (24)$$

donde:

$m_a$ : es la masa de aceite presente en la fase lipídica o masa de los compuestos solubles en hexano

$m_{ao}$ : es la masa de aceite inicial en el collets

La eficiencia  $E_a$  es equivalente al rendimiento porcentual relativo de aceite  $Y_a$  utilizado en el Capítulo 3.

#### 4.2.2. Etapa 2

Como se mencionó anteriormente, en esta etapa se analizó el efecto del tratamiento acuoso-enzimático en función del tiempo de extracción de aceite. Para

ello, se acondicionaron los collets sin tratamiento y con tratamiento acuoso-enzimático al contenido de humedad definido en base a los resultados de la Etapa 1. El procedimiento de extracción, fraccionamiento y cuantificación se realizaron de mismo modo que fueron descritos en el inciso anterior, con la salvedad de que los tiempos de extracción fueron de 1, 2, 3, 4 y 6 horas.

Complementariamente, se determinó el contenido total de fosfolípidos y su perfil a dos tiempos: uno en donde se presenta variación de la fracción lipídica y otro en donde esta no ocurre.

#### **4.2.3. Etapa 3**

Se analizó la capacidad extractiva del etanol y del isopropanol (IPA) siguiendo el mismo procedimiento que en la Etapa 1, utilizando collets con y sin tratamiento enzimático acondicionados al contenido de humedad seleccionado. Se empleó etanol al 96 % m/v con un punto de ebullición de 78,2 °C e isopropanol (para análisis 99 %) con un punto de ebullición de 82,5 °C. Se compararon dos tiempos de extracción (1 y 4 horas) y se analizó la fase de extracción a ambos tiempos (uno en donde se presenta variación de la fracción lipídica y otro en donde esta no ocurre).

Se evaluó la eficiencia de la extracción etanólica y con IPA según la Ecuación (24) y se cuantificó cada una de las fracciones.

#### **4.2.4. Etapa 4**

La extracción alcohólica se realizó en el sistema *batch* y el fraccionamiento se realizó como se describió en la Sección 4.2.2.1, utilizando etanol 96 % (m/v) e isopropanol (IPA). Las extracciones fueron realizadas a una temperatura constante de 70 °C, una velocidad de agitación de 270 rpm, que asegura una suspensión del material sólido y una relación sólido:sólvente de 1:5 (m:v). La relación de sólido:solvente fue determinada en base a los antecedentes sobre el

tema (Liaw *et al.* 2008; Kwiatkowski *et al.* 2002; Oliveira *et al.* 2012). Los tiempos de extracción se establecieron según el análisis de la Etapa 2.

El tratamiento enzimático de los collets se realizó a escala piloto en las condiciones utilizadas en el Capítulo 3 (sección 3.2.4) para llevar a cabo todos los ensayos con una muestra homogénea, obtenida de un mismo tratamiento.

Se determinó el contenido de fosfolípidos y tocoferoles totales, además de sus perfiles, de la fracción lipídica según se describió en el Capítulo 2, sección 2.1.4.2 y 2.1.4.1., respectivamente.

Se procedió a la cuantificación del contenido de proteína (Capítulo 2, sección 2.1.3.3.) de los residuos sólidos agotados.

### **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1. EFECTO DE LA HUMEDAD EN LA EXTRACCIÓN ETANÓLICA**

Se realizaron extracciones con etanol de collets de girasol con diferentes contenidos de humedad (entre 7 % y 65 % b.s.). La Tabla 4.2 muestra el porcentaje de material total extraído ( $Y_{MET}$ ), la fracción lipídica ( $W_a$ ) y la eficiencia de la extracción de aceite ( $E_a$ ) en función del contenido de humedad.

El material total extraído estuvo comprendido entre 30 y 34,5 % (g material extractable/100 g collets seco) y no se observa una funcionalidad con la humedad de la muestra, no presentando diferencias significativas en el intervalo analizado ( $p > 0,05$ ). La fracción de aceite ( $W_a$ ) estuvo comprendida entre un 60,5 % y un 70,1 % del material extractable, indicando la menor selectividad del etanol respecto al *n*-hexano durante la extracción. Los resultados sugieren una disminución de esta fracción con la humedad, pero el análisis estadístico sólo indica diferencias significativas a la menor humedad ( $p = 0,001$ ).

Baumler *et al.* (2016) reportaron un porcentaje de material extraído de 32,2 % con una fracción lipídica de 69 %, en muestras de collets de girasol con

una humedad de 6 % b.s., en extracción con etanol por método Soxhlet. Estos valores son similares a los obtenidos en el presente trabajo para una humedad del 7 % b.s.

**Tabla 4.2:** Porcentaje de material total extraído, la fracción lipídica y la eficiencia de la extracción de aceite, para los diferentes contenidos de humedad analizados.

| <b>Humedad</b><br>(% b.s) | $Y_{MET}^*$<br>$\left(\frac{g \text{ material extractable}}{100 g \text{ de collets seco}}\right)$ | $W_a^*$<br>$\left(\frac{g \text{ aceite}}{100 g \text{ material extractable}}\right)$ | $E_a^*$<br>$\left(\frac{g \text{ aceite}}{100 g \text{ aceite inicial en el collet}}$ |
|---------------------------|--|---|---|
| <b>7,0</b>                | 32,04 ± 0,72 <sup>ab</sup>   | 70,13 ± 1,13 <sup>a</sup>   | 98,51 ± 0,63 <sup>a</sup>   |
| <b>12,0</b>               | 34,48 ± 0,26 <sup>b</sup>  | 63,84 ± 0,56 <sup>b</sup>   | 96,54 ± 1,56 <sup>ab</sup>  |
| <b>25,0</b>               | 32,88 ± 1,12 <sup>ab</sup>   | 62,25 ± 1,26 <sup>b</sup>   | 86,32 ± 1,04 <sup>c</sup>   |
| <b>40,0</b>               | 29,99 ± 0,15 <sup>a</sup>  | 61,53 ± 1,83 <sup>b</sup>   | 80,96 ± 2,83 <sup>c</sup>   |
| <b>65,0</b>               | 32,94 ± 0,88 <sup>ab</sup>   | 60,50 ± 0,88 <sup>b</sup>   | 87,41 ± 3,90 <sup>bc</sup>  |

Los datos son valores medios ± error estándar. Los valores en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05) por método Tuckey.

\* Estos valores fueron obtenidos calculando las ecuaciones presentadas en la sección.

La eficiencia de la extracción de aceite presentó mayor variabilidad (Tabla 4.2). A 7 % de humedad el etanol tiene una capacidad similar a la del *n*-hexano para extraer aceite, con una eficiencia de 98,51 %. En cambio, en el rango de mayores humedades no se observan diferencias significativas y la extracción cae a valores de alrededor del 85%. A estas humedades la extractabilidad del aceite se vió afectada por la mezcla agua:solvente, observándose que cuando la concentración de solvente disminuye, la fracción de aceite también lo hace, dando lugar a una mayor extracción de los compuestos que representan el material no lipídico obtenido durante la extracción etanólica.

Estos resultados pueden ser explicados en términos del efecto de la humedad sobre la estructura del sólido y su interacción con el solvente. La



isoterma de sorción de agua en harinas y collets de girasol puede ser dividida en tres regiones (Cardarelli *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2018). A bajas humedades, en la región de monocapa, el agua es fuertemente retenida por enlaces hidrofílicos sobre los sitios polares en la matriz del sólido, principalmente carbohidratos y proteínas, por lo que prácticamente no interactúa con el solvente. Se han reportado valores de monocapa en el intervalo 4-5,7 % b.s harinas y collets de girasol (Cardarelli *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2018). En la región intermedia el agua es retenida fundamentalmente por adsorción en multicapas, con enlaces más débiles, en los microcapilares y la estructura fibrosa del sólido. El agua adsorbida produce una cierta expansión y disrupción de la estructura, favoreciendo la adsorción y difusión del solvente. Pérez *et al.* (2018) estudiaron el efecto de la humedad de los collets sobre la extracción con hexano y la calidad del aceite obtenido. Dichos autores utilizaron contenidos de agua de 12,40 y 18,92 % b.s. y obtuvieron rendimientos similares, levemente superiores al valor con 5.65 % b.s.

A humedades relativamente altas la mayor parte del agua está condensada y es retenida mecánicamente en los espacios vacíos y macrocapilares del sólido, por lo que tiene un comportamiento similar al agua libre. Este agua libre puede interferir con la penetración del solvente cuando es inmisible como el hexano, reduciendo la velocidad de extracción pero no significativamente el rendimiento (Pérez *et al.*, 2018). Pero en el caso de un solvente miscible en agua como los alcoholes, un alto contenido de agua libre puede modificar la composición, y en consecuencia, las propiedades del solvente. Cuando la concentración de alcohol disminuye, la solubilidad del aceite se reduce bruscamente a causa de que la polaridad del solvente aumenta, y con ello también aumenta la extracción de otros componentes solubles en solventes polares (Johnson y Lusas, 1983; Navarro *et al.*, 2016). Gandhi *et al.* (2003) obtuvieron eficiencias de 96 % y 86 % para una relación etanol:agua de 90:10 y 80:20 respectivamente; en la extracción de aceite de soja en Soxhlet durante 6 h. En el presente trabajo, con una relación

etanol:agua cercana a 90:10 (considerando la humedad de la muestra) se obtuvo una eficiencia promedio de 86 %, inferior a la reportada por estos autores.

A bajas humedades la extracción etanólica presenta un alto rendimiento final, aun cuando la velocidad de extracción es menor (Baümler *et al.*, 2016), por ello no es conveniente analizar el efecto del tratamiento enzimático, en este intervalo ya que las diferencias pueden resultar poco significativas. Además, el material obtenido luego de la extracción acuosa-enzimática sale del extractor batch con un contenido acuoso entre 48 y 65 % b.s., lo que implicaría la incorporación de una etapa intermedia de secado para acondicionar la humedad del sólido. Los resultados obtenidos muestran que a humedades relativamente altas no hubo diferencias significativas en la eficiencia de extracción de aceite (Tabla 4.3), presentando una eficiencia promedio de 85 %. Por estas razones se decidió utilizar el collet pre-tratado tal cual sale del extractor batch.

#### 4.3.2. EFECTO DEL TIEMPO EN LA EXTRACCIÓN ETANÓLICA

El efecto del tiempo en la extracción etanólica fue otra consideración importante para determinar la capacidad extractiva del etanol tanto en collets como en collets pre-tratados enzimáticamente para estudiar simultáneamente el efecto del tratamiento enzimático. Se utilizaron tiempos de extracción entre 1 y 6 horas. A fin de posibilitar la comparación de los resultados, y en función de lo discutido en la sección anterior, el contenido de humedad de las muestras fue fijado en 48 % b.s

En la Tabla 4.3 se muestran los valores promedio obtenidos para la fracción lipídica ( $W_a$ ) (g aceite/ 100 g de material extractable) y la eficiencia de la extracción etanólica ( $E_a$ ) (g de aceite/ 100 g de aceite inicial en los collets pre-tratados) durante la extracción etanólica en ambos materiales. El análisis estadístico presentó diferencias significativas en la eficiencia de extracción entre

las muestras ( $p = 0,005$ ) y entre los tiempo de extracción ( $p < 0,0001$ ), pero no se encontró interacción significativa entre las variables (tiempo y tratamiento).

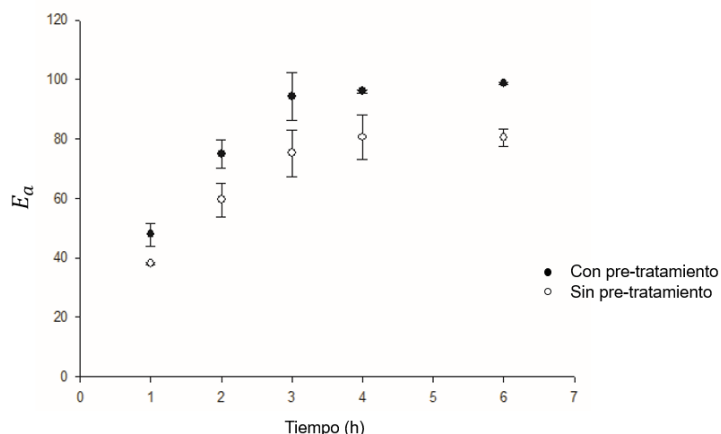
**Tabla 4.3:** Eficiencia de la extracción etanólica de aceite y fracción lipídica en collets con y sin pre-tratamiento enzimático (humedad de 48% b.s.)

| Tiempo<br>(h) | Sin pre-tratamiento    |                      | Con pre-tratamiento   |                       |
|---------------|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|               | $E_a$                  | $W_a$                | $E_a$                 | $W_a$                 |
| 1             | $38,02 \pm 0,30^{aA}$  | $48,54 \pm 0,20^a$   | $47,72 \pm 3,87^{aB}$ | $75,36 \pm 0,27^a$    |
| 2             | $60,94 \pm 4,69^{bA}$  | $67,54 \pm 3,04^b$   | $75,02 \pm 4,70^{bB}$ | $77,98 \pm 0,02^a$    |
| 3             | $75,16 \pm 7,95^{bcA}$ | $67,00 \pm 0,94^b$   | $94,21 \pm 3,95^{cB}$ | $84,64 \pm 2,46^b$    |
| 4             | $80,57 \pm 7,33^{cA}$  | $59,59 \pm 0,88^c$   | $96,08 \pm 0,57^{cB}$ | $80,42 \pm 1,99^{ab}$ |
| 6             | $80,43 \pm 2,81^{cA}$  | $61,54 \pm 1,83^b^c$ | $98,67 \pm 0,50^{cB}$ | $78,94 \pm 1,30^{ab}$ |

Valores en la misma columna seguida por diferentes letras minúsculas (efecto del tiempo) son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey.

Valores en la misma fila seguida por diferentes letras mayúscula (efecto del tratamiento) son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey

En la Figura 4.2 se observa que la eficiencia de la extracción etanólica  $E_a$  para muestras con y sin pre-tratamiento enzimático aumentó continuamente con el tiempo de extracción, especialmente en las primeras tres horas, y luego tiende asintóticamente a un valor máximo. En el análisis estadístico del efecto del tiempo en cada muestra se observó que la eficiencia de la extracción presentó diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) a 1, 2 y 3 horas en collets sin y con pre-tratamiento (Tabla 4.3). A partir de las 3 horas de extracción, no se observaron diferencias significativas en la eficiencia ( $p > 0,0936$ ), debido fundamentalmente al alto grado de error observado en algunas determinaciones, obteniendo un máximo promedio de 80,50% y 96,32% en collets sin y con pre-tratamiento, respectivamente. Al analizar el efecto del tratamiento enzimático a un mismo tiempo de extracción, se observa que  $E_a$  fue superior en las muestras con pre-tratamiento (Figura 4.3), para todos los tiempos analizados.



**Figura 4.2:** Eficiencia de la extracción etanólica en collets sin y con pretratamiento enzimático

Al evaluar la fracción lipídica se observaron diferencias significativas tanto a los distintos tiempos de extracción como entre muestras ( $p = 0,005$ ). En la Tabla 4.3 se puede observar que con el avance de la extracción en los collets sin pre-tratamiento, la fracción lipídica aumentó en las primeras 3 horas de extracción y luego disminuyó levemente. Esto puede explicarse en términos de la baja selectividad del etanol hacia los triglicéridos. Al principio, algunos compuestos polares que tiene afinidad con el etanol (fosfátidos, polifenoles, azúcares, pigmentos, etc.) lixivian más rápidamente que los lípidos por lo que la fracción resto ( $W_r$ ) es más alta. Luego, a medida que se va extrayendo el aceite, aumenta la fracción lipídica. Apparentemente al final, cuando el rendimiento de aceite alcanza asintóticamente el máximo, el etanol continúa extrayendo otros compuestos polares del sólido.

Por otro lado, las muestras con pre-tratamiento presentaron un comportamiento similar aunque de menor intensidad, con un máximo a las 2-3 horas, y fracciones lipídicas significativamente superiores a las de los collets. Esto puede deberse en gran medida a que, como se discutió en el capítulo anterior, la extracción acuosa-enzimática elimina parte de algunos compuestos como azúcares reductores, polifenoles, proteínas solubles y fosfolípidos hidratables,

provocando una disminución del contenido de estos componentes antes de la extracción alcohólica. Si bien, varios autores han mencionado la baja selectividad de los alcoholes durante la extracción, solo algunos han realizado fraccionamiento para separar los componentes lipídicos de los no lipídicos y los antecedentes sobre el tema aun resultan escasos. Citeau *et al.* (2018) reportaron en extracción etanólica de aceite de colza, un fraccionamiento en frío de las fracciones obtenidas luego de la extracción y un fraccionamiento similar al informado en este trabajo, con lavados con *n*-hexano para separar las fracciones  $W_a$  y  $W_r$ . Baümler *et al.* (2016), por su parte, realizaron extracción etanólica de aceite de collets de girasol, utilizando un fraccionamiento similar al realizado en el presente capítulo. Sánchez *et al.* (2018), también llevaron a cabo extracciones etanólicas de aceite de canola pre-tratadas con microondas, realizando un fraccionamiento del material total extractable (en  $W_a$  y  $W_r$ ), donde informaron que la fracción no lipídica se vio disminuida luego del pre-tratamiento. Los trabajos citados podrían avalar el tipo de fraccionamiento utilizado en el presente trabajo como efectivo para la separación de la fracción resto.

En conclusión, podría considerarse favorable para la extracción alcohólica, la realización de un tratamiento acuoso-enzimático previo a la extracción, teniendo en cuenta que este aumenta tanto la recuperación de aceite como la fracción lipídica en la fase líquida.

#### *4.3.2.1. Contenido de fosfolípidos en aceites a dos tiempos de extracción.*

En el Capítulo 3 se observó que luego de la extracción acuosa-enzimática el porcentaje de fosfolípidos disminuyó en el aceite residual obtenido con *n*-hexano. Debido a ello, se realizó un análisis del contenido de fosfolípidos en el aceite extraído a 1 y 4 horas de extracción. Estos tiempos fueron seleccionados en base al análisis realizado en la sección anterior, considerando por un lado tiempos que presenten diferencias significativas entre ellos, y por otro lado un

tiempo en el que la eficiencia es cercana a la capacidad extractiva máxima para el etanol en las condiciones analizadas. En la Tabla 4.4 se presentan los resultados obtenidos para el contenido total de fosfolípidos en el aceite y su perfil.

**Tabla 4.4:** Análisis de fosfolípidos en aceites obtenidos por extracción con etanol.

|  | Tiempo 1 h                 |                            | Tiempo 4 h                 |                            |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|  | <i>Sin pre-trat</i>        | <i>Con pre-trat</i>        | <i>Sin pre-trat</i>        | <i>Con pre-trat</i>        |
| <b>Fosfolípidos Totales</b><br>(g/kg Aceite) | 8,87 ± 0,22                | 26,26 ± 1,32               | 7,95 ± 0,19                | 16,95 ± 0,51               |
| <b>PC (%)</b>                                | 44,29 ± 0,13 <sup>aA</sup> | 48,85 ± 1,06 <sup>bA</sup> | 36,24 ± 0,61 <sup>aB</sup> | 44,14 ± 1,57 <sup>bA</sup> |
| <b>PI (%)</b>                                | 40,89 ± 3,61 <sup>aA</sup> | 38,97 ± 1,44 <sup>aA</sup> | 48,96 ± 0,25 <sup>aA</sup> | 41,15 ± 2,23 <sup>bA</sup> |
| <b>PE (%)</b>                                | 11,20 ± 1,00 <sup>aA</sup> | 7,55 ± 0,79 <sup>aA</sup>  | 8,69 ± 0,55 <sup>aA</sup>  | 9,97 ± 0,12 <sup>aA</sup>  |
| <b>PA (%)</b>                                | 3,61 ± 0,01 <sup>aA</sup>  | 4,62 ± 0,70 <sup>aA</sup>  | 6,11 ± 0,19 <sup>aB</sup>  | 4,74 ± 0,54 <sup>aA</sup>  |

Valores en la misma fila seguida por diferentes letras minúsculas (comparación del efecto del tratamiento al mismo tiempo) son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey.

Valores en la misma fila seguida por diferentes letras mayúscula (comparación del efecto del tiempo en las mismas condiciones) son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey.

Los aceites con y sin tratamiento enzimático obtenidos en la extracción etanólica presentaron un mayor contenido de fosfolípidos totales con respecto al aceite obtenido en la caracterización de la materia prima (4,62 y 2,08 g/Kg Aceite). Estos resultados siguen la misma tendencia que los reportados por Capellini *et al.* (2017) para muestras de aceite de salvado de arroz y por Citeau *et al.* (2018) en aceite de colza. Esto podría ser explicado por la diferencia de polaridades de los disolventes. Los lípidos polares están ligados por fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno, requieren disolventes polares capaces de romper tales uniones y liberarlos (Brum y Arruda, 2009). El etanol al ser más polar extrae más lípidos con estas características, como son los fosfolípidos, que el hexano utilizado para extraer el aceite original. Capellini *et al.* (2017) calcularon las constantes dieléctricas (una medida de polaridad molecular) del *n*-hexano y etanol, obteniendo valores de 1,81 y 22,29 respectivamente. Esta diferencia entre los

valores de las constantes dieléctricas del *n*-hexano y el etanol pueden estar relacionadas con el contenido más alto de fosfolípidos en el aceite extraído con etanol respecto al determinado en la materia prima.

El contenido de fosfolípidos del aceite extraído de los collets pre-tratados fue elevado, alrededor de 10 veces superior al contenido original y 2-3 veces superior al de la muestra sin tratar. Aparentemente las enzimas, al degradar las paredes celulares, también liberan o hace más accesibles los fosfolípidos que componen las membranas celulares que no estaban originalmente en el aceite. Los fosfolípidos, en las semillas de girasol, están presentes no solo en las membranas de los cuerpos lipídicos, asociados con las proteínas, sino también en las membranas biológicas. Las membranas citosólicas, mitocondrial y vacuolar, están compuestas de fosfolípidos entre los cuales PC, PE y PI son las especies más prominente (Salas *et al.*, 2006). PC y PI son los mayoritarios, mientras que PE resulta muy variable de acuerdo al tipo de célula estudiada (Nelson *et al.*, 2008). Esta distribución de los fosfolípidos dentro de la célula, podría explicar la extracción de una mayor cantidad de los mismos, atribuyendo el aumento no solo a la polaridad del solvente sino también a la ruptura de las estructuras de las membranas por acción enzimática.

En ambos casos, el contenido de fosfolípidos fue mayor a 1 h que a 4 h de extracción, indicando que parte de estos compuestos están más accesibles o tienen mayor afinidad con el etanol, por lo que al principio son extraídos más rápidamente. La interacción entre tiempo y tratamiento resultó significativa ( $p = 0,0012$ ), sugiriendo que el contenido de fosfolípidos a lo largo de tiempo no tiene el mismo comportamiento para cada tratamiento. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la eficiencia de la extracción (recuperación de aceite) es significativamente menor para la muestra sin tratar (Tabla 4.3) y que su contenido de fosfolípidos también es menor.

La comparación de los perfiles de fosfolípidos (Tabla 4.4) muestra que los aceites extraídos del material con pre-tratamiento tienen un mayor contenido de PC que los aceites extraídos de los collets. Esto podría ser explicado porque PC resulta ser el fosfolípido mayoritario tanto en las membranas de los cuerpos lipídicos como de las membranas citosólicas (Nelson *et al.* 2008). La comparación del perfil de los aceites de la misma muestra a diferentes tiempos sugiere que la PC se extrae más rápidamente. El análisis estadístico de los datos indica que los collets sin tratar presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en PC y PE entre 1 y 4 horas de extracción, mientras que el perfil de fosfolípidos de los aceites pre-tratados no presentó diferencias significativas ( $p = 0,0001$ ).

#### 4.3.3. EFECTO DEL TIPO DE ALCOHOL

En esta etapa se evaluó el comportamiento de un alcohol alternativo como el isopropanol en la extracción de aceite de collets con y sin pre-tratamiento enzimático, a dos tiempos de extracción (1 y 4 horas). En la Tabla 4.5 se presentan los correspondientes valores de la eficiencia de extracción, que se comparan con los resultados obtenidos en la etapa anterior para etanol.

**Tabla 4.5:** Eficiencia de la extracción ( $E_a$ ) con isopropanol y etanol.

| Tiempo<br>(h) | Etanol                        |                               | Isopropanol                   |                               |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|               | <i>Sin pre-trat</i>           | <i>Con pre-trat</i>           | <i>Sin pre-trat</i>           | <i>Con pre-trat</i>           |
| 1             | 38,03 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup> | 47,72 $\pm$ 3,87 <sup>b</sup> | 74,75 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup> | 78,98 $\pm$ 4,63 <sup>a</sup> |
| 4             | 80,57 $\pm$ 7,33 <sup>a</sup> | 96,08 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup> | 92,11 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup> | 96,23 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup> |

Valores en la misma fila seguida por misma letras minúsculas (comparación del efecto del tratamiento al mismo tiempo, mismo solvente) no son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey.

Se analizaron estadísticamente las interacciones entre los distintos factores y se observó que la interacción entre tipo de solvente y tiempo de extracción resultó significativa ( $p = 0,0009$ ), indicando que el tipo de solvente no



se comporta de la misma manera en los tiempos analizados. En cambio, no presentaron diferencias significativas en las demás interacciones: entre solvente-tratamiento ( $p = 0,5304$ ) y tiempo-tratamiento ( $p = 0,9473$ ).

Al comparar ambos alcoholes se puede observar que, en general, la extracción con isopropanol fue mayor que con etanol. La mayor diferencia se presentó a 1 hora donde la eficiencia de la extracción con isopropanol superó a la del etanol en un 96 % y 65 % en collets sin y con pre-tratamiento, respectivamente. En cambio, a las 4 horas la mejora en la eficiencia al usar isopropanol fue del 14 % en los collets sin tratar, no observándose diferencias significativas en las muestras tratadas. Se puede concluir que, en los tiempos estudiados, el uso de isopropanol mejora la eficiencia máxima de extracción en el caso de los collets sin tratar y la velocidad de extracción para ambos materiales.

Al analizar el efecto del pretratamiento enzimático, se observa que las diferencias en el caso del isopropanol no son tan marcadas como las obtenidas con etanol (Tabla 4.5). De hecho, el análisis estadístico indica que para el isopropanol no hay diferencias significativas, tanto a 1 hora ( $p = 0,3289$ ) como a 4 horas de extracción ( $p = 0,1017$ ),

Abu-Arabi *et al.* (2000), realizaron una extracción de aceite de jojoba con isopropanol, obteniendo una eficiencia del 86 %, en Soxhlet por 18 h de extracción. Estos valores resultaron inferiores a los reportados en este trabajo a pesar de haber llevado a cabo una extracción de mayor tiempo. Li *et al.* (2014) realizaron una comparación de solventes para la extracción de aceite de colza (método Soxhlet, 6 horas de extracción), obteniendo para isopropanol y etanol una eficiencia de 83,1 % y 22,8 %, respectivamente. Estos valores también son inferiores a los obtenidos en el presente trabajo para ambos alcoholes, aun considerando que el tiempo de extracción, en este caso también fue mayor.

Del mismo modo que el etanol, el isopropanol también presentó baja selectividad, ya que además de material lipídico se obtuvieron otros componentes

no solubles en *n*-hexano. La Tabla 4.6 presenta la fracción resto  $W_r$  obtenida luego de la separación de las fracciones para la extracción con ambos solventes.

**Tabla 4.6:** Material no lipídico ( $W_r$ ) de la extracción con etanol e isopropanol.

| Tiempo<br>(h) | Etanol                     |                            | Isopropanol                |                            |
|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|               | <i>Sin pre-trat</i>        | <i>Con pre-trat</i>        | <i>Sin pre-trat</i>        | <i>Con pre-trat</i>        |
| <b>1</b>      | 51,46 ± 0,20 <sup>aA</sup> | 24,64 ± 0,27 <sup>bA</sup> | 19,89 ± 1,30 <sup>aA</sup> | 15,15 ± 0,72 <sup>bA</sup> |
| <b>4</b>      | 40,41 ± 0,88 <sup>aB</sup> | 19,58 ± 1,99 <sup>bB</sup> | 19,55 ± 4,98 <sup>aA</sup> | 11,99 ± 2,76 <sup>aA</sup> |

Valores en la misma fila seguida por diferentes letras minúsculas (efecto del tratamiento el mismo alcohol alcoholes) son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey.

Valores en la misma columna seguida por diferentes letras mayúscula (efecto del tiempo para un mismo tratamiento con el mismo alcohol) son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey

En el análisis de la varianza no se observaron interacciones significativas entre tiempo-solvente ( $p = 0,9907$ ) y tiempo-tratamiento ( $p = 0,8588$ ).

Como se mencionó en la sección anterior, el etanol extrae una elevada cantidad de material no lipídico, observándose una amplia diferencia entre el material que recibió tratamiento enzimático y el que no, para ambos tiempos analizados. La fracción resto en las extracciones etanólicas de collets tratado se redujo considerablemente, siendo aproximadamente un 79 % menor que en la extracción etanólica de collets sin tratar ( $p < 0,0054$ ).

En el caso del isopropanol, la fracción no lipídica fue marcadamente inferior a la obtenida con etanol, del orden del 40-60 %. La fracción resto final extraída con isopropanol en collets sin pre-tratamiento fue similar a la obtenida con etanol en collets tratados. Cuando se realizó el análisis estadístico de la extracción con isopropanol, se observó que a 1 hora  $W_r$  presentó diferencias significativas ( $p = 0,0462$ ), siendo mayor en las muestras sin pre-tratamiento. En cambio, a 4 horas de extracción esta diferencia no fue observada ( $p = 0,2014$ ), debido al elevado error en las determinaciones.

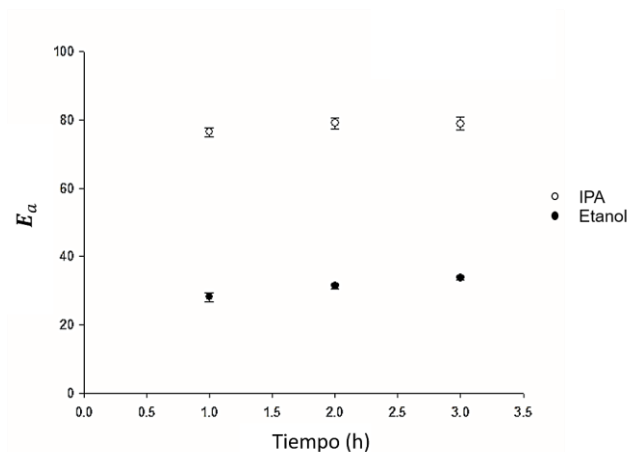
Como se mencionó previamente, solo algunos autores realizaron fraccionamiento del material total extraído con etanol, destacando la baja selectividad del mismo (Baumler *et al.* 2016; Citeau *et al.* 2018; Sanchez *et al.* 2018). Sin embargo, aún no se ha reportado el fraccionamiento del material total extraído en el proceso extractivo con isopropanol.

#### 4.3.4. EXTRACCIÓN BATCH CON ETANOL E ISOPROPANOL

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que uso de la extracción acuosa-enzimática como pre-tratamiento de los collets aumenta la velocidad de extracción y el rendimiento de aceite y disminuye la fracción lipídica en la extracción etanólica, y en menor medida en la extracción con isopropanol (IPA), por lo que se continuaron los estudios utilizando muestras con pre-tratamiento.

Por otra parte, si bien el método Soxhlet permitió estudiar el efecto de distintas variables y tipo de solvente, utiliza condiciones de flujo óptimas y temperaturas extremas, ya que se alcanzaron las temperaturas de ebullición de los solventes (Etanol ~78 °C e IPA ~82 °C). Estas condiciones brindan las máximas recuperaciones, pero se alejan de las que se pueden utilizar en un proceso real. Por esta razón se utilizó un extractor batch y una temperatura menor ( $T = 70\text{ °C}$ ), en un intervalo de tiempo de 1 a 3 horas, para comparar la extracción alcohólica con etanol e isopropanol (IPA). Debe aclararse que se seleccionó un intervalo de tiempo razonable, donde la extracción con hexano ya es muy alta, dado que el objetivo fue analizar la viabilidad del proceso en función del rendimiento. En el caso de querer estudiar y modelar la cinética de la extracción hubiese sido necesario explorar otros tiempos, inferiores a 1 h y superiores a 3 h.

La Figura 4.3 muestra la eficiencia de extracción para los dos alcoholes utilizados en función del tiempo.



**Figura 4.3:** Eficiencia de la extracción de aceite de muestras pre-tratadas enzimáticamente en función del tiempo de extracción, utilizando IPA y etanol como solvente.

En dicha figura se puede observar claramente la diferencia de capacidad de extracción entre ambos alcoholes. El IPA presentó un rendimiento considerablemente mayor que el etanol a los diferentes tiempos de extracción ( $p < 0,05$ ). La eficiencia de aceite recuperado con etanol varió entre  $28,09 \pm 1,30$  y  $33,69 \pm 0,44$  %, mientras que el rendimiento del isopropanol varió entre  $71,72 \pm 1,27$  y  $78,49 \pm 1,54$  %. La mayor capacidad extractiva que presentó el IPA puede ser explicado por la temperatura de miscibilidad del aceite que tiene cada solvente. La temperatura de miscibilidad es la temperatura a la que se observa una única fase entre el aceite y el alcohol, es decir donde el aceite se encuentra solubilizado en el alcohol formando una única fase. Gandhi *et al.* (2003) consideraron que la temperatura de miscibilidad del aceite de soja en etanol es de  $70^\circ\text{C}$ , mientras que la del mismo aceite en IPA es de  $50^\circ\text{C}$ , aunque la solubilidad también depende de la hidratación del solvente. Por otra parte, el IPA presenta un azeótropo con un porcentaje de humedad mayor, lo cual podría influir en la eficiencia de la extracción.

A partir de las curvas de extracción se puede concluir que hay una etapa inicial rápida, donde se lixivian el material extraíble más accesible (presente en la superficie del sólido o en los macroporos del mismo), seguido de una etapa más

lenta de dilución y difusión desde el interior de la estructura sólida. Esto ya ha sido observado y modelado tanto para extracción con hexano (Baümler *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2011) como para extracción con etanol (Baümler *et al.*, 2016). A través del análisis de varianza se observó que la interacción entre tiempo de extracción y el solvente no resultó significativa ( $p=0,9758$ ) en el rango estudiado, fundamentalmente porque se ha superado la etapa inicial de lixiviación o lavado donde se extrae una fracción importante del material. El etanol con el transcurso del tiempo de extracción presentó diferencias significativas ( $p = 0,0003$ ), incrementando el rendimiento a medida que aumenta el tiempo. Mientras que el isopropanol estadísticamente no presentó diferencias significativas en el rendimiento a los diferentes tiempos ( $p=0,2042$ ). Esto concuerda con lo obtenido en la sección 4.4. El IPA presenta una mayor velocidad de extracción por lo que se acerca más rápidamente y en forma asintótica al valor máximo. El etanol, en cambio, tiene una menor velocidad de extracción y extiende en el tiempo la etapa difusiva. Baümler *et al.* (2016) reportaron un comportamiento similar para la extracción etanólica de collets de girasol, aunque con rendimientos mayores que van de alrededor del 30 % a las 0,5 h hasta 65 % a la 4,5 horas.

Capellini *et al.* (2017) reportaron rendimientos de aceite de salvado de arroz de 59 % y 71 % con los azeótropo de etanol e isopropanol, respectivamente (en extracción batch con una relación 1:3 de sólido: solvente a una temperatura de 70 °C, durante 1 hora). Los valores reportados para IPA son similares a los presentados en este trabajo a 1 hora de extracción, mientras que en el caso del etanol los rendimientos informados por dicho autor fueron mayores. Capellini *et al.* (2019) estudiaron también la extracción de aceite de sésamo en las mismas condiciones que en el estudio anterior, con rendimientos de 80 % y 82 % para etanol e IPA, respectivamente. En este caso, si bien con IPA se obtuvieron resultados similares a 3 horas de extracción, con etanol los rendimientos presentados siguen siendo inferiores.

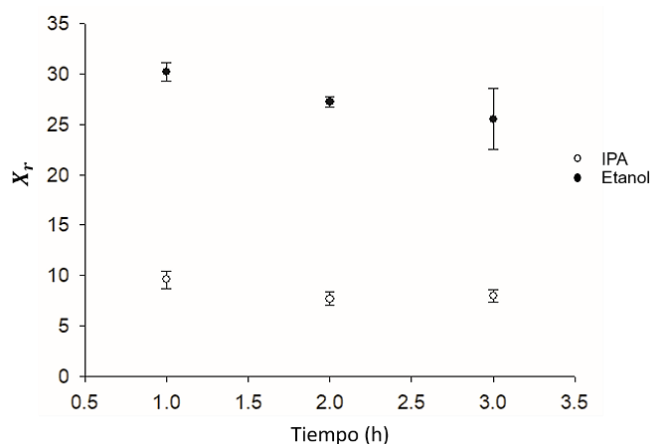
De Oliveira *et al.* (2013) estudiaron el uso de etanol e IPA en la extracción de aceite de semillas de maracuyá (sistema batch, 8 h a 40 °C, relación sólido:líquido de 1:6 y 1:4 ), reportaron rendimientos aproximados de 66 % y 73 % para etanol y de 82 % y 68 % para IPA. Comparando estos resultados con los presentados en este trabajo se observa que si bien los rendimientos son marcadamente superiores para etanol, con un tiempo de extracción considerablemente mayor, los rendimientos con IPA son ligeramente inferiores.

Sawada *et al.* (2014) informaron una eficiencia en la extracción de aceite de soja con el azeótropo de etanol de 50 % durante una hora de extracción (sistema batch, relación sólido: líquido de 1:3, 70 °C). Por último, Zhang *et al.* (2002) reportaron una eficiencia máxima de extracción para aceite de colza extraído con azeótropo de isopropanol, del 97,6 % a 75 °C en sistema batch. En este último caso, la eficiencia resulta superior a la obtenida en este estudio.

Los antecedentes informados respecto de la eficiencia en la extracción con IPA en la mayoría de los casos, se asemejan a los obtenidos en este estudio. Sin embargo los rendimientos obtenidos con etanol, en todos los casos resultaron considerablemente mayores. Esta variación en la eficiencia del etanol podría atribuirse a las diferencias presentadas tanto en las matrices utilizadas, especialmente su contenido de humedad, como en la relación sólido-solvente. Algunos autores indican que el isopropanol tiene una capacidad similar de extracción entre su estado puro y su azeótropo, a diferencia del etanol que presenta diferencias en la extracción con etanol absoluto o su azeótropo (Capellini *et al.*, 2017). En base a lo expuesto, se puede considerar que el contenido de agua de la muestra afecta principalmente la eficiencia del etanol, como se encontró en la sección 4.2, no así la eficiencia del IPA. Como se concluyó previamente (sección 4.2), contenidos de humedad inferiores al 12 % son significativamente influyentes en la extracción utilizando etanol como solvente. Y en la mayoría de los casos las matrices utilizadas tienen un contenido de humedad

inferior al 10 % b.s. mientras que el material utilizado en esta tesis tenía un contenido de humedad elevado.

En la extracción batch también se obtuvieron otros compuestos que no resultaron material lipídico debido a la baja selectividad de los alcoholes. La Figura 4.4 muestra la fracción no lipídica o resto extraída con ambos solventes en función del tiempo.



**Figura 4.4:** Fracción resto en función del tiempo, utilizando IPA y etanol como solvente.

La fracción resto presentó diferencias significativas entre los alcoholes a todos los tiempos de extracción ( $p < 0,0001$ ), siendo el etanol quien triplicó la cantidad extraída con IPA. La interacción entre tiempo-solvente no resultó significativa ( $p = 0,7386$ ), aunque se observa un cierto descenso a medida que avanza la extracción. El análisis estadístico indica que la fracción resto no presentó diferencias significativas para etanol con el tiempo ( $p = 0,4904$ ), mientras que si se observaron diferencias para el IPA ( $p = 0,0242$ ).

La fracción resto se comparó a los diferentes tiempos analizados, considerando el método de extracción (Batch y Soxhlet). Se puede observar que  $W_r$  presentó diferencias significativas para las 3 horas de extracción, exhibiendo una mayor cantidad de material no lipídico en las extracciones realizadas en

sistema batch. Esto podría estar influenciado, por ejemplo, por la agitación y la temperatura de extracción que afectan la cantidad total de material extraído.

#### 4.3.4.1. Componentes minoritarios de los aceite

##### 4.3.4.1.1. Fosfolípidos

Los aceites obtenidos de cada una de las extracciones se caracterizaron por su contenido y composición de fosfolípidos. En la Tabla 4.7 se presenta el contenido total y perfil de fosfolípidos en los aceites extraídos con etanol e isopropanol a los tres tiempos analizados. El contenido total de fosfolípidos fue significativamente diferente entre los alcoholes ( $p < 0,003$ ), siendo alrededor de 4,5 veces superior en la extracción etanólica. El contenido de fosfolípidos totales, para todos los aceites, fue mayor al obtenido en el aceite del collets pre-tratados extraído con *n*-hexano ( $2,08 \pm 0,051$  g/kg). En la extracción con hexano solo aproximadamente el 50 % de los fosfolípidos se eliminan con el aceite, mientras que el resto queda retenido en la matriz sólida, pero con etanol la extracción es mucho mayor (Baümler *et al.*, 2010). Una tendencia similar a la observada en este estudio reportaron Capellini *et al.* (2017) para aceites de salvado de arroz. Estas diferencias pueden deberse, como se mencionó anteriormente, a la afinidad de los fosfolípidos por cada solvente y a la distinta polaridad de los mismos. La elevada polaridad de los solventes alcohólicos pueden extraer mayores cantidades de fosfolípidos y material insaponificable de las matrices sólidas que el *n*-hexano. Los alcoholes etanol e isopropanol presentan diferente longitud de cadena por lo tanto la polaridad de los mismos es diferente. Algunos autores informaron que la ionización de los fosfolípidos disminuyó con la disminución de la constante dieléctrica (isopropanol azeótropo, 17,30, etanol azeótropo 22,29) (Guo *et al.* 2005).

La polaridad de los fosfolípidos también fue mencionada con anterioridad donde se destacó que PC existe en el aceite en forma de zwitterión que es



hidratable, PI forma complejo con potasio y magnesio siendo totalmente hidratable debido al grupo inositol que es hidrofílico. PE es hidratable solo si se combina con iones monovalentes. PA existe como ácido disociado parcialmente y se encuentra formando un complejo con un ion metálico, es hidratable cuando este ion es monovalente. Los fosfolípidos son hidratables, o en otras palabras, pasan a la fase acuosa (polar) cuando el aceite entra en contacto con agua, siempre que se den algunas condiciones como una carga eléctrica neta formada por la disociación del grupo fosfato; sus cargas eléctricas estén a cierta distancia, como en PC, donde los tres grupos metilo evitan que el átomo de amonio se mueva cerca del grupo fosfato disociado o tengan grupos hidrófilos como los grupos hidroxilo en el fosfatidilinositol (PI) (Dijkstra, 2012).

**Tabla 4.7:** Contenido de fosfolípidos totales y perfil para IPA y etanol en los tiempos de extracción analizados.

|                      | IPA                       |                           |                           | ETANOL                    |                           |                           |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                      | 1 h                       | 2 h                       | 3 h                       | 1 h                       | 2 h                       | 3 h                       |
| <b>Total</b><br>g/kg | 3,48 ± 0,18 <sup>a</sup>  | 3,47 ± 0,12 <sup>a</sup>  | 3,64 ± 0,06 <sup>a</sup>  | 16,17 ± 0,07 <sup>a</sup> | 15,22 ± 0,60 <sup>a</sup> | 15,83 ± 0,12 <sup>a</sup> |
| <b>PC</b>            | 81,67 ± 1,04 <sup>a</sup> | 76,14 ± 1,90 <sup>a</sup> | 78,62 ± 1,69 <sup>a</sup> | 48,05 ± 1,45 <sup>a</sup> | 41,76 ± 3,98 <sup>a</sup> | 45,77 ± 0,05 <sup>a</sup> |
| <b>PI</b>            | 6,67 ± 0,41 <sup>a</sup>  | 9,92 ± 1,24 <sup>a</sup>  | 17,37 ± 2,22 <sup>b</sup> | 45,76 ± 1,34 <sup>a</sup> | 43,55 ± 1,86 <sup>a</sup> | 42,14 ± 0,18 <sup>a</sup> |
| <b>PE</b>            | 7,40 ± 0,43 <sup>a</sup>  | 7,61 ± 0,34 <sup>a</sup>  | 3,58 ± 0,32 <sup>b</sup>  | 6,18 ± 0,11 <sup>a</sup>  | 6,92 ± 0,21 <sup>b</sup>  | 7,60 ± 0,08 <sup>c</sup>  |
| <b>PA</b>            | 4,26 ± 0,19 <sup>a</sup>  | 6,41 ± 0,88 <sup>a</sup>  | 4,24 ± 1,15 <sup>a</sup>  | 2,42 ± 0,10 <sup>a</sup>  | 3,42 ± 0,11 <sup>b</sup>  | 4,48 ± 0,05 <sup>c</sup>  |

\*El perfil fue expresado en %.

Valores en la misma fila seguida por la misma letra minúscula (efecto del tiempo para un mismo alcohol) no son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey

La interacción tiempo-solvente no presentó diferencias significativas ( $p = 0,1244$ ). En la tabla se observa, al analizar cada solvente, que el contenido de fosfolípidos totales no presentó diferencias significativas para ninguno de los solventes entre 1 y 3 horas ( $p > 0,05$ ). En consecuencia, se puede concluir que en el intervalo de tiempo estudiado no hubo una extracción diferencial de los fosfolípidos respecto a los triglicéridos. En cambio se ha encontrado que los

fosfolípidos se eliminan a una velocidad menor que los triglicéridos durante la extracción de aceite girasol tanto con *n*-hexano (Baümler *et al.*, 2010) como con etanol (Baümler *et al.*, 2016). La diferencia de comportamiento entre ambos estudios se puede encontrar en el efecto del pre-tratamiento enzimático, que incrementa la disponibilidad de los fosfolípidos de la estructura celular.

Si se compara la composición de los fosfolípidos (Tabla 4.7) se puede observar que los fosfolípidos en el aceite de extracción con IPA muestran una alta concentración de PC (alrededor del 80%) y un porcentaje relativamente bajo de los otros tres. Mientras que los fosfolípidos en el aceite de extracción con etanol presentan una concentración de PC y PI (alrededor de 45% cada uno) y un porcentaje relativamente bajo de PE y PA. Cuando estos resultados se comparan con el perfil de fosfolípidos en el aceite residual en los collets pre-tratados enzimáticamente (Tabla 3.19) se encuentra que la extracción con IPA produjo un enriquecimiento en PC (de 62 a 78 % en promedio) mientras que la extracción etanólica aumentó el porcentaje de PI (de 24 a 44 % en promedio). El efecto de la extracción etanólica sobre el perfil de fosfolípidos ya se discutió en la sección 4.3. La extracción con IPA, que aparentemente elimina muchos menos fosfolípidos celulares, no tiene el mismo efecto. Por el contrario, produce un aumento en el porcentaje de PC a costa de PI.

Si bien la cantidad de fosfolípidos en los aceites extraídos con hexano de collets pre-tratados son menores que en los obtenidos con alcohol, en general la diferencia más importante en el perfil se vio marcado por PC y PI. Algunos autores han descrito el uso de etanol y mezclas alcohólicas acuosas para el fraccionamiento de PC y PI. PC es relativamente más soluble en etanol que PI; por lo tanto, una extracción con etanol acuoso da lugar a una fracción enriquecida con PC (Cabezas *et al.* 2009a; Cabezas *et al.* 2009b; Guiotto *et al.* 2015). Esto podría explicar, en la comparación de perfiles, que PC se ve disminuida en el caso de etanol con respecto al porcentaje presente en los collets pre-tratados (61,55 %).

Si se compara el efecto del tiempo sobre el perfil de los fosfolípidos (Tabla 4.7) se observa que las diferencias entre distintos tiempos, para cada medio de extracción, son poco significativas. Baümler *et al.* (2016) obtuvieron, para la extracción con etanol, que PC y PE tienen una mayor velocidad de eliminación que PA y PI. Este comportamiento no se puede observar en los resultados de este trabajo, debido en parte a las diferencias relativamente bajas entre los rendimientos a los tres tiempos (Figura 4.3) y en parte al efecto del pre-tratamiento enzimático.

La distribución de los fosfolípidos resulta un análisis complejo ya que su extracción depende de variables importantes como el pH, la constante dieléctrica y la viscosidad (Guo *et al.* 2005), que van más allá del enfoque de esta tesis.

#### 4.3.4.1.2. Tocoferoles

Los tocoferoles también fueron analizados en los aceites obtenidos de la extracción con IPA y etanol. La Tabla 4.8 muestra la composición de tocoferoles para ambos alcoholes a los diferentes tiempos.

**Tabla 4.8:** Composición de tocoferoles de los aceites obtenidos con extracción alcohólica a tres tiempos de extracción.

| Tocoferoles<br>(ppm) | IPA                    |                       |                        | ETANOL                 |                        |                       |
|----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
|                      | 1 h                    | 2 h                   | 3 h                    | 1 h                    | 2 h                    | 3 h                   |
| <b>Total</b>         | 327 ± 10 <sup>aA</sup> | 322 ± 7 <sup>aA</sup> | 291 ± 14 <sup>aB</sup> | 498 ± 12 <sup>bA</sup> | 476 ± 13 <sup>bA</sup> | 440 ± 9 <sup>bB</sup> |
| <b>α tocoferol</b>   | 92,50 ± 1,51           | 89,68 ± 5,84          | 90,83 ± 0,41           | 89,47 ± 1,13           | 90,36 ± 4,74           | 90,07 ± 0,47          |
| <b>β tocoferol</b>   | 0,99 ± 0,11            | 0,79 ± 0,30           | 0,93 ± 0,37            | 1,06 ± 0,08            | 0,66 ± 0,07            | 0,60 ± 0,15           |
| <b>β tocotrienol</b> | 7,50 ± 0,14            | 9,53 ± 0,91           | 8,77 ± 0,50            | 8,56 ± 0,44            | 8,98 ± 0,15            | 9,33 ± 0,71           |

Valores en la misma fila seguidos por diferentes letras minúsculas (efecto del solvente para un mismo tiempo) son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey.

Valores en la misma fila seguidos por diferentes letras mayúsculas (efecto del tiempo para un mismo alcohol) son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey.

El contenido total de tocoferoles en los aceites obtenidos con IPA fue alrededor de un 30% menor que con etanol. Analizando el contenido de tocoferoles totales en función del tiempo se puede observar que a medida que avanza la extracción la cantidad de tocoferoles disminuye levemente, presentando diferencias significativas solo a 3 horas de extracción, en los dos alcoholes utilizados ( $p = 0,0013$ ). Los tocoferoles son componentes intrínsecos de los cuerpos lipídicos de las semillas de girasol (Fisk et al., 2006) por lo que parece razonable suponer que tienen un comportamiento durante la extracción similar a la de los triglicéridos. En el modelado de la cinética de extracción de compuestos minoritarios de collets de girasol, para los tocoferoles se ha obtenido una constante cinética para el período difusivo similar a la del aceite, aunque más dependiente de la temperatura, tanto para hexano (Baümler et al., 2010) como para etanol (Baümler et al., 2016). Por consiguiente, se puede concluir que hubo una cierta pérdida o degradación de los tocoferoles durante la extracción.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la composición ni con el tiempo ni con el tipo de solvente, debido probablemente a que alrededor del 90 % es  $\alpha$ -tocoferol.

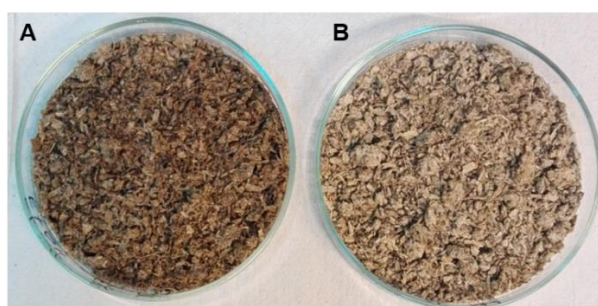
De acuerdo con el contenido de tocoferoles totales presentes en el aceite de los collets con tratamiento y extraído con *n*-hexano (414 ppm), la extracción etanólica produjo un aumento en el contenido de tocoferoles totales del aceite, debido probablemente a la polaridad del solvente como en el caso de los fosfolípidos (debe tenerse en cuenta que con este solvente la cantidad total extraída es relativamente baja). En cambio, la extracción con IPA da una reducción en el contenido de tocoferoles.

Baümler et al. (2016) encontraron contenidos de tocoferoles similares a los de este trabajo, sin cambios significativos con el proceso, en la extracción etanólica de aceite de collets de girasol. Por otra parte, Tir et al. (2012), reportaron cantidades mayores de tocoferoles totales en extracciones con IPA y etanol que

en extracciones con *n*-hexano, considerando que los solventes polares extraen mayor cantidad de tocoferoles que los no polares. Estos resultados solo concuerdan parcialmente con los obtenidos en el presente trabajo.

#### **4.3.4.2. Composición de las harinas residuales**

Las harinas residuales, como se mencionó previamente, constituyen un subproducto importante en la industria aceitera. El residuo agotado o harinas obtenidas luego de la extracción alcohólica fueron caracterizados según su contenido de proteína. En la Figura 4.6, se muestran las harinas obtenidas luego de la extracción, donde se observa que las extraídas con etanol resultaron más oscuras que las extraídas con isopropanol. Esta diferencia de color puede deberse a los compuestos fenólicos y a los cambios oxidativos de los polifenoles durante el procesamiento (Sen y Bhattacharyya, 2000).



**Figura 4.5:** Harinas residuales obtenidas luego de la extracción alcohólica.  
(A) Etanol - (B) Isopropanol.

##### **4.3.4.2.1. Proteínas**

La Tabla 4.9 muestra el contenido de proteína bruta, expresado en porcentaje de proteína en el sólido seco y desgrasado para el residuo agotado obtenida con ambos alcoholes a diferentes tiempos de extracción. En ella se puede observar que el contenido de proteína no presentó diferencias significativas para un mismo alcohol en los diferentes tiempos ni entre alcoholes ( $p > 0,05$ ).

Cuando se comparan estos resultados con el contenido de proteínas

presentes en los collets pre-tratados ( $38,70 \pm 0,60 \%$ ) se observa una disminución del contenido de proteínas alrededor de un 10-15 % en ambos alcoholes. Este porcentaje puede constituir parte de la fracción resto obtenida tanto con isopropanol como con etanol durante el procesamiento.

**Tabla 4.9:** Contenido de proteínas en las harinas residuales para etanol e isopropanol a tres tiempos de extracción.

| Tiempo (h) | Composición (% b.s.d*) |                    |
|------------|------------------------|--------------------|
|            | IPA                    | ETANOL             |
| 1          | $33,38 \pm 1,22^a$     | $33,32 \pm 1,43^a$ |
| 2          | $32,47 \pm 1,50^a$     | $34,25 \pm 1,08^a$ |
| 3          | $33,04 \pm 0,67^a$     | $34,13 \pm 1,14^a$ |

Valores en la misma columna seguida por diferentes letras minúscula (efecto del tiempo para un mismo alcohol) son significativamente diferentes con  $p < 0,05$  Test Tuckey

\*base seca desgrasada

Capellini *et al.* (2017) reportaron para salvado de arroz que la proteína presentó mayor afinidad con la hidratación del solvente. Sawada *et al.* (2014) informaron que la extracción de proteínas de soja aumentó a medida que se incrementó el contenido de agua en el solvente, el mismo efecto es logrado con la temperatura, excepto a temperaturas superiores a 90 °C donde la cantidad de proteína extraída, tiende a ser igual para ambos alcoholes y sus azeótropos. Kwiatkowski y Cheryan. (2002) evaluaron el rendimiento de proteína extraída del maíz molido a 50 °C utilizando etanol con diferentes niveles de hidratación, los autores observaron que al aumentar el contenido de agua del solvente se conduce a mayores concentraciones de proteínas solubilizada. Debe tenerse en cuenta que en estos estudios se utilizó materia prima sin pretratamiento. Estos datos están acordes con los obtenidos en esta sección, ya que se observó una leve disminución en el contenido de proteínas en la fracción sólida.

#### **4.4. CONCLUSIONES**

En los resultados obtenidos durante el estudio del efecto del contenido de agua del material, se observó que a partir del 12% de humedad el rendimiento de aceite de collets de girasol no varía significativamente, pudiendo recuperarse alrededor de un 85% del aceite total presente en la muestra. Por ello, se considera que el etanol podría ser utilizado para extraer el aceite de los collets tratados, aun con elevado contenido acuoso, ya que la miscibilidad del aceite en etanol podría aumentarse utilizando temperaturas de ebullición o cercanas a la misma.

La máxima capacidad extractiva del etanol en los collets con y sin tratamiento enzimático, con un contenido de humedad de 48 % (b.s.), se obtuvo a partir de las 3 horas, donde la eficiencia de la extracción comienza a hacerse asintótica. El rendimiento promedio fue de 79,84 %, mientras que en los collets tratados el máximo extraído soluble en *n*-hexano fue de 96,32 %. Durante todos los tiempos analizados, los collets pre-tratados presentaron una mayor eficiencia de extracción que los collets sin tratar, pudiendo concluir que un pre-tratamiento acuoso-enzimático podría ser beneficioso para la extracción etanólica.

Uno de los inconvenientes que presentó el uso de etanol en la extracción de aceite fue su baja selectividad, extrayendo además de aceite, otros compuestos polares. En las extracciones sin tratamiento enzimático previo el porcentaje de resto varió entre 6,5% y 12%, mientras que en las extracciones con pre-tratamiento acuoso-enzimático el porcentaje de resto obtenido fue entre 2,5% y 6%, presentando una reducción del 45-70% respecto de las muestras sin tratar.

Si bien el uso de enzimas, en estas condiciones, favorecería la extracción de aceite con etanol, el hecho de que el solvente sea más polar que el *n*-hexano, favoreció la extracción de fosfolípidos de la estructura celular, que resultan no deseables en el aceite.

El estudio del uso de isopropanol se realizó con el fin de comparar el uso de etanol frente a otro alcohol de cadena corta, en la extracción de aceite de collets con y sin pre-tratamiento enzimático, utilizando ambos solventes alternativos. En este análisis se observó que el IPA presentó una mayor eficiencia durante la extracción y por otro lado, la cantidad de material no lipídico se redujo en un 70% comparado con el etanol.

El método batch obtuvo menores rendimientos que el método Soxhlet con ambos solventes, en el caso del etanol el rendimiento disminuyó en la primera hora un 50%, mientras que con IPA, la disminución del rendimiento fue de un 9%. La disminución de los rendimientos con el método batch puede atribuirse a la hidratación del solvente. a la eficiencia de la agitación y a la temperatura de extracción.

Cuando se analizaron los componentes minoritarios en la extracción batch, el IPA presentó una menor extracción de fosfolípidos, comparable con la obtenida con *n*-hexano, mientras que el etanol extrae una cantidad considerablemente mayor. La extracción de una menor cantidad de fosfolípidos resulta favorable para los aceites. Al analizar los tocoferoles, el etanol extrajo una cantidad superior a la obtenida con *n*-hexano de aceite de harinas pre-tratadas. En cambio, la cantidad de tocoferoles totales extraída con IPA, se redujo considerablemente.

Al analizar la composición de las harinas obtenidas luego de la extracción se observó que la cantidad de proteína liberada durante la extracción fue de un 10-15%, dando como resultado una harina con un porcentaje de proteína levemente menor a la utilizada como materia prima.



#### **4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abraham, G., Hron, R., & Koltun, S. (1988). Modeling the solvent extraction of oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(1), 129-135.
- Abu-Arabi, M., Allawzi, M., Al-Zoubi, H., & Tamimi, A. (2000). Extraction of jojoba oil by pressing and leaching. *Chemical Engineering Journal*, 76(1), 61-65.
- Baker, E., & Sullivan, D. (1983). Development of a pilot-plant process for the extraction of soy flakes with aqueous isopropyl alcohol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(7), 1271-1277.
- Bäumler, E. R., Carrín, M. E., & Carelli, A. A (2016). Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 1-8.
- Bäumler, E. R., Carrín, M. E., & Carelli, A. A. (2017). Diffusion of tocopherols, phospholipids and sugars during oil extraction from sunflower collets using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 194, 1-8.
- Brum, A. A. S., & Arruda, L. F. D. (2009). Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, 32(4), 849-854.
- Cabezas, D. M., Diehl, B., & Tomás, M. C. (2009a). Effect of processing parameters on sunflower phosphatidylcholine-enriched fractions extracted with aqueous ethanol. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(10), 993-1002.
- Cabezas, D. M.; Diehl, B. W. K.; Tomas, M. C. (2009b) Sunflower lecithin: Application of a fractionation process with absolute ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 189–196.
- Capellini, M. C., Giacomini, V., Cuevas, M. S., & Rodrigues, C. E. C. (2017). Rice bran oil extraction using alcoholic solvents: Physicochemical

- characterization of oil and protein fraction functionality. *Industrial Crops & Products*, 104, 133–143.
- Capellini, M. C., Chiavoloni, L., Giacomini, V., & Rodrigues, C. E. C. (2019). Alcoholic extraction of sesame seed cake oil: Influence of the process conditions on the physicochemical characteristics of the oil and defatted meal proteins. *Journal of Food Engineering*, 240, 145-152.
- Cardarelli, D. A., Mattea, M. A., & Crapiste, G. H. (2000), Water-hexane sorption in sunflower meals. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 587-592.
- Citeau, M., Albe Slabi, S., Joffre, F., & Carré, P. (2018). Improved rapeseed oil extraction yield and quality via cold separation of ethanol miscella. *OCL*, 25(2), D207.
- Clark, P., & Snyder, H. (1989). Factors affecting the rapid equilibrium method for analysis of total oil in soybean cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66(9), 1316-1320.
- de Oliveira, R. C., de Barros, S. T. D., & Gimenes, M. L. (2013). The extraction of passion fruit oil with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 458-463.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2011). InfoStat versión 2011. *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. URL [http://www. infostat. com. ar](http://www.infostat.com.ar), 8, 195-199.
- Dijkstra, A. J. (2012). Capítulo 5. Degumming. En Dijkstra A. J. (Ed), *Edible Oil Processing from a Patent Perspective*. Springer, Boston, MA. 121–155.
- Ferreira-Dias, S., Valente, D. G., & Abreu, J. M. (2003). Comparison between ethanol and hexane for oil extraction from *Quercus suber* L. fruits. *Grasas y Aceites*, 54(4), 378-383.

- Gallegos-infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F., Gomez-Sánchez, D., Zuno-Floriano, F., & Vidaña-Martínez, S. A. (2007). The quality of vegetable oil from three varieties of sunflower seeds (*Helianthus annuus*). *Journal of Food Quality*, 30(4), 413-423.
- Gandhi, A., Joshi, K., Jha, K., Parihar, V., Srivastav, D., Raghunadh, P., Kawalkar, J., Jain, S., & Tripathi, R. (2003). Studies on alternative solvents for the extraction of oil - I soybean. *International Journal of Food Science & Technology*, 38(3), 369-375.
- Guiotto, E.N.; Tomás, M.C. & Diehl, B.W.K. (2015). Capítulo 3. Sunflower lecithin. En Ahmad, M. U., & Xu, X. (Eds.). *Polar Lipids: Biology, Chemistry, and Technology*. Elsevier. 57-75.
- Guo, B. Y., Wen, B., Shan, X. Q., Zhang, S. Z., & Lin, J. M. (2005). Separation and determination of phospholipids in plant seeds by nonaqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1074(1-2), 205-213.
- Harris, W., Bishop, F., Lyman, C., & Helpert, R. (1947). Isopropanol as a solvent for extraction of cottonseed oil: I. Preliminary investigations. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 24(11), 370-375.
- Hron Sr, R., Koltun, S., & Graci Jr, A. (1982). Biorenewable solvents for vegetable oil extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59(9), 674A-684A.
- IUPAC (1992) Section 1: Oleaginous seeds and fruits. En: Paqueot, C, & Hautfenne, A. (Eds.). *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. 7<sup>th</sup> Edition. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). London: Blackwell Scientific. pag 13-16
- Johnson, L. A., & Lusas, E. (1983). Comparison of alternative solvents for oils extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(2), 229-242.

- Kuk, M., & Hron, R. (1998). Cottonseed extraction with a new solvent system: isohexane and alcohol mixtures. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(8), 927-930.
- Kwiatkowski, J. R., & Cheryan, M. (2002). Extraction of oil from ground corn using ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(8), 825-830.
- Li, Y., Fine, F., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., Carre, P., Pages, X., & Chemat, F. (2014). Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 242-251.
- Liau, M. Y., Natan, F., Widiyanti, P., Iksari, D., Indraswati, N., & Soetaredjo, F. (2008). Extraction of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) using n-hexane and ethanol: studies of oil quality, kinetic and thermodynamic. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(3), 49-54.
- Lusas, E. W., Watkins, L. R., & Koseoglu, S. (1991). Isopropyl alcohol to be tested as solvent. *Inform*, 2, 970–976..
- Navarro, S. L., Capellini, M. C., Aracava, K. K., & Rodrigues, C. E. (2016). Corn germ-bran oils extracted with alcoholic solvents: Extraction yield, oil composition and evaluation of protein solubility of defatted meal. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 185-194.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Oliveira, R., Oliveira, V., Aracava, K. K., & da Costa Rodrigues, C. E. (2012). Effects of the extraction conditions on the yield and composition of rice bran oil extracted with ethanol—A response surface approach. *Food and Bioproducts Processing*, 90(1), 22-31.
- Pérez, E. E., Baümler, E.R., Crapiste, G.H. & Carelli, A,A. (2018). Effect of sunflower collets moisture on extraction yield and oil quality. *European Journal of Lipids Science and Technology*, 121(2), 1-7.

- Proctor, A., & Bowen, D. (1996). Ambient-temperature extraction of rice bran oil with hexane and isopropanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(6), 811-813.
- Rao, R. K., & Arnold, L. K. (1956). Alcoholic extraction of vegetable oils. III. Solubilities of babassu, coconut, olive, palm, rapeseed, and sunflower seed oils in aqueous ethanol. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 33(9), 389-391.
- Rao, R. K., & Arnold, L. K. (1957). Alcoholic extraction of vegetable oils. Part IV. Solubilities of vegetable oils in aqueous 2-propanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 34(8), 401-404.
- Rodrigues, E.C.C, Longo, N. M., Silva, C. C., Aracava, K. K., & Garavazo, B. R. (2010). Ethanolic extraction of soybean oil: Oil solubility equilibria and kinetic studies. *Chemical Engineering Transactions*. 24, 811–816.
- Salas, J. J., Martínez-Force, E., & Garcés, R. (2006). Phospholipid molecular profiles in the seed kernel from different sunflower (*Helianthus annuus*) mutants. *Lipids*, 41(8), 805-811.
- Sánchez, R. J., Fernández, M. B., & Nolasco, S. M. (2018). Hexane-free green solvent extraction of canola oil from microwave-pretreated seeds and of antioxidant-rich byproducts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(9), 1-19.
- Sangaletti-Gerhard, N., Romanelli, T. L., Vieira, T. M. F. d. S., Navia, R., & Regitano-d'Arce, M. A. B. (2014). Energy flow in the soybean biodiesel production chain using ethanol as solvent extraction of oil from soybeans. *Biomass and Bioenergy*, 66, 39-48.
- Sawada, M. M., Venâncio, L. L., Toda, T. A., & Rodrigues, C. E. (2014). Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and protein solubility of defatted meal. *Food Research International*, 62, 662-670.

- Seth, S., Agrawal, Y. C., Ghosh, P. K., & Jayas, D. S. (2008). Effect of moisture content on the quality of soybean oil and meal extracted by isopropyl alcohol and hexane. *Food and Bioprocess Technology*, 3(1), 121-127.
- Seth, S., Agrawala, Y. C., Ghoshb, P. K., Jayasb, D. S., & Singh, B.P.N., S. (2007). Oil extraction rates of soya bean using isopropyl alcohol as solvent. *Biosystems Engineering*, 97(2), 209-217.
- Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M., & Lema, J. (1998). Ethanolic extraction of sunflower oil in a pulsing extractor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(6), 753-754.
- Singh, P. P., Maier, D. E., Cushman, J. H., & Campanella, O. H. (2004). Effect of viscoelastic relaxation on moisture transport in foods. Part II: sorption and drying of soybeans. *Journal of mathematical biology*, 49(1), 20-34.
- Sullivan, D., Campbell, B., Conway, M., & Grimsby, F. (1982). Isopropanol extraction of oilseeds [Soybeans and other oil seeds]. *Cotton Gin and Oil Mill Press*.
- Tir, R., Dutta, P. C., & Badjah-Hadj-Ahmed, A. Y. (2012). Effect of the extraction solvent polarity on the sesame seeds oil composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(12), 1427-1438.
- Toda, T. A., Sawada, M. M., & Rodrigues, C.E.C, (2016). Kinetics of soybean oil extraction using ethanol as solvent: Experimental data and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 1-10.
- Zhang, F., Rhee, K., & Koseoglu, S. (2002). Isopropyl alcohol extraction of cottonseed collets: efficiency and performance. *Journal of Food Lipids*, 9(2), 147-160.

# CAPÍTULO 5

## CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJO PROPUESTO A FUTURO

### 5.1. CONCLUSIONES GENERALES

En los últimos años se han realizado avances importantes en el desarrollo de técnicas o procesos ecológicos para reducir el impacto ambiental. La idea del uso de solventes alternativos para la extracción de aceite y la aplicación de pre-tratamientos con el fin de utilizar metodologías más amigables con el medioambiente, es una temática interesante para proporcionar la posibilidad del uso de tiempos de extracción más cortos, un menor consumo de solventes y una disminución en el consumo energético. Este trabajo apunta a la necesidad de encontrar una forma de extracción de aceite que resulte más favorable para el medioambiente y para la salud.

En el presente trabajo se planteó *“el uso de enzimas en el proceso extractivo de aceite de collets de girasol, utilizando solventes no convencionales y la obtención de otros derivados, a escala laboratorio, promoviendo el desarrollo de tecnologías alternativas”*. Para llevar a cabo los objetivos se han abordado un gran número de técnicas analíticas y se ha desarrollado un manejo óptimo de laboratorios relacionado con métodos de extracción de aceite y su caracterización.

A continuación se presentan las conclusiones generales alcanzadas a partir de los capítulos abordados en la presente tesis:

En primera instancia, se realizó la caracterización de los collets utilizados como materia prima a lo largo de toda la tesis y se brindó información de la matriz y su composición, aportando valores de contenido de aceite, contenido proteico y de fibras estructurales, los cuales fueron los componentes mayoritarios en los collets de girasol.

En principio, se realizó una extracción acuosa y acuosa-enzimática de aceite de collets de girasol. Para llevar a cabo el proceso se definieron variables generales para describir un comportamiento preliminar de este tipo de extracción, para luego poder optimizarlo. Las variables de proceso definidas en esta instancia fueron elegidas en base a los antecedentes obtenidos de bibliografía. El diseño de experimentos planteado fue TAGUCHI, un diseño de experimentos robusto o también llamado “insensible”, seleccionado para explorar los factores que pudieran afectar la extracción. Este permitió definir las variables de proceso con el menor número de ensayos posibles, sin tener en cuenta las interacciones entre ellas, con el objetivo de facilitar la selección de factores generales que pueden influir en el proceso de extracción acuoso y acuoso-enzimático. En esta oportunidad se definieron variables como relación enzima:sustrato, tipo de solución reguladora y tiempo de extracción, obteniéndose como variables significativas el tiempo y la relación enzima:sustrato. Se pudo afirmar que una extracción acuosa asistida por enzimas logra mejores rendimiento de aceite que una extracción acuosa simple en las mismas condiciones de extracción. Aun así, en el intervalo de condiciones estudiadas, tanto la extracción acuosa como la acuosa-enzimática presentaron rendimientos bajos.

En base a los conocimientos obtenidos en el diseño TAGUCHI y considerando que el diseño utilizado solo permitió definir parámetros generales, se decidió definir otras variables de proceso que pudieran influir en el proceso acuoso-enzimático para poder mejorar el proceso de extracción y encontrar una condición óptima para obtener mejores rendimientos. Las variables analizadas fueron, velocidad de agitación, tiempo de extracción, temperatura y relación enzima:sustrato. En el análisis se estudiaron dos



variables de respuesta: aumentar el rendimiento de aceite y minimizar el contenido de proteínas liberada en la fracción líquida durante la extracción. El análisis de estas dos variables de respuesta permitiría obtener no solo un mayor rendimiento de aceite sino también una harina rica en proteínas luego de la extracción. Para cumplir con el objetivo, se llevó a cabo la aplicación de metodología de superficie de respuesta combinada con un diseño experimental central compuesto, dicha combinación es ampliamente utilizada en procesos alimentarios. Como conclusión se observó que las variables más influyentes en la extracción acuosa-enzimática fueron velocidad de agitación y temperatura para la respuesta rendimiento de aceite, mientras que cuando se consideró el efecto sobre la proteína liberada, además de estas variables, la relación enzima:sustrato también resultó un factor influyente, en el intervalo de factores estudiados. Si bien se obtuvieron modelos de optimización individuales de cada variable de respuesta, la optimización simultánea fue el objetivo principal, donde el modelo obtenido pudo predecir adecuadamente las dos respuestas (rendimiento porcentual relativo de aceite  $Y_a$  y rendimiento porcentual relativo de proteína liberada en la fracción líquida  $Y_p$ ). Si bien el rendimiento relativo porcentual de aceite obtenido fue bajo, comparando con el rendimiento obtenido en el primer diseño, se logró mejorar la extracción en un 60%.

Luego de estudiar la extracción acuosa-enzimática a escala laboratorio, se realizó una extracción con los factores optimizados a escala piloto, donde se observó que el proceso no puede ser escalado en forma directa ya que no se alcanza la extracción máxima, por lo que sería necesario realizar estudios experimentales adicionales en el equipo piloto.

Con el objetivo de estudiar el efecto del proceso de extracción acuoso-enzimático sobre la calidad del aceite se realizó una extracción con *n*-hexano del aceite residual en el sólido obtenido y se comparó con la composición original. El aceite obtenido del residuo sólido con *n*-hexano presentó diferencias en componentes menores, con un contenido menor de fosfolípidos, favorable para la industria, y una leve

reducción en el contenido de  $\alpha$ -tocoferol, aunque el contenido total de tocoferoles se mantuvo en el intervalo hallado para aceites crudos de girasol.

La extracción acuosa asistida por enzimas a partir de collets de girasol brindó rendimientos máximos de alrededor del 22%. Si se suma a lo extraído en la etapa de prensado, realizado en la industria, da rendimientos del orden del 80 % del aceite extraíble presente originalmente en la semilla. Esto muestra que, en general, la combinación prensado - extracción acuosa enzimática es más eficiente que la extracción acuosa enzimática directa a partir de las semillas de girasol. Sin embargo, estos rendimientos aun resultan bajos en comparación con los obtenidos por extracción con hexano, por lo que esta tecnología no puede ser competitiva a nivel comercial.

A partir de lo expuesto y siguiendo con el objetivo de querer reemplazar el uso de *n*-hexano se decidió utilizar el residuo sólido obtenido luego de la extracción acuosa-enzimática y estudiar la extracción de aceite con alcoholes de cadenas cortas, como etanol e isopropanol. En primer lugar se realizaron pruebas de extracción en Soxhlet determinando los efectos de la humedad y del tiempo en la capacidad extractiva del etanol, estas pruebas preliminares se realizaron sobre collets sin tratamiento enzimático. El estudio de humedad en la extracción etanólica fue realizado con el objetivo de poder utilizar el residuo sólido de la extracción acuosa-enzimática tal cual sale del tratamiento, ya que el mismo presentó un elevado contenido acuoso y podría requerir un secado previo. Posteriormente, se realizaron extracciones del residuo sólido a un contenido de humedad de 48% (b.s.), humedad a la que sale de la extracción acuosa-enzimática, y se compararon con los rendimientos de material total extraído obtenidos sobre las muestras sin tratamiento enzimático. Luego de realizada la extracciones etanólicas se observó que la miscela contenía otros componentes que se disolvían en el etanol, por esta razón se realizó un fraccionamiento de estos componentes para determinar las diferentes fracciones obtenidas y cuantificar la eficiencia real de la extracción alcohólica con respecto al aceite. Se observó que la eficiencia de la extracción de aceite fue superior con collets tratados y que el contenido

de otros componentes que se extraían con etanol constituía hasta un 30% del material total extraído. Las extracciones realizadas con collets tratados enzimáticamente presentaron una fracción resto considerablemente inferior, sugiriendo que parte de este resto soluble en etanol se habría eliminado con el agua en la extracción acuosa-enzimática, por su polaridad. Por otra parte, se realizaron análisis de caracterización del aceite según su contenido de fosfolípidos, donde se observó que en las extracciones etanólicas, aumentaban considerablemente. Aun así, según los resultados obtenidos podría considerarse favorable para la extracción alcohólica la realización de un tratamiento acuoso-enzimático previo a la extracción, teniendo en cuenta que este aumenta la recuperación de aceite.

Finalmente, para comparar la extracción etanólica, se utilizó otro solvente alcohólico como el isopropanol. En estas experiencias se observaron mejores rendimientos de aceite con el uso de isopropanol como solvente alternativo y una mayor selectividad durante la extracción, con un menor porcentaje de resto en collets sin tratar y aún más bajos en collets tratados enzimáticamente. Luego de las extracciones realizadas, se hicieron análisis a los aceites obtenidos para comparar su composición según el alcohol utilizado y se observó que si bien con isopropanol la cantidad de fosfolípidos extraídos fue menor que con etanol y similares a los extraídos con *n*-hexano, los tocoferoles totales disminuyeron considerablemente comparados con el etanol. Por otro lado, con ambos alcoholes se reduce levemente la cantidad de proteínas en el residuo sólido agotado.

En base a lo expuesto, resulta de interés el uso de alcoholes como solventes alternativos al *n*-hexano para collets tratados enzimáticamente, ya que de esta forma se podría reducir los problemas de baja selectividad del solvente, liberando en el pre-tratamiento la mayor cantidad de componentes solubles en el alcohol como azúcares, fosfolípidos, pigmentos, ceras y otros compuestos. Por otra parte, el isopropanol podría resultar un alcohol más eficiente, por las ventajas mencionadas

anteriormente, un rendimiento de aceite y una selectividad considerablemente mayor a la del etanol.

## **5.2. TRABAJO PROPUESTO A FUTURO**

A futuro una de las temáticas que podría desprenderse de este trabajo es el análisis detallado de la composición de residuo sólido luego de la extracción acuosa-enzimática y del residuo agotado de la extracción alcohólica. Por un lado el efecto de la extracción acuosa-enzimática sobre el contenido de compuestos fenólicos, ya que las harinas de girasol poseen un elevado contenido, siendo el ácido clorogénico (CGA: ácido 5-cafeil-quínico) el más abundante. Estos compuestos son considerados una de las razones por la cual no se utilizan las harinas de girasol para consumo humano. Por otro lado, sería interesante analizar la composición y calidad de las proteínas obtenidas luego de la extracción acuosa-enzimática y de la extracción alcohólica.

Otra de las temáticas a abordar es el análisis detallado de la composición de la fracción líquida para poder recuperar algunos componentes presentes en la misma, como por ejemplo los azúcares y las proteínas solubles liberadas en dicha fracción, pudiendo ser considerados para su posterior uso. En el caso de la extracción alcohólica sería conveniente realizar un estudio de la composición de la fracción no lipídica para cerrar los balances y para analizar la posibilidad de recuperación de compuestos valiosos.

Desde el punto de vista de los procesos sería necesario realizar una optimización de las condiciones para la extracción batch o a escala piloto, ya que se obtuvieron rendimientos menores a los encontrados a escala laboratorio para la extracción acuosa-enzimática y en Soxhlet para la extracción alcohólica, respectivamente. También se podría ampliar el estudio sobre el efecto del tiempo de extracción a fin de analizar y modelar la cinética, determinando las constantes respectivas.