

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“Extracción de manteca de Copoazú
(*Theobroma grandiflorum* [Willd. Ex Sprin.] K.
Schum) por prensado hidráulico de semillas
pre-tratadas enzimáticamente”.**

TESIS PRESENTADA POR:

Bach. **MOGROVEJO BARRA, Deysi**

Bach. **TORRES YALLI, Eusebia**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

ASESOR: FLORES ARIZACA, Jesús Manuel

PUERTO MALDONADO, PERÚ

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“Extracción de manteca de Copoazú
(*Theobroma grandiflorum* [Willd. Ex Sprin.] K.
Schum) por prensado hidráulico de semillas
pre-tratadas enzimáticamente”**

TESIS PRESENTADA POR:

Bach. **MOGROVEJO BARRA, Deysi**

Bach. **TORRES YALLI, Eusebia**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

ASESOR: FLORES ARIZACA, Jesús Manuel

PUERTO MALDONADO, PERU

2020

DEDICATORIA

Especialmente a Dios por ser siempre mi guía, y no dejarme nunca sola en mi caminar, por darme fuerzas para seguir adelante y para que siempre esté presente, perdonándome, cuidando y guiándome en todo momento.

A mi padre Hugo Mogrovejo Zamalloa, a la memoria de mi madre Teófila Barra Merma (+), por ser los seres más importantes en mi vida, y enseñarme lo importante que es la vida.

A mi hermana Norma Mogrovejo Barra, como también a mi tía y hermanos, gracias por el apoyo incondicional, dedicando mucho esfuerzo en mi formación personal y sobre todo profesional, millones de gracias por sus consejos y correcciones que han sido de gran ayuda para ser la persona que hoy soy.

Deysi Mogrovejo Barra

Dedico este logro a Dios, por ser guía en toda mi carrera profesional, gracias por su fortaleza en los momentos débiles y buenos, sobre todo por darme una vida llena de experiencias y aprendizaje.

A mis padres con mucho cariño y amor: Edison Edgar Torres Segovia y Eusebia Yalli Salas, por sus sabios consejos, apoyo incondicional, comprensión y motivación agradecerles a mis hermanos (as) por estar presentes en cada paso que doy, amistades y tíos (as), Percy F. Torres

Eusebia Torres Yalli

PRESENTACIÓN

Este proyecto de investigación tiene la finalidad dar a conocer sobre la variación de los índices de calidad y el rendimiento de la manteca de Copoazú (*T. grandiflorum*) extraída por prensado hidráulico con/sin tratamiento enzimático. La tesis consta de las siguientes unidades:

Capítulo I Problema de investigación, dónde se problematiza el problema objetivo de investigación, describiéndose los objetivos y la hipótesis correspondiente.

Capítulo II: Marco teórico, dónde se describe la base teórica del trabajo de investigación enfocándonos en la manteca de Copoazú, proceso enzimático y la extracción de aceites y grasas por prensado hidráulico.

Capítulo III: Metodología de investigación, se presenta la metodología desarrollada para validar la hipótesis a través de trabajos experimentales utilizando DCC e I – optimal, utilizando la plataforma Desing Expert 11.1.0.1, así mismo se describe la metodología del análisis de los índices de calidad y ácidos grasos de la manteca de Copoazú.

Capítulo IV: Resultados de trabajo de investigación, se presenta los resultados hallados en la investigación con énfasis en a) Características morfológicas de la semilla de Copoazú, b) Extracción de grasa por método soxhlet, c) extracción de manteca por prensado hidráulico sin tratamiento enzimático, d) Extracción de manteca de Copoazú por prensado hidráulico con pre-tratamiento enzimático.

Conclusión, dónde se presenta los resultados del trabajo de investigación.

Invitamos a los lectores a realizar la lectura completa de la tesis desarrollada para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial.

RESUMEN

Se investigó el efecto de las condiciones de pre-tratamiento enzimático de la semilla de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) con la variación de los índices de calidad, y el rendimiento en manteca cruda extraído por prensado hidráulico, aplicándose diseño I-optimal de tres factores: relación enzima:sustrato (E:S), temperatura de inoculación (T_{inoc}) y tiempo de inoculación (t_{inoc}). Para optimizar las condiciones operativas, la función objetiva se maximiza en el rendimiento y minimiza en el cambio de los índices de calidad. Manteniendo constante la humedad de la muestra a 5 %, temperatura 80 °C, malla #15 y presión aplicada de 300 bar, las almendras de *T. grandiflorum* con previo tratamiento con celulasa:hemicelulasa, muestran un rendimiento y eficiencia en manteca extraída de 47,633 g/100g y 80,1 %, respectivamente a las condiciones de E:S de 1,363:100 g:g, T_{inoc} de 43,05 °C y t_{inoc} de 7 horas. Los índices de yodo, acidez, saponificación y peróxidos fueron 10,171 g I₂/100g, 3,333 mg KOH/g, 138,861 mg KOH/g, y 15,694 mEq O₂/Kg respectivamente. La mayor cantidad de ácidos grasos en la manteca fue el ácido oleico (w-9), con un valor de 40,94 % y 40,61% m/m, seguido del ácido esteárico de 34,645 % y 34,87 %, representando el 75,58 % a 75,48 % del total de ácidos grasos contenidos. El tratamiento enzimático permitió incrementar el rendimiento en 17,3 % y la eficiencia en 18,65 % respecto a muestras sin tratamiento enzimático; por otro lado, los ácidos grasos y los índices de calidad no han tenido una variación significativa.

Palabras claves: Tratamiento enzimático, prensado hidráulico, modelo matemático, optimización, Copoazú, índices de calidad.

ABSTRACT

The effect of the enzymatic pre-treatment conditions of the Copoazu seed (*Theobroma grandiflorum*) with the variation of the quality indices, and the yield in raw butter extracted by hydraulic pressing were investigated, applying three-factor I-optimal design: enzyme: substrate ratio (E: S), inoculation temperature (T_{inoc}) and inoculation time (t_{inoc}). To optimize operating conditions, the objective function is maximized in performance and minimized in the change of quality indices. Keeping the humidity of the sample constant at 5%, temperature 80 °C, mesh # 15 and applied pressure of 300 bar, the *T. grandiflorum* almonds with previous cellulase treatment: hemicellulase, show a yield and efficiency in butter extracted from 47,633 g / 100g and 80,1%, respectively at the conditions of E: S of 1,363: 100 g: g, T_{inoc} of 43,05 °C and t_{inoc} of 7 hours. Indices of iodine, acidity, saponification and peroxides were 10,171 g I₂ / 100g, 3,333 mg KOH / g, 138,861 mg KOH / g, and 15,694 mEq O₂ / Kg respectively. The highest amount of fatty acids in the butter was oleic acid (w-9), with a value of 40,94% and 40,61% m / m, followed by stearic acid of 34,645% and 34,87%, representing 75,58% to 75,48% of the total fatty acids contained. The enzymatic treatment allowed to increase the yield by 17,3% and the efficiency by 18,65% with respect to samples without enzymatic treatment; On the other hand, fatty acids and quality indices have not had a significant variation.

Keywords: Enzymatic treatment, hydraulic pressing, mathematical model, optimization, Copoazu, quality indices.

GLOSARIO

ANOVA: Análisis de Varianza

b.s: base seca

c.a: próximo a

cm: centímetro

bh: base húmeda

DCC: Diseño Compuesto Central

g: gramo

h: horas

Kg: kilogramo

m.s.n.m: metros sobre nivel del mar

m: metro

mg: miligramo

min: minutos

mL: mililitro

mm: milímetro

MPa: mega pascal

rpm: revolución por minuto

UV: ultravioleta

p/p: peso/peso

μL: microlitro

μm: micrómetro

°C: grados centígrados

INTRODUCCIÓN

El Copoazú (*Theobroma grandiflorum*), es un árbol de origen amazónico perteneciente a la familia *Sterculiaceae*, cultivado en regiones tropicales del Perú, Brasil, Ecuador, Bolivia y Colombia (Rojas Gonzales, et al., 1996). El fruto en promedio tiene 16,74 a 18,0 % de semilla, con un contenido de 17,24 % de proteína y 60 % de grasa, componentes fenólicos y aromáticos propios de las *Theobromas*, usándose como insumo en la producción de Cupulate y base en polvo para la industria alimentaria (Genovese , et al., 2009). Los componentes bioactivos contenidos en la semilla, son el flavan-3-ol monomérico, proantocianidinas, (+) - catequina, (-) – epicatequina y otros que están asociados con propiedades cancerígenas, anti-inflamatorios de protección cardiovascular, modulación de la respuesta inmune, función endotelial y actividades antimicrobiales e inhibidor enzimático (Pugliese, et al., 2013). Las semillas de Copoazú, son utilizados como sustituto graso alternativo al Cacao para la producción de cupulate, debido a su contenido de grasa, superior a 60% b.s (Lannes S, et al., 2003). Las semillas contienen ácidos grasos saturados/insaturados con usos potenciales en la industria cosmética, farmacéutica, alimentaria y dermatológico (Gilabert-Escrivá, et al., 2002); (Lannes S, et al., 2003); (Medeiros, et al., 2006). (Lafont, et al., 2011).

El perfil de los ácidos grasos de la manteca de *T. grandiflorum*, muestra un contenido alto de omega – 9 (42,3 %), y un balance importante entre los ácidos grasos saturados 50,43% e insaturados 40,82% (Alviárez G., et al., 2016), debido a estas proporciones y los flavonoides, la manteca de *T. grandiflorum* se convierte en un fuente natural para la industria cosmeceútica, con propiedades nutritivas, humectantes y emolientes, ideal para la preparación de productos de uso dermatológicos y farmacológico (Gilabert-Escrivá, et al., 2002). Respecto a la grasa de cacao el de Copoazú tiene un mayor contenido de ácidos grasos saturados 69,3% y menor ácido graso insaturado 30,7% (Alviárez G., et al., 2016).

Existen diferentes tecnologías consideradas para la extracción de aceites y mantecas vegetales, una de las más empleadas es el prensado hidráulico en frío,

seguido el espeller en frío. Por otro lado, gracias a las tecnologías convencionales se pueden obtener aceites y grasas, que generalmente se utilizan solventes orgánicos, esta última tecnología citada ha ocasionado una gran controversia debido a que las soluciones orgánicas (hexano) utilizados quedan saturados en el aceite y/o torta del fruto del proceso de extracción, asimismo causa problemas volátiles generando riesgos de toxicidad en el ser humano cancerígenas y la mala calidad del producto por altas temperaturas. (Guan & Shufen Li, 2007). Por lo tanto el proceso de extracción por prensado hidráulico sigue siendo más limpia y no generan concentraciones de compuestos residuales, estos beneficios tecnológicos se traducen en la alta calidad del producto debido al uso cosmecéutico, farmacológico y la salud ocupacional del operario, tornándose de interés en la población mundial, dicho método es muy eficientes.

Las semillas oleaginosas son sometidas a la acción enzimática, la celulasa y hemicelulasa se desdoblan en moléculas más pequeñas, facilitando la evacuación de los glóbulos grasos al exterior, (Grasso, 2013). Indica qué: “Una buena alternativa es la utilización de tratamientos enzimáticos, con el fin de facilitar la liberación del aceite, degradando las estructuras celulares”. Esto quiere decir que la mayoría de la enzimas hidrolíticas como lo son las pectinasas, hemicelulasas y las celulasas tienen el papel de romper de estructura con la que cuenta la membrana células del cotiledón, con el fin de hacer más penetrable la estructura, es importante mencionar que la eficiencia de este efecto depende del tamaño que tienen la partícula. “Las enzimas proteolíticas hidrolizan principalmente las proteínas de las membranas celulares y del citoplasma” (Grasso, 2013), (Dominguez, et al., 1994).

El objetivo de la investigación fue, determinar la relación que se presenta entre las condiciones de pre-tratamiento enzimático de la semilla de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) con la variación de los índices de calidad, y el rendimiento en manteca cruda extraídos por prensado hidráulico.

ÍNDICE

	Pág.
CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Descripción del problema	1
1.2 Formulación del problema	3
1.3 Objetivos	4
1.4 Variables	4
1.5 Operacionalización de variables	5
1.6 Hipótesis.....	6
1.7 Justificación	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antecedentes de estudio	8
2.2 Marco teórico.....	10
2.2.1. Producción de variedades comerciales.	10
2.2.2. Taxonomía del Copoazú.	11
2.2.3. Descripción morfológica de la planta de Copoazú.....	12
2.2.4. Composición del fruto de Copoazú.....	12
2.3 Semilla de <i>T. grandiflorum</i>	13
2.3.1. Composición química de la semilla de Copoazú.....	13
2.3.2. Estructura morfológica de las semillas de Copoazú.....	14
2.3.3. Manteca de Copoazú.....	16
2.3.4. Extracción de manteca de semillas oleaginosas.....	17
2.3.5. Composición química de la manteca	17
2.3.6. Grasas	19
2.3.7. Ácidos Grasos	19
2.3.8. Composición de las grasas.....	24
2.4 Métodos de extracción de aceites y grasas.	26
2.5 Aplicación de enzimas industriales en la extracción de aceites.	28
2.5.1 Factores que influyen en la actividad enzimática.....	29
2.6 Enzimas utilizadas en la degradación de paredes celulares para la obtención de aceites vegetales:.....	32
2.6.1 Cinética enzimática.....	34
2.7 Definición de términos	36
CAPÍTULO III: METODOLOGIA DE INVESTIGACION	38

3.1.	Tipo de estudio	38
3.2.	Diseño de estudio	38
3.3.	Población y muestra	38
3.3.1	Población.....	38
3.3.2	Muestra	38
3.4.	Métodos y técnicas	38
3.4.1.	Materiales, equipos y reactivos	38
3.4.2.	Metodología	44
3.4.3.	Pre – tratamiento del fruto de Copoazú	44
3.4.4.	Caracterización morfológica de la semilla	47
3.4.5.	Extracción de manteca por prensado hidráulico sin tratamiento enzimático de las semillas de Copoazú	48
3.4.6.	Pre-tratamiento enzimático y extracción de manteca por prensado hidráulico	51
3.4.7.	Métodos para análisis físico–químico de la manteca.....	52
3.4.8.	Extracción de grasa de semilla de Copoazú por soxhlet	53
3.4.9.	Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases (CG–MS).....	54
3.5.	Tratamiento de datos.....	55
3.5.1.	Diseño experimental para la optimización del proceso de extracción de manteca de Copoazú por prensado hidráulico.....	55
3.5.2.	Diseño experimental para la optimización del proceso de pre-tratamiento enzimático.....	58
3.5.3.	Análisis estadístico.....	60
3.5.4.	Tratamiento de los datos	62
CAPÍTULO IV: RESULTADOS DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN		63
4.1.	Características morfológicas de la semilla de Copoazú.....	63
4.2.	Extracción de grasa por el método soxhlet	66
4.3.	Extracción de manteca por prensado hidráulico sin tratamiento enzimático	67
4.3.1.	Efectos de diferentes tratamientos en el rendimiento y eficiencia de extracción	67
4.3.2.	Efectos de las variables independientes sobre parámetros de respuesta ..	69
4.3.3.	Modelamiento matemático de superficie de respuestas.....	72
4.3.4.	Optimización.....	73
4.4.	Extracción de manteca de Copoazú por prensado hidráulico con pre-tratamiento enzimático.....	75

4.4.1 Efecto de los diferentes tratamientos en el rendimiento y eficiencia de la manteca extraída.....	77
4.4.2 Efectos de las variables independientes en los parámetros de respuesta.....	78
4.4.3 Ajuste a modelo de superficie respuesta	84
4.4.4 Superficie respuesta	86
4.4.5 Optimización de respuesta múltiple	87
4.5 Análisis por cromatografía de la manteca de Copoazú (ácidos grasos).....	92
CONCLUSIONES	94
SUGERENCIAS.....	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIAS.....	97

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: PLANTA Y FRUTOS DEL COPOAZÚ EN ESTADO NATURAL	12
FIGURA 2: (A Y B) FRUTO Y SEMILLAS DE <i>T. GRANDIFLORUM</i>	14
FIGURA 3: CARACTERÍSTICAS DEL MESÓFILO ENCONTRADOS POR FM.....	15
FIGURA 4: COTILEDÓN DE CÉLULAS POLIFENÓLICAS	16
FIGURA 5: MESÓFILOS FRESCOS.....	16
FIGURA 6: ESTRUCTURA QUÍMICAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS CIS-LINOLEICO Y A-LINOLEICO	20
FIGURA 7: VELOCIDAD DE REACCIÓN AL TIEMPO.....	35
FIGURA 8: VELOCIDAD DE LA RECCION EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE LAS ENZIMAS.	36
FIGURA 9: FRUTOS DE COPOAZÚ (<i>T. GRANDIFLORUM</i>).....	44
FIGURA 11: FRUTO Y CULPA DE COPOAZÚ	45
FIGURA 12: PULPA Y SEMILLA DE COPOAZÚ	45
FIGURA 10: FLUJO GRAMA PARA LA OBTENCIÓN DE MANTECA DE SEMILLAS DE COPOAZÚ PRE-TRATADAS ENZIMÁTICAMENTE.....	46
FIGURA 13: PELADO DE SEMILLA DE COPOAZÚ	47
FIGURA 14: MOLIENDA DE SEMILLA DE COPOAZÚ.....	48
FIGURA 15: PRENSADO DE SEMILLAS DE COPOAZÚ	50
FIGURA 16: MANTECA CRUDA DE COPOAZÚ(A), ANÁLISIS DE ÍNDICE DE CALIDAD DE LA MANTECA (B).....	50
FIGURA 17: EQUIPO DE INCUBACIÓN.....	51
FIGURA 18: PRENSADO DE SEMILLA DE COPOAZÚ.....	52
FIGURA 19: DIMENSIONES DE LAS SEMILLAS DE COPOAZÚ	64
FIGURA 20: SEMILLA DE <i>T. GRANDIFLORUM</i> (C = COTILEDÓN, B = TEJIDO TRANSLÚCIDO, GLÓBULOS DE LÍPIDOS)	65
FIGURA 21: SEMILLA FRESCA DE <i>T. GRANDIFLORUM</i> PARTICULADA A) ANTES DE PRENSADO, B) DESPUÉS DE PRESADO	65
FIGURA 22: RENDIMIENTO EN MANTECA DE COPOAZÚ EXTRAÍDO POR PRENSADO HIDRÁULICO (G/100 G) COMO FUNCIÓN DEL NÚMERO DE OBSERVACIONES. ..	68
FIGURA 23: EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EN: A) RENDIMIENTO DE MANTECA EXTRAÍDA B) EFICIENCIA DE MANTECA EXTRAÍDA	69

FIGURA 24: EFECTOS DE VARIABLES INDEPENDIENTES EN EL RENDIMIENTO DE MANTECA EXTRAÍDA, A) HUMEDAD; B) TEMPERATURA; C) GRANULOMETRÍA; Y D) PRESIÓN.....	71
FIGURA 25: VARIACIÓN DE LA DESEABILIDAD, RENDIMIENTO Y EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE MANTECA DE COPOAZÚ POR Prensado Hidráulico como función de humedad, granulometría, temperatura de calentamiento y presión de prensado.	75
FIGURA 26: RENDIMIENTO DE MANTECA DE COPOAZÚ POR EXTRAÍDO Prensado Hidráulico vs Tratamiento y Eficiencia	77
FIGURA 27: RENDIMIENTO DE MANTECA DE COPOAZÚ A) TEMPERATURA vs ENZIMA Sustrato B) TIEMPO vs ENZIMA Sustrato.....	79
FIGURA 28: VARIACIÓN DE LOS ÍNDICES DE CALIDAD DE LA MANTECA DE COPOAZÚ A) ÍNDICE DE ACIDEZ-TIEMPO B) ÍNDICE DE PERÓXIDO-TEMPERATURA C) RENDIMIENTO-TEMPERATURA D) RENDIMIENTO-TIEMPO.....	82
FIGURA 29: ÍNDICE DE PERÓXIDO A) TEMPERATURA vs ENZIMA Sustrato B) TIEMPO vs TEMPERATURA.....	83
FIGURA 30: ÍNDICE DE ACIDEZ A) ENZIMA Sustrato vs TEMPERATURA B) ENZIMA Sustrato vs TIEMPO.....	83
FIGURA 31: RENDIMIENTO DE MANTECA DE COPOAZÚ A) TEMPERATURA vs ENZIMA Sustrato B) TIEMPO vs ENZIMA Sustrato Y C) TIEMPO vs TEMPERATURA.....	84
FIGURA 32: GRÁFICOS DE SUPERFICIE 3D DE LOS VALORES ÓPTIMOS PARA CADA FACTOR Y RESPUESTAS Y LA DESEABILIDAD EN EL ESTUDIO DE EXTRACCIÓN DE MANTECA DE COPOAZÚ POR Prensado en Frio con Previo Tratamiento Enzimático.....	90
FIGURA 33: RESULTADOS POR CROMATOGRAFÍA	93

INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1: VARIABLES INDEPENDIENTES, DEPENDIENTES E INTERVINIENTES	5
TABLA 2: COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL COPOAZÚ.....	13
TABLA 3: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SEMILLA DE COPOAZÚ.	14
TABLA 4: MANTECA DE COPOAZÚ.....	17
TABLA 5: COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LA MANTECA DE COPOAZÚ.	18
TABLA 6: ÍNDICE DE CALIDAD DE LA MANTECA DE COPOAZÚ	19
TABLA 7: ÁCIDOS GRASOS MÁS COMUNES.....	25
TABLA 8: ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DE LA MANTECA DE SEMILLA DE COPOAZÚ Y SUS RESPECTIVAS NORMAS	53
TABLA 9: MATRIZ DE FACTORES Y NIVELES (DESIGN EXPERT 11.1.0.1)	55
TABLA 10: MATRIZ DE RESPUESTAS PARA EL ESTUDIO DE EXTRACCIÓN DE MANTECA DE SEMILLA DE COPOAZÚ.....	56
TABLA 11: MATRIZ DE DISEÑO CODIFICADO (DESIGN EXPERT 11.1.0.1).....	57
TABLA 12: MATRIZ DE FACTORES Y NIVELES PARA EL ESTUDIO DE PRE-TRATAMIENTO ENZIMÁTICO EN LA EXTRACCIÓN DE LA MANTECA DE SEMILLA DE COPOAZÚ POR PENSADO HIDRÁULICO.	58
TABLA 13: MATRIZ DE RESPUESTAS.....	59
TABLA 14: MATRIZ DE DISEÑO (DESIGN EXPERT 11.1.0.1)	59
TABLA 15: ANÁLISIS ANOVA.....	61
TABLA 16: MATRIZ DE DISEÑO CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	62
TABLA 17: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA SEMILLA DE COPOAZÚ	63
TABLA 18: PROMEDIO DE EXTRACCIÓN POR SOXHLET.....	66
TABLA 19: RESULTADO DE EXTRACCIÓN DE MANTECA DE COPOAZÚ DE ACUERDO	68
TABLA 20: ANOVA PARA MODELO CUADRÁTICO.....	70
TABLA 21: ESTADÍSTICAS DE AJUSTE	73
TABLA 22: ESTADÍSTICAS DE AJUSTE	73
TABLA 23: CONDICIONES OPERATIVAS ÓPTIMAS.....	74
TABLA 24: RESULTADOS DE ÍNDICE DE CALIDAD CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	76
TABLA 25: RESULTADOS DE ÍNDICE DE CALIDAD CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	80
TABLA 26: ESTADÍSTICOS DE AJUSTE PARA EL RENDIMIENTO.....	86

TABLA 27: RESTRICCIONES CONSIDERADAS PARA LA OPTIMIZACIÓN MULTIVARIABLE– MULTIRESUESTA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE MANTECA DE COPOAZÚ PREVIO TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.	88
TABLA 28: SOLUCIONES ÓPTIMAS.....	92
TABLA 29: RESULTADO DE ÁCIDOS GRASOS	93

CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Descripción del problema

El Copoazú (*Theobroma grandiflorum*), se caracteriza por ser un cultivo permanente, cuyo fruto está formado principalmente de pulpa y semilla; esta última representa el $16,74 \pm 1,0\%$ al fruto, (Souza, et al., 1996.), el uso de las propiedades bioactivas de la semilla ha despertado un interés comercial orientado a la industria farmacológica , cosmeceútica y alimentaria (Gilabert-Escrivá, et al., 2002).

Las semillas provenientes del proceso de despulpado, son utilizadas para elaboración de “Cupulate” previa fermentación. En los últimos años la industria cosmética ha mostrado interés en utilizar la manteca extraída de la semilla de *T. grandiflorum*, sobre todo por su composición en ácidos grasos insaturados, flavonoides, así como su potencial para humectar y nutrir la piel, su capacidad de absorción de agua y propiedad emoliente ideal para la preparación de productos de uso dermatológico (Gilabert-Escrivá, et al., 2002).

La extracción de aceite y manteca vegetales en los últimos años ha despertado una motivación al desarrollo de nuevas tecnologías más amigables con el medio ambiente y la salud humana, garantizando la calidad de los productos. Los procesos asistidos por enzimas se tornan prometedores, siempre en cuando se establezcan las condiciones adecuadas de inoculación e hidrólisis del sustrato, seguido de un prensado hidráulico. Para aumentar el rendimiento de extracción de aceites, en la última década se ha incrementado la utilización de enzimas como alternativas para mejorar la eficiencia de los procesos. De este modo la tecnología enzimática se ha utilizado en procesos de extracción de aceites

vegetales de girasol, pepa de uva, soya (Kashyap, et al., 2007), maíz (Nyam, et al., 2009) y de oliva (Najafian, et al., 2009).

La mayoría de las enzimas utilizadas tales como celulasas, hemicelulasas, pectinasas son utilizadas con el objetivo de romper la estructura de las paredes celulares del cotiledón (Rosenthal, et al., 1996), el efecto del tratamiento con enzimas en semillas oleaginosas previamente molida, depende del tamaño de partícula.

La semilla de *T. grandiflorum*, contiene 55 a 60% de grasa, 15 a 18% de proteínas y 18 a 22% de fibra (Souza, et al., 1996.), así mismo, los componentes bioactivos identificados por pugliese 2013, flavonoides: (+) - catequina, (-) - epicatequina, isoscutellarein 8-O- β -D-glucuronide, hipolaetin 8-O- β -glucuronide, quercetina 3-O- β -D-glucurónido, quercetina 3-O- β -D-glucurónido Éster metílico de 6 ", quercetina, kaempferol y isoscutellarein 8-O- β -D-glucuronide 6 " -methyl ester. Glucósidos de flavonoides sulfatados, teograndinas I y II (Pugliese, et al., 2013). Las sustancias químicas mencionados, contribuyen al interés a la revalorización de la semilla por la industria alimentaria y cosmeceútica, esto es la producción de copulate y manteca orientada al desarrollo de nanocarriers o nanoemulsiones para uso cosmético y médico. Los procesos agroindustriales orientados al aprovechamiento de la semilla de *T. grandiflorum* es limitado.

Así mismo las regulaciones ambientales y el estricto control de las emisiones de efluentes contenido de soluciones orgánicos, han motivado a la industria oleaginosa buscar procesos alternativos a los usos de hexano, para extracción de aceites y grasas; una alternativa, más ecológica, es el uso de procesos asistidos por enzimas, la implementación de este proceso en la extracción de manteca contenida en la semilla de *T. grandiflorum*, requieren de estudios en las cuales establezcan correlaciones entre los parámetros operativos el hardware del equipo donde se lleva a cabo el proceso, con la calidad y rendimiento en la manteca extraída, que esta tesis a abordado, dado que se ha observado una limita observación en este tema específico.

La extracción de aceites y grasas por prensado hidráulico de matrices oleaginosas, requiere la aplicación de una carga mecánica bastante alta, con el objetivo de separar los aceites y/o grasas contenidas en las muestras. Toda muestra orgánica está constituida de tejidos celulares, donde están ocluidos los glóbulos grasos; estas grasas por la acción mecánica parcialmente migran desde los intersticios a la pared externa de la muestra; este proceso de migración, es la etapa limitante cuando se tiene partículas grandes o demasiadas pequeñas, por ello los rendimientos reducidos comparados con procesos de expresión mecánica.

Este último método tiene el inconveniente de someter la matriz vegetal a presiones y temperaturas muy altas, desnaturalizando los componentes esenciales del aceite, inconvenientes que el proceso hidráulico no los tiene, por ello la extracción de aceites y grasas son para uso cosmético y médico. Por otro lado, cuando la matriz oleaginosa es sometida a la acción enzimática, la celulasa, hemicelulasa, proteasa, viscosime, etc., desdoblan las fibras celulares en moléculas más pequeñas, incrementando el área superficial de exposición de los glóbulos grasos y en consecuencia su rendimiento.

El método de prensado hidráulico previo tratamiento enzimático tiene el inconveniente de establecer el tipo de enzima utilizado, las condiciones de temperatura y tiempo de inoculación así como, el grado de agitación. Se tiene limitada información respecto al uso de enzimas para extracción de manteca de Copoazú, y su relación con la calidad, rendimiento, motivo de la tesis.

1.2 Formulación del problema

¿Qué relación se presenta entre las condiciones de pre-tratamiento enzimático de la semilla de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) en la variación de los índices de calidad, y el rendimiento en manteca cruda extraídos por prensado hidráulico?

1.3 Objetivos

Objetivos generales

- Determinar la relación que se presenta entre las condiciones de pre-tratamiento enzimático de la semilla de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) con la variación de los índices de calidad, y el rendimiento en manteca cruda extraído por prensado hidráulico.

Objetivos específicos

- Establecer las condiciones operativas óptimas del proceso de extracción de manteca de Copoazú por prensado hidráulico de muestras sin tratamiento enzimático.
- Establecer una relación matemática de superficie respuesta entre la cantidad de enzima:sustrato (semilla particulada), tiempo y temperatura de inoculación con el rendimiento de manteca extraída por prensado hidráulico de muestras de semilla de Copoazú previamente sometidos a tratamiento enzimático.
- Optimizar las condiciones operativas, minimizando la variación de los índices de calidad y maximizando el rendimiento y eficiencia de manteca extraída por prensado hidráulico.
- Evaluar la variación en la composición de ácidos grasos de la manteca extraída por prensado hidráulico de muestras sin y con previo tratamiento enzimático.

1.4 Variables

Variables Independientes: Pre-tratamiento enzimático:

Z₁: Enzima/sustrato (g: g)

Z₂: Temperatura de hidrólisis enzimático (°C)

Z₃: Tiempo tratamiento enzimático (horas)

Variables Dependientes: Índice de calidad de la manteca de Copoazú:

Y₁: Índice de acidez (mg de KOH/g)

Y₂: Índice de saponificación (mg de KOH/g)

Y₃: Índice de yodo (g I₂/100 g)

Y₄: Índice de peróxidos (mEq O₂/kg)

Rendimiento en manteca obtenida (g/100g*100)

Variables Intervinientes

X₁: Granulometría (# malla)

X₂: Temperatura calentamiento (°C)

X₃: Humedad (%)

X₄: Presión de prensado (bar)

1.5 Operacionalización de variables

Tabla 1: Variables Independientes, dependientes e intervinientes

VARIABLES	INDICADORES	INDICES
VARIABLES INDEPENDIENTES		
	Enzima/sustrato (g:g)	0,5; 0,64; 1,02; 1,04; 1,055; 1,5
Pre-tratamiento enzimático	Temperatura de hidrólisis enzimática (°C)	30; 32; 40,4; 40,7; 40,8; 50
	Tiempo tratamiento enzimático (horas)	6; 7,2; 10,08; 11,7; 11,82; 12; 15,6; 16,74; 16,8; 18
VARIABLES DEPENDIENTES		
Índice de calidad de la manteca de Copoazú	Y ₁ : índice de acidez	mg de KOH/g
	Y ₂ : índice de saponificación	mg de KOH/g
	Y ₃ : índice de yodo	g I ₂ /100 g
	Y ₄ : índice de peróxidos	mEq O ₂ /kg
Rendimiento en manteca obtenida	Relación entre cantidad grasa extraída y el total disponible	(g/100g*100)
VARIABLES INTERVINIENTES		
Sin pre-tratamiento enzimático	Granulometría (# malla)	15
	Temperatura de calentamiento (°C)	80
	Humedad (%)	7
	Presión de prensado (bar)	300

Fuente: Elaboración propia, (2018)

1.6 Hipótesis

H_i: El incremento del área de exposición de los glóbulos grasos de la semilla de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) por efecto del pre-tratamiento enzimático, incrementa el rendimiento en la cantidad de grasa extraída por prensado hidráulico, y los índices de calidad no se modifican sustancialmente respecto a la semilla cruda.

H₀: El incremento del área de exposición de los glóbulos grasos de la semilla de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) por efecto del pre-tratamiento enzimático, no incrementa el rendimiento en la cantidad de grasa extraída por prensado hidráulico, y los índices de calidad se modifican sustancialmente respecto a la semilla cruda.

1.7 Justificación

Las semillas de Copoazú, es utilizado como un sustituto graso alternativo al Cacao para la producción de chocolate, debido a su alto contenido de grasa, superior a 60% peso seco. Las semillas contienen ácidos grasos saturados/insaturados con usos potenciales en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (Gilabert-Escrivá, et al., 2002) (Lannes S, et al., 2003); (Medeiros, et al., 2006). Se ha despertado en los últimos 20 años una motivación que tienen que ver con el estudio de la extracción por prensado hidráulico y con fluidos supercríticos ofreciendo la oportunidad, dado su eficiencia y ser capaz de poder extraer de manera selectiva las sustancias que son de mayor interés, pero sin dejar nada de trazas de materia solvente en el extracto. Estos beneficios tecnológicos se traducen en la alta calidad del producto y la salud ocupacional del operario, tornándose de interés en la población mundial.

Por otro lado, hoy en día gracias a las tecnologías que son de manera convencionales, con el propósito de obtener grasas y aceites, para utilizar generalmente el solvente orgánico, sin muchas veces percatar el riesgo que

esto implica por contener un alto grado de toxicidad, en el ser humano, su inflamabilidad por los residuos que producen.

Debido a este problema, se están evolucionando nuevas ideas tecnológicas, con el fin de cuidar a nuestro medio ambiente, que sean más respetuosas para evitar consecuencias para la salud, y sobre todo que garantice la calidad del producto, por esta razón se va generar un valor agregado a la semilla de Copoazú en la “Región de Madre de Dios”, que en la actualidad se desconoce el estudio de la semilla del Copoazú en la extracción de manteca con o sin el pre-tratamiento enzimático de las semillas sin fermentar, beneficiando a nivel social como agricultores intermediarios y consumidores finales en la comercialización a nivel nacional y mundial a gran escala de producción como en las industrias cosmeceútica mejorando la calidad de vida y económica de la región.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de estudio

Moreno, et al (2013) Realizaron la “Caracterización fisicoquímica de la grasa de las semillas del fruto de Copoazú”, con la finalidad de establecer las similitudes entre la grasa de Copoazú (*T. Grandiflorum*) y la manteca de Cacao para su aprovechamiento industrial, realizando pruebas fisicoquímicas de las accesiones de la Vega (V-168), Terraza (T-045) y Cordillera (C-873). Las condiciones para el pre-tratamiento enzimático se adicionaron agua destilada en una relación 1:3 con enzima comercial Maxoliva® disuelta a una concentración de 2% enzima/sustrato y 100 g de muestra con las condiciones de temperatura 50 °C y 6 horas de incubación. Las semillas fueron sometidas al proceso de centrifugación a una velocidad de 4500 rpm durante 30 minutos; Las semillas tratadas térmicamente se colocaron en un secador a 100 °C durante 20 minutos con el fin de inactivar la actividad enzimática. En cuanto al rendimiento de la grasa en la semilla de Copoazú se determinó que las accesiones V-168 muestra mayor rendimiento con un valor de 57,192%. Con enzima 25,367% y sin enzima y 19,230%. Ya que además existen valores desde 10,733 y 42 mg ácido gálico/100 g de grasa. Convirtiéndose en una materia prima ideal para la elaboración de productos nutracéuticos y alimenticios. El rendimiento de manteca de Copoazú (57%) y cacao (31%) (Moreno, et al., 2013).

Ezeh, et al., (2015) Investigaron “Mejorar la recuperación del aceite de nuez de tigre (*Cyperus esculentus*) por presión mecánica: Contenido de humedad, tamaño de partícula, alta presión y efectos de pre-tratamiento enzimático”, el objetivo del estudio fue evaluar el impacto de varios factores y pre-tratamiento enzimático en la recuperación de aceite de nuez de tigre por prensado mecánico. Las muestras se secaron durante 1,5 h hasta que el contenido de humedad fue 6,5% y 8%, se molieron y tamizaron a un tamaño de partícula

de $\leq 0,85$ mm. Sin pre-tratamiento enzimático se usó 30g de muestras, se colocó en bolsa de polietileno y posteriormente en un recipiente a presión para ser sometido a presiones de 50, 300, 500 y 700 MPa (por 15 min tiempo de retención a 40 °C). El tratamiento enzimático se aplicó con tres tipos de enzimas: Proteasa, α -amilasa y Viscozyme L en relación de (1:1:1). Las enzimas de diferentes pesos totales (0,15, 0,30, 0,45 g) se añadieron a 50 ml de agua destilada y 30g de muestra, se ajustó a un pH 8 usando NaOH 0,5 M. La incubación se llevó a cabo durante 6 h a 40 °C en un baño de agua con una velocidad de agitación lineal de 180 rpm. Después de la incubación, la mezcla se secó en un horno de vacío a una T° 55°C hasta lograr una humedad final de 6,5 y 8 %. El aceite se extrajo por prensado hidráulico a una presión de 38 Mpa por 40 y 50 s. El rendimiento del aceite sin enzima fue 23,1 % y con enzima 35 % (Ezeh, et al., 2015).

García, M. (2014) Estudia la “Evaluación del tratamiento enzimático para la extracción mecánica del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (*passiflora edulis var. flavicarpa degener*)”, cuyo objetivo fue el efecto del tratamiento de las características de la calidad del aceite. Se aplicó el tratamiento enzimático (celulasa y hemicelulasa), concentración de enzima (0,5 y 2%, al sustrato), relación MP: agua (3:1 y 5:1) y tiempo de hidrólisis (4 y 18 horas). Los niveles optimizados fueron, concentración de enzima 1,95%, Relación MP agua 5,68:1 y Tiempo de hidrólisis 22,8 horas; con los que logró alcanzar un rendimiento experimental de $20,19 \pm 0,40$ % (b.s) a comparación del rendimiento obtenido con una extracción convencional (sin aplicación de enzimas) fue de 11,87 % (p/p) (b.s). Los ácidos grasos poliinsaturados representan el 73,27% y 73,14% de los aceites extraídos con y sin tratamiento enzimático respectivamente, de los cuales el ácido graso linoleico fue el predominante en el aceite de semilla de maracuyá obtenido con tratamiento enzimático es de 72,89% y sin tratamiento 72,72%. Obteniendo el 26,36 % (b.s) de aceite (extracto etéreo) (García Moreno, 2014).

2.2 Marco teórico

El Copoazú (*Theobroma grandiflorum*).

El Copoazú: “Es una planta fructífera, de la familia de las Esterculiáceas, típicamente amazónica y con muchas cualidades nutritivas en su pulpa y semilla, es pariente semejante al cacao y macambo, su domesticación es relativamente reciente”, (Hernández & Barrera, 2004).

El Copoazú se encuentra distribuido dentro de la cuenca amazónica, de Perú, Guyana, Brasil, Colombia y Venezuela, pero en el país de Brasil es donde se encuentra un programa para mejorar su procesamiento, con el fin de aprovechar su comercialización.

“La pulpa es utilizada para preparar refrescos, helados, néctares, mermeladas, vinos, licores y otros productos frescos. De las semillas molidas se obtiene una pasta similar al chocolate de cacao, denominada cupulate”, (Hernández G. & Barrera G., 2004).

“Finalmente, la cáscara es usada como abono orgánico en los sistemas agroforestales y debidamente procesada, constituye un componente en el alimento para animales de cría”, (Hernández G. & Barrera G., 2004).

El Copoazú tiene la capacidad de desarrollarse en suelos de origen trópicos húmedos, ya que es su mejor hábitat para reproducirse, pero también se han hallado pruebas que pueden desarrollarse en una especie nativa en América oriental.

2.2.1. Producción de variedades comerciales.

La producción de este fruto se produce por diferentes variedades, según su corteza y carcasa, por tal motivo existen tres grupos diferentes:

Variedades de Copoazú (*T. grandiflorum*)

(Hernandez & Barrera, J., 2004), distingue tres variedades que a continuación se menciona.

1. **Copoazú redondo:** “Es la variedad más común de la amazonia brasilera, los frutos presentan extremos redondeados y su cáscara tiene de 6 a 7mm de grosor”. (Hernandez & Barrera, J., 2004)
2. **Copoazú mamorana:** “Sus frutos son los de mayor tamaño, sus extremos son puntudos, su cáscara es más gruesa, entre 7 y 9 mm, puede alcanzar un peso aproximado de 2,5 Kg a 4 Kg” (Hernandez & Barrera, J., 2004)
3. **Copoazú mamau:** “Su mayor característica es la carencia de semilla también recibe los nombres de copo sin semilla o Copoazú sin semilla (Venturieri, et al., 1984). Tiene peso aproximado de 1,5 Kg”. (Hernandez & Barrera, J., 2004)

2.2.2. Taxonomía del Copoazú.

“El Copoazú pertenece a la familia Sterculiaceae, que abarca aproximadamente 65 géneros, cerca de 1000 especies, con una distribución predominantemente tropical y subtropical. En Brasil, esta familia está representada por 11 géneros y cerca de 115 especies”, (Hernandez & Barrera, J., 2004)

Para el autor (Zapata, et al., 1996) La taxonómica del Copoazú se clasifica de la siguiente manera:

División: Fanerogamas

Clase: Angiospermae

Orden: Malvales

Familia: Sterculiaceae.

Género: Thebroma

Especie: Grandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum

Nombre común: Copoazú, copoasu, cupuazu, cupuassu, cacao blanco.



Figura 1: “Planta y Frutos del Copoazú en estado natural”.

Fuente: Hernández et al., (2006)

2.2.3. Descripción morfológica de la planta de Copoazú.

El Copoazú es un árbol leñoso, arbóreo, del bosque tropical húmedo, de ciclo perenne, de crecimiento erecto y semierecto, de forma cilíndrica. En árboles de tres años y medio se ha registrado tronco con diámetro de 10cm y altura de 4m. En estado adulto la altura puede llegar a 18m. La hoja es simple, alterna, oblanceolada o elíptica, (Lucias Loayza, 2018). La flor es solitaria, axilar, con corola de color morado, es pubescente y tiene estípulas en el pedúnculo.

Fruto

El fruto posee diferentes formas, generalmente tiene un ápice y base terminada en punta que le da la variabilidad al fruto (Rojas & Escobar, 1996). El fruto es una cápsula, con 12 a 15 cm de largo y 10 a 12 cm de diámetro, cuyo peso promedio es de 1200 g, la cáscara es de 1cm de grosor, dura, recubierta por pilosidades de color café rojizo, la pulpa que rodea las semillas es blanca, crema o amarillo cremoso, (Lim, 2012)

2.2.4. Composición del fruto de Copoazú

En la Tabla 2. Comparación de autores de la composición porcentual del fruto de Copoazú.

Tabla 2: Composición porcentual del Copoazú.

Parte del Fruto	Santos & Condurú	Barbosa, Nazaré & Nagata	Calzavara, Müller & Kawage	Media
Corteza (%)	46,0	42,0	46,0	44,6
Pulpa (%)	37,0	40,0	36,0	37,7
Semilla (%)	17,0	18,0	18,0	17,7

Fuente: Santos, (1982); Barbosa, et al., (1979); Calzavara, (1970)

2.3 Semilla de *T. grandiflorum*

En los datos obtenidos se han conseguido una gran cantidad de semillas, las cuales varía de 25 a 50, por cada fruto, la forma de este es comúnmente elíptica-aplanada. Cuentan con una longitud de 2,2 a 3,5, con un ancho de 1,5 a 2,5 cm, el mesocarpio es de color blanco y mide 7 mm de espesor, (Lim, 2012). “Están cubiertas por una pulpa blanco amarillenta de sabor ácido y de aroma agradable” (Argüello & Bolaños, 1999).

Las semillas pueden ser utilizadas en la fabricación de distintos productos, con características de confiterías, aunque el grano cuenta con características que no son muy favorables, esto es porque la grasa contiene de un 50 –a 60% de muestras, que son diferentes a las grasas que contiene el cacao, como las propiedades del tiempo y temperatura de cristalización de grasas, tiene mayor viscosidad que la manteca de cacao (Lannes, et al., 2004). “Las semillas de Copoazú tienen un alto contenido de polifenoles, donde los flavonoides principalmente constituyen el 5,5% de su peso en base húmeda”. (Dreosti, 2000). “La manteca es muy utilizada en la formulación de cosméticos hidratantes y en la industria alimenticia”. (Gilabert-Escrivá, et al., 2002).

2.3.1. Composición química de la semilla de Copoazú.

El Copoazú contiene semillas que son esencialmente oleaginosas, el cual contiene un lípido que es superior al 50%, por tal motivo contiene un cantidad considerable de carbohidratos y proteínas. “Los principales ácidos grasos

presentes en el aceite son los ácidos oleico y esteárico. En proporciones menores se encuentran también los ácidos araquídico, palmítico, linoleico, bénico, gadoléico, heptadecanoico y palmitoléico” (Chaar, 1980); (Silva, 1988).

Tabla 3: Composición química de la semilla de Copoazú

Peso fresco	(%)	Peso fresco	(%)
Humedad	23,34	Carbohidratos	20,07
Proteína	17,24	Fibra	5,77
Grasa	57,22	Ceniza	3,85

Fuente: Gonzales, et al., (1996)

2.3.2. Estructura morfológica de las semillas de Copoazú.

El fruto de *T. grandiflorum* es ovoide (figuras A) y muestra una variación del tamaño de las semillas (figura B). Los mesófilos de cotiledón de esta especie mostró la siguiente característica de género: un mesófilo aplanada, que siempre se plegó densamente alrededor del eje de la radícula hipocotílica y mesófilos blanquecinos, o más oscuro si la síntesis de antocianinas era abundante (figura A). La morfología foliar cotiledón fue evidente a partir de los haces vasculares dispersos alrededor del tejido mesófilo, (Barroso, et al., 1999); (Silva, et al., 2001). *T. grandiflorum* (B), el espesor del mesófilo cotiledón fue de 0,7 mm, los cotiledones son más delgadas. Barras = 10 mm.

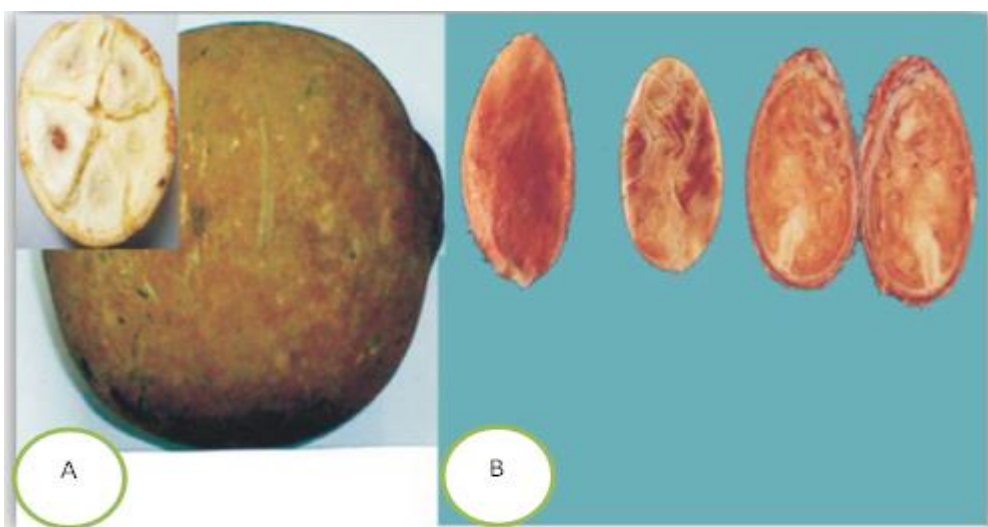


Figura 2: (A y B) Fruto y semillas de *T. grandiflorum*

Fuente: Martini, et al., (2008)

Las especies estudiadas mucílago inicialmente sintetizada, gránulos de almidón, lípidos y proteínas cuerpos concomitantemente (Figura 3). Síntesis mucílago intenso ocurrió en todas las células de semillas y también en otros tejidos del fruto.

La Figura 3, *T. grandiflorum*. I tinción / KI reacción del mesófilo. El mucílago, los pequeños gránulos de almidón y de los depósitos fenólicos. M = mucílago; pH = células polifenólicos; gránulos St = almidón. Barras: 50 m (2). Una peculiaridad de las semillas maduras *T. grandiflorum*, (Martini, 2004) fue la presencia de filas de células polifenólicos mostradas perpendicular al borde cotiledón mesófilo.

I tinción /: tinción gram

KI reacción del mesófilo: yoduro de potasio

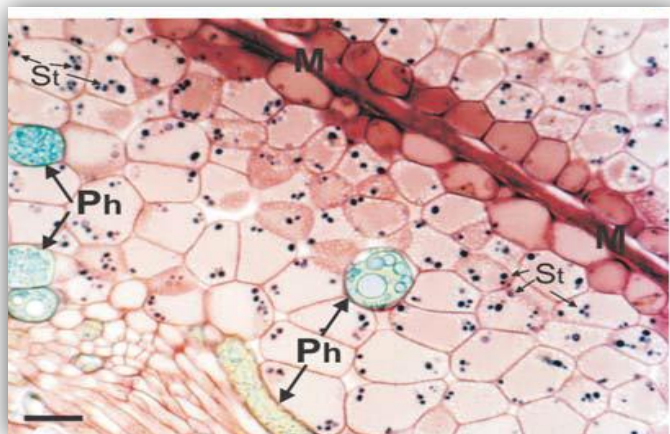


Figura 3: Características del mesófilo encontrados por FM.

Fuente: Martini, et al., (2008)

El cotiledón de *T. grandiflorum* mostró una gran cantidad de células polifenólicas idioblastas intercaladas con las células mesófilas. Una peculiaridad de las semillas maduras de *T. grandiflorum* (Martini, 2004) fue la presencia de filas de células polifenólicas desplegadas perpendiculares al borde mesófilo del cotiledón.

Cuando los mesófilos frescos fueron sometidos a temperaturas superiores a 28 °C, los glóbulos de lípidos de esas células vivas rápidamente se unieron. La figura 5 (lado izquierdo) muestra las características. Las cuatro celdas

cerradas en el lado izquierdo (flechas) muestran la asociación suelta del tejido de células del mesófilo. Una masa de proteínas filtradas se ve a la derecha. (Prot = reservas de proteínas). Barras = 10m.



Figura 4: Cotiledón de células polifenólicas

Fuente: Martini, et al., (2008)

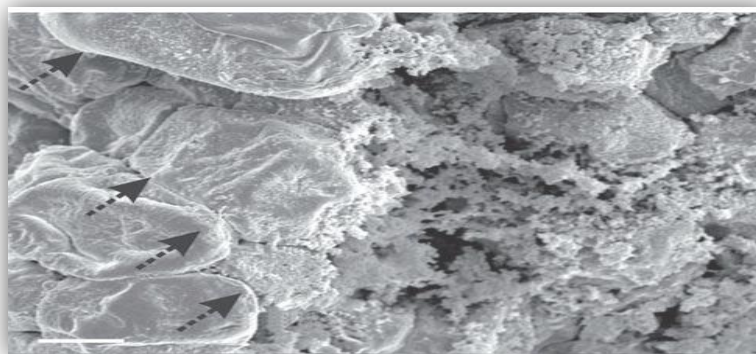


Figura 5: Mesófilos frescos.

Fuente: Martini, et al., (2008)

2.3.3. Manteca de Copoazú.

La manteca del Copoazú es un triglicéridos, que cuenta con una composición de manera equilibrada de ácidos grasos, de saturados e insaturados para dar un punto bajo de fusión del producto (aproximadamente 30 °C), como también la apariencia de un blando sólido, es decir que se pueda derretir con mayor facilidad y sobre todo rápidamente, cuando se encuentre en contacto con la piel, ya que este producto se utiliza para la realización de cosméticos. “La manteca de Copoazú se encuentra ácidos grasos en mayor proporción como es el ácido oleico (omega 9) un tipo de ácido graso mono insaturado y en menor presencia de ácidos grasos saturados”. (Moreno, et al., 2013).

2.3.4. Extracción de manteca de semillas oleaginosas.

El fin que tiene la producción de aceites de origen vegetal, para el consumo humano y no comestibles, se encuentran destinados para la fabricación y producción de farmacéuticos, y cosmético, debido a que es referida a la remoción del aceite que se encuentra en la semilla oleaginosas, mediante la extracción química o mecánica.

“Las oleaginosas se dividen en dos grandes grupos, oleaginosas de bajo contenido graso (aquellas con 20% de aceite o menos) y las oleaginosas de alto contenido graso (aquellas que tienen hasta 50-60% de aceite)”. (Guarín, 2011).

2.3.5. Composición química de la manteca

Tiene una extrema capacidad de absorción de agua, es un emoliente que le brinda un tacto agradable y suave a la piel.

Tabla 4: Manteca de Copoazú

Cada 100g de manteca contiene	
Proteína	1,7 g
Calcio	23 mg
Fosforo	26 mg
Hierro	30 mg
Vitamina B ₁	0,04 mg
Vitamina B ₂	0,04 mg
Vitamina C	33 mg
Índice de digestibilidad	94,10%
No contiene caferencia	

Fuente: Hernández G. & Barrera G., (2004); Villachica, (1996).

En la Tabla 4, se detallan los porcentajes de los ácidos grasos que se encuentran identificados en el aceite extraído de las semillas de Copoazú; se lograron identificar el 90% de los compuestos de la muestra, encontrándose en mayor proporción ácido oléico (36,30%) y el ácido esteárico (29,27%),

conformando los dosel 65,57% del material oleícola; Mientras que el aceite de Copoazú está constituida por un 50,43% de ácidos grasos saturados y 40,82% de insaturados, en la identificación de ácidos grasos hay mayor contenido de ácido oleico (36,3%), esteárico (29,27%) y palmítico (7,26%); los índices de calidad, como saponificación (188,15 mg KOH/g muestra), yodo (49,33 g de I/g de grasa) y acidez (1,04 mg KOH/g muestra), “Muestran que la manteca de Copoazú podría ser utilizado en la industria alimentaria y cosmética” (Alviárez G., et al., 2016).

Tabla 5: Composición de ácidos grasos de la manteca de Copoazú.

Ácidos grasos	Fórmula	Composición química p/p (%)
Ácido caprico	C10:0	0,01±0,00
Ácido laurico	C12:0	0,01±0,00
Ácido tridecanoico	C13:0	0,02±0,01
Ácido mirístico	C14:0	0,03±0,00
Ácido pentadecanoico	C15:0	0
Ácido palmítico	C16:0	7,26±0,20
Ácido palmitoleico	C9-C16:1	0,12±0,04
Ácido margárico	C17:0	0,20±0,01
Ácido heptadecanoico	C 10-C17:1	0,01
Ácido esteárico	C18:0	29,27±0,80
Ácido oleico	C 9,12-C18:1	36,30±1,00
Ácido linoelaidico	T9,12-C18:2	0,04±0,00
Ácido linoleico	C9,12-C18:2	3,60±0,08
Ácido araquídico	C20:0	11,22±0,32
Ácido α linolenico	C9,12,15-C18:3(n-3)	0,20±0,01
Ácido henicosanoico	C21:0	0,04±0,00
Ácido eicosadienoico	C11-C20:1	0,22±0,01
Ácido behenico	C22:0	2,11±0,06
Ácido lignocerico	C24:0	0,25±0,01

Fuente: Alviárez G., et al., (2016)

La capacidad de la manteca que contiene el Copoazú para poder resistir a la energía radiante y a los efectos de los (UV), que son las calóricas con enzimas, se pueden determinar mediante el índice de peróxido y dienos conjugados.

Según la norma (Codex, 1999); “la manteca de Copoazú se clasifica como un aceite no secante, lo que la habilita para ser utilizado en la industria cosmética”, (Lafont, et al., 2011).

Tabla 6: Índice de calidad de la manteca de Copoazú

Parámetros	Manteca Copoazú	Codex Alimentarius
Índice de Acidez ^a	1,04+/- 0,1	4
Índice de Saponificación ^b	188,15 +/- 1,5	184 – 196
Índice de yodo ^c	49,33 +/- 1,5	<100

^amg KOH/g; ^bmg KOH/g; ^cgI₂/100g

Fuente: Alviárez G., et al., (2016)

2.3.6. Grasas

Las grasas básicamente están: “Compuestas por ácidos grasos, moléculas constituidas por una unión de átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Pero, no todas las uniones son iguales, justamente se dividen en saturados e insaturados (estos últimos a su vez se subdividen en monoinsaturados, poliinsaturados)”. (Medina, 2016)

“El total de grasas que se consuman, la tercera parte, sean poliinsaturadas, la tercera monoinsaturados y el tercio restante saturadas (estas últimas no deben superar el 10% de las calorías de la dieta). A continuación las analizaremos por separados”, (Medina, 2016)

2.3.7. Ácidos Grasos

Los ácidos grasos que se encuentran el en Copoazú representan de un 90 al 96% del peso molecular que contienen los triglicéridos. “Los ácidos grasos existentes en la naturaleza sustancias puras o como parte de moléculas más complejas conocidas como lípidos. Los ácidos grasos libres se componen de

un grupo carboxilo y una cadena de hidrocarburo (R), siendo representado por R-COOH”, (FAO, 2012).

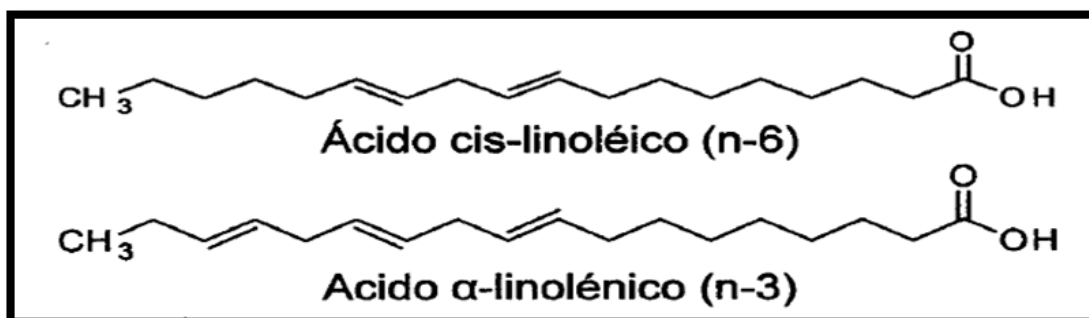
Los ácidos grasos individuales se distinguen entre sí por la naturaleza de la cadena de hidrocarburo, es decir, número de carbono y la presencia de insaturaciones. Esta cadena puede variar en longitud desde 4 a 24 átomos de carbono y pueden ser saturados, monoinsaturados (un doble enlace) o poliinsaturados (dos o más dobles enlaces).

Estos incluyen, por ejemplo, ácido esteárico (ácido graso saturado de 18 carbonos), ácido oléico (ácido graso monoinsaturado de 18 carbonos) y los ácidos linolénico y linoléico (ambos ácidos que contiene 18 carbonos dos y tres enlaces dobles, respectivamente).

“Algunos de los ácidos grasos insaturados producen efectos especiales en el organismo vivo y son denominados ácidos grasos esenciales. Estos ácidos grasos no pueden ser sintetizados por el organismo humano y de esta forma, deben ser obtenidos por la dieta”. (FAO, 2012).

“Existen dos tipos de ácidos grasos esenciales, los ácidos grasos n-6, derivada del ácidos cis-linoléico (C18:2), la serie n-3, derivada del ácido α -linolénico (C18:3). Las estructuras químicas de los ácidos grasos n-6 y n-3 se presentan en la Figura 6”. (FAO, 2012)

Figura 6: Estructura químicas de los ácidos grasos cis-linoléico y α -linolénico



Fuente: Martin et al., (2006).

Los ácidos grasos son biomoléculas de origen orgánicas, es decir de naturaliza lipídica, que se encuentra formada por una larga cadena de

hidrocarbonada lineal, cuenta con un par de átomos de carbono, y cuando existen casos extremos hay un grupo de carboxilo.

Estos ácidos grasos son de ácidos orgánicos monoenoicos, que están presente en las grasas, que son raramente libres y casi siempre esterificando al glicerol, como también eventualmente a otros alcoholes, pertenecen a una cadena lineal, y cuentan con un par de átomos de carbono.

Ácidos grasos saturados

Los ácidos grasos de origen saturados químicamente se encuentran contenidos por todos los átomos de carbono, menos el átomo terminal, se encuentran unidos a dos átomos de hidrogeno, por lo tanto se encuentran saturados de hidrogeno. “Este tipo de grasas provienen del reino animal, excepto el aceite de coco y el cacao, son sólidas a temperatura ambiente. Su consumo está relacionado con un aumento del colesterol sanguíneo y con la aparición de enfermedades cardiovasculares”, (Medina, 2016).

Todos los enlaces que se encuentran en los ácidos grasos saturados son covalentes entre los átomos de carbono que son de enlaces simples, esto hace que sea lineales la cadena hidrocarbonada, estos ácidos son de origen sólido y de temperatura ambiente.

Los ácidos saturados cuentan con un formula general R-COOH, y también se pueden calificar en cuatro subgrupos, dependiendo de la longitud con la que cuanta la cadena, que puede ser muy larga, larga, mediana o corta.

Hoy en día existen muchas definiciones sobre los subgrupos de SFA, pero los expertos de FAO/WHO. “Reconocieron que era necesario establecer unas definiciones a nivel internacional y es por ello que recomendó las siguientes definiciones para describir los subgrupos de SFA” (FAO, 2008).

- **Los Ácidos grasos de cadena corta:** son todos aquellos que contienen de 3 a 7 átomos de carbono.

- **Los Ácidos grasos de cadena media:** son todos aquellos que tienen de 8 a 13 átomos de carbono.
- **Los Ácidos grasos de cadena larga:** son todos aquellos que contienen de 14 a 20 átomos de carbono.
- **Los Ácidos grasos de cadena muy larga:** son todos aquellos que contienen de 21 o más átomos de carbono.

Ácidos grasos insaturados

“Se encuentran los ácidos monoinsaturados, los poliinsaturados. Estos provienen en general del reino vegetal (a excepción del pescado que es muy rico en poliinsaturados) son líquidos a la temperatura ambiente, su consumo está asociada con mayores niveles de colesterol bueno”, (Medina, 2016).

Los ácidos grasos insaturados cuentan con uno o varios enlaces que son dobles en la cadena de los carbonos, la distancia entre los átomos de carbono no es la misma que tienen otros átomos, como tampoco los ángulos de enlaces, debido a esto presentan codos, pueden tener cambio de dirección, en lugares donde existan o aparecen un doble enlace entre átomos de carbono.

“Se clasifican en tres subgrupos según la longitud de su cadena. Pese a que no se ha llegado a un consenso internacional para definir los subtipos de los ácidos grasos insaturados, la Consulta de Expertos FAO/WHO recomienda las siguientes definiciones”. (FAO, 2008).

- **Los Ácidos grasos insaturados de cadena corta:** son aquellos que tienen 19 o menos átomos de carbono.
- **Los Ácidos grasos insaturados de cadena larga:** son todos aquellos que contiene de 20 a 24 átomos de carbono.
- **Los Ácidos grasos insaturados de cadena muy larga:** son todos a aquellos que cuentan con 25 o más átomos de carbono

Ácidos monoinsaturados

Los ácidos monoinsaturados se encuentran en dos átomos de carbono, que se encuentran situados en forma consecutiva, pero que están unidos en un solo átomo de hidrógeno, ya que pertenece a los insaturados, tienen la capacidad de fijar más hidrógeno.

Indican los nutricionistas que el consumo de esta grasa monoinsaturadas tiene que representar el 13 y 23% de las grasas que son consumidas.

El aceite de oliva contiene de 54 a 80% de ácido oleico, por esto es el mejor para el consumo humano, por dos motivos fundamentales:

1. El más resistente a la descomposición química, ya que provocan altas temperaturas.
2. No es absorbido totalmente por los alimentos que se llegan a freír en el, aumentando la buena digestión, y disminuyendo su valor calórico final. (Medina, 2016).

Ácidos poliinsaturados

Los ácidos poliinsaturados tienen la capacidad de poseer dos o más pares de átomos de carbonos de origen insaturados, y tiene el beneficio de poder disminuir el colesterol total, como también la concentración del colesterol malo.

Es importante mencionar que estas grasas sufren de un inconveniente de que se pueden oxidar con gran facilidad, ya que intervienen en procesos de formación radicales libres, que son muy perjudiciales para la salud.

El organismo tiene la capacidad de poder inactivar estos procesos a través de sustancias antioxidantes, pero no se puede llegar al extremo de abusar con las grasas poliinsaturadas, por tal motivo lo más recomendable es consumir del 3 al 7% de este tipo de grasa, sin sobrepasar el 10%, porque afectaría a la salud.

“El ácido graso poliinsaturado más frecuente es el ácido linoleico presente en altas proporciones en el aceite de girasol y uva”, (Medina, 2016).

Ácidos grasos omega 3 y omega 6

Las grasas son de gran utilidad para nuestro organismo y por lo tanto es útil que estén presentes en el cuerpo en cantidades apropiadas. Entre los ácidos grasos existe una variedad de sustancias que se conocen como omega 3 y 6. Los ácidos grasos omega se encuentran dentro de los denominados como esenciales debido a que el propio cuerpo humano no los produce. Esto hace que deban ser ingeridos a través de una alimentación adecuada. Investigaciones científicas han demostrado que, en zonas geográficas donde se consumen estos ácidos en forma cotidiana, los niveles de aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares son apenas existentes. El análisis de la alimentación de esas zonas llevó a la conclusión de que los elementos en común de esas dietas regionales, los ácidos grasos Omega 3 y 6, son los responsables de tales virtudes, (Medina, 2016)

Entre otras funciones del Omega-3 se destaca su intervención en la formación de las membranas de las células; conforman la mayor parte de los tejidos cerebrales y las células nerviosas son ricas en ácidos grasos Omega-3; y se convierten en prostaglandinas, sustancias con un papel importante en la regulación de los sistemas: cardiovascular, inmunológico, digestivo, reproductivo y que tienen efectos antiinflamatorios, (Medina, 2016)

Los ácidos grasos Omega 3 y Omega 6 son grasas poliinsaturadas que aparecen como aceites. Linolénicos omega 3, linoléicos y araquidónicos omega 6. Los ácidos grasos Omega 3 y 6 se encuentran en altas concentraciones en los pescados, y en menor proporción en semillas y aceites vegetales como lino, soja, zapallo y nueces, (Medina, 2016).

2.3.8. Composición de las grasas

Ácidos grasos CIS

“Poseen los átomos de hidrógeno al mismo lado de la cadena formando una estructura doblada”, (Medina, 2016).

Estos ácidos son calificados como la grasa buena, en el cual podemos encontrar el omega 6 y 3, que tienen la capacidad de eliminar o disminuir el colesterol malo, esto es porque contiene propiedades que son antiinflamatorias, el cual permite disminuir las enfermedades coronarias.

Ácidos grasos TRANS

“Los átomos de hidrógeno están ubicados en lados opuestos de la cadena formando una estructura derecha, fácilmente acumulable una sobre otra fuertemente, se solidifican formando cristales duros con alto punto de fusión, con propiedades físicas, químicas cercanas a los ácidos grasos saturados” (Medina, 2016).

Los Ácidos grasos TRANS, son de origen insaturados por lo tanto cuentan con dos átomos de hidrógeno que se encuentran uno a cada lado del doble enlace,

Esto hace que la molécula sea rectilíneo, se pueden encontrar comúnmente en los alimentos industrializados, que son sometidos a la hidrogenación, con la intención de solidificarlos, como lo es la margarina

Tabla 7: Ácidos grasos más comunes.

NOMBRE	FORMULA	PARES INSATURADOS	PM	FUENTES
Butírico	$C_4H_8O_2$		88	Mantequilla
Palmítico	$C_{12}H_{24}O_2$		256	Ac. Palma
Láurico	$C_{16}H_{32}O_2$		200	Ac. coco
Oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	09:10	282	Ac. Vegetales y animales
Linoléico	$C_{18}H_{32}O_2$	9:10, 12:13	280	Ac. Vegetales (maíz, maní, soya)
Linolénico	$C_{18}H_{30}O_2$	9:10, 12:13, 15:16	278	
Araquidónico	$C_{20}H_{30}O_2$	5:6, 8:9	312,5	Grasas animales y vegetales

Fuente: Medina M., (2016)

2.4 Métodos de extracción de aceites y grasas.

El método por prensado se utiliza la fuerza mecánica para romper las estructuras de la muestra liberando la materia grasa contenida en ella. Este método puede manejar tamaños variables de muestra y en la mayoría de los casos como pre-tratamientos de la extracción con solvente (Rojas & Burbano, 2012).

Prensa hidráulica

Se basan en el conocido principio de Pascal, alimentándose un pistón de gran diámetro con fluido a alta presión y bajo caudal consiguiendo altísimas fuerzas resultantes. La entrega de energía es controlada en cada momento tanto en fuerza como en velocidad se mantiene el control constante del proceso (Barba Munoz & Reyes Teran, 2011).

En las tecnologías del prensado de aceites vegetales de Farment, para semillas oleaginosas secas se usan exclusivamente prensas continuas de tornillo sinfín en diversos conjuntos y diferentes preparaciones preliminares de las semillas.

Para una carga determinada de las semillas, acondicionadas y listas para el prensado, el rendimiento en aceite depende de la velocidad a que se aplica la presión, el máximo alcanza el tiempo de drenaje del aceite, a la presión total y temperatura o viscosidad del aceite. (Bailey, 1961); (Óbrien, 2009).

Prensado discontinuo

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

Este mismo autor menciona que el rendimiento en la obtención de aceite por prensado mecánico depende de una serie de factores relacionados con la afinidad del aceite por los sólidos de las semillas. Entre estos factores se encuentra: el grado de humedad, método de cocción y composición química de la semilla; además las semillas alteradas retienen, generalmente, más aceite que las sanas. (Bailey, 1984); (Óbrien, 2009) menciona que generalmente la torta generada en este proceso tiene un contenido de aceite residual desde 15 hasta 18%.

Prensado Continúo.

Se utiliza comúnmente para extraer el aceite de la materia oleaginosa es el “expeller”, el cual es un dispositivo mecánico que utiliza un tornillo horizontal con un diámetro del cuerpo creciente cuyo objetivo es aumentar la presión sobre la materia prima a medida que avanza a través del tornillo. El cilindro alrededor del tornillo está perforado de tal manera que permite incrementar la presión interna para que en primera instancia desaloje el aire y posteriormente el aceite a través del cilindro, (Shahidi, 2005).

(Óbrien, 2009), reporta que la torta proveniente del expeller presenta un contenido de aceite residual entre 3 y 10%. Esta torta es normalmente transformada en harina y expandida como fuente proteica.

Extracción Asistida con Ultrasonido

La extracción por ultrasonido mejora la transferencia de masa del sólido al solvente, utilizando como transporte la difusión por la pared celular y la convección en los poros del sólido. Las partículas sólidas y líquidas se encuentran en constante vibración y aceleración, dando como resultado el paso rápido del soluto de la fase sólida hacia el solvente (Fuentes, 2013).

Extracción con solventes.

Este método de extracción con solventes es el más eficiente. Las micelas del solvente que se encuentran en la superficie del material se difunden a través de la pared celular hacia los cuerpos oleosos localizados dentro de las

células, mientras las micelas continúan entrando y solubilizando al aceite, la presión interna se acumula y la micela concentrada se difunde de regreso fuera de la célula. Este proceso continúa hasta que la concentración de las micelas dentro de las células del material oleaginoso se equilibre con la concentración de la micela fuera de éste, (Shahidi, 2005)

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

Extracción por Soxhlet con solventes.

Es un método que trabaja con un solvente inicialmente en estado líquido y a presión atmosférica, al elevar su temperatura y superando el punto de ebullición se convierte en vapor. Los componentes se extraen por diferencia de concentraciones (Fuentes, 2013).

2.5 Aplicación de enzimas industriales en la extracción de aceites.

Definición de enzimas

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

El centro activo se compone del centro catalítico y del centro de enlace (separados espacialmente). El primero es el responsable de la naturaleza química de la reacción catalizada (especificidad de acción), el segundo de la afinidad por el sustrato (especificidad de sustrato). Mientras que el centro

catalítico puede ser relativamente inespecífico, la especificidad del centro de enlace es extremadamente alta, de tal forma que solo unas pocas sustancias de naturaleza química muy parecida pueden ser empleadas como sustrato (Nelson & Cox, 2005).

2.5.1 Factores que influyen en la actividad enzimática

a) Efecto del pH

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

b) Efecto de la temperatura.

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

Aunque las reacciones catalizadas por los enzimas parecen, con frecuencia, poseer una temperatura óptima, el pico que se observa al representar la actividad catalítica frente a la temperatura se produce porque las enzimas, al ser proteínas, se desnaturalizan por acción del calor y se inactivan cuando la elevación de la temperatura sobrepasa un cierto punto. La aparente temperatura “óptima” es, por tanto, la resultante

de dos procesos: 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura, y 2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima al sobrepasar una temperatura crítica (Nelson & Cox, 2005)

c) Efecto de la concentración/Actividad de agua.

Normalmente las actividades de las enzimas tienen lugar in vitro en medios acuosos, aunque las reacciones enzimáticas in vivo pueden ocurrir no sólo en el citoplasma, sino también en las membranas celulares, en los depósitos de lípidos y en el sistema de transporte electrónico, donde se sabe que la transferencia de electrones ocurre en una matriz lipídica (Fennema, 2000), menciona que existen diversos métodos para evaluar el efecto de la actividad de agua sobre las enzimas. Uno de ellos consiste en desecar cuidadosamente una muestra biológica no calentada (o sistema modelo) que contenga actividades enzimáticas, equilibrarla a varias actividades de agua y medir la actividad enzimática. De esta manera se ha observado que por debajo de una actividad de agua de 0,35 (menos de uno por ciento del agua total) no hay actividad de la fosfolipasa sobre la lecitina. Otro caso observado es el de la β -amilasa, la cual no tiene actividad sobre el almidón hasta alrededor de una actividad de agua de 0,8 (aproximadamente un dos por ciento del agua total); su actividad aumenta unas quince veces hasta 0,95 (aproximadamente doce por ciento del agua total). A partir de estos ejemplos, se pudo concluir que el contenido total de agua tiene que ser menos que 1-2 % para evitar la actividad enzimática.

d) Efecto de la presencia de inhibidores

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

Ventajas del uso industrial de las enzimas.

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

El empleo de enzimas tiene muchas ventajas, se muestra a continuación:

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

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

2.6 Enzimas utilizadas en la degradación de paredes celulares para la obtención de aceites vegetales:

Sineiro, et al., (1998) Mencionan que la pared celular vegetal está compuesta por dos membranas: la primera compuesta de una matriz amorfa de pectina, hemicelulosa y proteínas con microfibrillas de celulosa; y la segunda prevalecen la celulosa y hemicelulosa (Reed, 1975), señala que las enzimas utilizadas para degradar paredes celulares son del tipo carbohidrasas, las cuales generalmente son específicas para un enlace glucosídico en particular, (Sineiro, et al., 1998), recomiendan emplear celulasas y hemicelulasas. Las pectinasas son también efectivas, sobre todo en vegetales y frutas ya que las pectinas son componentes estructurales de estos.

a) Pectinasas

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

Según (Bruchman, 1980), las pectinasas se pueden clasificar en:

➤ **Pectinestearasas**

La enzima solo separa grupos metilo que se encuentren en la proximidad de grupos carboxilo libres. La pectina totalmente esterificada con metanol es atacada lentamente. La hidrólisis empieza por un extremo y va progresando en la dirección de formación de la cadena. La pectinestearasa es una enzima muy específica que ataca casi únicamente a los grupos metilos de las sustancias pépticas, (Bruchman, 1980).

➤ **Poligalacturonasas**

Las enzimas de este tipo que hidrolizan en general enlaces α -1,4 D-galacturónidos en los pectatos y otros galacturónidos. Se pueden

distinguir varios tipos de actividades dependiendo de si las cadenas de pectina son descompuestas cuando están metiladas o cuando no lo están, y si el ataque empieza por cualquier punto no seleccionado (endoenzimas) o por el final de la cadena (exoenzimas). (Bruchman, 1980).

➤ **Pectatoliasas**

Esta enzima elimina restos Δ -4,5-D-galacturónicos de la pectina, ejerciendo así una despolimerización no hidrolítica, (Bruchman, 1980).

b) Celulasas

Las celulasas hidrolizan los enlaces β -1,4-glucano de las cadenas de celulosa y de sus productos de degradación dando como molécula final a la glucosa, (Bruchman, 1980). La “celulasa” no es ninguna enzima aislada sino un sistema enzimático que posee por lo menos tres actividades: endoglucanasa, celobiohidrolasa, exoglucosidasa y β -glucosidasas (Fennema, 2000). La mejor fuente de obtención de preparados técnicos capaces de atacar a la celulosa cristalina es el hongo *Trichoderma viride*. También los preparados obtenidos a partir del *Aspergillus niger* tienen cierta importancia (Bruchman, 1980).

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

c) Hemicelulasas

(Fennema, 2000), menciona que existen varias endo- y exo- pentanasas (hidrolasas), debido a la gran complejidad de las hemicelulosas. Las enzimas de tipo endo- son de dos tipos: las arabanasas que hidrolizan los enlaces glucosídicos 1,4- α -D-arabinopiranosilo en el esqueleto lineal de los arabanos y las xilanasas que hidrolizan los enlaces glicosídicos 1,4- β -D-xilanopiranosilo en xilanos y arabinoxilanos. Las enzimas del tipo exo- de un

primer grupo actúan en el extremo no reductor de los arabanos (las arabinosidasas), xilanos (xilosidasas) y las arabinoxilanos (xilanosidasas).

Algunos hongos producen cantidades considerables de pentosanasas. Se cree que las pentosanasas están primariamente localizadas en el salvado, pero se desconoce dónde están localizadas las enzimas que son sintetizadas de nuevo durante la germinación (Fennema, 2000).

2.6.1. Cinética enzimática

a) Fundamentos termodinámicos.

Las reacciones catalizadas por enzimas, así como las reacciones químicas, se rigen por el flujo de energía que se presenta a medida que los reactantes se convierten en productos. La velocidad con la que se lleva a cabo, o si solo una reacción se lleva o no a cabo, son funciones de aspectos energéticos.

Existen dos formas de acelerar la velocidad de una reacción química. Una de ellas es elevar la temperatura, la otra aumentar el número de moléculas capaces de alcanzar un estado de transmisión que les haga poseer un estado activado con suficiente energía para la transición de reactante a producto. La rapidez de una reacción química también puede verse incrementado para la adición de un catalizador, este se combina con los reactantes en forma transitoria y se produce un estado de transmisión de menor energía de activación que el correspondiente a la reacción no catalizada. Cuando se forman los productos de la reacción, se genera para el catalizador, (Izquierdo Vega , 2012).

b) Cinética de las reacciones catalizadas

La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas presentan una dependencia característica de la concentración del sustrato. A bajas concentraciones de sustrato. La velocidad inicial es proporcional a la concentración de la enzima sola. Esta depende de la rapidez en la concentración del sustrato, (Izquierdo Vega , 2012).

c) El tratado enzimático simple se basa en tres principios fundamentales:

Que el sustrato S forma un complejo intermediarios enzima sustrato ES con la enzima E.

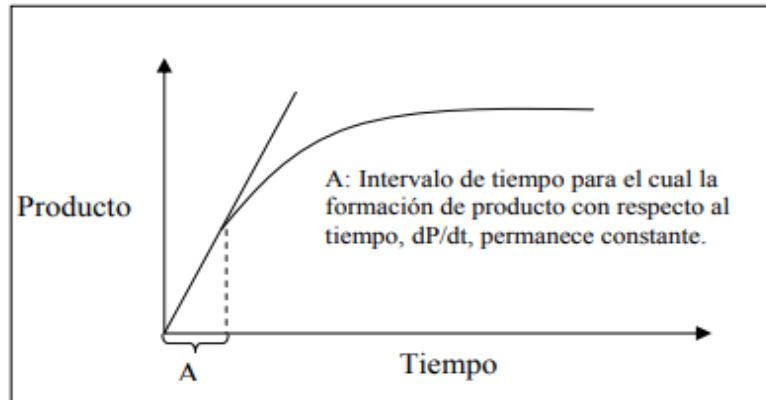


Figura 7: Velocidad de reacción al tiempo.

Fuente: Izquierdo V., (2012)

En la Figura 7 se observa la velocidad de la reacción al tiempo t (es decir, la velocidad de la desaparición del sustrato, $-ds/dt$, o la velocidad de la formación del producto, dp/dt se presenta con la pendiente de la curva P o $S = f(t)$. estas pendientes varían con el tiempo durante el curso de la reacción, debido a la desaparición del sustrato, las mediciones cinéticas se basan generalmente en la parte lineal de la curva, es decir, la velocidad inicial o la rapidez inicial de la reacción. En esta región, la concentración del producto es extremadamente pequeña y, en consecuencia, la descomposición de producto a sustrato es insignificante (determinado por la constante rapidez k_2).

La determinación de los cambios de la reacción como función de la concentración de las enzimas no es lineal sino hiperbólica para una concentración dada de sustrato (Figura 8). El sustrato está en forma de complejo enzima-sustrato a altas concentraciones de enzimas. Como consecuencia de esto, la velocidad inicial, la velocidad inicial de la reacción como función de la concentración de las enzimas permanece constante en estas condiciones de la reacción.

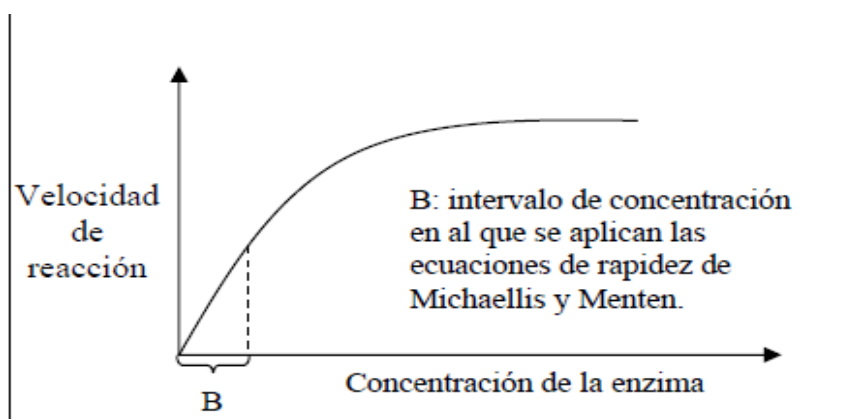


Figura 8: Velocidad de la reacción en función de la concentración de las enzimas.

Fuente: Izquierdo V., (2012)

2.7 Definición de términos

Índice de calidad de la manteca

1. Índice de acidez (mg de KOH/g)

Presencia natural de la acidez libre en las grasas, es decir la suma de los ácidos grasos no combinados, resultado de la hidrólisis o descomposición lipolítica de algunos triglicéridos, (Medina, 2016).

También consiste en cuantificar a los ácidos grasos libres presentes en la muestra, los cuales se forman por hidrólisis de los triacilglicéridos. Este valor se expresa como el número gramos de ácidos grasos libres contenidos en cien gramos de grasa, (Peña, 2008).

2. Índice de saponificación (mg de KOH/g)

Es una medida de los ácidos grasos libres y combinados que existen en la grasa y es inversamente proporcional a la masa molecular media de los ácidos grasos: cuando menor es la masa molecular media de los ácidos grasos presentes (es decir, cuanto mayor sea la proporción de ácidos grasos de cadena corta), Tanto mayor será el índice de saponificación. El IS se utiliza para comprobar la pureza de las grasas. El IS representa la

cantidad de hidróxido de potasio necesario para la saponificación de 1 g de muestra (Peña, 2008).

3. Índice de Yodo (g I/100g)

Se define como la cantidad de gramos de yodo que resulta ligada por cada 100 gramos de grasa. El índice de yodo es una medida del grado de instauración de los componentes de una grasa; será tanto mayor cuanto mayor sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, por esto se utiliza para comprobar la pureza e identidad de las grasas. Así, el índice de yodo del ácido oléico es 90, del ácido linoléico es 181 y del ácido linolénico es 274, (Jimenez, et al., 2010).

4. Índice de peróxido (meq/g)

Indica el estado de oxidación inicial del aceite en miliequivalentes de oxígeno activo por gramo de grasa, permitiendo detectar la oxidación antes de que se note organolépticamente, por medio de olores característicos de la rancidez. A mayor índice de peróxido el aceite se oxidara más fácilmente (Jimenez, et al., 2010).

Las grasas sufren oxidación espontánea por el oxígeno del aire, por acción enzimática o de microorganismo, la luz el calor y ciertas impurezas tales como el agua y los metales. La fase inicial de la oxidación de la grasa implica la adición del oxígeno al átomo de carbono del doble enlace con formación de un hidroperóxido que es el producto de la descomposición primaria de la oxidación de las grasas, (Medina, 2016).

5. Humedad

La mayoría de los productos naturales probablemente presenten algo de agua, y los aceites no son la excepción. Pueden absorber humedad durante el mismo almacenamiento, por lo tanto, es casi imposible mantener un producto seco. La solubilidad en el agua de los aceites y grasas oscila entre el 0,05 – 0,30%. Los análisis de humedad son importantes en el comercio, (Lawson, 1999).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo de estudio

La investigación es cuantitativa y experimental

3.2. Diseño de estudio

Cuantitativo, correlacional, predictivo y experimental, Utilizándose Diseños Experimentales de Superficie de Respuesta, Diseño Compuesto Central y Diseño I-Óptimo, desarrollando en la plataforma de Design Expert 11.1.0. Tal como se presenta en el Ítem 3.5.1.

3.3. Población y muestra

Población

Sr. Mario Alagón Huamaní cuenta con 8 hectáreas de producción de Copoazú, con un total de 340 plantones, cada plantón produce 20 frutos; por tanto se produce 6 800 frutos, con un peso total aproximado de 10 200 Kg de fruto.

En promedio cada fruto tiene de 30 a 50 semillas, con un peso promedio de 2,6 a 3,0 gramos; por tanto la población total de semillas fue 204 000 a 340 000 unidades, con un peso promedio de 484,2 a 1 020Kg de semilla fresca.

Muestra

Para un total de 32 experimentos según las matrices de diseño indicando en la Tabla 11 y Tabla 14, se utilizó un total de 44 Kg de semilla fresca.

3.4. Métodos y técnicas

3.4.1. Materiales, equipos y reactivos

a) Materia prima e insumos

Los frutos de Copoazú fueron colectados del fundo Pachac Illary km 63,5 provincia de Tambopata Distrito de Inambari, carretera Cusco del Departamento de Madre de Dios, ubicado en 19L 0426915; UTM

8580927 a una latitud de 234 m.s.n.m a una temperatura máxima de 35 °C y temperatura mínima de 24°C con una humedad relativa de 83%.

Celulasa extraída a partir de *Aspergillus niger*. La actividad enzimática se indica por el proveedor Sigma Aldrich, fue empleándose a una temperatura de 37°C y pH 6 durante su aplicación.

Hemicelulasa purificada a partir de *Aspergillus niger*, cuya actividad β -galactasa se considera lo indicado por el proveedor Sigma Aldrich, empleándose una temperatura de 37°C y pH 6 durante su aplicación.

b) Lugar de ejecución

La investigación se llevó acabo en los siguientes laboratorios de la carrera profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios: Laboratorio de procesos Agroindustriales, Laboratorio de biología, laboratorio de química, laboratorio de investigación Ingeniería Agroindustrial, laboratorio ambiental regional. Así como los laboratorios de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC) laboratorio de cromatografía y la Universidad Nacional del Altiplano (UNA) laboratorio de bromatología de Ingeniería Agroindustrial, respectivamente.

c) Materiales de Laboratorio

- Agua destilada
- Bagueta
- Bolsas de alta densidad grado alimentario (polipropileno cap. 1kg; densidad 1,5 μ m).
- Campanas desecadoras de vidrio al vacío (gel sílice)
- Cucharilla de metal.
- Cuchillo de acero inoxidable
- Espátula. Marca tramontina
- Fiola 250ml \pm 0,2% Germany
- Frascos de vidrio acaramelados de 25mL
- Frascos de vidrio de 450mL
- Gradillas de plástico

- Indumentarias (Mandil, Mascarilla , guantes y botas)
- Materiales de acondicionamiento
- Matraz Erlenmeyer 100, 150 y 250 mL \pm 0,5%, Marca Germany
- Micropipetas de 10-50 μ l marca Kyntel, rango variable (MT562105BD)
- Micropipeta de 200-1000 μ l marca Kyntel, rango variable (MT562200NR)
- Mortero
- Papel filtro whatman # 42
- Peras de decantación
- Picetas
- Pipetas graduadas 10 y 20 mL \pm 0,1% marca Germany
- Pirex 30x20 cm
- Placas Petry, marca Germany
- Probetas graduadas 50 \pm 0,5% y 100 mL \pm 1% Germany
- Tamiz # 5, 10, 15, 20 y 25mm acero inoxidable
- Telas de algodón
- Tina capacidad 5 L
- Tubos de ensayo 10, 20 ml \pm 0,1% BOECO Germany
- Tubos de ensayo tapa rosca 20 ml \pm 0,1% Pyrex vista
- Vasos de precipitación de 50 \pm 0,1mL, 100 \pm 0,5mL y 200 \pm 1 mL marca Germany
- Viales HPLC 2ml
- Bandejas de acero inoxidable
- Mesa de trabajo de acero inoxidable

d) Equipos

- Agitador magnético, modelo MC-S, capacidad 1000 ml, potencia de calefacción 500w, velocidad 100-2100 rpm, T° máxima de trabajo 350 °C, tensión 230/50 Hz, placa calefactora circular en acero inox. De 150mm
- Baño termostático Marca Tomos, serie CDK S24, voltio 220V, temperatura 5 – 95 °C, capacidad 8L, Potencia 1600 W, Tensión 220

V, Temperatura -10°C a 80°C, Sensor PT-100, Precisión de control $\pm 0,1^\circ\text{C}$, Cuba y bandeja en acero inox. 304

- Prensa hidráulica. Marca truper (presión max. 300 bar; capacidad 100- 1200 g), temperatura manual 0-32°C, manejo manual
- Centrifuga marca Greetmed, Modelo 2615, serie GT119-100T, Velocidad máx 0-4000 rpm, tiempo 0-25 min, Capacidad 6x15mL, voltaje 220, T° ambiente
- Congeladora, marca BEKO, modelo CHA 28020, serie: HSA32520, capacidad 215/218 L, voltaje 220, T° -18 a 30 °C, color blanco con puertas reversibles
- Estufa, marca METROTEST modelo MS-H3 Germany, T° regulable desde 0-200 °C, voltaje 220, programador 24 horas, ejecutado el interior en acero inox. AISI 304
- Laptop TOSHIBA Core i5 5200U 2.2GHz (c/TB 2.7 GHz), pantalla LED 15.6" HD, 4 GB RAM / Disco Duro 500GB, DVD±RW, Teclado numérico, Windows 8.1, voltaje 220
- Molino artesanal marca corona diámetro de 15cm, Con tolva alta, Material: hierro fundido, Acabado superficial: estaño electrochapado Almohadilla: Caucho, Manija: Madera, capacidad de Peso: 3,5Kg.
- Plancha de calentamiento; Fisher scientific; serie: 208Noo35, Temperatura máxima: 540 °C, Voltaje: 230V 50/60Hz, Medidas: 5 / 10 / 3,6 (12,7 x 25,4 x 9,1 cm), Tipo de enchufe: varios, Tamaño del plato: 4,25" x 4,25" (10,8 x 10,8 cm).
- Pulpeadora marca INOXTRON, modelo DFV 27-60, capacidad 500 Kg/h potencia, suministro trifásico de 5 HP; Voltaje 220, acero inoxidable.
- Soxhlet modelo KD-7005, rango de temperatura 400 °C, capacidad de balón 250 mL, potencia 400W*6, material de construcción acero Inoxidable 304 y Acero CR recubierto con pintura electrostática, c.a. 1,2 kg, frecuencia 110 VAC 50/60 Hz.

e) INSTRUMENTOS

- Balanza analítica, marca SARTORIUS, Nro. de referencia 6971966, capacidad max. 220g, tamaño de platillo Ø 80mm, voltaje 230 V/50 Hz, rango de estabilidad 1/4-Dig., Legibilidad 0,0001 g, reproducibilidad 0,1 mg, tiempo de estabilización menor a 8 segundos, pantalla LCD, color blanco, con cubierta en vidrio de 3 ventanas, desviación linealidad, ejecutado en acero inox.
- Balanza granataria digital, PCE-BTS 15, cap. Max. 5 Kg ± 0,2, Modelo: JCS-B, pantalla LCD, sensibilidad 0,1g, tamaño del plato 235 x 342 mm, reproducibilidad 5 g, lineabilidad ±5, display digital de buen tamaño retroiluminado
- Potenciómetro, marca: HANNA, modelo HI-3220, rango: -2,0 a -14 pH, mV: +/-2000 mV, Temperatura: -20,0 a 120,0 °C (-4,0 a 248,0°F), Resolución: pH: 0,1; 0,01; 0,001 pH, mV: 0,1 mV, Temperatura: 0,1°C (0,1°F), Precisión pH: +/-0,01; +/-0,002 pH, , mV: +/-0,2 mV, Canales de Entrada 1, Sondas: HI 1131B electrodo de pH con conector BNC y HI 7662-T sonda de temperatura de acero inoxidable (incluido), Memoria de Registro 200 muestras, Conectividad con PC: USB Opto-aislada (con software HI 92000), Impedancia de Entrada 1012 Ohmios, Alimentación: 12 VCC, Dimensiones 235 x 207 x 110 mm, Peso: 1,8 kg.
- Rango de Medición (nD) 1,3000 a 1,7000, Brix 0,0 a 95,0% Resolución Índice de Refracción (nD) 0,001, Brix 0,5% Precisión de la Medición Índice de Refracción (nD) ±0,0002, Brix ±0,1%, Rango de Temperatura 5 a 50°C (Rango de temperatura regulada por medio de un baño de agua) Precisión del Termómetro ±0,2°C Temperatura Ambiente 5 a 40°C Fuente de Luz Lámpara LED (Aproximación a la longitud de onda de la línea D) Fuente de Poder AC100 a 240V, 50/60Hz Consumo de Energía 5VA Dimensiones y Peso 13x18x23cm, 2,5kg (Unidad principal) 10x11x7cm, 0,5kg (Termómetro)
- Espectrofotómetro UV visible modelo 4211/50, rango de longitud 200-1000nm , ancho de banda 4nm, exactitud de longitud de onda ±1nm,

resolución de longitud de onda ± 1 nm, rango fotométrico -0,097 a 2,5 A ; 0 a 125% T, exactitud fotométrica $\pm 0,5\%$ T, reproducibilidad fotométrica $\pm 0,3\%$ T, luz difusa 0,3% T, estabilidad $\pm 0,002$ A/h a 500nm, lámpara tungsteno, detector fotodiodo de silicio, alimentación 220V/50Hz, dimensiones 470x370x180mm, peso 12kg, compartimento de muestras 4 cubetas estándar de 10 mm paso de luz.

- Termómetro W0101, rango de medición -10 a + 100° C, exactitud $\pm 1^\circ$ C, Color de la varilla de vidrio: Franja posterior blanca, Longitud total: 300mm, Líquido termométrico: Alcohol color rojo, protegido por una funda metálica de $\varnothing 10$ mm
- Termómetro infrarrojo marca BENETECH, modelo GM320, color naranja + negro, material: plástico, pantalla 1,2 pulgadas LCD, rango de temperatura -50°C ~ 380°C (-58 ~676F), precisión $\pm 1,5^\circ$ C ($\pm 2,7$ F) o el 1,5% durante 0°C, longitud de onda de respuesta 8~14um, tiempo de reacción 500 mseg., el 95% en relación, humedad relativa 10% ~ 90% RH sin condensación, desarrollado por 2 pilas AAA, duración de la batería: láser de 12 horas, objeto relación de la distancia: 12:1
- Cromatógrafo de gases HPLC. Agilent technologies 6890N, acoplado con un espectrofotómetro de masas 5975 B MSD, Volumen inyector 1 μ l, T° 190°C, Split 100:1
- Estereoscopio, (OPTIXCAM OCS – 10.0X 10. OMP), N° inv: 892, Tubo inclinado 45°, distancia entre ojos 55 – 75 mm, Caballete Columna, con iluminación LED (0,35W luz transmitida + 1W luz reflejada), ejecutado en metal

f) Reactivos

- Ácido acético del laboratorio MERCK
- Ácido clorhídrico 0,559 N del laboratorio MERCK
- Almidón en polvo del laboratorio MERCK
- Azul de metileno del laboratorio MERCK
- Cloroformo del laboratorio MERCK
- Etanol 99,9% del laboratorio MERCK

- Fenolftaleína del laboratorio MERCK
- Éter etílico del laboratorio MERCK
- Hidróxido de potasio del laboratorio MERCK
- Hidróxido de sodio del laboratorio MERCK
- Metanol marca. Fisher scientific
- Reactivo wijs del laboratorio MERCK
- Tetracloruro de carbono del laboratorio MERCK
- Tiosulfato de sodio del laboratorio MERCK
- Yoduro de potasio del laboratorio MERCK

3.4.2. Metodología

3.4.3. Pre – tratamiento del fruto de Copoazú

- a) **Materia prima.** Los frutos de Copoazú de la variedad mamorana fueron recolectadas del fundo Pachac Illary km 63,5 provincia de Tambopata Distrito de Inambari, con un estado de madurez considerado como “maduro”, según las características mencionados por el Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – Sinchi (Hernández G & Barrera G, 2009)



Figura 9: Frutos de Copoazú (*T. grandiflorum*).

Fuente: Elaboración propia, (2018)

- b) Selección y clasificación.** Esta etapa, consistió es separar los frutos deteriorados (sobremaduros y senescentes) y/o con daños mecánicos, físicos o biológicos. El proceso se llevó a cabo manualmente, en mesas de trabajo ejecutados en acero inoxidable AISI 304.



Figura 10: Fruto y culpa de Copoazú

Fuente: Elaboración propia, (2018)

- c) Lavado y desinfección.** En esta etapa, los frutos de Copoazú se lavaron por inmersión en agua con hipoclorito de sodio 0,5 – 1,0% durante 10 minutos. Posteriormente se enjuagaron y se dejan escurrieron, eliminando las partículas extrañas adheridas en su superficie exterior.
- d) Pulpeado.** Se llevó a cabo en una pulpeadora mecánica (malla con orificios de 8mm de diámetro) de 3 HP construidos en acero inoxidable AISI 304, separándose las semillas de la pulpa. Las semillas obtenidas se colectan en recipientes de acero inoxidable AISI 304 para pasar a la siguiente etapa.



Figura 11: Pulpa y semilla de Copoazú

Fuente: Elaboración propia, (2018)

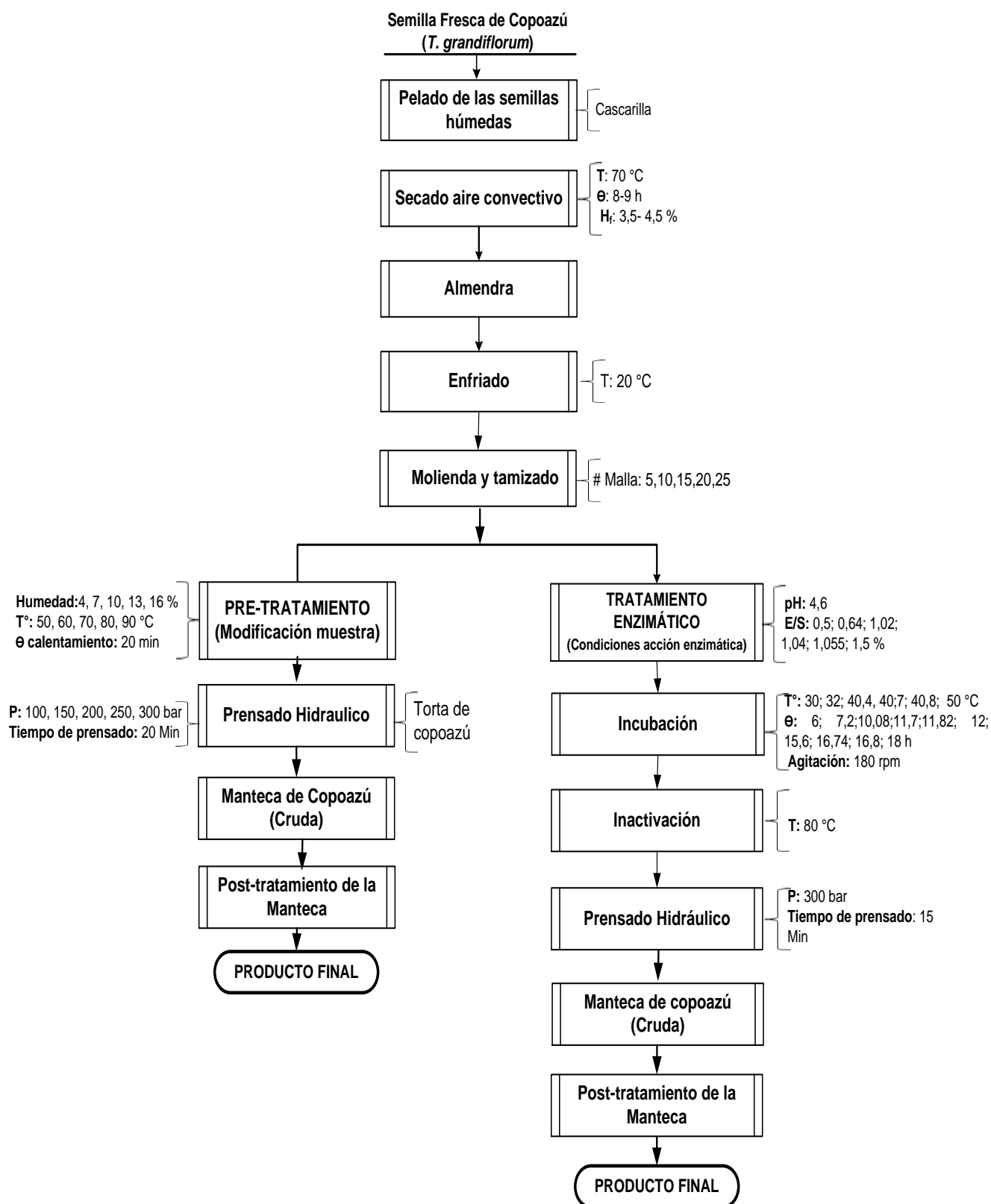


Figura 12: Flujo grama para la obtención de manteca de semillas de Copoazú pre-tratadas enzimáticamente.

Fuente: Elaboración propia, (2018)

- 1. Selección y pelado de semilla frescas de Copoazú.** Después del pulpeado del fruto de Copoazú, las semillas frescas se seleccionaron y pelaron manualmente en una mesa de acero inoxidable con la ayuda de un cuchillo realizando incisiones en la parte central de las semillas y desprendiendo la cascarrilla de las almendras.
- 2. Deshidratado de la semilla en secador de aire convectivo.** Las semillas peladas, fueron deshidratadas en una estufa con corriente de aire convectivo, a una temperatura de 70 °C por un tiempo de 8-9 horas, hasta alcanzar una humedad de 5 %.



Figura 13: Pelado de semilla de Copoazú

Fuente: Elaboración propia, (2018)

3.4.4. Caracterización morfológica de la semilla

La caracterización morfológica consistió, en la determinación de la geometría promedio de las semillas y el análisis estereoscópico de las mismas, para lo cual, se tomaron 10 unidades de almendras de la especie mamorana. Para establecer la geometría, las muestras se sometieron a mediciones métricas, de: longitud (L), diámetro (D) y espesor (E) de las semillas, con un vernier de precisión. Mientras que para el análisis estereoscópico, las muestras se sometieron a un corte transversal longitudinal con una cuchilla afilada, obteniéndose dos mitades. Para observar los glóbulos grasos, las muestras se rociaron con una solución de azul de metileno, para luego observar y

fotografiar en un estereoscopio trinocular con luz polarizada, según la recomendación realizada por (Scussel, et al., 2014).

3.4.5. Extracción de manteca por prensado hidráulico sin tratamiento enzimático de las semillas de Copoazú

Para establecer las condiciones óptimas del proceso de prensado hidráulico de muestra con tratamiento enzimático previo, se determinaron las condiciones óptimas con muestras sin tratamiento enzimático, considerando las siguientes variables independientes o factores de diseño: Humedad de la Muestra (Z_1); Temperatura de calentamiento (Z_2); Granulometría (Z_3); Presión de prensado (Z_4) tal como se aprecia en la Tabla 9. Para optimizar se utilizó el Diseño de Superficie Respuesta, Diseño Compuesto Central (DCC), cuya matriz de diseño se muestra en la Tabla 11. El procedimiento seguido en esta etapa, fue:

1. **Molienda y tamizado.** Operación unitaria realizada con la finalidad de facilitar la transferencia de la grasa contenida en los intersticios vasculares de la semilla hacia el exterior. La reducción de tamaño de las semillas, se efectuaron en un molino de disco manual y las partículas obtenidas temporalmente se almacenaron en bolsas de polietileno con cierre hermético. Según la matriz de diseño, Tabla 11, se requirió muestras con # mallas: 5; 10; 15; 20 y 25 en un total de 23 Kg, las que se obtuvieron tamizando las muestras particuladas en un juego de mallas de la serie Tyler,



Figura 14: Molienda de semilla de Copoazú

Fuente: Elaboración propia, (2018)

- 2. Adecuación de la humedad de las muestras tamizadas:** Las humedades de las muestras se ajustaron según el procedimiento descrito por (Ogunsina, et al., 2014), quienes evalúan el efecto de los tratamientos previos sobre la expresión mecánica de aceite de Ogunsina, et al., (2014). Se ajustaron las humedades a valores de: 4, 7, 10, 13, 16 %, agregando agua destilada en relación de muestra/agua, según la siguiente Ecuación:

$$MC_{db} = \frac{MC_{wb}}{100 - MC_{wb}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$M_m = M_{C_{db}} \times M_d \quad (3.2)$$

Dónde:

MC_{db} , Contenido de humedad en base seca,

MC_{wb} , Contenido de humedad en base húmedo,

M_d , Masa de la materia seca,

M_w , Masa de agua a ser añadida.

El proceso de humectación fue refrigerado por un periodo de 4 °C durante 3 días. Las muestras se envasan en bolsas polietilenos de alta densidad selladas para su homogenización y distribución de agua a lo largo de las muestras según (Nader, et al., 2016)

- 3. Calentamiento de la muestra antes de prensado hidráulico:** Las muestras con la humedad y granulometría establecidas en las etapas anteriores, se calentaron a las temperaturas indicadas en la matriz de diseño, Tabla 11, en una estufa con aire convectivo y controlado por un controlador PID, fijándose el set-point de la temperatura pre-establecida.

El tiempo de calentamiento en cada caso fue de 20 min. Para corroborar la temperatura de las muestras se utilizaron un sensor de temperatura infrarrojo.

- 4. Prensado hidráulico:** Las muestras acondicionadas según la matriz de diseño de la Tabla 11, se trasvasan en el cilindro de extracción para luego proceder a extraer la grasa por prensado hidráulico, utilizando muestras

c.a. 1200 g de muestra/batch, y sometándose a presiones 100, 150, 200, 250, 300 bar. Estas presiones de prensado, en cada caso se mantuvieron constantes por un lapso de 20 minutos. De esta operación, se obtienen por un lado la manteca de la semilla de Copoazú y por el otro la torta retenida en el cilindro, que posteriormente se sometieron a análisis de contenido de grasa para establecer la eficiencia de extracción de los distintos tratamientos.



Figura 15: Prensado de semillas de Copoazú

Fuente: Elaboración propia, (2018)

5. **Post-tratamiento de la manteca obtenida.** La manteca extraída, inicialmente se filtra, se pesó y midió el volumen obtenido, seguidamente fueron trasvasados en frascos de 400 ml. Se toman muestras de 25 mL para análisis de las propiedades funcionales correspondientes según la matriz de respuestas, Tabla 11, y refrigerados a temperatura de 5 °C.



Figura 16: Manteca cruda de Copoazú (A), análisis de índice de calidad de la manteca (B)

Fuente: Elaboración propia, (2018)

3.4.6. Pre-tratamiento enzimático y extracción de manteca por prensado hidráulico

Con el objetivo de establecer las condiciones operativas óptimas de pre-tratamiento enzimático de la semilla de *T. grandiflorum* con la variación de los índices de calidad, y el rendimiento en manteca cruda extraídos por prensado hidráulico. Previamente se han establecido las condiciones óptimas de prensado hidráulico, esto es: humedad muestra, temperatura de calentamiento, granulometría y presión de prensado, seguido el procedimiento del ítem 3.

El pre-tratamiento enzimático se sigue según la matriz de diseño de la Tabla 16.

1. **Tratamiento enzimático de las semillas particuladas:** En esta operación se utilizó una combinación de dos enzimas (Celulasa - hemicelulasa) en relación de (1:1). Las enzimas y sus condiciones de hidrólisis se basaron a las indicaciones específicas dadas por el proveedor Sigma Aldrich y los experimentos de hidrólisis pre-establecidos.



Figura 17: Equipo de incubación

Fuente: Elaboración propia, (2018)

2. **Incubación:** En este proceso se realizó en un reactor tipo tanque con agitación de velocidad media para activar las enzimas a diferentes temperaturas (30; 32; 40,4; 40,7; 40,8; 50 °C) a un tiempo de (6; 7,2; 10,08; 11,7; 11,82; 12; 15,36; 16,74; 16,8 y 18 horas) se trabajó con

100g de muestra y 100ml de solución buffer a una velocidad de agitación lineal de 180 revoluciones por minuto (constante).

3. **Inactivación enzimática.** Una vez que el tratamiento enzimático concluyó, se procedió a inactivar las enzimas mediante la aplicación de aire convectivo 80°C (estufa) hasta una humedad final de 5%.
4. **Prensado hidráulico:** Las muestras acondicionadas se colocaron en una tela blanca con una cantidad c.a. 100 g de muestra, a una presión de 300 bar por un tiempo constante de 15 min. Obteniendo manteca y torta de Copoazú.

Las muestras pre-tratadas enzimáticamente, se sometieron a prensado hidráulico a las condiciones óptimas establecidas en el ítem 4.



Figura 18: Prensado de semilla de Copoazú

Fuente: Elaboración propia, (2018)

3.4.7. Métodos para análisis físico-químico de la manteca

Para los análisis físico químicos de la manteca cruda de semilla de *T. grandiflorum*, fue realizado en el laboratorio de bromatología de la Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno. Los análisis y sus respectivas normas se Muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Análisis Físico Químico de la manteca de semilla de Copoazú y sus respectivas normas

ANALISIS	MÉTODO
Índice de Acidez	Método AOAC – 1998, 940.28
Índice de Peróxidos	Método AOAC – 1998, 965.33
Índice de Yodo	Método AOAC – 1998, 993.20
Índice de Saponificable	Método AOAC – 1998, 920.160

Fuente: Laboratorio de bromatología de UNA-Puno, (2018).

3.4.8. Extracción de grasa de semilla de Copoazú por soxhlet

Con el objetivo de comparar el rendimiento y la calidad de la manteca obtenida, una muestra testigo se sometió a la extracción por el método soxhlet (Jensen, 2007); (Luque de Castro & Priego Capote, 2010) de la muestra sin tratamiento. Los resultados obtenidos son considerados para el cálculo del rendimiento y eficiencia de extracción por prensado hidráulico. El procedimiento seguido fue:

- **Acondicionamiento de la muestra:** Triturar la semilla descascarada en un mortero y luego deshidratar en una estufa a una temperatura de c.a 105 °C, hasta peso constante;
- Lavar y secar el equipo soxhlet en una estufa a 70 °C, y enfriar en una campana de desecación, por un lapso de tiempo hasta que la temperatura sea la ambiental, c.a. 27 °C;
- En una balanza analítica, pesar balón de destilación vacío (m_1);
- Pesar la muestra seca en una balanza analítica (M); envolver la muestra en papel filtro y registrar los pesos obtenidos. Posteriormente poner la muestra a la cámara de extracción del soxhlet;
- Trasvasar solvente (éter etílico) al balón de destilación;
- Ensamblar las partes del equipo Soxhlet (balón, extractor Soxhlet, adaptador y refrigerante);

- Conectar el sistema de refrigeración al refrigerante asegurándose una circulación constante de agua fría. Por efecto de calentamiento del solvente, la misma asciende al condensador y el condensado por efecto de la gravedad percola en la cámara de extracción del soxhlet, extrayendo la grasa contenida, siendo un proceso discontinuo y cíclico, para lo cual se deja este ciclo por el lapso de 3 a 4 horas;
- Concluido el tiempo de proceso, se retira el balón conteniendo solvente y extracto etéreo, para evaporar el solvente remanente en m_2 una estufa a temperatura de c.a. 50 °C hasta peso constante.
- En una balanza analítica, pesar el balón con grasa extraída y registrar los datos, (m_2);

El contenido de grasa en la semilla sin tratamiento, se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{Grasa}(\%) = \frac{m_2 - m_1}{M} \times 100 \quad (3.3)$$

3.4.9. Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases (CG-MS)

Para el análisis de cromatografía de ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo a gases marca Agilent, modelo 6890N, equipado a un espectrómetro de masas Agilent 5975B. Los compuestos fueron separados en columna DB – 23, de 60m, con diámetro interno de 0,250 mm y espesor de la película 0,15 μm . La programación de la temperatura de la columna fue iniciada en 50°C por 2 min, calentada a 5°C/min hasta 230°C y mantenida en isoterma durante 35 minutos. La temperatura inicial utilizada en el inyector fue de 225°C. El gas de arrastre fue Helio con velocidad de 0,8ml/min Las muestras fueron inyectadas en volumen de 0,2 μL , Los ácidos grasos fueron identificados por la comparación de los tiempos de retención y la cuantificación hecha por normalización de área (%). la identificación se basó en la comparación de las señales de espectro de masas de cada componente con los datos compilados en la librería FAME23 y NISTO1 a.L. (Wiley).

3.5. Tratamiento de datos

Para establecer la relación entre las condiciones de pre-tratamiento enzimático de la semilla de *T. grandiflorum* en la variación de los índices de calidad, y el rendimiento en manteca cruda extraídos por prensado hidráulico, se realizaron dos grupos de experimentos diseñados, primero para establecer las condiciones óptimas de prensado y luego las condiciones de pre-tratamiento enzimático, utilizándose los diseños de superficie respuesta, tipos: Diseño Compuesto Central Reducido y Diseño I-óptimo respectivamente, desarrollados en el entorno del software Design Expert versión 11.1.1

3.5.1. Diseño experimental para la optimización del proceso de extracción de manteca de Copoazú por prensado hidráulico

El objetivo de esta etapa fue, establecer las condiciones operativas óptimas a las cuales realizar el prensado hidráulico de la semilla de *T. grandiflorum*, estableciéndose como variables independientes o factores manipuladas la humedad de la muestra, la temperatura de calentamiento, granulometría de la muestra y presión de prensado, evaluando el rendimiento, eficiencia y los índices de calidad de la manteca extraída.

Tabla 9: Matriz de factores y niveles (DesignExpert 11.1.0.1)

Nombre	Unidad	Mínimo (- 1)	Media (0)	Máximo (+1)	Dev. std.
Z ₁	% b.s	4,00	10,00	16,00	2,83
Z ₂	°C	50,00	70,00	90,00	9,43
Z ₃	# malla	5,00	15,00	25,00	4,71
Z ₄	Bar	100,00	200,00	300,00	47,14

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Dónde:

Z₁= Humedad de la Muestra

Z₂= Temperatura de calentamiento

Z₃= Granulometría

Z₄= Presión de prensado

Tabla 10: Matriz de respuestas para el estudio de extracción de manteca de semilla de Copoazú

	Nombre	Unidades	Mínimo	Máximo	Media	Modelo
Y_1	Indice de acidez	de mg KOH/g	1,244	2,598	1,64	CR
Y_2	Acidos grasos libres	% Oleico Ac.	0,625	1,305	0,83	CR
Y_3	Indice de saponificación	de mg KOH/g	64,986	109,106	91,24	C
Y_4	Indice de yodo	g I ₂ /100g	24.662	79,312	51,59	CR
Y_5	Indice de peróxidos	de mEq O ₂ /Kg	9,210	20,412	12,66	CcoR
Y_6	Rendimiento Manteca obtenida	g/100 g	14,21	36,110	28,25	C
Y_7	Eficiencia prensado	de %	23,357	59,416	46,46	C

* CR, Cuadrático reducido, C, Cuadrático, CcoR, Cúbico Reducido.

Fuente: Elaboración propia, (2018)

El nivel de los valores de los factores se toman como referencia de estudios similares para Cacao y Jatropha (Subroto, 2015); (Owolarafe , 2008), tal como se observa en la Tabla 9. Las variables respuestas priorizadas según estudios en la calidad de la manteca de semilla de Copoazú (De Azevedo, et al., 2003) (Alviárez G., et al., 2016); (Gilabert-Escrivá, et al., 2002) se observan en la Tabla 10.

El número total de experimentos se establece con la ecuación (3.4), siendo para el estudio 19 experimentos, y la matriz del diseño se observa en la Tabla 11.

$$N = 2^{k-p} + (2k) + r \quad (3.4)$$

Dónde,

N = Número de experimentos;

k = Número de factores o variables independientes (k = 4);

p = Número de fraccionamiento (p = 1); y

r = Número de repeticiones en el centro de diseño, (r = 3)

Los resultados se analizaron estadísticamente usando el Software Desing Expert 11, obteniéndose los efectos principales y las interacciones de los coeficientes del modelo de regresión multivariable. El modelo de regresión, fue:

$$y_i = b_0 + \sum_{i=1}^{NV} b_i z_i + \sum_{i=1}^{NV} \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{NV} b_{ij} z_i z_j + \sum_{i=1}^{NV} b_{ii} z_i^2 \quad (3.5)$$

Dónde,

y_i , las respuestas o variables dependientes;

b_0, b_i, b_{ij} , coeficientes del modelo;

z_i, z_{ij}, z_i^2 , factores o variables independientes en su estado natural

Tabla 11: Matriz de diseño codificado (DesignExpert 11.1.0.1)

Nro.	X_1 Humedad muestra (%)	X_2 Temperatura calentamiento (°C)	X_3 Granulometría (# malla)	X_4 Presión prensado (bar)
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	1	-1	1
3	-2	0	0	0
4	0	0	0	0
5	1	1	-1	-1
6	1	-1	-1	1
7	0	0	0	2
8	2	0	0	0
9	0	-2	0	0
10	0	0	2	0
11	1	1	1	-1
12	-1	-1	1	-1
13	1	-1	1	1
14	-1	1	1	1
15	0	0	-2	0
16	0	0	0	0
17	0	2	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	-2

Fuente: Elaboración propia, (2018)

3.5.2. Diseño experimental para la optimización del proceso de pre-tratamiento enzimático

El objetivo de esta etapa fue establecer las condiciones operativas óptimas de pre-tratamiento enzimático de la semilla de *T. grandiflorum* con la variación de los índices de calidad, y el rendimiento en manteca cruda extraídos por prensado hidráulico. En la Tabla 12, se muestran los factores considerados y el valor de sus niveles se toman como referencia de estudios similares para otros productos (Guerra & Zúñiga, 2003). Las variables respuestas priorizadas según estudios en la calidad de la manteca de semilla de Copoazú (Gilabert-Escrivá, et al., 2002); (De Azevedo, et al., 2003); (Alviárez G., et al., 2016) . Se observan en la Tabla 13.

Tabla 12: Matriz de factores y niveles para el estudio de pre-tratamiento enzimático en la extracción de la manteca de semilla de Copoazú por prensado hidráulico.

	Nombre	Unidades	Nivel			Dev. Est.
			Bajo	Alto	Media	
Z ₁	Enzima:Sustrato	g:g	0,5:100	1,5:100	0,9962:100	0,41
Z ₂	Temperatura	°C	30	50	39,74	8,31
Z ₃	Tiempo	H	6	18	12	4,7

Fuente: Elaboración propia, (2018)

El número total de experimentos establecidos a través del Diseño I-optimó, con el Software Desing Expert 11, fue de 13 experimentos. El modelo de regresión, se estableció utilizando la Ec. (3.2). En la Tabla 14 se observa la matriz de diseño.

Tabla 13: Matriz de respuestas.

	Nombre	Unidades	Mínimum	Máximum	Media	Modelo
Y ₁	Índice Yodo	g I ₂ /100 g	10,0065	10,6797	10,38	Quadratic
Y ₂	Índice Acidez	mg KOH/g	3,0399	4,37143	3,63	Quadratic
Y ₃	Índice Peróxido	mEq O ₂ /Kg	13,2438	19,137	16,33	Quadratic
Y ₄	Índice Saponificación	mg KOH/g	124,302	148,646	134,03	Quadratic
Y ₅	Rendimiento	g/100 g (b.s)	25,7081	47,9812	41,69	Quadratic
Y ₆	Eficiencia	%	43,2069	80,6407	70,07	Quadratic

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Tabla 14: Matriz de diseño (Design Expert 11.1.0.1)

N°	Factores escala codificada			Factores escala natural		
	X1: Enzima: Sustrato (g:g)	X2: Temperatura (°C)	X3: Tiempo (h)	Z1: Enzima: Sustrato (g:g)	Z2: Temperatura (°C)	Z3: Tiempo (h)
1	-1	-1	-0,8	0,50:100	30,0	7,2
2	-1	-1	1	0,50: 100	30,0	18,0
3	0,04	-1	-0,05	1,02:100	30,0	11,7
4	1	-0,8	-1	1,50:100	32,0	6,0
5	1	-0,8	0,8	1,50:100	32,0	16,8
6	-1	0,08	-0,03	0,50:100	40,8	11,82
7	0,11	0,07	0	1,055:100	40,7	12,0
8	0,11	0,07	-1	1,055:100	40,7	6,0
9	-0,72	1	-1	0,64:100	50,0	6,0
10	-0,72	1	0,79	0,64:100	50,0	16,74
11	0,08	0,04	0,6	1,04:100	40,4	15,6
12	1	1	-0,32	1,50:100	50,0	10,08
13	1	1	1	1,50:100	50,0	18,0

Fuente: Elaboración propia, (2018)

3.5.3. Análisis estadístico

Los análisis de los resultados se realizaron mediante ANOVA, usado para discutir los efectos relativos de todos los factores en la respuesta y determinar qué factores tienen los mayores efectos (Gunst, et al., 1996); (Montgomery, 2010). Los parámetros usando ANOVA son calculados con las ecuaciones presentadas en la tabla 15.

❖ Ajuste de los parámetros a los modelos establecidos:

Estimación de los parámetros de los modelos, utilizando los métodos de la **máxima verosimilitud** (ML) y **mínimos cuadrados** (LS), según:

Relación de Máxima Verosimilitud (ML) para modelos no lineales entre variables independientes ζ_{ij} y dependientes ξ_{ij}

$$\xi_{ij} = h_j(\zeta_{ij}; k; u) \quad j = 1, 2, \dots, m \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (3.6)$$

La estimación de parámetros según ML se obtiene minimizando óptimamente el siguiente criterio cuadrático (Gunst, et al., 1996); (Archontoulis & Miguez, 2015)

$$S(k) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^m \left[\frac{(\xi_{ij} - \zeta_{ij})^2}{\sigma_{\zeta_{ij}}^2} + \frac{(\xi_{ij} - h(\zeta_{ij}; k; u))^2}{\sigma_{\xi_{ij}}^2} \right] \quad (3.7)$$

La formulación del criterio anterior se basa en las siguientes suposiciones:

- El modelo propuesto es capaz de representar los datos sin desviación sistemática alguno;
- Los experimentos son independientes; y
- El error de las medidas está normalmente distribuido con media cero y matriz de covarianza conocida

$$\text{diag}(\sigma_{x_{1,i}}^2, \sigma_{x_{2,i}}^2, \sigma_{x_{3,i}}^2, \dots, \sigma_{x_{m,i}}^2) \quad (3.8)$$

Tabla 15: Análisis ANOVA

Fuente de Variación	Variación; suma de cuadrados	Grados de Libertad	Varianza; suma de cuadrados promedio	Razón F ₀	Valor probabilístico
X_1	$bn\sum_i (y_i - \bar{y})^2$	$a-b$	MS_{X_1}		
X_1X_2	$n\sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_j)^2$	$a(b-1)$	$MS_{X_1X_2}$		
Error	$\sum_i \sum_j \sum_k (y_{ijk} - \bar{y}_{ij})^2$	$ab(n-1)$	MS_E		
Total	$\sum_i \sum_j \sum_k (y_{ijk} - \bar{y})^2$	$abn-1$			

Fuente: Gunst, et al., (1996); Archontoulis & Miguez (2015)

Relación de Mínimos Cuadrados (LS): para modelos no lineales entre variables independientes ζ_{ij} y dependientes ξ_{ij} , asumiendo que la varianza del error en las medidas de cada variable dependiente es conocido, la siguiente función objetivo LS puede ser formulado:

$$S_{Tx}(k) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{(P_i^{cal} - \hat{P}_i)^2}{\sigma_{P_i}^2} + \frac{(y_i^{cal} - \hat{y}_i)^2}{\sigma_{y_i}^2} \right] \quad (3.9)$$

- ❖ Optimización multi-objetivo para el proceso, según la siguiente función objetivo:

$$\begin{aligned} \text{Minimize } f_1 &= f_1(x_1, x_2, \dots, x_n) \\ \text{Maximize } f_2 &= f_2(x_1, x_2, \dots, x_n) \end{aligned} \quad (3.10)$$

Con respecto a X

$$\text{Sujeto a: } \mathbf{x}^L \leq \mathbf{x} \leq \mathbf{x}^U \quad \mathbf{h}(\mathbf{x}) = 0 \quad \mathbf{g}(\mathbf{x}) \leq 0$$

3.5.4. Tratamiento de los datos

Tabla 16: Matriz de diseño con tratamiento enzimático

N°	Enzima:Sustrato g:g	Temperatura °C	Tiempo h
1	0,5:100	30	7,2
2	0,5:100	30	18
3	1,02:100	30	11,7
4	1,5:100	32	6
5	1,5:100	32	16,8
6	0,5:100	40,8	11,82
7	1,055:100	40,7	12
8	1,055:100	40,7	6
9	0,64:100	50	6
10	0,64:100	50	16,74
11	1,04:100	40,4	15,6
12	1,5:100	50	10,08
13	1,5:100	50	18

Fuente: Elaboración propia, (2018)

CAPÍTULO IV: RESULTADOS DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

4.1. Características morfológicas de la semilla de Copoazú

Las semillas de *T. grandiflorum* con las cuales se han trabajado, fueron de la especie mamorana, con forma geométrica elipsoide, caracterizado por la relación de L/A 1,0173 cm, L/E 2,020 cm y A/E 1,986 cm., corroborando lo manifestado por (Santos, et al., 2012).

Tabla 17: Características morfológicas de la semilla de Copoazú

Semilla			
	Unidad	Fresco	Seco
Longitud (L)	Cm	2,233 ±1,510	2,221 ±1,505
Ancho (A)	Cm	2,195 ±1,489	2,189 ±1,646
Espesor (E)	Cm	1,105 ±0,748	0,984 ±0,666
Peso	g	2,813 ±1,904	2,796 ±1,897
Color		Blanco	Marrón claro

Fuente: Elaboración propia, (2018)

En la Tabla 17, se observan los valores de la longitud, ancho, espesor y peso, siendo en promedio $2,233 \pm 1,510$ cm, $2,195 \pm 1,489$ cm, $1,105 \pm 0,748$ cm y $2,813 \pm 1,904$ respectivamente, medidas de semillas frescas con humedad promedio de 83 %, cuando estas semillas fueron sometidos a deshidratación en estufa convectivo de aire forzado hasta alcanzar en promedio la humedad de la semilla 5 %, las medidas de longitud, ancho y espesor a estas condiciones disminuyeron en 0,53%, 0,27% y 0,10 % respectivamente. Datos reportados por Santos, 2012; de las dimensiones geométricas de longitud, ancho y espesor para semillas de *T. Grandiflorun*, *T. bicolor*, y *T. cacao*, en promedio fueron de 2,68 cm, 2,01 cm, 1,07cm; 2,83 cm, 2,02cm, 1,00 cm; 2,72 cm, 1,40 cm, 0,89 cm, respectivamente. Para el

caso de la semilla de *T. grandiflorum*, los datos de las dimensiones determinados en la investigación están en el rango de los reportados por otros investigadores, pero comparando con las semillas de *T. bicolor* y *T. cacao*, en la longitud es menor de 17,9 a 21,09 %, en el ancho es mayor en 7,97 a 36,21 % y en el espesor es mayor en 3,16 a 19,45 % (Santos, et al., 2012).



Figura 19: Dimensiones de las semillas de Copoazú

Fuente: Elaboración propia, (2018)

En la Figura 20, se muestra las características mesofílicas de la semilla de *T. grandiflorum* fresco, observados a través de un estereoscopio trinocular con cámara con un aumento de 0,75 X, donde se puede apreciar el tejido translúcido (B), cotiledones (C). Esta observación coincide con reportes de Martini, et al., (2008), para semillas de *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *T. Cacao* y *T. subincanum*, quienes manifiestan que los lípidos en estas semillas están acumuladas adyacentemente en la pared celular, así mismo, cuando los frutos alcanzan la madurez las reservas de proteína y lípidos prevalecen sobre los otros componentes estructurales (Martini, et al., 2008).

Dado que, los glóbulos de lípidos en las semillas de los Theobromas se encuentran asociados con las reservas de proteínas, con diámetros que varían de 1 a 3 μm , y al ser sometidos a un calentamiento de 28 °C, los glóbulos de lípidos coalescen, formando gotas de mayor tamaño, esto corrobora las observaciones de muestras particuladas antes y después

del prensado hidráulico, las muestras previamente fueron coloreados con una solución de azul de metileno Martini, et al., (2008). En la Figura 21, podemos apreciar la presencia de gotas de grasa antes del prensado y la desaparición parcial después del prensado.

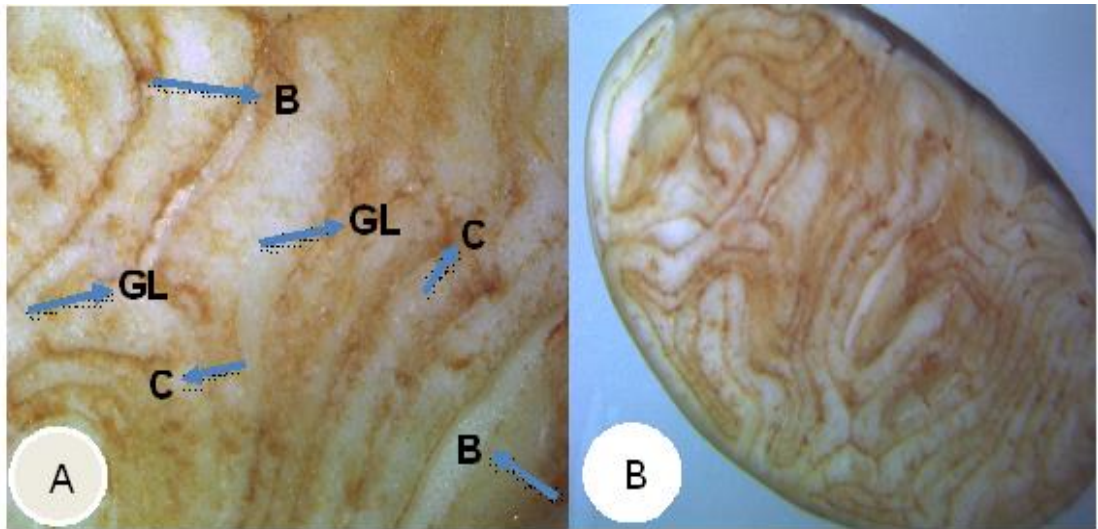


Figura 20: Semilla de *T. grandiflorum* (C = cotiledón, B = tejido translúcido, GL = glóbulos de lípidos)

Fuente: Elaboración propia, (2018)

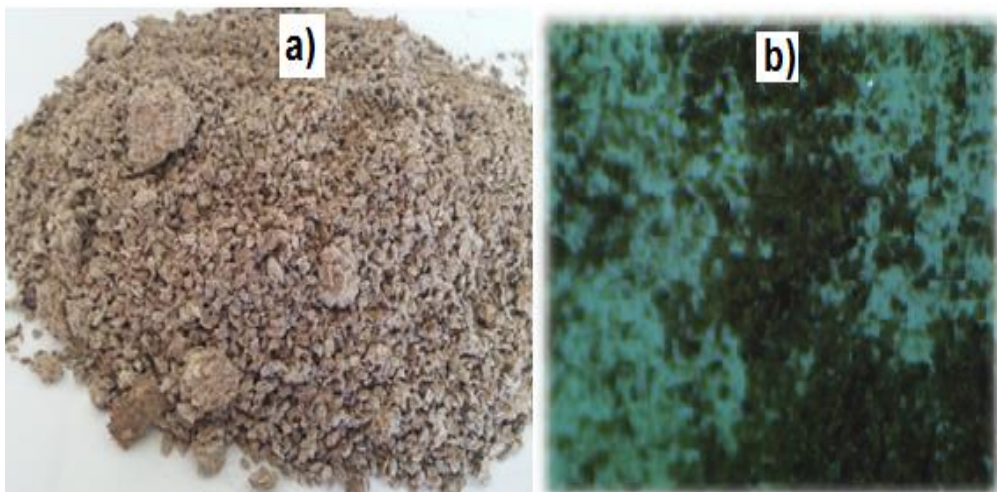


Figura 21: Semilla fresca de *T. grandiflorum* particulada a) antes de prensado, b) después de prensado

Fuente: Elaboración propia, (2018)

4.2. Extracción de grasa por el método soxhlet

En la Tabla 18, se muestran el contenido inicial de la manteca en la semilla de Copoazú, siguiendo el método descrito por Jensen, (2007); Luque C. & Priego C., (2010), utilizando como solvente éter etílico. Los resultados obtenidos por triplicado tienen investigación realizada por Lannes S. et al., (2003), quienes reportan el contenido de grasa de la semilla Copoazú de 60 %, utilizando éter etílico como solvente, y un tiempo de extracción de 6 horas.

Según, Moreno, et al., (2013) el rendimiento de extracción de manteca de *T. grandiflorum* fué 57,192%, utilizando como solvente bencina de petróleo con una duración de 6 horas y 8 de evaporación del disolvente remanente a una temperatura de 60 °C; Lorena A., (2007), *T. cacao* y *T. bicolor*, utilizando como solvente hexano, obtuvieron rendimientos de 50,88% y 40,9% respectivamente. Resultados, que nos indica que la semilla de *T. grandiflorum* tiene mayor contenido de grasa respecto a los de *T. cacao* y *T. bicolor*.

Tabla 18: Promedio de extracción por soxhlet

Muestra	Peso inicial (g)	Peso muestra (g)	Peso final (g)	Peso grasa (g)	Contenido de grasa (%) b.s
M1	109,8406	5	112,7944	2,95380	59,076
M2	121,7724	5	124,8325	3,06010	61,202
M3	120, 942	5	123,985	303,243	60,860
				suma total	181,138
				Promedio	60,379 ±0,659

Fuente: Elaboración propia, (2018)

4.3. Extracción de manteca por prensado hidráulico sin tratamiento enzimático

4.3.1 Efectos de diferentes tratamientos en el rendimiento y eficiencia de extracción

Los resultados obtenidos del rendimiento de manteca extraída por prensado hidráulico con respecto a la muestra en b.s, se muestra en la Tabla 19, observándose que, el mayor rendimiento extraído se tiene en el séptimo (07) tratamiento, con 36,11 % en peso (b.s) a las condiciones siguientes: humedad 10 %, temperatura 70°C, granulometría 15 # de malla, presión de prensado 300 bar, y las mismas condiciones la eficiencia fue de 59,4158 %. Mientras que el menor rendimiento extraído está en el decimonoveno (19) tratamiento, con un rendimiento de 14, 21 % en peso (b.s), a las condiciones: humedad 10%, temperatura 70°C, granulometría 15# malla, presión 100 bar. A estas dos condiciones de extracción, se aprecia el efecto de la presión de prensado de 300 y 100 bar. El promedio global de rendimiento fue de 28,25 % con una desviación de $\pm 5,6$. Los valores más altos en el rendimiento se tienen en los tratamientos 7, 13, 14, 2 y 10, con un promedio de 34,242 $\pm 1,749$ % en peso (b.s), mientras que los tratamientos con menor rendimiento son 19, 1, 3, 5 y 11, con un promedio de 20,704 $\pm 3,728$ % en peso (b.s), con intervalo de confianza menor al 95 % de 25,53937 y mayor al 95 % de 30,96168.

Según Gonzales B. & Peña C., (2015) el rendimiento de grasa extraído por prensado hidráulico para semillas de *T. cacao* fue de 40 % a las condiciones de: temperatura 100 °C, tiempo de prensado 20 min, a una presión de 490 bares y con 1,5 kg de muestra para cada tratamiento, y con sistema de calentamiento con banda de 1000 watt. Dado que no se tiene reportes de extracción de manteca por prensado hidráulico de semilla de *T. grandiflorum*, podemos aseverar que los resultados obtenidos son comparables con los reportados por Bustos. G. (2015), más aún que la prensa hidráulica utilizado es de un sistema manual de extracción con una carga total de 32 Tn.

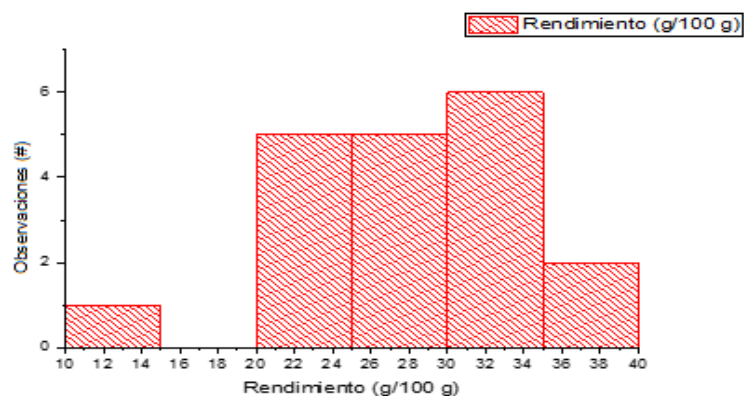


Figura 22: Rendimiento en manteca de Copoazú extraído por prensado hidráulico (g/100 g) como función del número de observaciones.

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Tabla 19: Resultado de extracción de manteca de Copoazú de acuerdo al diseño DCC

N°	Z_1 Humedad % b.s	Z_2 temperatura °C	Z_3 Granulometría #malla	Z_4 Presión prensado bar	Y_5 Rendimiento g/100g	Y_6 Eficiencia prensado %
1	7	60	10	150	21,36	35,3464
2	7	80	10	250	32,87	54,4065
3	4	70	15	200	22,07	36,6101
4	10	70	15	200	30,21	49,7245
5	13	80	10	150	22,19	36,2752
6	13	60	10	250	28,86	47,1584
7	10	70	15	300	36,11	59,4158
8	16	70	15	200	30,48	49,5153
9	10	50	15	200	29,75	48,9669
10	10	70	25	200	32,19	53,0181
11	13	80	20	150	23,69	38,7866
12	7	60	20	150	24,16	39,9279
13	13	60	20	250	35,87	58,6076
14	7	80	20	250	34,17	56,5329
15	10	70	5	200	29,25	48,1183
16	10	70	15	200	29,55	48,6279
17	10	90	15	200	30,68	50,5065
18	10	70	15	200	29,09	47,8242
19	10	70	15	100	14,21	23,3566

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Observando la Figura 22, se concluye que sólo una observación tiene un rendimiento de 10 – 15% de grasa extraída, mientras que 5 observaciones en rendimientos en manteca extraída de 20 – 24% y 25 – 30% respectivamente, así mismo al mayor número de observaciones se lleva a cabo con rendimiento en manteca extraída de 30 – 35%, finalmente solo 2 observaciones tienen el mayor rendimiento (35 a 40%), las mismas llevados a las siguientes observaciones: 10 % b.s, T° 70 °C, granulometría 15, presión 300 bar, rendimiento 36,11%; las condiciones para el bajo rendimiento humedad, 13% b.s, T° 60 °C, granulometría 20, presión 250 bar, rendimiento 35, 87%.

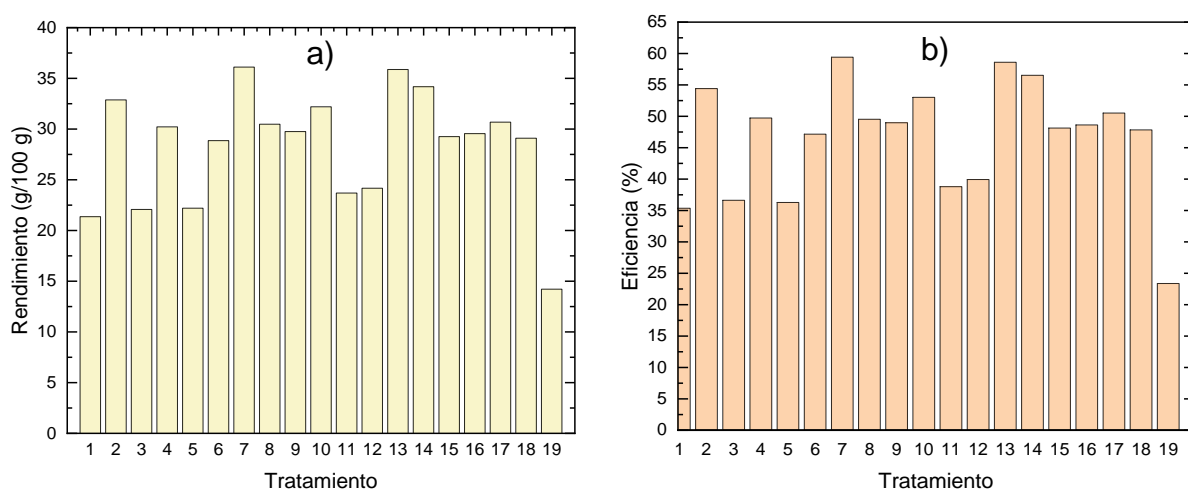


Figura 23: Efecto de los tratamientos en: a) Rendimiento de manteca extraída b) Eficiencia de manteca extraída

Fuente: Elaboración propia, (2018)

4.3.2. Efectos de las variables independientes sobre parámetros de respuesta

Cuando la humedad de la muestra varía de 4 a 16 %, el rendimiento de manteca extraída fue de 22,07 % a 30,48 % respectivamente, representando un incremento del 27,59 %. A condiciones consideradas como óptimas (80 °C, Malla 15 y 300 bar), cuando la humedad cambia de 4 a 10 % se da el mayor incremento en el rendimiento, luego se torna más lento, manteniéndose casi constante, tal como se observa en la Figura 24. A

Por otro lado, analizado el efecto de la temperatura en los tratamientos, según datos reportados en la Tabla 19, podemos observar que, cuando la temperatura de calentamiento de la muestra pasa de un nivel inferior, 50 °C a

un nivel superior, 90 °C, se incrementa el rendimiento en 3,03 %, por tanto, el efecto independiente de temperatura fue mínima, corroborado con un valor p de 0,5274, para un nivel de significancia del 95 %, tal como se observa en la Tabla 20 – Análisis de varianza. A condiciones consideradas como óptimas (5 % humedad, Malla 15 y 300 bar), cuando la temperatura varía de 60 °C a 80 °C, el rendimiento se incrementa proporcionalmente en forma casi lineal, Figura 24. b. Ezeh, et al., (2015) *Cyperus esculentus*, utilizando prensado hidráulico, obtuvieron rendimiento de 23,1 y 35%. Resultados que nos indica que la semilla de *T. grandiflorum* tiene mayor contenido de grasa respecto al *Cyperus esculentus*.

Tabla 20: ANOVA para modelo cuadrático.

Parámetros	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor F	Valor P
Modelo	565,91	14	40,42	44,68	0,0011
A-Humedad de la Muestra	35,36	1	35,36	39,09	0,0033
B-Temperatura de calentamiento	0,4324	1	0,4324	0,478	0,5274
C-Granulometría	21,37	1	21,37	23,62	0,0083
D-Presión de prensado	239,8	1	239,8	265,07	< 0,0001
AB	0,7353	1	0,7353	0,8128	0,4183
AC	2,43	1	2,43	2,69	0,1765
AD	0,041	1	0,041	0,0453	0,8418
BC	6,14	1	6,14	6,79	0,0597
BD	22,02	1	22,02	24,34	0,0079
CD	2,01	1	2,01	2,22	0,2103
AÂ ²	15,35	1	15,35	16,97	0,0146
BÂ ²	0,3246	1	0,3246	0,3588	0,5814
CÂ ²	1,31	1	1,31	1,45	0,2951
DÂ ²	26,91	1	26,91	29,75	0,0055
Residual	3,62	4	0,9047		
Falta de ajuste	2,98	2	1,49	4,71	0,1752
Error Puro	0,6339	2	0,3169		
Total corregido	569,53	18			

Fuente: Elaboración propia, (2018)

El efecto de Granulometría de los tratamientos reportados en Tabla 19, podemos observar que, la granulometría de la muestra en un nivel inferior, # malla 5 el rendimiento fue 29,25 % cuando la humedad 10 % b.s, temperatura 70 °C , presión 200 bar; así mismo cuando # malla 25 el rendimiento fue 32,19 % a las condiciones: humedad 10 % b.s, temperatura 70°C, presión 200 bar, incrementándose el rendimiento 9,13%; esto nos indica el efecto de granulometría a las condiciones analizadas es reducido en análisis de varianza con una significancia p-valor 0,0083 para un nivel de significancia 95 % tal como se observa en la Tabla 20 de análisis de varianza (ANOVA).

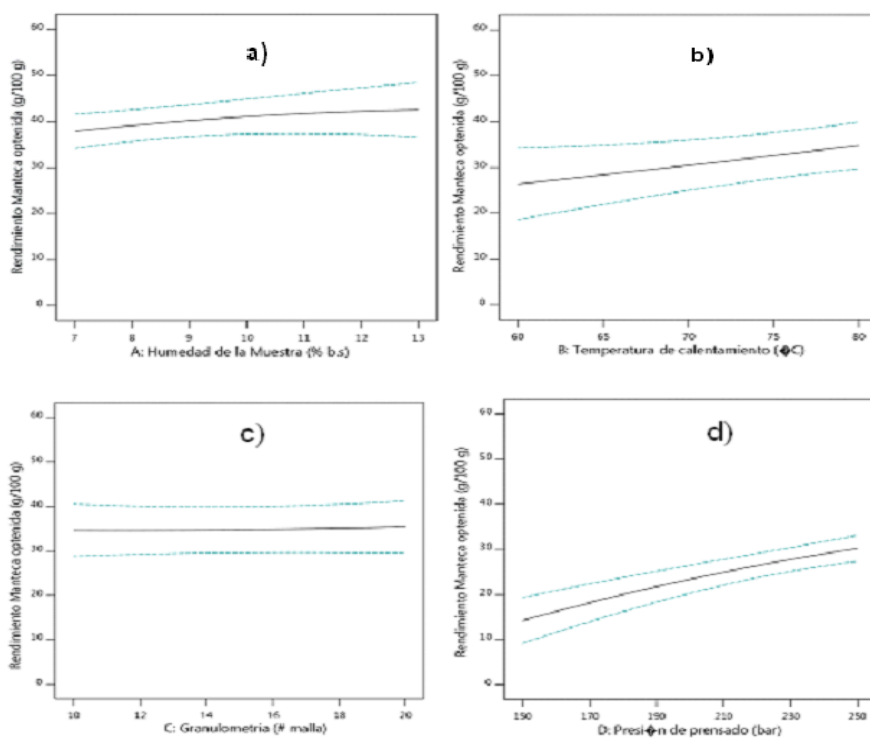


Figura 24: Efectos de variables independientes en el rendimiento de manteca extraída, a) humedad; b) temperatura; c) granulometría; y d) presión

Fuente: Elaboración propia, (2018)

El efecto de Presión de los tratamientos reportados en la Tabla 19, podemos observar que, cuando la presión de la muestra en un nivel inferior 100 bar a las condiciones humedad 10 % b.s, temperatura 70 °C, # malla 15 el rendimiento fue 14,21 % y a un nivel superior de 300 bar a las condiciones: humedad 10 % b.s, temperatura 70 °C, # malla 15 el rendimiento fue 36,11

%; incrementando con un rendimiento de 60,65 %, esto nos indica el efecto de la presión con la temperatura es significativo, p-valor 0,0079 para un nivel de significancia 95 % tal como se observa en la Tabla 20 de análisis de varianza (ANOVA). El rendimiento se incrementa proporcionalmente en forma creciente tal como se observa en la Figura 24.d. Ezeh, et al., (2015) *Cyperus esculentus*, utilizó prensado hidráulico con las siguientes condiciones de: tamaño de partícula 0,85 mm b.s, humedad 6,5%, presión 700 Mpa, T° 40°C, obteniendo rendimiento de 35%.

4.3.3. Modelamiento matemático de superficie de respuestas

Según Nader J. et al., (2016) utilizó ajuste matemático para su investigación de *arachis hypogaea* para dar un coeficiente de regresión adecuado al efecto de cada parámetro lineal y cuadrático. Aplicando en la investigación las ecuaciones matemáticas que describen el comportamiento del efecto de las variables de entrada (Humedad % b.s, temperatura °C, granulometría de la muestra #malla, y presión prensado bar) en el rendimiento y eficiencia de extracción de manteca contenido en la semilla se Copoazú, para un nivel de confiabilidad $\alpha = 0,05$, según el tratamiento de los datos experimentales mediante el ajuste a modelos no-lineales, utilizando el software de DesignExpert, fueron:

Rendimiento

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento} = & +43,70450 + 1,195164Z_1 - 0,970365Z_2 + 3,387812Z_3 - 0,060108Z_4 + 0,014292Z_1Z_2 \\ & + 0,036750Z_1Z_3 - 0,000675Z_1Z_4 - 0,017525Z_2Z_3 + 0,004692Z_2Z_4 + 0,002005Z_3Z_4 \\ & - 0,095550Z_1^2 + 0,001251Z_2^2 + 0,0100052Z_3^2 - 0,000455Z_4^2 \end{aligned} \quad (3.11)$$

Dónde:

$Z_1 = \text{Humedad de la muestra}$

$Z_2 = \text{Temperatura de calentamiento}$

$Z_3 = \text{Granulometría}$

$Z_4 = \text{Presión de prensado}$

Tabla 21: Rendimiento sin pre-tratamiento enzimático.

Std. Dev.	Media	C.V. %	R ²	Adjusted R ²
0,9511	28,25	3,37	0,9936	0,9714

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Estadísticamente la Ec. (3.11) es significativo con una desviación de 0,64%, la diferencia entre R² ajustado y R² es llevar a 2 que corroborara el buen ajuste al modelo, por lo tanto el modelo de superficie de respuestas se puede utilizar para predecir el comportamiento del rendimiento de manteca extraída como función de la variación de Z₁, Z₂, Z₃ y Z₄.

Eficiencia

$$\begin{aligned}
 \text{Eficiencia}_{\text{aprensado}} = & +73,37238 + 2,03733Z_1 - 1,63358Z_2 + 0,615409Z_3 - 0,023954Z_1 * Z_2 + 0,060439Z_1 * Z_2 \\
 & - 0,001568Z_1 * Z_4 - 0,028482Z_2 * Z_3 + 0,007799Z_2 * Z_4 + 0,003241Z_3 * Z_4 - 0,16115 \\
 & - 0,16154Z_1^2 + 0,002142Z_2^2 + 0,016885Z_3^2 - 0,000749Z_4^2
 \end{aligned}
 \tag{3.12}$$

Tabla 22: Eficiencia sin pre-tratamiento enzimático.

Std. Dev.	Media	C.V. %	R ²	Adjusted R ²
1,55	46,46	3,33	0,9938	0,9719

Fuente: Elaboración propia, (2018)

El modelo, Ec. (3.12), representa con una desviación del 0,62 % de los datos experimentales, así mismo, la diferencia entre R² y R² ajustado es menor que 0,2, que corrobora lo manifestado. La relación de ruido mayor a 4 es la deseable, en nuestro caso, su relación es de 26,219, indicando una señal adecuada. Este modelo se puede utilizar para navegar por el espacio de diseño.

4.3.4 Optimización

Establecer las condiciones operativas óptimas basada en la búsqueda multi-objetiva con un enfoque de deseabilidad en el rango de valores de la

humedad de la muestra (Z_1), temperatura de calentamiento (Z_2), granulometría de la muestra (Z_3) y presión de prensado (Z_4), bajo las restricciones de maximización y minimización, utilizando el modelo matemático, Ec. (3.11) y (3.12), para un valor de deseabilidad de 0,83, se tiene un rendimiento en manteca extraída de 39,41 g manteca/100 g muestra b.s., y una eficiencia de 65,16 % (Tabla 22), respecto a la manteca extraída por el método soxhlet. Las condiciones óptimas establecidos fueron: humedad de la muestra 5 %, temperatura de calentamiento 80 °C, granulometría malla 15 y una presión de prensado hidráulico de 300 bar. A estas condiciones operativas, se tiene una manteca con un índice de acidez de 0,77 mg KOH/g, ácidos grasos libres 0,37 % ác. Oleico, índice de saponificación 94,91 mg KOH/g, índice de yodo 35,33 g I_2 /100g e índice de peróxidos de 9,22 mEq O_2 /Kg. Estos valores de los índices de calidad de la manteca extraída están por debajo de los recomendados por la FAO, 2012 para aceites y grasas de grado comestible. El valor del índice de peróxidos de 9,22 mEq O_2 /Kg, es un indicativo de que, la manteca no tiene señal de deterioro, corroborado con el bajo valor de índice de acidez 0,77 mg OH/g.

Tabla 23: Condiciones operativas óptimas

Variables operativos	Unidad	Valores Óptimos
Humedad de la Muestra	%	5,00
Temperatura de calentamiento	°C	80,00
Granulometría	# malla	15,43
Presión de prensado	Bar	300,00
Índice de acidez	mg KOH/g	0,77
Índice de saponificación	mg KOH/g	94,91
Índice de yodo	g I_2 /100 g	35,33
Índice de peróxidos	mEq O_2 /Kg	9,22
Rendimiento Manteca obtenida	g/100 g b.s.	39,41
Eficiencia de prensado	%	65,16

Fuente: Elaboración propia, (2018)

En los gráficos de superficie 3D y perturbación de la función de deseabilidad en cada óptimo se usa para explorar la función en el espacio factorial, cuya respuesta individual muestra el punto óptimo, tal como se muestra en la Figura 25.

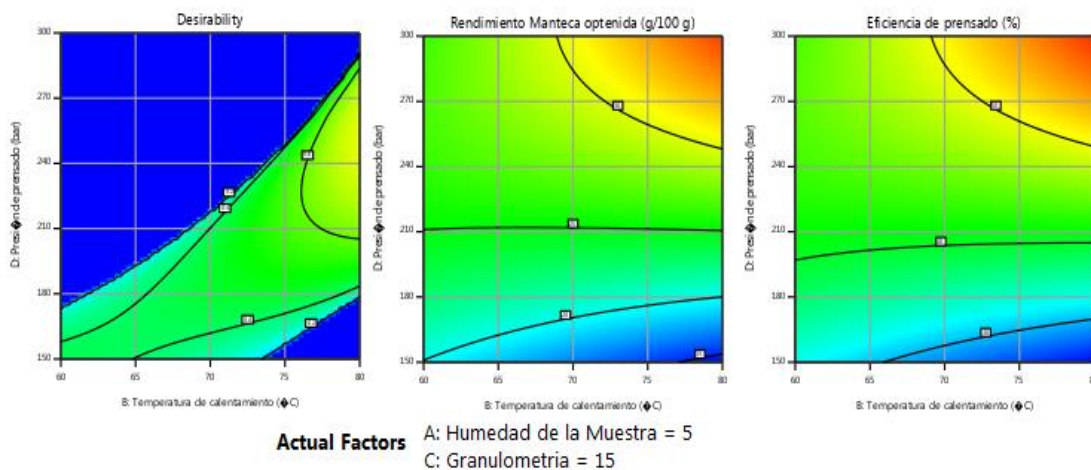


Figura 25: Variación de la deseabilidad, rendimiento y eficiencia de extracción de manteca de Copoazú por prensado hidráulico como función de humedad, granulometría, temperatura de calentamiento y presión de prensado.

Fuente: Elaboración propia, (2018)

El valor de las condiciones operativas óptimas, son las que se consideran en la siguiente etapa, extracción de manteca por prensado hidráulico de muestras sometidas previamente a tratamiento enzimático.

4.4. Extracción de manteca de Copoazú por prensado hidráulico con pre-tratamiento enzimático

Todos los análisis realizados estarán enmarcadas en las condiciones operativas establecidas en el proceso de prensado sin enzimas siendo estos: temperatura 80°C, humedad 5%, presión 300 bar y granulometría # malla 15.

Según García C. & Maziero, (2017) indica que el pH de la solución para la inoculación enzimático del sustrato (semilla de Copoazú) es uno de los parámetros que influyen en el rendimiento y calidad de los grasas extraídas, el mismo que debe estar en su valor, donde la actividad enzimática sea

máxima pero muy distante al punto isoeléctrico de la proteína de la matriz vegetal de la que se extrae los aceites o grasas. Según Carvalho S., (2010) Para semilla de Copoazú el punto isoeléctrico esta aun pH de 3,5.

Para el trabajo de investigación se han utilizado celulasa y hemicelulasa, para los cuales el pH de máxima actividad enzimática es 4,6 respectivamente, previos ensayos en cada enzimática de la mezcla celulasa y hemicelulasa se ha determinado el pH máxima actividad fue de 4,6. Este valor de pH se mantuvo constante en todos los experimentos de pre-tratamiento enzimático.

Tabla 24: Resultados de índice de calidad con tratamiento enzimático

N°	Z_1	Z_2	Z_3	Y_5	Y_6
	E/S (g:g)	T (°C)	t (h)	Rendimiento g/100 g (b.s)	Eficiencia %
1	0,5:100	30	7,2	39,7324	66,7771
2	0,5:100	30	18	35,6216	59,8682
3	1,02:100	30	11,7	25,7081	43,2069
4	1,5:100	32	6	45,2269	76,0116
5	1,5:100	32	16,8	44,9841	75,6036
6	0,5:100	40,8	11,82	44,669	75,074
7	1,055:100	40,7	12	47,9812	80,6407
8	1,055:100	40,7	6	45,9022	77,1466
9	0,64:100	50	6	42,1797	70,8903
10	0,64:100	50	16,74	41,7324	70,1385
11	1,04:100	40,4	15,6	45,2244	76,0074
12	1,5:100	50	10,08	43,563	73,2152
13	1,5:100	50	18	39,4877	66,3659

Fuente: Elaboración propia, (2018)

4.4.1 Efecto de los diferentes tratamientos en el rendimiento y eficiencia de la manteca extraída

Los resultados obtenidos en el rendimiento de manteca extraída por prensado hidráulico de muestras previamente tratados enzimáticamente, se muestran en la Tabla 24, observándose que, el mayor rendimiento en manteca extraída tiene lugar en el séptimo (7) tratamiento, siendo 47,98 % en peso (b.s) a las condiciones siguientes: E:S 1,055:100 g: g, temperatura 40,7 °C, tiempo 12 horas y una eficiencia del 80,64 %, respecto a muestras extraídas por método soxhlet. Mientras que el menor rendimiento extraído está en el tercer (3) tratamiento, con 25,71 % en peso (b.s) de manteca extraída, a las siguientes condiciones: E:S 1,02:100 g:g, temperatura 30°C, tiempo 11,7 horas y una eficiencia es de 43,21 %. El promedio del rendimiento fue de 41,69 % con una desviación de $\pm 5,82$.

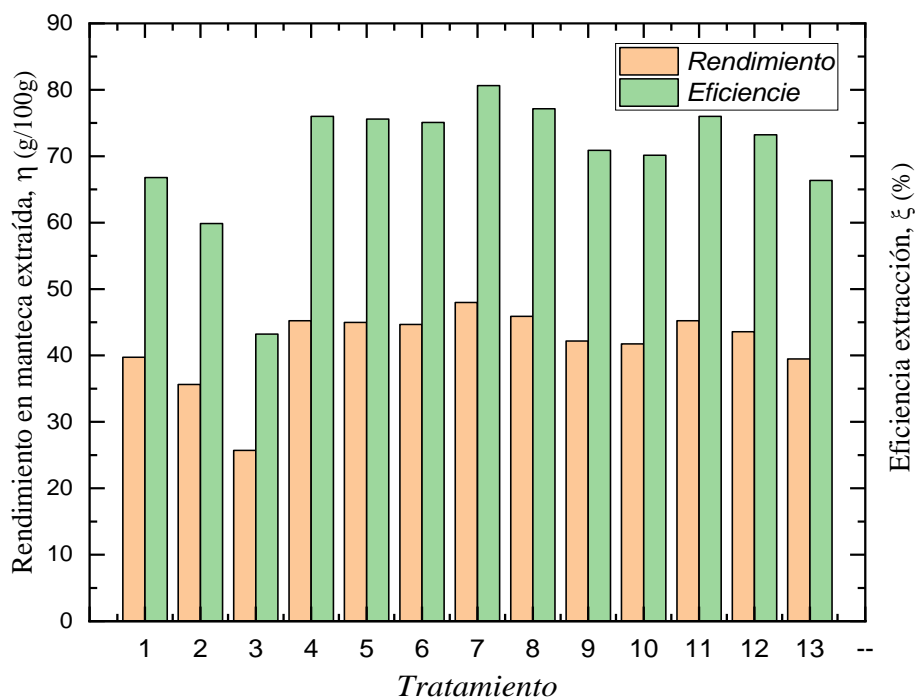


Figura 26: Rendimiento de manteca de Copoazú por extraído prensado hidráulico vs tratamiento y eficiencia

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Los valores más altos en el rendimiento se tienen en los tratamientos 7, 8, 4, 11 y 5 con un promedio de $45,86 \pm 1,232$ % en peso (b.s), mientras que los tratamientos con menor rendimiento son 3, 2, 13, 1 y 10, con un promedio de $36,46 \pm 6,403$ % en peso (b.s), con intervalo de confianza menor al 95 % de 38,18.

Según Moreno, et al., (2013), rendimiento en grasa extraída de la semilla del fruto de Copoazú (*T. Grandiflorum*) fue 25,367 % a temperatura 50° C por 6 horas de tratamiento enzimático: enzima maxolive. Comparando con los resultados obtenidos al inocular las semillas particuladas con hemicelulasa y celulasa, que fue de 47,98 % en peso (b.s), supera en 47,13 % respecto al reportado por Moreno, et al., (2013). Según García, (2014), en los procesos con tratamiento enzimático, la matriz vegetal está sometidos a un mayor grado de fractura a nivel molecular, conllevando a facilitar la extracción de solutos o aceites almacenados en los intersticios de la muestra, esto demuestra al comparar el rendimiento de las mismas muestras sin previo tratamiento enzimático, que fue de 36,11 %, observándose un incremento del 24,74 % de muestras con previo tratamiento enzimático.

4.4.2 Efectos de las variables independientes en los parámetros de respuesta

En la tabla 25, se muestra la matriz de diseño y las respuestas de las pruebas experimentales, observándose que, la relación enzima: sustrato al pasar del nivel inferior (0,5:100 g:g) al nivel superior (1,5:100 g:g), el índice de yodo disminuye en 1,48 %, el índice de acidez aumenta 10,84%, el índice de peróxido aumenta en 1,12%, el índice de saponificación se incrementa 6,66%, el rendimiento aumenta 7,64%, y la eficiencia aumentó 7,64%. Según García C. & Maziero, (2017) manifiesta que, el rendimiento en aceite sólo se incrementa hasta una cierta cantidad de dosis de enzima, por el límite de la misma, disminuye la eficiencia en la extracción, también ocurre en la calidad, pudiendo generar compuestos indeseados, olores y sabores desagradables. En la Figura 27, se aprecia que, para una cantidad de 100 g de sustrato, incrementando la cantidad de la mezcla de enzimas celulasa y hemicelulasa

de 0,5:100 a 1,055:100 g:g llega a un máximo de rendimiento en manteca extraída a 47,9812 g manteca/100 muestra en b.s, luego descende el rendimiento a $43,3154 \pm 0,05$ g manteca/100g muestra en b.s., que corrobora lo manifestado por (García Candido & Maziero, 2017).

Según el Análisis de Varianza, de la Tabla 20, para un nivel de confiabilidad del 99,95 % ($\alpha = 0,5$), el efecto combinado de la relación enzima:sustrato con la temperatura de inoculación en el rendimiento de manteca extraída es menos significativo que la relación enzima:sustrato con el tiempo de inoculación figura 26, para un rango de temperatura de inoculación de 37 a 47 °C y la relación enzima:sustrato de 0,5:100 a 0,75:100 g:g se observan rendimientos de 40 a 50 g manteca/100 g muestra en b.s.

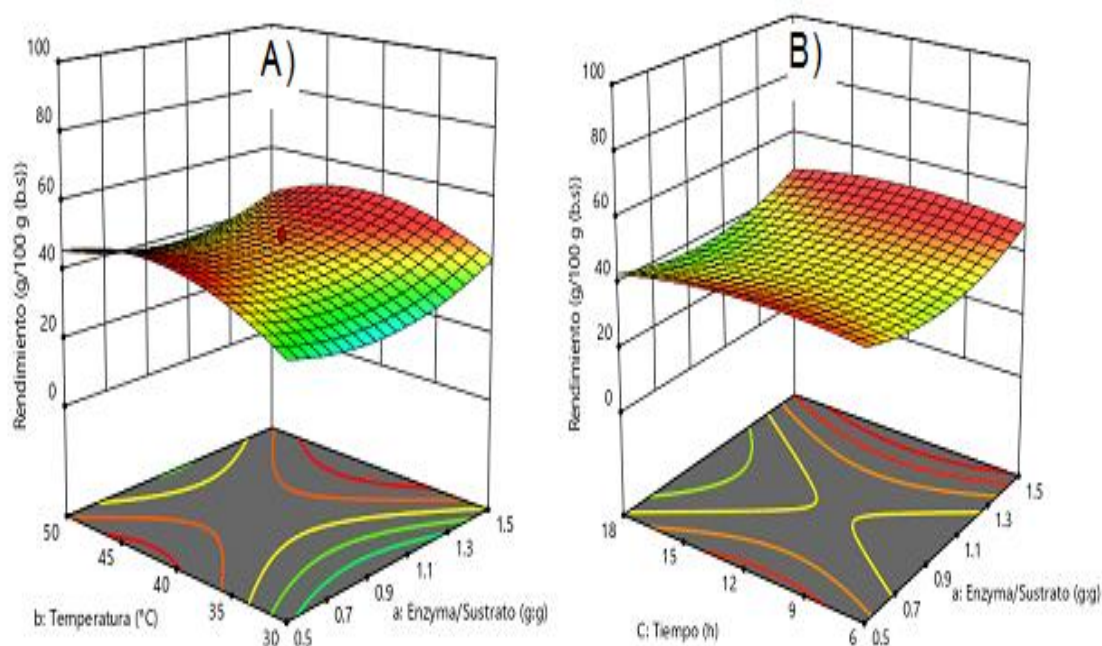


Figura 27: Rendimiento de manteca de Copozú a) temperatura vs enzima sustrato b) tiempo vs enzima sustrato

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Tabla 25: Resultados de índice de calidad con tratamiento enzimático

N°	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
	E/S (g:g)	T (°C)	t (h)	Índice de yodo g I ₂ /100g	Índice de acidez mg KOH/g	Índice de peróxido mEq O ₂ /Kg	Índice de saponificación mg KOH/g	Rendimiento g/100 g (b.s)	Eficiencia %
1	0,5	30	7,2	10,28	3,34	19,14	126,31	39,73	66,78
2	0,5	30	18	10,63	3,14	17,08	142,18	35,62	59,87
3	1,02	30	11,7	10,57	4,37	18,20	137,59	25,71	43,21
4	1,5	32	6	10,07	3,47	17,44	143,51	45,23	76,01
5	1,5	32	16,8	10,37	3,68	14,42	141,42	44,98	75,60
6	0,5	40,8	11,82	10,25	3,57	13,24	124,30	44,67	75,07
7	1,055	40,7	12	10,01	3,99	15,41	127,79	47,98	80,64
8	1,055	40,7	6	10,36	3,04	14,29	126,74	45,90	77,15
9	0,64	50	6	10,65	3,35	18,20	136,57	42,18	70,89
10	0,64	50	16,74	10,68	3,25	14,20	130,14	41,73	70,14
11	1,04	40,4	15,6	10,55	4,11	15,87	129,67	45,22	76,01
12	1,5	50	10,08	10,39	3,54	17,68	148,65	43,56	73,22
13	1,5	50	18	10,10	4,35	17,14	127,51	39,49	66,37

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Quando la temperatura de inoculación enzimática se incrementa del nivel inferior (30°C) al nivel superior (50°C), el índice de yodo disminuye en 0,39 %, indicándonos que los ácidos grasos insaturados han disminuido ligeramente, el índice de acidez se incrementó en 0,06%, un indicativo de la no ocurrencia de lipólisis manteniéndose los ácidos grasos libres, el incremento de la temperatura de la inoculación enzimática no tiene un efecto significativo en la variación o reducción de la calidad de la manteca, según el códex alimentarius, (2001) está manteca es apto para el consumo humano.

El índice de peróxido se redujo en 7,92%, indicándonos una reducción en la autoxidación de los ácidos grasos insaturados, como efecto del incremento de la temperatura. Codex alimentarius, (2001); El límite máximo para aceites y mantecas sin refinar extraídas por prensado en frío es de 15 meq/kg, el índice de

saponificación aumenta 0,26 %, el rendimiento y la eficiencia se incrementan en 19,29%.

El efecto de la variación del tiempo de tratamiento enzimático de 6 horas (nivel inferior) a 18 horas (nivel superior), se traduce en un incremento de 0,085 %, 12,39% y 2,74% y una disminución de 0,56 %, por tanto el peso molecular promedio de los ácidos grasos presentes varían muy poco, según el análisis de los ácidos grasos por cromatografía de gases el ácido graso de cadena larga, ácido bohémico está en una proporción bastante pequeña (1,8%) seguido de ácidos grasos de cadena intermedia que están en mayor proporción, teniendo un número relativamente mayor de grupos funcionales carboxilos por unidad de masa de grasa, índices de yodo, acidez, peróxido y saponificación respectivamente, mientras que en el rendimiento y eficiencia disminuyeron en 18,32%.

El efecto de la variación en la relación de $M_E:M_S$, del nivel inferior al nivel superior de 0,5:100 a 1,5:100 g:g, se refleja en el incremento de los índices de acidez, peróxido y saponificación de 10,84 %, 1,12 % y 6,6 % respectivamente, mientras que disminuye en el índice de yodo en 1,55 %, así mismo el rendimiento y eficiencia se incrementa en 7,64 %, estas variaciones se pueden apreciar en las Figuras 27.

El efecto de la temperatura en el proceso enzimático disminuyó el peróxido a 7,92% por tanto no afectó el parámetro de índice de calidad del producto cuanto menor es la temperatura mejora la calidad de la grasa, a mayor temperatura reduce el rendimiento.

El efecto del tiempo en el tratamiento enzimático la reacción enzimática incrementó el rendimiento a 19,29% a menor de 50°C a tiempos prolongados de incubación afecta al sustrato con extracción de componentes indeseables y mala calidad del producto.

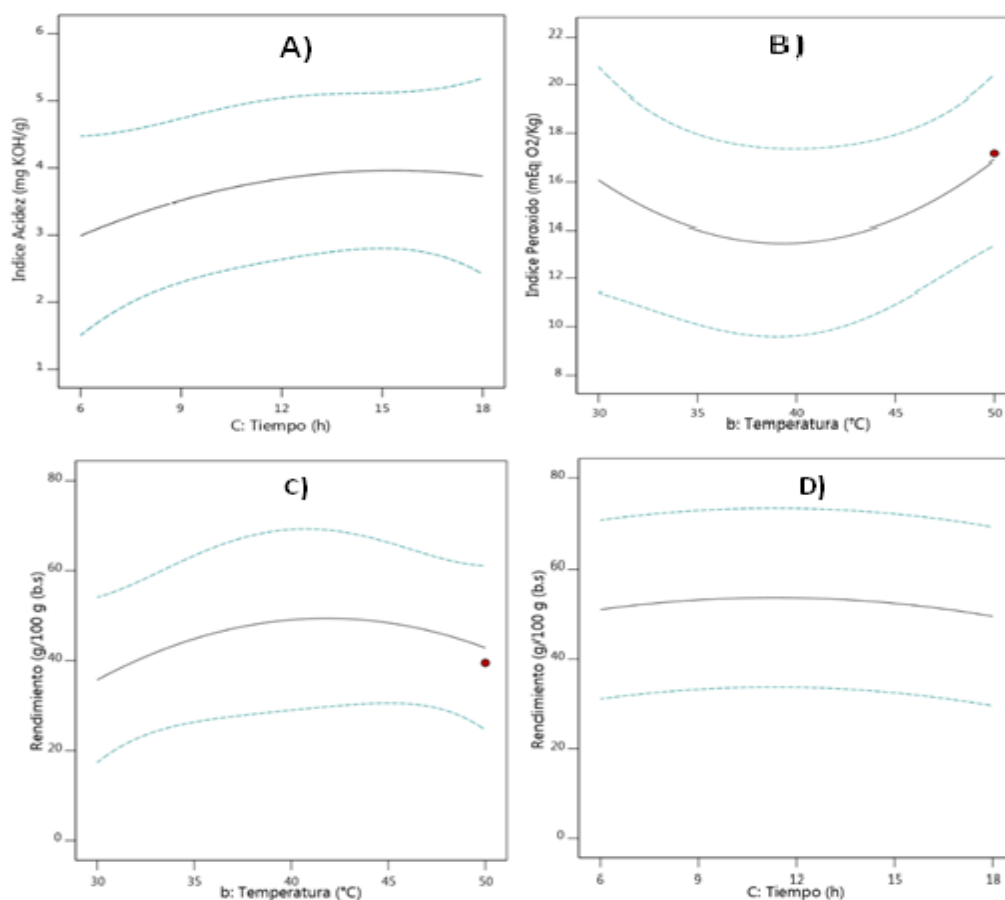


Figura 28: Variación de los índices de calidad de la manteca de Copoazú a) Índice de acidez-tiempo b) Índice de peróxido-temperatura c) Rendimiento-temperatura d) Rendimiento-tiempo.

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Según el modelo matemático de la ecuación (3.15) y las figuras 28 Observamos, que el nivel mínimo del índice de peróxido se da a las siguientes condiciones: relación enzima:sustrato 0,5:100 g:g, tiempo 18 horas y temperatura 40,18 °C, por debajo del valor recomendado por él Codex alimentarius, (2001), (meq O₂/kg). Este valor se ve perturbado principalmente por la variación del tiempo y temperatura que representa 16,58% con desviación 20,63% (R^2 0,7937)

Observando la relación de índice de peróxido a las condiciones: temperatura 50 °C, tiempo 6 horas evidenciándose el inicio de la rancidez de la manteca.

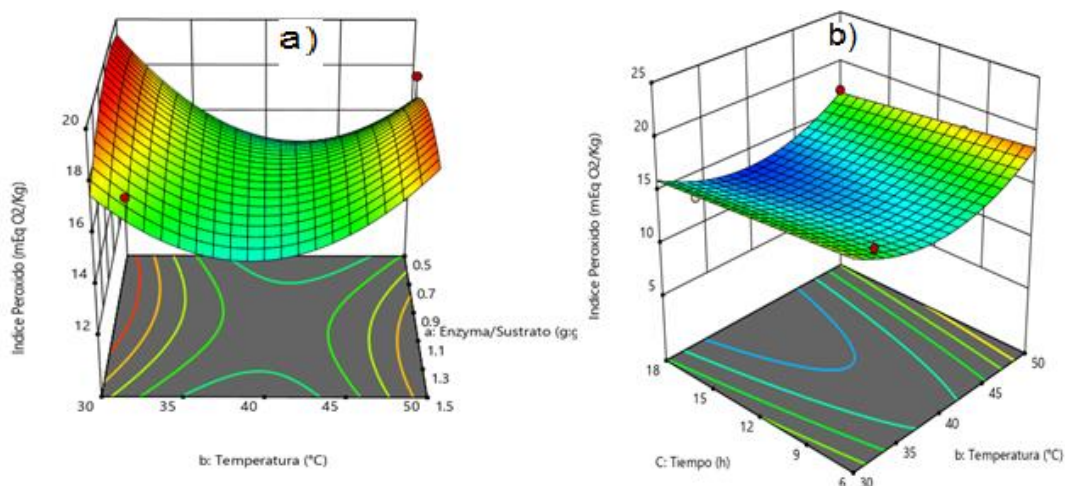


Figura 29: Índice de peróxido a) temperatura vs enzima sustrato b) tiempo vs temperatura

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Según el modelo matemático de la Ecuación (3.14) y las figuras 29 Observamos, que el nivel mínimo del índice de acidez se da a las siguientes condiciones: relación enzima:sustrato 1,5:100 g:g, tiempo 18 horas y temperatura 45 °C, por debajo del valor recomendado por él Codex alimentarius, (2001), (4 mg KOH/g). Este valor se ve perturbado principalmente por la variación del tiempo y temperatura que representa 16,58% con desviación 20,63% (R^2 0,7467).

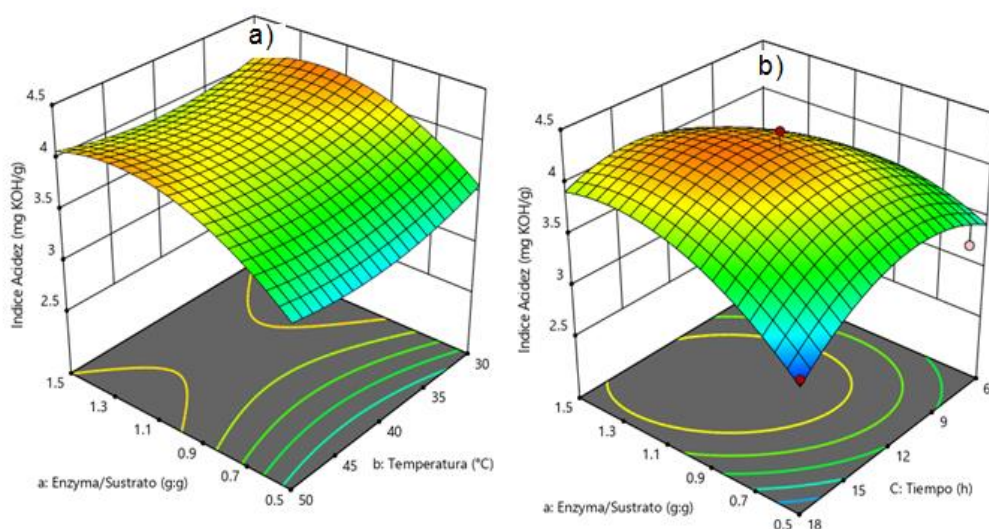


Figura 29: Índice de acidez a) enzima sustrato vs temperatura b) enzima sustrato vs tiempo

Fuente: Elaboración propia, (2018)

El máximo rendimiento obtenido según el diseño compuesto Central, se da a una relación E:S de 1,5:100 g:g, temperatura de inoculación 40,18°C y tiempo de inoculación de 6,18 horas manteniendo el tiempo de inoculación el valor óptimo, si se modifica la temperatura de 40,18°C a 30°C y la relación E:S a 1:100 g:g, se observa una reducción en el rendimiento de manteca de 38,37%, según el modelo de Superficie de Respuesta en la Ecuación (3.17) En términos de variables naturales relación de evaluación enzima / sustrato, temperatura, tiempo con una desviación 0,15% (R^2 0,9985).

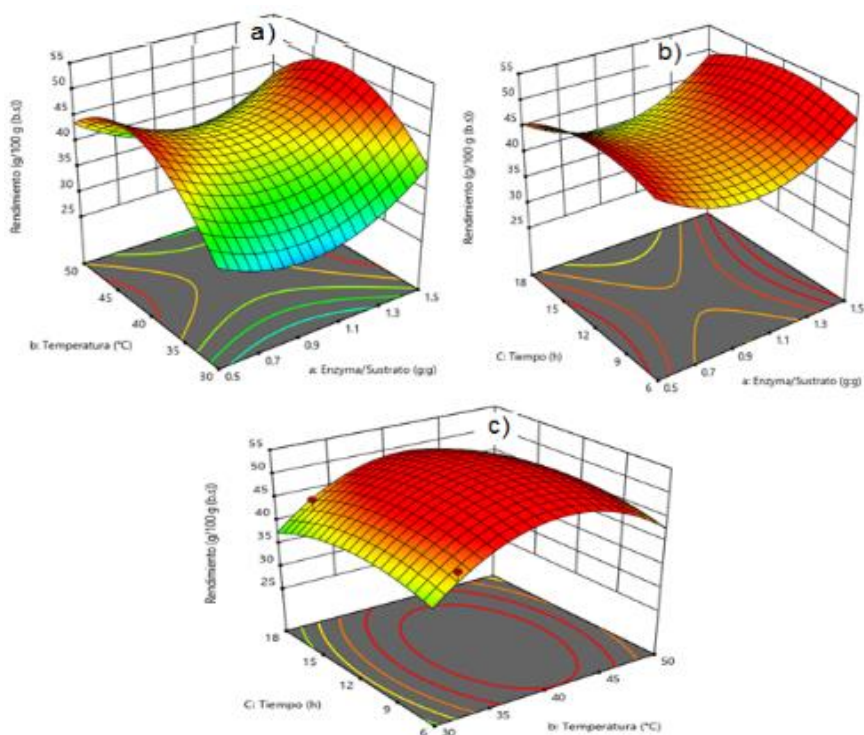


Figura 30: Rendimiento de manteca de Copoazú a) temperatura vs enzima sustrato b) tiempo vs enzima sustrato y c) tiempo vs temperatura

Fuente: Elaboración propia, (2018)

4.4.3 Ajuste a modelo de superficie respuesta

Basado en la respuesta generada por los trece experimentos ($N = 0$ 13), los datos experimentales obtenidos se ajustaron a modelos polinómicos no lineales, para proporcionar un coeficiente de regresión adecuado al efecto de cada parámetro lineal y cuadrático, junto con el efecto de las interacciones entre los parámetros operativos (relación $M_e:M_s$; temperatura inoculación y tiempo de inoculación). Las ecuaciones del modelo

desarrollado fueron capaces de predecir de manera efectiva el índice de yodo, índice de peróxidos, índice de saponificación, índice de acidez, rendimiento y eficiencia en manteca extraída. Las condiciones operativas que se han mantenido a un valor pre-establecido, fueron: humedad de la muestra 5 %, tamaño de muestra malla # 15, temperatura de calentamiento de 80 °C por un lapso de 20 minutos y la presión de prensado de 300 bar. Nader J. et al., (2016), ajusta sus 20 tratamientos a modelos matemáticos. Las ecuaciones de los modelos ajustados para cada parámetro de respuesta, así como los coeficientes de correlación (R^2), son los siguientes:

Índice de yodo:

$$Y_1 = 12,33246 + 1,97206 Z_1 - 0,184874 Z_2 + 0,113746 Z_3 - 0,012381 Z_1 Z_2 - 0,015589 Z_1 Z_3 - 0,002172 Z_2 Z_3 - 0,753889 Z_1^2 + 0,002829 Z_2^2 \quad (3.13)$$

Dónde:

Z_1 Relación enzima: sustrato (g:g)

Z_2 Temperatura de inoculación (°C)

Z_3 Tiempo de inoculación (horas)

Índice de acidez:

$$Y_2 = +5,08412 + 1,94346 Z_1 - 0,157214 Z_2 + 0,132806 Z_3 + 0,006726 Z_1 Z_2 + 0,079635 Z_1 Z_3 + 0,002247 Z_2 Z_3 - 1,36582 Z_1^2 - 0,011257 Z_2^2 - 0,011257 Z_3^2 \quad (3.14)$$

Índice de peróxido

$$Y_3 = +71,06516 + 0,114643 Z_1 - 2,65549 Z_2 - 0,219656 Z_3 + 0,195157 Z_1 Z_2 + 0,085468 Z_1 Z_3 - 0,00919 Z_2 Z_3 - 4,15654 Z_1^2 + 0,030254 Z_2^2 \quad (3.15)$$

Índice de saponificación

$$Y_4 = +201.94625 + 11.61064Z_1 - 6.31455Z_2 + 7.42856Z_3 - 1.74693Z_1Z_3 - 0.106763Z_2Z_3 + 10.31267Z_1^2 + 0.093686Z_2^2 - 0.068608Z_3^2 \quad (3.16)$$

Rendimiento

$$\text{Rendimiento} = -113,074441 - 42,05155Z_1 + 9,13643Z_2 - 1,71447Z_3 - 0,061125Z_1Z_3 - 0,005268Z_2Z_3 + 22,34352Z_1^2 - 0,109881Z_2^2 + 0,07852Z_3^2 \quad (3.17)$$

Eficiencia

$$\text{Eficiencia} = -195,21027 - 61,28021Z_1 + 15,29911Z_2 - 2,66286Z_3 - 0,388689Z_1Z_2 - 0,047979Z_1Z_3 + 0,006022Z_2Z_3 + 40,12925Z_1^2 - 0,179586Z_2^2 + 0,179543Z_3^2 \quad (3.18)$$

Tabla 26: Estadísticos de ajuste para el rendimiento

Std. Dev.	Media	C.V. %	R ²	Adjusted R ²
6,64	41,69	15,93	0,9979	0,9874

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Para un nivel de significancia del 99,99 % ($\alpha = 0,05$), los modelos de segundo orden de regresión múltiple, Ecs. 3,13 a 3,18, pueden utilizarse para predecir el comportamiento del proceso del tratamiento enzimático de la manteca de Copoazú en la variación de los índices de calidad y rendimiento de manteca extraída por prensado hidráulico, con un error c.a. 10 a 1,26 %. Esta predicción está enmarcada en el rango de valores de la matriz de variables indicada en la Tabla 27.

4.4.4 Superficie respuesta

Como se muestran en las Figuras 28, 29 y 30, las tendencias de las superficies de respuesta estimadas variaron según cada parámetro de respuesta. Se encontró que el tiempo de inoculación y la relación enzima: sustrato tiene un efecto significativo en el índice de saponificación,

rendimiento y eficiencia en la recuperación de grasa inicialmente contenido, manteniendo constante los valores de humedad de la muestra 5 %, tamaño de muestra malla # 15, temperatura de calentamiento de 80 °C por un lapso de 20 minutos y la presión de prensado de 300 bar. Por otro lado, la interacción de la relación enzima: sustrato y la temperatura de inoculación, es la que muestra un mínimo efecto en el rendimiento de manteca extraída, para $\alpha = 0,05$, el valor de test de Fisher es 0,1036866 y el valor p de 0,778.

La ecuación en términos de factores reales puede usarse para hacer predicciones sobre la respuesta para niveles dados de cada factor. Aquí, los niveles deben especificarse en las unidades originales para cada factor. Esta ecuación no debe usarse para determinar el impacto relativo de cada factor porque los coeficientes se escalan para acomodar las unidades de cada factor y la intersección no está en el centro del espacio de diseño. Superficie de respuestas según Nader J. et al., (2016), las tendencias estimadas varió de acuerdo con cada parámetro de respuestas se encontró que la duración de prensado que tiene un efecto insignificante de la relación de pérdida de grasa y el % de deformaciones irreversibles.

4.4.5 Optimización de respuesta múltiple

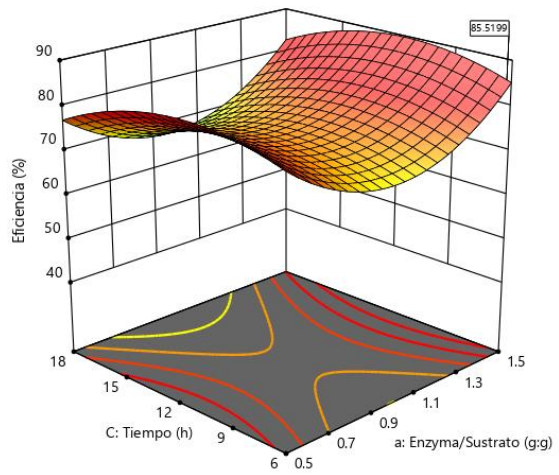
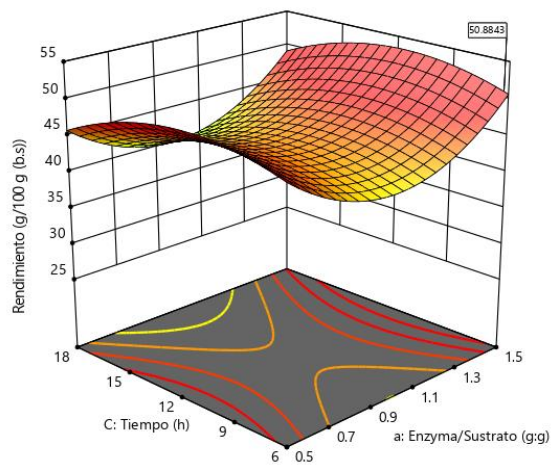
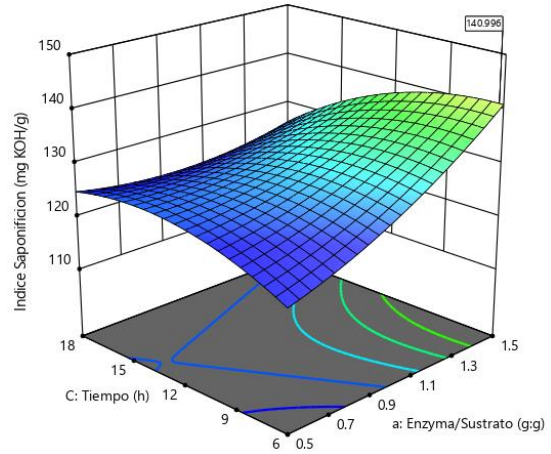
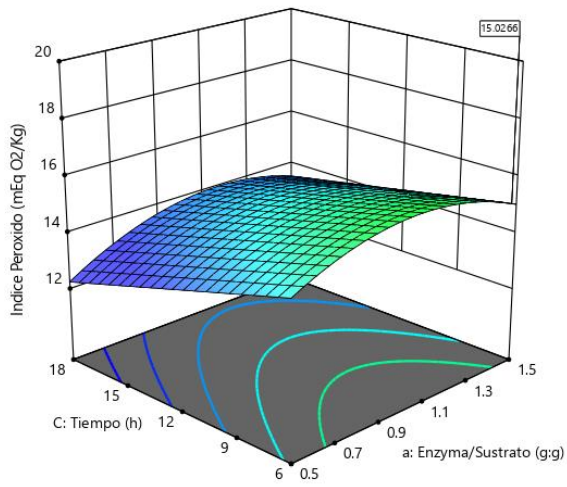
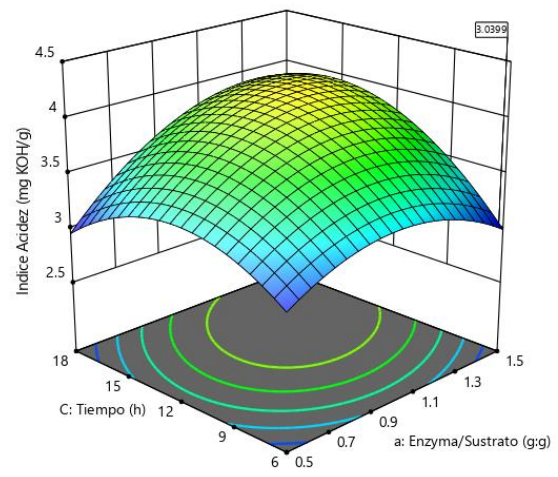
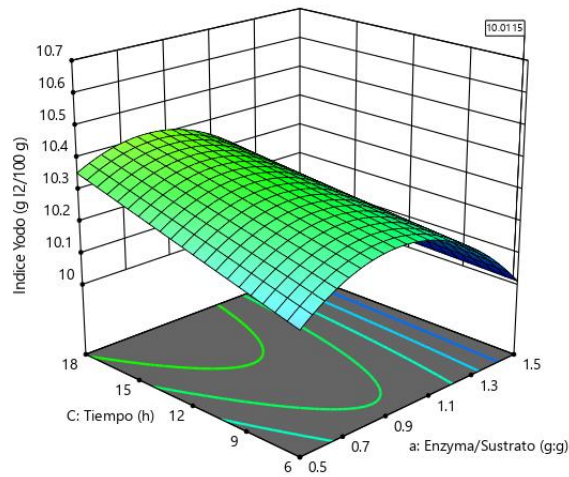
Utilizando el Desing Expert versión 11, se optimiza la combinación de niveles de las variables independientes que satisfaga simultáneamente los criterios de optimización (maximizar o minimizar) considerados para cada caso, según la Tabla 27. Los modelos matemáticos de la función objetiva son las Ecs. (3.13 a 3.18). Los factores evaluados son la relación enzima: sustrato, temperatura y tiempo de inoculación en el rango considerado en la matriz de factores y niveles para el estudio de pre-tratamiento enzimático en la extracción de la manteca de semilla de Copoazú por prensado hidráulico, Tabla 12.

TABLA 27: Restricciones consideradas para la optimización multivariable-multirespuesta del proceso de extracción de manteca de Copozú previo tratamiento enzimático.

Nombre	Unidades	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Importancia
a:Enzima:Sustrato	(g:g)	En rango	0,5:100	1,5:100	5
b:Temperatura	(°C)	En rango	30	50	3
C:Tiempo	(horas)	En rango	6	18	3
Índice Yodo	($gI_2/100g$)	En rango	10,01	10,68	3
Índice Acidez	(mg de KOH/g)	Minimizar	3,04	4,37	3
Índice Peróxido	(mEq O_2/Kg)	Minimizar	13,24	19,14	4
Índice Saponificación	(mg de KOH/g)	Maximizar	124,30	148,65	2
Rendimiento	($g/100g*100$)	Maximizar	25,71	47,98	5
Eficiencia		Maximizar	43,21	80,64	5

Fuente: Elaboración propia, (2018)

La optimización numérica, utilizando los modelos busca en el rango de factores las mejores compensaciones para lograr múltiples objetivos (maximizar, minimizar, en el rango), asignándole una importancia a cada objetivo para ajustar la forma de su función de deseabilidad particular (Tabla 27). El algoritmo combina la función objetivo con las restricciones. La búsqueda de objetivos comienza en un punto de partida aleatorio y continúa hasta la pendiente más empinada al máximo o la pendiente menos empinada el mínimo, según la curvatura de las superficies de respuesta y su combinación en la función de deseabilidad, que, al comenzar desde varios puntos en el espacio de diseño, las posibilidades mejoran para encontrar el “mejor” máximo local. En los gráficos de superficie 3D y perturbación de la función de deseabilidad en cada óptimo se usa para explorar la función en el espacio factorial, cuya respuesta individual muestra el punto óptimo, tal como se muestra en la Figura 32.



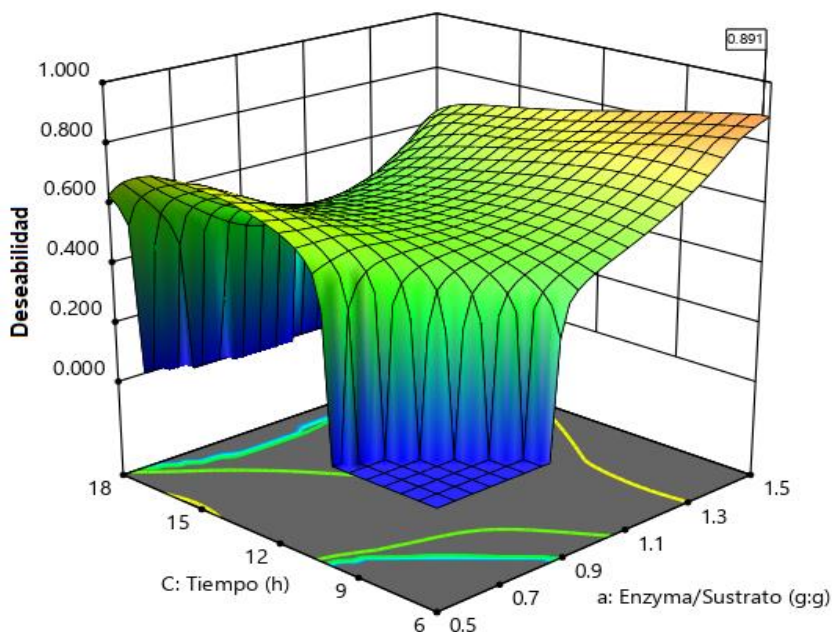


Figura 31: Gráficos de superficie 3D de los valores óptimos para cada factor y respuestas y la deseabilidad en el estudio de extracción de manteca de Copoazú por prensado en frío con previo tratamiento enzimático.

Fuente: Elaboración propia, (2018)

De la optimización multiobjetivo, con un enfoque en la función de deseabilidad, con un valor de 0,825, valor próximo a 1, que satisface a las restricciones consideradas y establece que el máximo rendimiento en manteca extraído a una relación Enzima: sustrato de 1,363:100 g:g, temperatura de inoculación de 43,05 °C y Tiempo de inoculación de 7 horas es de 47,633 g manteca/ 100g muestra en b.s. Por otro lado, a las mismas condiciones se tiene una eficiencia de 80,056 % (Tabla 28). El tratamiento enzimático permitió incrementar el rendimiento en 17,3 % y la eficiencia en 18,65 % respecto a la manteca extraída sin tratamiento enzimático por prensado hidráulico. Según Moreno, et al., (2013) a las condiciones de relación enzima: sustrato 1:3, temperatura de inoculación de 50 °C y 6 horas de incubación, agitación de 4500 rpm, obtuvo 25,367 % de rendimiento de manteca de Copoazú, utilizando enzima comercial Maxoliva®, mientras que en el estudio se utilizó celulasa y hemicelulasa, por tanto, el valor obtenido en el trabajo es muy por encima del valor reportado por Moreno, et al., (2013).

Por otro lado, Ezeh, et al., (2015) para la extracción de nuez de tigre (*Cyperus esculentus*), reporta que el tratamiento enzimático (proteasa y α -amilasa) incrementa su rendimiento respecto al proceso sin tratamiento enzimático de 34 %, respecto al establecido en la investigación que fue de 17,3 %, esto se puede deber a la estructura celular del *C. esculentus* es distinto al de *T. gradiflorum* y también por el uso de distintas enzimas.

En la tabla 28, se observan los valores de los factores y respuestas considerados óptimos para una deseabilidad de 0,825. La calidad de la manteca obtenida a una relación Enzima: sustrato de 1,363:100 g:g, temperatura de inoculación de 43,05 °C y Tiempo de inoculación de 7 horas, son: índice de yodo, $10,171 \pm 0,149$ g I₂/100g, Índice Acidez de $3,333 \pm 0,338$ mg KOH/g, Índice Peróxido de $15,694 \pm 1,087$ mEq O₂/Kg e Índice Saponifican de $138,861 \pm 1,886$ mg KOH/g. Según el Codex Alimentarius, (2001) para el aceites y grasas sin refinar extraídos por prensado en frio el índice de peróxidos es 15 mEq O₂/Kg y el índice de acidez de 4 mg KOH/g, con los cuales se consideran comestibles, en el caso de los resultados obtenidos, están de bajo de estos valores. Así mismo, si se compara los índices de calidad de manteca extraída sin tratamiento enzimático, apreciamos que por efectos del tiempo y temperatura de inoculación enzimáticas llevados a cabo en medio acuoso, contribuyó en el incremento de los índices de acidez y saponificación en 1,719 y 47,761 mgKOH/g y mg KOH/g respectivamente, que nos indica que las cadenas largas de ácidos grasos se han roto, así como el incremento de los ácidos grasos de cadena corta. Por otro lado, el índice de yodo ha disminuido en 63,1 g I₂/100g, que corresponde que la cantidad de ácidos grasos insaturados susceptibles al deterioro se han reducido, así mismo, el índice de peróxidos se ha incrementado en 5,816 mEq O₂/Kg, con una evidencia del leve inicio de la oxidación primaria de la manteca de Copoazú. Estos valores establecidos, están en el rango indicado en (Codex Alimentarius , 2001).

Tabla 28: Soluciones óptimas.

Variable	Unidad	Valor considerado como óptimo
Relación Enzima: sustrato	g:g	1,363:100
Temperatura de inoculación	°C	43,05
Tiempo de inoculación	Hora	7,064
Índice Yodo	g I ₂ /100g	10,171 ± 0,149
Índice Acidez	mg KOH/g	3,333 ± 0,338
Índice Peróxido	mEq O ₂ /Kg	15,694 ± 1,087
Índice Saponifican	mg KOH/g	138,861 ± 1,886
Rendimiento	g/100g	47,633 ± 5,582
Eficiencia	%	80,056 ± 9,382
Deseabilidad		0,825

Fuente: Elaboración propia, (2018)

4.5 Análisis por cromatografía de la manteca de Copoazú (ácidos grasos)

Identificación de los ácidos grasos

En la Tabla 29, se muestran los porcentajes de los ácidos grasos identificados en la manteca de Copoazú sin previo tratamiento enzimático y con tratamiento enzimático, observándose que, la mayor cantidad de ácidos grasos en la manteca de Copoazú es el ácido oleico (w-9), con un valor de 40,94 % y 40,61% m/m, seguido del ácido esteárico de 34,645 % y 34,87 % respectivamente. Ambos representan el 75,58 % a 75,48 % del total de ácidos grasos contenidos en la manteca de Copoazú. Por otro lado, se tiene el 55,75% total grasa saturada respecto al 44,3 % de ácidos grasos insaturados. El efecto del tratamiento enzimático en los ácidos grasos, es la reducción del ácido oleico y linoleico en 0,8 y 1,6 % respectivamente, corroborado por la variación de los índices de calidad. Estos valores establecidos, están en el rango indicado en (Codex Alimentarius , 2001).

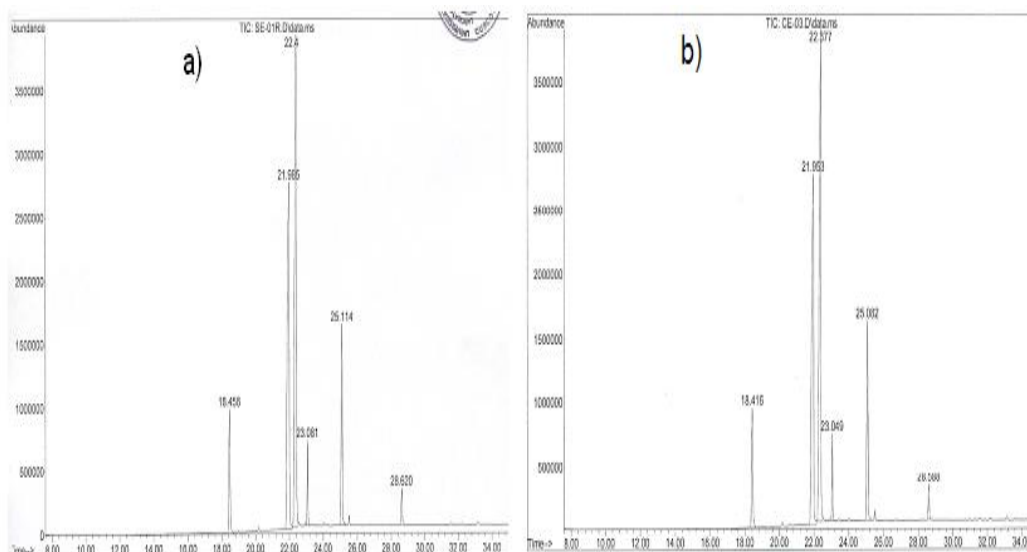


Figura 32: Resultados por cromatografía

Fuente: Elaboración propia (2018)

Tabla 29: Resultado de ácidos grasos

Ácidos	Sin enzima (S/E %)		Con enzima (C/E %)		Promedio	
	M1	M2	M1	M2	S/E %	C/E %
Ácido palmítico	7,48	7,37	7,49	7,37	7,425	7,43
Ácido esteárico	34,85	34,44	34,68	35,06	34,645	34,87
Ácido oleico	40,74	41,14	40,71	40,51	40,94	40,61
Ácido linoleico	3,29	3,53	3,43	3,28	3,41	3,355
Ácido araquídico	11,82	11,74	11,89	11,99	11,78	11,94
Ácido behenico	1,81	1,78	1,8	1,78	11,78	11,94

Fuente: Elaboración propia, (2018)

CONCLUSIONES

- En la investigación se utilizó la metodología de superficie de respuestas (MSR) con el objetivo de determinar la relación que se presenta entre las condiciones de pre-tratamiento enzimático de la semilla de Copoazú (*T. grandiflorum*) por prensado hidráulico. A partir de los resultados obtenidos se obtuvieron las siguientes conclusiones:
- En el proceso de extracción de manteca contenido en semillas de *T. grandiflorum* por prensado hidráulico de muestras previamente adecuadas en la humedad y granulometría de las semillas, temperatura de calentamiento, y presión de prensado. Para una deseabilidad de 0,83; el modelo no lineal de superficie respuesta con R^2 0,9936, maximizando rendimiento y eficiencia, minimizando el valor de los índices de calidad, las condiciones óptimas establecidos fueron: humedad de la muestra 5 %, temperatura de calentamiento 80 °C, granulometría malla # 15 y una presión de prensado hidráulico de 300 bar. A estos valores, se tiene un rendimiento de 39,41 g manteca/100 g muestra b.s., y una eficiencia de 65,16 %, obteniéndose una manteca con los siguientes índices de calidad: acidez de 0,77 mg KOH/g, ácidos grasos libres 0,37 % ác. oleico, índice de saponificación 94,91 mg KOH/g, índice de yodo 35,33 g I₂/100g e índice de peróxidos de 9,22 mEq O₂/Kg, manteca de buena calidad según el Codex Alimentarius 2001.
- La extracción de manteca de semillas de *T. grandiflorum* previamente pre-tratadas con celulasa:hemicelulasa (1:1), según diseño I-optimal, con 13 experimentos. Para $\alpha = 0,05$, los modelos de segundo orden de regresión múltiple, ajustan adecuadamente el comportamiento de la variación de los índices de calidad, el rendimiento y la eficiencia de la manteca extraída por prensado hidráulico, con un error c.a. 1,0 a 1,26 %, el tiempo de inoculación y la relación enzima: sustrato tiene un efecto significativo en el índice de saponificación, rendimiento y eficiencia en la recuperación de grasa inicialmente contenido, manteniendo constante los valores de humedad de la muestra 5 %, tamaño de muestra malla # 15, temperatura de calentamiento de 80 °C por un

lapso de 20 minutos y la presión de prensado de 300 bar. Por otro lado, la interacción de la relación enzima: sustrato y la temperatura de inoculación, es la que muestra un mínimo efecto en el rendimiento de manteca extraída, con test de Fisher es 0,1036866 y el valor p de 0,778.

- Las condiciones óptimas, para muestras con previo tratamiento enzimático, con deseabilidad de 0,825, se establece que el máximo rendimiento en manteca extraído a una relación enzima: sustrato de 1,363:100 g:g, temperatura de inoculación de 43,05 °C y Tiempo de inoculación de 7 horas es de 47,633 g manteca/ 100 muestra en b.s. y una eficiencia de 80,1 %. Por tanto, el tratamiento enzimático permitió incrementar el rendimiento en 17,3 % y la eficiencia en 18,65 % respecto a la manteca extraída sin tratamiento enzimático por prensado hidráulico, debido a mayor área de exposición de los glóbulos grasos de la semilla de *T. grandiflorum* por efecto del pre-tratamiento enzimático.
- Los índices de calidad de la manteca extraída por prensado en frío de semillas con previo tratamiento enzimático, se han incrementado respecto a muestras sin hidrólisis enzimático en 2,56 mg KOH/g, 43,95 mg KOH/g, 6,47 mEq O₂/Kg en los índices de acidez, saponificación y peróxidos respectivamente, mientras que el índice de yodo se ha reducido en 25,159 g I₂/100 g, debido al efecto combinado entre el tiempo y temperatura de inoculación en solución acuosa de enzimas.
- La manteca de Copoazú extraído, tiene una calidad comparable según el Codex alimentarius 2001, para uso alimentario, cosmético y farmacológico, con un contenido de ácido oleico (ω -9) de 40,61 a 40,94 %, ácido esteárico del 34,645 a 34,87 %, y con un contenido de 55,75 % ácidos grasos saturados y 44,3 % de ácidos grasos insaturados. La variación en la composición de los ácidos grasos de la manteca sin tratamiento enzimático con la manteca con previo tratamiento con celulasa:hemicelulasa es insignificante.

SUGERENCIAS

Las siguientes sugerencias para futuras investigaciones siguiendo la línea del proyecto de investigación.

- Por lo contenido proteico de la semilla de Copoazú, del uso de Proteasa sumando a la Celulasa y Hemicelulasa podríamos incrementar el rendimiento en manteca cruda extraída. En la investigación solo se han considerado Celulasa y Hemicelulasa por tanto se recomienda realizar investigaciones adicionales utilizando Proteasa, Celulasa y Hemicelulasa.

- En la investigación se han extraído la manteca cruda con índices de calidad que están dentro de las recomendaciones por el Codex alimentarius (2001), pero no se ha evaluado la vida útil de la manteca, por tanto se sugiere realizar investigaciones adicionales para establecer la vida útil de la manteca cruda de Copoazú.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- Alviárez G., E., Murillo A., W. & Rojanob, B. A., 2016. Caracterización y extracción lipídica de las semillas del cacao amazónico (*Theobroma grandiflorum*). *Revista Ciencia en Desarrollo*, p. Vol. 7 No. 1.
- Archontoulis, S. V. & Miguez, F. E., 2015. Nonlinear regression models and applications in Agricultural research, *Agronomy Journal*. segunda ed. s.l.:Doi 10.2134.
- Argüello, H. & Bolaños, C., 1999. Obtención de frutos de buena calidad y procesamiento de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*). Programa Nacional de Transferencia de tecnología, p. 25.
- Badui, S., 1990. *Química de los alimentos*. Volumen 2.
- Bailey, A., 1961. *Aceites y grasas industriales*. Barcelona: s.n.
- Bailey, A., 1984. *Aceites y grasas industriales*. Primera ed. Zaragoza, España : Reveté S.A.
- Barba Munoz, L. F. & Reyes Teran, O., 2011. Cálculo y diseño de una prensa hidráulica tipo C con capacidad de 20 toneladas, México : s.n.
- Barbosa, W., Nazaré R, F. R. & Nagata, I., 1979. Estudio físicos e químicos de los frutos Bacuri (*Platona insignis*), Cupuacu (*Theobroma grandiflorum*) e Muruci (*Byrsonima crassilia*). *Concurso Brasileiro de Fruticultura* , pp. 797-808.
- Barroso, G. M., Morim, M. P., Peixoto, A. L. & Ichazo C, L. F., 1999. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa..
- Bruchman, 1980. *Bioquímica técnica*. Volumen 1.
- Calzavara, B., 1970. Fruteiras: abeiros, abricozeiro, bacurizeiro, cupuacuzeiro. p. 24.
- Carvalho, S., 2010. Caracterización morfológica de la hoja de girasol, rasgos de frutos y semillas entre brasileña *Theobroma* las especies L.
- Chaar, J., 1980. Composição do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) e conservação de seu néctar por meios físicos e químicos. p. 87.
- Codex Alimentarius , 2001. *Fats, Oils and Related Products*.. segunda ed. s.l.:s.n.
- Codex, 1999. Norma del Codex para aceites vegetales especificados STAN 210.pp. 1-14.
- De Azevedo, A. B., Kopcak, U. & Mohamed, R. S., 2003. Extraction of fat from fermented cupuacu seeds with supercritical solvents, *Journal of Supercritical Fluids*. primera ed. s.l.:Doi: 10.1016/S0896-8446(02)00240.

- Dominguez, H., Nuñez, M. & JM, L., 1994. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds. *Food Chem*, pp. 49, 86.
- Dreosti, I. E., 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine *Nutrition* (16), 692- 694). United States.. pp. 692-694.
- Ezeh, O., H. Gordon, M. & Niranjana, K., 2015. Mejora de la recuperación del aceite de nuez de tigre (*Cyperus esculentus*) Prensado mecánico: Contenido de humedad, tamaño de partícula, alta presión y Efectos enzimáticos previos al tratamiento. *El Sevier*, pp. 355-358.
- FAO, 2008. *Grasas y ácidos grasos en alimentación y nutrición humana*. s.l.:s.n.
- FAO, 2012. *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana*. España: s.n.
- Fennema, O., 2000. *Química de los Alimentos*. España: Acribia Zaragoza.
- Fuentes, L., 2013. Comparación de los Métodos de Extracción Soxhlet, Extracción Asistida por Microondas y Extracción Asistida por Ultrasonido, en el Proceso de Obtención de Extracto de Aloe Vera.
- García Candido, R. & Maziero, P., 2017. Enzymatic pretreatment for edible oils extraction. Segunda ed. Estados Unidos : 13:978-1-4987-5209-1.
- García Candido, R. & Maziero, P., 2017. Enzymatic pretreatment for edible oils extraction. segunda ed. s.l.:13:978-1-4987-5209-1.
- García Moreno, R. I., 2014. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO PARA LA EXTRACCIÓN MECÁNICA DEL ACEITE VEGETAL DE LAS SEMILLAS DE MARACUYÁ (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa Degener*)”.
- Genovese , M. I., S., C. & S., L., 2009. Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and "chocolates" from cocoa and cupuassu. *Issue* 29(4), pp. 810-814.
- Gilabert-Escrivá, M. V., Gonçalves, L. A. G., Silva, L. R. S. & Figueroa, A., 2002. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behavior of fats from seed of Brazilian Amazonian *Theobroma* species. *Food Agric*, pp. 1425-1431.
- González Bustos , A. R. & Peña Chila, F. I., 2015. "Rediseño de un sistema óleo hidráulico de extracción de manteca de cacao", Ecuador: s.n.
- Gonzales, R. y otros, 1996. El cultivo de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) en el pie monte Amazónico.
- Grasso, F., 2013. Diseño del proceso: pretratamiento enzimático para extracción de aceites vegetales en un extractor de columna. En: Argentina: s.n.
- Guan , W. & Shufen Li, Y. R., 2007. Food Chemistry comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. Segunda ed. s.l.:10.1016.

- Guarín, O., 2011. Extracción de aceite de semillas oleaginosas , s.l.: s.n.
- Guerra , E. G. & Zúñiga, M. E., 2003. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipa de uva, vitis vinifera, por prensado en frío. Issue 1, pp. 53-57.
- Gunst, R. F., Myers , R. H. & Montgomery , D. C., 1996. Response surface Methodology: precess and productOptimization Using Designed Experiments. s.l.:10.2307/1270613.
- Gutiérrez, B., 2003. Proyecto de inversión de una planta de extracción y empaque de aceite de aguacate para el rancho villa reguero.
- Hernandez, B. A. s. & Calderon, D. S. S., 2013. "Obtension de una cobertura de chocolate a partir de cacao silvestres, copoazu(theobroma grandiflorum) y maraco (theobroma bicolor), de la amazonia colombiana". colombia: s.n.
- Hernández G, M. S. & Barrera G, J. A., 2009. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - Sinchi.
- Hernández G., M. S. & Barrera G., J. A., 2004. Bases técnicas para el aprovechamiento agroindustrial de especies nativas de la amazonia. Investigación en el Manejo y Transformación de Frutos Nativos de la Amazonia, p. 82.
- Hernández G, M. S. & Barrera G, J. A., 2009. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - Sinchi.
- Hernandez, M. & Barrera, J., 2004. "Manejo pos-cosecha transformacion de frutales nativos promisorio en la amazonia colombiana". En: colombia, santafe de bogota.: s.n., pp. 22-33.
- Hernández, M. & Barrera, J., 2004. Manejo pos-cosecha transformación de frutales nativos promisorio en la Amazonía Colombiana. En: Colombia, Santafe de Bogotá.: s.n., pp. 22-33.
- Izquierdo Vega , J. A., 2012. Cinética Enzimática, México: s.n.
- Jensen, W. B., 2007. The Origin of the Soxhlet Extractor. Chemycal Education.
- Jimenez, A. Y., Aguilera Uceda, M., Gaforio J, J. & Beltrán, G., 2010. Influence of olive paste preparation conditions on virgin olive oil triterpenic compounds at laboratory-scale. Food Chemistry 119, pp. 765-769.
- Kashyap, M. y otros, 2007. Oil extraction rates of enzymatically hydrolyzed soybeans. Jorunal of Food Engineering, pp. 611-217.
- Lafont, J., Páez, M. & Portacio, A., 2011. Extraccion y caracterizacion fisicoquímica del aceite de la semilla (almendra) del marañon (Anacardium occidentale L). Información Tecnológica, 22(1), pp. 51-58.
- Lannes S, C., Medeiros M, L. & Gioielli L, A., 2003. Las interacciones físicas entre las grasas interacciones físicas entre las grasas ccopcopCopoazú y el oazú

- y el oazú y el oazú y el oazú y el oazú y el oazú y el oazú y el oazú y el oazú y el oazú y el cacao. *Grasas y Aceites*. pp. 253-258.
- Lannes, S., Medeiros, M. & Gioielli, L., 2004. Rheological properties of cupuassu and cocoa fats. *Grasas y Aceites*. s.l.:s.n.
- Lawson, H., 1999. *Aceites y grasas alimentarios, tecnología, utilización y nutrición*. Zaragoza: Acribia: s.n.
- Lim, K. T., 2012. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plant:, Fruits.. Volumen 3*.
- Lorena Arriaga, C., 2007. Contenido de Ácidos Grasos de la manteca proveniente de mezclas, en distintas fracciones, de semillas de *Theobroma cacao* y *Theobroma bicolor* y su uso en la manufactura de chocolate..
- Lucias Loayza, L. J., 2018. Caracterización agro-morfológica de Copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schum.) en la Estación Experimental de Sapecho, Alto Beni, La Paz. *Revista Carrera de Ingeniería Agronómica – UMSA*.
- Luque de Castro, M. D. & Priego Capote, F., 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Chromatography*: 10.1016.
- Martinez , A., Perez , M. & Perez , L., 2010. (Martinez E., y otros, 2006).. pp. 34:240-246.
- Martini, M., 2004. Caracterização das sementes de seis espécies de *Theobroma* em relação ao *Theobroma cacao* L..
- Martini, M. E., Goncaves Lenci, C., Figueira , A. & De Queiroz Tavares, D., 2008. Mucilage pockets in cotyledon tissue of *Theobroma*. *Brasil*, Volumen 1, pp. 147-154.
- Medeiros, M., AMIB, A., RNM, P. & SCS, L., 2006. Isotermas de sorción Cacao y productos de Copoazú. *J. Eng Alimentos*, pp. 402-406.
- Medina, M. B. G., 2016. *aceites y grasas comestibles*, s.l.: s.n.
- Montgomery, 2010. *Design and Analysis of Experiments*. En: s.l.:10.1007/b97673.
- Moreno Liliana, S. A. C. J. C. D., 2012. Caracterización físicoquímico d ela grasa de las semillas del fruto de Copoazú. *alimentos hoy*, 22(30).
- Moreno, A., Sandoval, L., Criollo , J. & Criollo, D., 2013. Caracterizacion fisicoquimica de la grasa de las semillas del fruto de copoazu. *alimentos hoy*.
- Moreno, L., Sandoval, Á., Criollo, Y. & Criollo, D., 2013. Caracterizacion fisicoquímica de la grasa de las semillas de Copoazú. *Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 22(30).
- Nader, J., Fawaz, N., Afit, C. & Louka, N., 2016. A novel process for preparing low-fat peanuts: Optimization of the oil extraction yield with limited structural and organoleptic damage. *Food Chemistry*, Issue 197, p. 1215–1225.

- Najafian, L., Ghodsvali, A., Haddad, M. & Diosady, L., 2009. Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food research international* , pp. 171-175.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M., 2005. *Principios de Bioquímica*. En: s.l.:Omega, p. 1152.
- Nyam, L. y otros, 2009. Enzyme-assisted aqueous extraction of kalahari melon seed oil. *Journal of the american oil chesmists society*, pp. 1235-1240.
- Óbrien, R., 2009. *Fats and Oils. Formulating and processing for aplicaciones*. Tercera ed. USA: CRC Press.
- Ogunsina, B. S., Olatunde, G. A. & Adeleye, O., 2014. Effect of Pre-Treatments on Mecchanical Oil Expression Fron Dika Kernels. *Nigerian Food Journal*.
- Owolarafe , O. K., 2008. Mathematical modelling and simulation of the hydraulic expression of oil from oil palm fruit. s.l.:10.1016.
- Pancardo Lagunas, I. A., 2016. Efecto del procesamiento del cacao (*Theobroma cacao L.*) en la capacidad antioxidante durante la obtención de licor y cocoa.
- Peña, R. S., 2008. *Guia de practica de laboratorio*. Puno: s.n.
- Pugliese, A. G., Tomas Barbera, F. A., Truchado, P. & Genovese, M. I., 2013. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and Antioxidant Activity of *Theobroma grandiflorum* (cupuassu) Pulp and Seeds. 20 Marzo, Volumen 61, pp. 2720-2728.
- Reed, G., 1975. *Enzymes in food processing*. Volumen 2, p. 573.
- Rojas Gonzales, S., Zapata Ortiz, J. A., Pereira, A. & Varon, E., 1996. *Cultivo de copoazu*.
- Rojas, G., 1996. *El cultivo de Copoazú Ttheobroma grandiflorum) en el pie monte Amazónico..*
- Rojas, J. & Burbano, F., 2012. Efecto de un pretratamiento enzimático en el proceso de obtención de la semilla del mango (*Mangifera Indica L.*).
- Rojas, S. & Escobar, A., 1996. *CORPOICA. Programa Regional Agrícola. El Cultivo de cupuazú (Theobroma grandiflorum).. Colombia: s.n.*
- Rosenthal, A., Pyle, D. & Niranjana, K., 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. pp. 402-420.
- Ruiz, M. V. & Huesa, L. J., 1991. *La manteca de karité. Instituto de la Grasa y sus Derivados. C.S.I.C., Volumen 42, pp. 151-154.*
- Santos, M., 1982. *Caracterização física, química e tecnológica do bacuri (Platonia insignis Mart.) e seus produtos*. p. 63.
- Santos, r. C., Pires, J. L. & Correa, R. X., 2012. Morphological characterization of the leaf, sunflower, fruit and seed traits among Brazilian theobroma species L. *Evol gerent rescur cullivos*, pp. 327-345.

- Scussel, V. M. M., D, S. G. & EH., M., 2014. La estereoscopia y la microscopia electrónica de barrido de la nuez de Brasil (Bertholletia. Ciencia de los Alimentos, Issue 79: 1443-1453.
- Shahidi, F., 2005. Bailey's Industrial Oil and Fat products. Sexta ed. EUA: Wiley Intersciencie.
- Silva, C. R., Figueira A, V. & E.C.A.S., S., 2001. Diversidade no gênero Theobroma. In Melhoramento genético do cacauero. pp. 49-50.
- Silva, W. d., 1988. Gordura de cupuaçu: sucedâneo da manteiga de cacau. p. 124.
- Sineiro, J., Domínguez, H. & Nuñez , M., 1998. Influencia del tratamiento enzimático en la calidad de aceites vegetales. Grasas y Aceites, Volumen 49 , pp. 191-202.
- Souza A, V., Vasconcelos, L., Araújo, E. & Alves, R. B., 2000. Platonía insignis Mart.). Jaboticabal Série Frutas Nativas. p. 72.
- Souza, A. d. G. C. y otros, 1996.. Fruteiras da Amazônia.. 85-85007-92-3 ed. Botânica: Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Manaus: EMBRAPA-CPAA,.
- Subroto, E., 2015. Optimization of mechanical oil extraction from Jatropha curcas L: Kernel using responde surface method. s.l.:10.1016.
- Venturieri, G. A., Alves, M. & Nogueira, 1984. Venturieri, GA; Alves, MLB; Nogueira, cultivando MD copuazú. Informe de la Sociedad Brasileña de frutas tropicales, v. 4, p. 15-17, 1984.. pp. 15-17.
- Villachica, H., 1996. Frutales y Hortalizas promisorias de la Amazonia. Tratado de Cooperación Amazónica.. Secretaría Pro Tempore. Lima, p. 367.
- Wiseman, A., 1991. Manual de biotecnología de los enzimas. España: Acibia S.A..
- Zapata, J., Pereira, A. & Varon, E., 1996. "Cultivo de copoazu". En: España: s.n., pp. 3-12.

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Indicadores	Índices
¿Qué relación se presenta entre las condiciones de pre-tratamiento enzimático de la semilla de Copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>) en la variación de los índices de calidad, y el rendimiento en manteca cruda extraídos por prensado hidráulico?	<p>Objetivo General: Determinar la relación que se presenta entre las condiciones de pre-tratamiento enzimático de la semilla de Copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>) con la variación de los índices de calidad, y el rendimiento en manteca cruda extraídos por prensado hidráulico.</p> <p>Objetivos Específicos: OE₁: Establecer las condiciones operativas óptimas del proceso de extracción de manteca de Copoazú por prensado hidráulico de muestras sin tratamiento enzimático. OE₂: Establecer una relación matemática de superficie de respuestas entre la cantidad de</p>	<p>H₁: El incremento del área de exposición de los glóbulos grasos de la semilla de Copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>) por efecto del pre-tratamiento enzimático, incrementa el rendimiento en la cantidad de grasa extraída por prensado hidráulico, y los índices de calidad no se modifican sustancialmente respecto a la semilla cruda.</p> <p>H₀: El incremento del área de exposición de los glóbulos grasos de la semilla de Copoazú (<i>Theobroma grandiflorum</i>)</p>	Variables Independientes: Pre-tratamiento enzimático de la semilla de Copoazú		
			Pre-tratamiento enzimático	Enzima:sustrato (g:g)	0,5; 0,64; 1,02; 1,04; 1,055; 1,5
				Temperatura de hidrólisis enzimática (°C)	30; 32; 40,4; 40,7; 40,8; 50
				Tiempo tratamiento enzimático (horas)	6; 7,2; 10,08; 11,7; 11,82; 12; 15,6; 16,74; 16,8; 18
			Variables Dependientes: Rendimiento y calidad de manteca obtenida por prensado hidráulico		
			Índice de calidad de la manteca de Copoazú	Y ₁ : Índice de acidez	(mg de KOH/g)
				Y ₂ : Índice de saponificación	(mg de KOH/g)
				Y ₃ : Índice de Yodo	(g I ₂ /100 g)
Y ₄ : Índice de peróxidos	(mEq O ₂ /kg)				
Rendimiento de manteca obtenida	Relación entre cantidad grasa extraída y el total	(g/100g*100)			

	<p>enzima:sustrato (semilla particulada), tiempo y temperatura de inoculación con el rendimiento de manteca extraída por prensado hidráulico de muestras de semilla de Copoazú previamente sometidos a tratamiento enzimático.</p> <p>OE₃: Optimizar las condiciones operativas, minimizando la variación de los índices de calidad y maximizando el rendimiento y eficiencia de manteca extraída por prensado hidráulico.</p> <p>OE₄: Evaluar la variación en la composición de ácidos grasos de la manteca extraída por prensado hidráulico de muestras sin y con previo tratamiento enzimático.</p>	<p>por efecto del pre-tratamiento enzimático, no incrementa el rendimiento en la cantidad de grasa extraída por prensado hidráulico, y los índices de calidad se modifican sustancialmente respecto a la semilla cruda.</p>		disponible	
--	--	---	--	------------	--

Fuente: Elaboración propia, (2018)

Anexo 2: Solicitud de autorización para realización de estudios



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS

LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

CONSTANCIA DE ANÁLISIS

El que suscribe, Responsable del Laboratorio de Cromatografía de la Facultad De Ciencias de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, a de constar.

Que las bachilleres Deysi Mogrovejo Barra y Eusebia Torres Yalli, de la Universidad Nacional Amazonica de Madre de Dios, han presentado al laboratorio 4 muestras denominadas "Manteca de Copoazú", para su caracterización e identificación de Ácidos grasos presentes. Para tal fin se ha utilizado el Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N, acoplado a un Espectrómetro de Masas Agilent 6890N para la caracterización de ácidos grasos, la identificación se basó en la comparación de las señales del espectro de masas de la muestra con los datos compilados en la librería FAME-DB23 y NIST v011 Wiley, con los siguientes resultados que se detalla a continuación.

Cusco, 24 de Octubre del 2018



Quim. Jorge Choquenaira Parí
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría - UNSAAC.
CGP - 914



Condiciones de Análisis de Ácidos Grasos

Cromatógrafo: Agilent 6890N
Software de Control: Chemstation B 030
Detector de Masas Agilent: 5975B
Energía de Ionización: 70eV
Modo de Ionización: Impacto Electrónico (IE)
Modo de escaneo de masas: 40 400 uma
Retraso del disolvente: 7.0 minutos

Inyector Automático: Agilent 7683B

Columna: DB-23, 60m x I.D 0.250 x 0.15um Film.

Condiciones del cromatografo.

Temperatura del Horno inicial 140°C

Rampa:

Pasos	°C/min	temp °C	Final time
Inic.	0	140	
1	0	140	5.00
2	5.00	230	12.00

Tiempo de Corrida: 35.00 min

Puerto de Inyección

Modo: Split
Relación de Split: 10:1
Temp. Inicial: 250 °C
Tipo de Gas: Helio
Flujo: 0.8 mL/min

Volumen de Inyección: 0.1uL



Quim. Jorge Choquenaija Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría - UNSAAC.
CDP - 914

Data Path : D:\DATA MSD\ACIDOS GRASOS\2018\Manteca Copoazu-DMB-ETY\
 Data File : SE-01R.D
 Acq On : 24 Oct 2018 16:17
 Operator : JCHP
 Sample : Manteca de Copoazu
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1



Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 0
 Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: RTE Integrator - rteint.p

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	18.458	7.48	C:\Database\Famedb23.L			
			C 16:0	12	000112-39-0	99
			C 15:0	10	007132-64-1	72
			C 14:0	8	000124-10-7	72
2	21.985	34.85	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:0	16	000112-61-8	98
			C 14:0	8	000124-10-7	93
			C 16:0	12	000112-39-0	58
3	22.408	40.74	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:1 (trans - 9) (omega 9)	17	001937-62-8	99
			C 18:1 (cis - 9) (omega 9)	18	000112-62-9	99
			C 15:1 (cis - 10)	11	090176-52-6	68
4	23.081	3.29	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6)	20	000112-63-0	99
			C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6)	19	002566-97-4	99
			C 20:3 (cis - 8,11,14) (omega 6)	27	001783-84-3	4
5	25.114	11.82	C:\Database\Famedb23.L			
			C 20:0	23	001120-28-1	99
			C 16:0	12	000112-39-0	76
			C 13:0	7	001731-88-0	53
6	28.620	1.81	C:\Database\Famedb23.L			
			C 22:0	30	000929-77-1	99
			C 10:0	4	000110-42-9	58
			C 16:0	12	000112-39-0	47

ACIDO GRASO-17.M Wed Oct 24 17:02:58 2018 UNSAAC



 Jorge Choquenadra Part
 Q.Q.P. N° 914

D:\DATA MSD\ACIDOS GRASOS\2018\Manteca Copoazu-DMB-ETY\SE-01

R.D

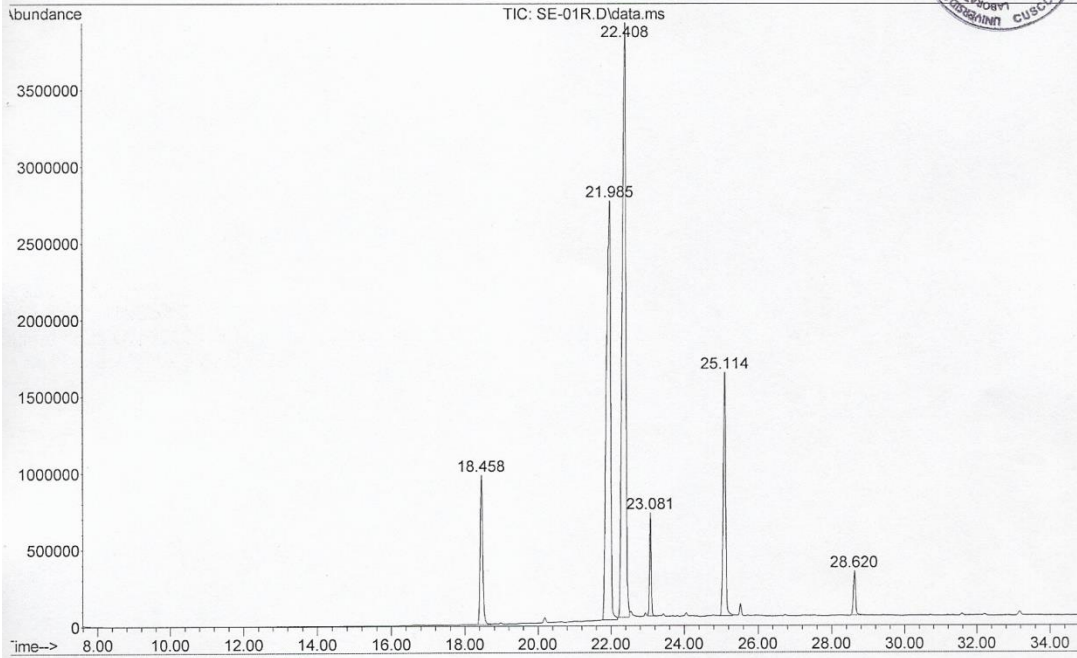
Operator : JCHP

Instrument : UNSSAC

Acquired : 24 Oct 2018 16:17 using AcqMethod ACIDO GRASO-18.M

Sample Name: Manteca de Copoazu

Sample Info :



Jorge Choquenatra Pari
Jorge Choquenatra Pari
C.O.P. N° 914

Lab Cromatografia UNSAAC Library Search Report

Data Path : D:\DATA MSD\ACIDOS GRASOS\2018\Manteca Copoazu-DMB-ETY\
 Data File : SE-02.D
 Acq On : 24 Oct 2018 13:48
 Operator : JCHP
 Sample : SE-02
 Misc :
 ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: RTE Integrator - rteint.p

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	18.416	7.37	C:\Database\Famedb23.L			
			C 16:0	12	000112-39-0	99
			C 15:0	10	007132-64-1	72
2	21.953	34.44	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:0	16	000112-61-8	98
			C 14:0	8	000124-10-7	93
3	22.377	41.14	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:1 (cis - 9) (omega 9)	18	000112-62-9	99
			C 18:1 (trans - 9) (omega 9)	17	001937-62-8	99
4	23.054	3.53	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6)	20	000112-63-0	99
			C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6)	19	002566-97-4	99
5	25.083	11.74	C:\Database\Famedb23.L			
			C 20:0	23	001120-28-1	99
			C 16:0	12	000112-39-0	76
6	28.593	1.78	C:\Database\Famedb23.L			
			C 22:0	30	000929-77-1	99
			C 10:0	4	000110-42-9	58
			C 16:0	12	000112-39-0	47

ACIDO GRASO-17.M Wed Oct 24 17:25:52 2018 UNSAAC



Jorge Choquendra Pari
 Jorge Choquendra Pari
 C.Q.P. N° 014

:D:\DATA MSD\ACIDOS GRASOS\2018\Manteca Copoazu-DMB-ETYSE-02

.D

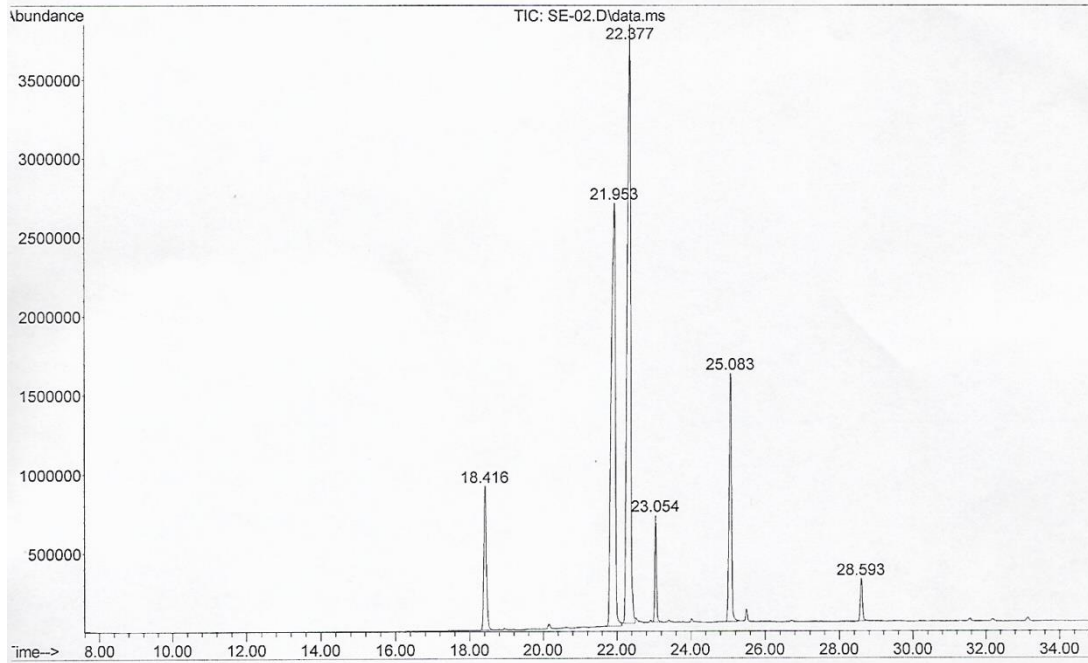
Operator : JCHP

Instrument : UNSSAC

Acquired : 24 Oct 2018 13:48 using AcqMethod ACIDO GRASO-18.M

Sample Name: SE-02

Sample Info :



Jorge Lhoquenaira Pari
C.Q.P. N° 914

Data Path : D:\DATA MSD\ACIDOS GRASOS\2018\Manteca Copoazu-DMB-ETY\
 Data File : CE-03.D
 Acq On : 24 Oct 2018 14:31
 Operator : JCHP
 Sample : CE-03
 Misc :
 ALS Vial : 3 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: RTE Integrator - rteint.p

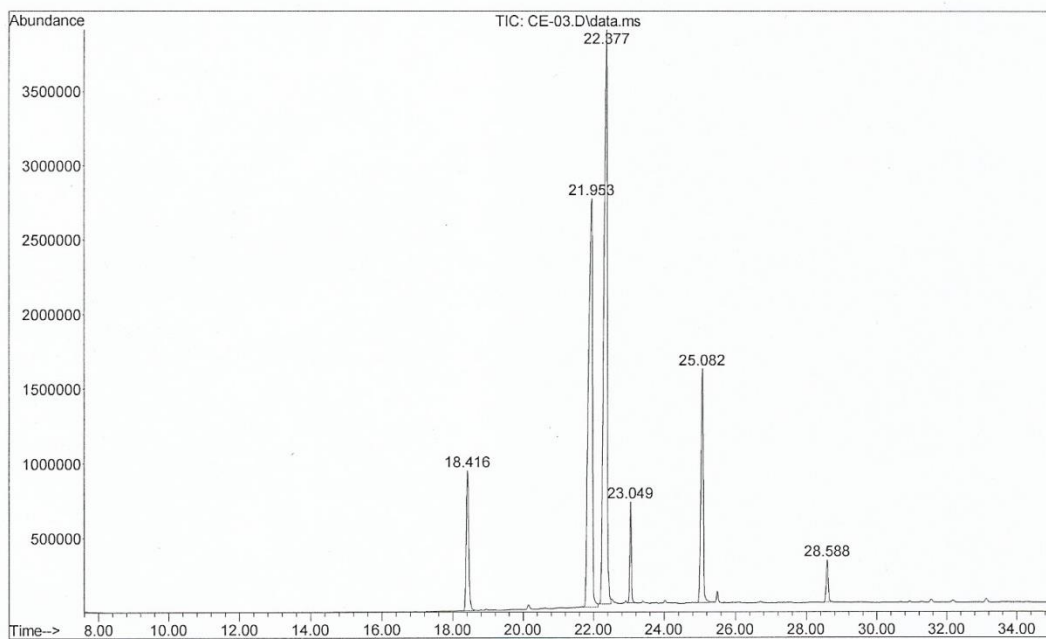
Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	18.416	7.49	C:\Database\Famedb23.L			
			C 16:0	12	000112-39-0	99
			C 15:0	10	007132-64-1	72
			C 14:0	8	000124-10-7	64
2	21.953	34.68	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:0	16	000112-61-8	98
			C 14:0	8	000124-10-7	94
			C 16:0	12	000112-39-0	58
3	22.377	40.71	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:1 (cis - 9) (omega 9)	18	000112-62-9	99
			C 18:1 (trans - 9) (omega 9)	17	001937-62-8	99
			C 16:1 (cis - 9)	13	001120-25-8	64
4	23.049	3.43	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6)	20	000112-63-0	99
			C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6)	19	002566-97-4	99
			C 20:3 (cis - 8,11,14) (omega 6)	27	001783-84-3	4
5	25.082	11.89	C:\Database\Famedb23.L			
			C 20:0	23	001120-28-1	99
			C 16:0	12	000112-39-0	76
			C 12:0	6	000111-82-0	53
6	28.588	1.80	C:\Database\Famedb23.L			
			C 22:0	30	000929-77-1	99
			C 10:0	4	000110-42-9	49
			C 15:0	10	007132-64-1	40

ACIDO GRASO-17.M Wed Oct 24 17:27:47 2018 UNSAAC



Jorge Choquenaira Parl
 C.Q.P. N° 914

File :D:\DATA MSD\ACIDOS GRASOS\2018\Manteca Copoazu-DMB-ETY\CE-03
... .D
Operator : JCHP
Instrument : UNSSAC
Acquired : 24 Oct 2018 14:31 using AcqMethod ACIDO GRASO-18.M
Sample Name: CE-03
Misc Info :



Jorge Choquenatta Pari
Jorge Choquenatta Pari
C.Q.P. N° 914

Lab Cromatografia UNSAAC Library Search Report

Data Path : D:\DATA MSD\ACIDOS GRASOS\2018\Manteca Copoazu-DMB-ETY\
 Data File : CE-04.D
 Acq On : 24 Oct 2018 15:14
 Operator : JCHP
 Sample : CE-04
 Misc :
 ALS Vial : 4 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\Famedb23.L Minimum Quality: 0

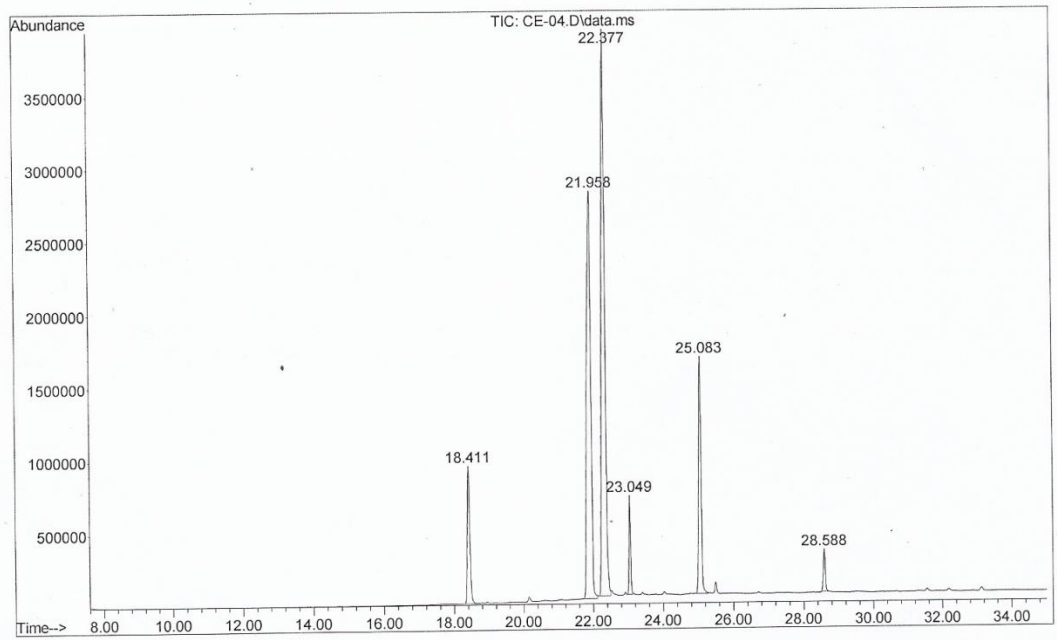
Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: RTE Integrator - rteint.p

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	18.411	7.37	C:\Database\Famedb23.L			
			C 16:0	12	000112-39-0	99
			C 15:0	10	007132-64-1	72
			C 14:0	8	000124-10-7	72
2	21.958	35.06	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:0	16	000112-61-8	99
			C 14:0	8	000124-10-7	93
			C 16:0	12	000112-39-0	58
3	22.377	40.51	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:1 (cis - 9) (omega 9)	18	000112-62-9	99
			C 18:1 (trans - 9) (omega 9)	17	001937-62-8	99
			C 16:1 (cis - 9)	13	001120-25-8	64
4	23.049	3.28	C:\Database\Famedb23.L			
			C 18:2 (cis,cis - 9,12) (omega 6)	20	000112-63-0	99
			C 18:2 (trans,trans - 9,12) (omega 6)	19	002566-97-4	99
			C 20:3 (cis - 8,11,14) (omega 6)	27	001783-84-3	4
5	25.083	11.99	C:\Database\Famedb23.L			
			C 20:0	23	001120-28-1	99
			C 16:0	12	000112-39-0	76
			C 13:0	7	001731-88-0	53
6	28.588	1.78	C:\Database\Famedb23.L			
			C 22:0	30	000929-77-1	99
			C 16:0	12	000112-39-0	50
			C 12:0	6	000111-82-0	50

ACIDO GRASO-17.M Wed Oct 24 17:29:13 2018 UNSAAC



File :D:\DATA MSD\ACIDOS GRASOS\2018\Manteca Copoazu-DMB-ETY\CE-04
... .D
Operator : JCHP
Instrument : UNSSAC
Acquired : 24 Oct 2018 15:14 using AcqMethod ACIDO GRASO-18.M
Sample Name: CE-04
Misc Info :





Jorge Choquenaira Pari
S.O.F. N° 914



Universidad Nacional del Altiplano - Puno
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Ciudad Universitaria, Av. Sesquicentenario N° 1150, Telf.: (051)599430 / IP. 10301 / (051) 366080



CONSTANCIA DE ANALISIS

El que suscribe Responsable del Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos de la Escuela Profesional de Ingeniería de Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agrarias UNA-PUNO.

Que la Bachiller DEYSI, MOGROVEJO BARRA y EUSEBIA, TORRES YALLI, de la Universidad Amazónica de Madre de Dios ha presentado al Laboratorio 19 muestras denominado Manteca de copoazú sin pre tratamiento enzimático y 13 "Manteca de copoazú con tratamiento enzimático" para la Determinación de INDICE DE PEROXIDO, INDICE DE IODO, INDICE DE ACIDEZ E INDICE DE SAPONIFICACION, con los siguientes resultados que se detalla a continuación.

Puno, C.U. 17 de Setiembre del 2018



[Handwritten Signature]
Oswaldo Arpezi Alca
INGENIERO AGROINDUSTRIAL
C.I.P. 160025





Universidad Nacional del Altiplano - Puno
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Ciudad Universitaria, Av. Sesquicentenario N° 1150, Telf.: (051)599430 / IP. 10301 / (051) 366080



Pag. 1 de 7

LABORATORIO DE EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE ALIMENTOS

INFORME DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS N° 0033-2018-LENA-EPIA



SOLICITANTE : DEYSI, MOGROVEJO BARRA
EUSEBIA, TORRES YALLI
PROCEDENCIA : UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZONICA DE MADRE DE DIOS
TESIS : "EXTRACCIÓN DE MANTECA DE COPOAZU (Thea5broma grandiflorum Willd. Ex Sprin. K. Schum) POR PRENSADO HIDRAULICO DE SEMILLAS PRE-TRATADAS ENZIMÁTICAMENTE."
PRODUCTO : Manteca de copozú sin pre tratamiento enzimático
ANÁLISIS SOLICITADO : INDICE DE PEROXIDO, INDICE DE IODO, INDICE DE ACIDEZ E INDICE DE SAPONIFICACION
FECHA DE RECEPCION : 11-04-2018
FECHA DE ENSAYO : 11-04-2018
FECHA DE EMISION : 15-04-2018

[Handwritten signature]
Oswaldo Alpasi Aleg
Magister en Ingeniería Agroindustrial
N.º 18023

RESULTADOS:

de acuerdo al Informe de los Análisis de Laboratorio que obra en los archivos los resultados





Universidad Nacional del Altiplano - Puno
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Ciudad Universitaria, Av. Sesquicentenario N° 1150, Telf.: (051)599430 / IP. 10301 / (051) 366080



Pag. 2 de 7

—MUESTRAS SIN PRE-TRATAMIENTO ENZIMÁTICO - ÍNDICE DE CALIDAD

Nº	Granulometría (# malla)	Tº (°C)	Humedad muestra (%)	Presión de prensado (bar)	Resultado de peróxido	Resultado de yodo	Resultado de acidez	resultado de saponificación
					(mEqO2/Kg)	(gI2/100g)	(mg de KOH/G)	(mg de KOH/G)
1	10	60	7	150	9.5749	48.8077	1.5377	92.7309
2	10	80	7	250	9.2098	79.3125	1.2547	93.7227
3	15	70	4	200	10.6157	34.5126	2.0922	97.8060
4	15	70	10	200	10.3645	31.8623	1.2455	69.2459
5	10	80	13	150	9.6506	64.3192	2.5393	107.9417
6	10	60	13	250	9.6693	70.2482	1.4835	86.6220
7	15	70	10	300	9.5584	45.3214	1.4804	97.9997
8	15	70	16	200	19.1005	60.5353	1.2664	92.9015
9	15	50	10	200	10.2076	72.5143	1.5265	108.7690
10	25	70	10	200	10.3288	24.9367	1.7199	88.6151
11	20	80	13	150	9.3756	24.6625	1.9828	77.4523
12	20	60	7	150	18.1258	63.7397	1.7565	104.9633
13	20	60	13	250	20.4116	25.5659	1.4954	68.4683
14	20	80	7	250	16.2162	25.9461	1.2447	91.9605
15	5	70	10	200	9.5639	72.3143	2.5978	109.1064
16	15	70	10	200	9.5602	73.3937	1.4931	99.0074
17	15	90	10	200	12.6582	65.9516	1.5016	64.9858
18	15	70	10	200	18.0148	70.0138	1.7502	100.1193
19	15	70	10	100	18.3824	26.2552	1.2458	81.1862

INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
 Oficina de Evaluación y Acreditación
 Jefatura de Alimento y Alimentación
 UNA-PUNO

[Handwritten Signature]
 Oficina de Alimento y Alimentación
 Ingeniería Agroindustrial
 C.I.P. 160625

