

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo final de graduación bajo la modalidad de proyecto presentado a
la Escuela de Tecnología de Alimentos para optar por el grado de
Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

**Extracción y recuperación de aceite de semilla de guayaba
(*Psidium guajava* L.) a nivel de laboratorio y evaluación de sus
propiedades fisicoquímicas**

Paola Gutiérrez Coto

B02885

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

Agosto, 2018

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:

Paola Gutiérrez Coto

Aprobado por:

M.Sc. Pedro Vargas Aguilar
Presidente del Tribunal

Ing. Eduardo Thompson Vicente
Director del Proyecto

M.Sc. Hermes Alvarado Montero
Asesor del Proyecto

M.Sc. Marvin Soto Retana
Asesor del Proyecto

Licda. Ana María Quirós Blanco
Profesora Designada

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Este trabajo se encuentra protegido por las leyes de propiedad intelectual; por tal motivo se prohíbe la reproducción parcial o total del mismo por parte de terceros.

DEDICATORIA

A mis papás, a mis hermanas, a mis amigos y a Sebas. Por apoyarme e impulsarme a lograr mis metas.

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá y a mi papá, por guiarme siempre por el mejor camino. Gracias por creer en mí y siempre estar presentes para que pudiera cumplir mis metas. Gracias por darme todo lo que necesité para llegar hasta donde estoy hoy.

A Sebas, por coincidir a mitad de esta gran aventura y crecer juntos desde ahí. Gracias por tanta ayuda apoyo y amor incondicional en todos estos años. También por la paciencia en mis crisis, los consejos y el impulso para lograr las cosas. Este logro también es tuyo.

A mi comité asesor. Al prof. Hermes Alvarado y prof. Marvin Soto por su disposición y ayuda durante todo el proyecto. Y especialmente al prof. Eduardo Thompson, por su inmensa paciencia, compromiso y dedicación con el proyecto, a pesar de las dificultades.

A mis compañeros y amigos de la U, con todos los que compartí momentos de diversión, risas, estrés, especialmente las chicas B1. Y a Danni, gracias por ser parte de mi vida durante toda la U.

A las remochas, Fabi, Vane y Verny. Por todos los proyectos en los que trabajamos juntos y que nos unieron aún más. Por todos los momentos buenos y malos que pasamos para lograrlo.

A mis amigos del cole, Deny, Adrián, Brenda, Mincho y Eddy. Gracias por sus chistes y apoyo siempre. Sin ustedes la vida no sería igual.

A Giova y Luis, gracias por toda la disposición y ayuda en el laboratorio. A Camacho y Alonso por toda la colaboración en planta. Gracias a los chicos del Laboratorio de Química del CITA, a los profes y personal de la Escuela de Tecnología de Alimentos, quienes fueron parte de mi formación. Siempre estaré muy agradecida por todo el cariño, conocimiento y ayuda que me brindaron.

ÍNDICE GENERAL

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xv
1. JUSTIFICACIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo General	8
2.2. Objetivos Específicos	8
3. MARCO TEÓRICO	9
3.1. Generalidades de la guayaba.....	9
3.1.1. Composición general de la guayaba.....	10
3.1.2. Propiedades de la guayaba.....	11
3.1.3. Producción de guayaba y subproductos de su procesamiento en Costa Rica.....	12
3.2. Aceites vegetales.....	13
3.2.1 Generalidades y composición	14
3.2.2. Propiedades fisicoquímicas de los aceites	16
3.2.3. Aceite de semillas de guayaba	23
3.3. Extracción de aceites	25

3.3.1. Extracción mecánica	26
3.3.2. Extracción con disolventes	26
3.3.3. Variables que influyen en el proceso de extracción de aceite con disolventes.....	28
3.3.4. Disolventes alternativos.....	31
3.4. Ultrasonido, aplicación en la industria alimentaria.....	32
3.4.1. Principios del uso de ultrasonido	32
3.4.2. Extracción de aceite asistida por ultrasonido (EAU)	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1. Localización.....	36
4.2. Materia Prima.....	36
4.3. Preparación de la materia prima	36
4.4. Caracterización de la materia prima	38
4.5. Comparación del rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.....	38
4.5.1. Diseño experimental.....	38
4.5.2. Procedimiento	39
4.5.3. Análisis estadístico	43
4.6. Determinación de las condiciones óptimas de extracción.....	43
4.6.1. Diseño experimental.....	43
4.6.3. Análisis estadístico	47
4.6.4. Validación del punto óptimo.....	47
4.7. Cinéticas de extracción	47
4.8. Evaluación de la calidad del aceite obtenido utilizando parámetros fisicoquímicos	48
4.9. Métodos de análisis físicos y químicos.....	49
4.8.1. Humedad.....	49

4.8.2. Grasa total.....	49
4.8.3. Tamaño de partícula promedio	49
4.8.4. Perfil de ácidos grasos	50
4.8.5. Densidad	50
4.8.6. Índice de refracción.....	50
4.8.7. Índice de saponificación	50
4.8.8. Índice de yodo.....	51
4.8.9. Índice de acidez.....	51
4.8.10. Índice de peróxidos	51
4.8.11. Determinación de coeficientes de extinción K_{232} y K_{270} (dienos y trienos conjugados).....	51
4.8.12. Tocoferoles	52
4.8.13. Reporte de resultados	53
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
5.1. Caracterización del residuo de semillas de guayaba seco	54
5.2. Comparación del rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.....	56
5.3. Determinación de las condiciones óptimas de extracción.....	60
5.3.1. Análisis de los resultados del diseño central compuesto.....	60
5.3.2. Evaluación del modelo de regresión cuadrático	62
5.3.3. Evaluación de las superficies de respuesta de la extracción convencional de aceite de semilla de guayaba con acetato de etilo	64
5.3.4. Condiciones de extracción para maximizar el rendimiento de aceite	66
5.3.5. Verificación del modelo de superficie de respuesta.....	68
5.3.6. Evaluación de la cinética de extracción.....	70
5.4. Evaluación de la calidad del aceite.....	72
6. CONCLUSIONES.....	84

6.1. Comparación del rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido.....	84
6.2. Determinación de las condiciones óptimas de extracción	84
6.3. Evaluación de la calidad del aceite obtenido utilizando parámetros fisicoquímicos	85
7. RECOMENDACIONES	86
8. REFERENCIAS.....	87
9. APÉNDICE	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Oxidación de ácidos grasos insaturados (AGI) y formación y descomposición de hidroperóxidos, como compuestos primarios de la oxidación. Adaptado de Morales y Przybylski (2013).	19
Figura 2. Presentación comercial de aceite de semillas guayaba (Best Nature's Cosmetic, 2018).	25
Figura 3. Etapas en las que se divide la cinética de una extracción con disolvente. Tomado de Chan, Yusoff y Ngoh (2014).	27
Figura 4. Fenómeno de cavitación generado por el ultrasonido (Tomado de Rutkowska, Namieśnik y Konieczka, 2017).	33
Figura 5. Diagrama de bloques de la preparación del residuo de guayaba previo a la extracción de su aceite.	37
Figura 6. Esquema del sistema de extracción de aceite asistida con ultrasonido (elaboración propia).	40
Figura 7. Diagrama de flujo de proceso de recuperación del aceite extraído en la extracción asistida por ultrasonido.	41
Figura 8. Esquema del sistema de extracción de aceite convencional (elaboración propia).	42
Figura 9. Esquema del sistema de extracción de aceite convencional para los tratamientos de la superficie de respuesta (elaboración propia).	46
Figura 10. Apariencia del aceite obtenido por extracción convencional con acetato de etilo.	60

- Figura 11.** Superficie de respuesta del efecto de los factores analizados sobre el rendimiento de extracción de aceite de semillas de guayaba. El tercer factor en cada gráfico se fijó en el valor del punto central. 65
- Figura 12.** Cinética de extracción del aceite de semilla de guayaba con acetato de etilo, empleando $R_{ds} = 6,2$ g disolvente/g residuo seco, $T = 36$ °C, $n = 2$. Las barras de error indican el intervalo de confianza al 95 % del promedio de los valores. 70
- Figura 13.** Relación entre los residuos predichos y los observados para el rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba. 104

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Producción de guayaba en toneladas métricas por los diez países con mayor producción (Pariona, 2017).....	9
Cuadro II. Composición proximal de las semillas de guayaba.....	11
Cuadro III. Producción estimada anual de los aceites y grasas vegetales mayoritarios en millones de toneladas (Gunstone, 2013).....	14
Cuadro IV. Ácidos grasos más comunes y de mayor importancia en la naturaleza.....	16
Cuadro V. Parámetros de calidad con sus respectivos límites máximos establecidos para aceites comestibles (Codex Alimentarius, 1999).	23
Cuadro VI. Perfil de ácidos grasos principales del aceite obtenido del residuo de semillas de guayaba (Uchôa-Thomas et al., 2014).....	24
Cuadro VII. Condiciones de operación utilizadas durante la EAU de aceite de semilla de guayaba.	39
Cuadro VIII. Variables independientes y niveles empleados en el DCCR para la optimización del proceso de extracción de aceite a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de guayaba.....	44
Cuadro IX. Ensayos del diseño central compuesto de tres factores con valores codificados para la optimización del proceso de extracción de aceite a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de guayaba.	45
Cuadro X. Contenido de humedad y grasa y tamaño de partícula promedio del residuo de guayaba seco utilizado para las extracciones de aceite.	54
Cuadro XI. Rendimientos promedio de aceite de semillas de guayaba obtenido por dos métodos diferente de extracción.....	57

Cuadro XII. Efecto de la temperatura, tiempo de extracción y relación de masa disolvente/residuo sobre el rendimiento de extracción de aceite de semillas de guayaba con acetato de etilo.	60
Cuadro XIII. Parámetros de ajuste y adecuación para evaluar el modelo generado...62	
Cuadro XIV. Análisis de significancia de los factores en el modelo generado que describe el rendimiento de extracción de aceite de semillas de guayaba.	63
Cuadro XV. Análisis de los valores de deseabilidad máximos de la superficie de respuesta para los factores analizados.	67
Cuadro XVI. Rango de rendimientos de extracción de aceite de semillas de guayaba experimentales y predichos por el modelo para dos condiciones de extracción.	68
Cuadro XVII. Composición química de ácidos grasos del aceite de semillas de guayaba extraído con acetato de etilo (n=1).	73
Cuadro XVIII. Contenido promedio (en porcentaje) de los principales ácidos grasos presentes en muestras de diferentes investigaciones sobre aceite de semillas de guayaba.	75
Cuadro XIX. Características fisicoquímicas del aceite de semillas de guayaba extraído con acetato de etilo y otros aceites de composición similar.	76
Cuadro XX. Características químicas de calidad del aceite de semillas de guayaba. ...	78
Cuadro XXI. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta de rendimiento de aceite (g/ 100 g residuo) de semillas de guayaba.	104
Cuadro XXII. Concentración de aceite en 25 g de extracto para la construcción de la cinética de extracción de aceite.	105

ABREVIATURAS

%: porcentaje	KOH: hidróxido de potasio
AG: ácido graso	m: masa
AGI: ácido graso insaturado	meq: miliequivalentes
ANDEVA: análisis de Varianza	mm Hg: milímetros de mercurio
AOAC: Association of Analytical Communities	N.A.: no aplica
BH: base húmeda	N.R.: no reportado
BS: base seca	P: presión
CG: cromatografía de Gases	p: probabilidad
CITA: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos	ppm: partes por millón
CNP: Consejo Nacional de Producción	PUFA: polyunsaturated fatty acid
d: diámetro	R²: coeficiente de determinación
DCCR: diseño central compuesto rotatable	R_{ds}: relación disolvente/sustrato
E: coeficiente de extinción	rpm: revoluciones por minuto
EAU: extracción asistida con ultrasonido	T: temperatura
EC: extracción convencional	t: tiempo
eq: equivalentes	TAG: triacilglicerol
FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations	TM: tonelada métrica
INEC: Instituto Nacional de Estadística y Censos	UV-V: ultravioleta-visible
I_s: índice de saponificación	v: velocidad

RESUMEN

Gutiérrez Coto, Paola.

Extracción y recuperación de aceite de semilla de guayaba (*Psidium guajava* L.) a nivel de laboratorio y evaluación de sus propiedades.

Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. San José, CR.

P. Gutiérrez., 2018.

122 pp.: 13 il.- 139 refs.

El objetivo del presente estudio fue evaluar las condiciones de un proceso de extracción de aceite del subproducto generado del procesamiento industrial de la guayaba. Se empleó acetato de etilo como disolvente y la aplicación de una extracción asistida por ultrasonido. Se realizó la optimización del proceso de extracción de aceite, para obtener el máximo rendimiento bajo las condiciones estudiadas en una extracción por lote, la cual implique un aprovechamiento para valorizar el residuo.

Previo a las extracciones de aceite, se procedió a caracterizar el residuo en polvo seco con el que se trabajó. Se determinó un contenido de humedad de $5,86 \pm 0,07$ g/ 100 g residuo, un contenido de grasa de $14,3 \pm 0,9$ g/ 100 g BS por el método de Soxhlet, y un tamaño de partícula promedio de 447 μm . Las características del residuo fueron apropiadas para la extracción de aceite.

En primer lugar se realizó la comparación de los procesos de extracción convencional y asistida por ultrasonido. Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente de 20 °C, por un tiempo de 15 min, con una relación disolvente/sustrato de 5,5. Para la EAU se empleó una sonda ultrasónica y una amplitud del 60 %. Se concluyó que el ultrasonido no produjo una mejora en el rendimiento de extracción de aceite respecto a la extracción convencional.

Mediante un diseño central compuesto rotatable, se logró la optimización de las tres variables estudiadas (tiempo, temperatura y relación disolvente/sustrato). Con el modelo generado se determinó que el rendimiento máximo se logra obtener con el

valor máximo de cada variable (40 °C/ 60 min/ R_{ss} : 7,0). Sin embargo, con la función de deseabilidad del programa Statistica®, se seleccionaron las condiciones de extracción de 36 °C, 10 min y R_{ss} : 6,2, las cuales corresponden a un valor de deseabilidad de 0,88. Bajo estas condiciones, se obtuvo un rendimiento del 75,1 % respecto al total de lípidos presentes en el residuo. Posterior a la optimización, se elaboró una cinética de extracción con las condiciones seleccionadas, durante 60 min. Se observó que la extracción alcanza el punto de equilibrio alrededor de los 5 min del proceso.

Por último, se analizaron las propiedades fisicoquímicas y de calidad del aceite extraído. El aceite obtenido contiene 80,9 g/ 100 g de ácidos grasos poliinsaturados, 7,21 g/ 100 g de ácidos grasos monoinsaturados y 11,9 g/ 100 g de ácidos grasos saturados, siendo el ácido linoleico el AG mayoritario. Se caracterizó el aceite mediante el índice de refracción a 20 °C ($1,4768 \pm 0,0003$), la densidad ($0,93 \pm 0,04$ g/mL), el índice de yodo ($93,5 \pm 0,8$ cg I_2 / g TAG) y el índice de saponificación (202 ± 1 mg KOH/ g TAG). Se determinaron los parámetros de calidad: índice de acidez ($3,29 \pm 0,03$ mg KOH/ g TAG), el índice de peróxidos (13 ± 2 meq peróxidos/ kg TAG), los coeficientes de extinción K_{232} ($0,50 \pm 0,02$ mL/ g·cm) y K_{270} ($0,50 \pm 0,02$ mL/ g·cm). Se determinó un contenido de tocoferoles de 33,70 mg eq α -tocoferol/ 100 g aceite.

El proceso de extracción de aceite por lote empleando acetato de etilo produjo altos rendimientos de extracción, aunado a la preparación previa del sustrato, de forma rápida y sin emplear altas temperaturas o gran cantidad de disolvente. No obstante, presentó la desventaja de la dificultad en la recuperación del aceite. Las propiedades fisicoquímicas obtenidas son características del aceite de guayaba. De acuerdo con los parámetros de calidad de aceite medidos, este no presenta una calidad idónea, por lo que el proceso requiere de mejoras para que sea factible realizarlo y obtener un aceite de alta calidad que pueda ser utilizado en industrias como la alimenticia y cosmética.

1. JUSTIFICACIÓN

La guayaba criolla (*Psidium guajava* L.), a pesar de no ser un cultivo de gran extensión en Costa Rica, es una materia prima importante para la elaboración de productos consumidos tradicionalmente como mermeladas, jaleas y para productos de exportación. Se estima que en el 2005 se exportaron pastas de fruta y mermeladas de guayaba hacia Europa con un valor de €41,9 millones y que la producción mundial entre frutas como guayaba, mango y mangostán superó los 33 millones de toneladas (Gómez, 2013). La guayaba de pulpa rosada es la preferida para procesos industriales, respecto a otras variedades de pulpa blanca, debido a su contenido de azúcares y rendimiento en la obtención de productos (CNP, 2014).

Como se trata de un producto altamente perecedero, la fruta suele industrializarse en forma de mermeladas, jaleas, pulpas, néctares, entre otros. Se estima que en el proceso de selección inicial se pierde aproximadamente un 10 % de la fruta, mientras que en la operación de despulpado se obtiene un rendimiento del 77 % (CNP, 2014). Según la Ley para la Gestión Integral de Residuos (Ley N° 8839, 2010), las empresas deben hacerse responsables de tratar o reducir los materiales generados de sus procesos, no sólo para reducir la contaminación ambiental, sino para buscar obtener ventajas económicas.

Del procesamiento de alimentos en general se obtiene gran cantidad de subproductos de diferentes formas. En el caso del procesamiento de frutas y vegetales, entre un 5 % y un 50 % de la materia prima que ingresa se descarta a lo largo del proceso. Los residuos sólidos comprenden, en su mayoría, desechos de procesos mecánicos de separación y preparación, que abarcan residuos de semillas, hojas, tallos, cáscaras, así como unidades no conformes desechadas por defectos físicos o biológicos. Por lo general, se manejan procesos de disposición en rellenos sanitarios, y algunos en compostaje o alimentación animal (Restrepo, 2006).

En los últimos años, ha tomado auge la tendencia de que la mejor forma de disponer de estos residuos es darles algún valor agregado, convirtiéndolos en materias primas para la obtención de otros productos (Armijo, 2014). Por lo tanto, aprovechar los residuos del procesamiento industrial de la guayaba para obtener diversos productos, entre ellos aceite de las semillas, se visualiza como una buena alternativa para valorizar desechos que se consideran inservibles.

Los residuos del despulpado de guayaba, formados en su mayoría por semillas y algunos restos de cáscaras y pulpa, abarcan alrededor de un 15 % del peso de la fruta (Armijo, 2016). Se ha encontrado que el contenido de aceite promedio de este subproducto es de 11,12 % en base seca (Arain *et al.*, 2017) y Castro, Rodríguez y Parada (2011) reportan valores de contenido de aceite hasta de un 20,2 % en las semillas de guayaba, lo cual las hace ver como una fuente de aceite promisoría. Además, la extracción del aceite de las semillas comprende un primer paso para la obtención de otros productos como proteína, fibra y compuestos bioactivos (Uchôa-Thomaz *et al.*, 2014).

Los aceites vegetales constituyen una parte importante de la nutrición humana; y se sabe que dependiendo de su composición, su consumo puede favorecer las funciones fisiológicas del organismo. Por otro lado, la industria cosmética y médica también hace uso de estos productos, por los beneficios adjudicados, ya sea por su composición de ácidos grasos o por la presencia de otros componentes minoritarios funcionales (Ixtaina, 2010; Leray, 2014).

A pesar de que se han diversificado las fuentes de las cuales se extraen los aceites, el mayor consumo sigue liderado por especies oleaginosas como la palma, soya, colza y girasol, las cuales representan el 83 % de los aceites vegetales consumidos mundialmente. Debido a esto, es necesario fomentar la búsqueda de fuentes vegetales subutilizadas, de forma tal que se consideren y valoricen derivados de procesos industriales disponibles en la región. Así, se pueden obtener aceites de alta calidad y

con posibles similitudes o ventajas nutricionales respecto a los ya consumidos (Ixtaina, 2010).

Entre los procesos tradicionales para la extracción de aceites se utiliza el prensado por extrusión. Este proceso consiste en hacer pasar los frutos o semillas oleaginosos a través de un tornillo sin fin que, por el efecto mecánico generado, va extrayendo el aceite y genera una torta rica en material sólido, la cual se somete posteriormente a una etapa de extracción con disolvente para aumentar el rendimiento (Martínez, 2010). Si bien se puede considerar como el método más amigable con el medio ambiente, por su bajo costo y el opcional uso de disolventes orgánicos como el hexano, presenta bajos rendimientos, por lo cual este método se reserva para materias primas con un contenido de aceite mayor al 20 % (Grasso, 2013).

Por lo tanto, la obtención de aceite a partir de semillas con un bajo contenido lipídico se limita a la extracción utilizando disolventes. En el proceso industrial, se realizan extracciones sucesivas del material oleaginoso previamente tratado (prensado o con una importante reducción de tamaño) con hexano, el cual es el disolvente comúnmente utilizado a nivel industrial.

Aparte de las implicaciones de seguridad que conlleva el manejo del hexano como disolvente por su alta inflamabilidad, el mayor cuestionamiento es la repercusión que presenta a nivel ambiental y en la salud. Se estima que por cada tonelada de semillas utilizadas, se liberan al menos 1,5 L de hexano a la atmósfera, el cual reacciona en presencia de luz solar para producir altas cantidades de ozono y otros oxidantes fotoquímicos (Grasso, 2013; Lohani, Fallahi y Muthukumarappan, 2015). Además, cabe mencionar que las condiciones de extracción pueden disminuir la calidad del aceite. Por ello, es necesario evaluar el uso de métodos alternativos, que sustituyan o eliminen el uso de este disolvente y que permitan una extracción eficiente de aceite de numerosas fuentes (Martínez y Ceballos, 2012; Islam *et al.*, 2015).

Entre las tecnologías novedosas para la extracción de aceite y otros componentes de diversas matrices se destacan el uso del ultrasonido, fluidos supercríticos, microondas, extracciones aceleradas con disolventes, altas presiones y pulsos eléctricos. Todos estos métodos mencionados poseen potencial para incrementar la eficiencia de las extracciones, así como el hecho que reducen o eliminan el uso de disolventes tóxicos en comparación con los métodos tradicionales. No obstante, de igual forma presentan desventajas, dentro de las cuales se encuentran su alto costo de inversión y alto consumo de energía, factores que limitan su uso (Tiwari, 2015).

La tecnología de extracción asistida con ultrasonido (EAU), como pretratamiento o durante la extracción, ha cobrado popularidad en las últimas décadas, debido a que requiere una menor inversión en comparación con otros equipos; además, que su uso es más simple y versátil (Tiwari, 2015). El ultrasonido es una forma de energía vibracional, la cual utiliza frecuencias entre los 20 y 100 kHz para su aplicación en alimentos (Chandrapala *et al.*, 2012). Según Vilku *et al.* (2008), las mejoras en una extracción se atribuyen a la propagación de ondas ultrasónicas de altas presiones en un medio elástico, que resultan en un fenómeno de cavitación. La implosión de las burbujas de cavitación genera una gran turbulencia, colisiones a altas velocidades entre las partículas y perturbación de los microporos de la biomasa, lo cual acelera la difusión de las partículas.

El fenómeno de cavitación mencionado es el que provoca un aumento en la transferencia de masa, la penetración del disolvente en los tejidos y promueve el efecto de capilaridad (Da Porto, Porretto y Decorti, 2013). Al comparar este proceso con extracciones convencionales con disolventes, se encuentra una reducción en el tiempo de extracción, un menor consumo de disolvente y además, debido al uso de temperaturas de operación más bajas, ayuda a mantener la calidad del aceite y a minimizar la pérdida de compuestos bioactivos. También, permite el uso de disolventes más amigables con el medio ambiente, lo cual en su totalidad, da como

resultado un ahorro en la cantidad de disolventes, energía y disminución de desechos por extracción (Vilku *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Tiwari, 2015).

Respecto a las ventajas de la extracción asistida con ultrasonido mencionadas anteriormente, el estudio realizado por Da Porto, Porretto y Decorti (2013) mostró resultados bastante favorables. Para la extracción de aceite de semillas de uva, se determinó que utilizando un tiempo de extracción de 30 min, con condiciones de ultrasonido de 20 kHz y 150 W, así como empleando un 33 % menos de hexano y una temperatura máxima de 30 °C, se obtuvo un rendimiento muy similar a una extracción Soxhlet por 6 horas. Otro caso es la extracción de aceite de soya con una mezcla de hexano e isopropanol, donde se utilizaron condiciones similares (baño a 25 °C, relación de soya molida/disolvente de 2:3); se observó que los rendimientos de aceite obtenidos fueron entre 2,4 % y 9 % mayor con los tratamientos de ultrasonido, en todos los tiempos evaluados (Li *et al.*, 2004).

No se han realizado estudios donde se evalúe una extracción de aceite de semilla de guayaba asistida con ultrasonido. Se reportan sólo algunos artículos científicos de caracterización de las semillas de guayaba y su aceite; sin embargo, la extracción se ha realizado con métodos y disolventes convencionales. Uchôa-Thomaz *et al.* (2014) realizaron la caracterización completa de la semilla de guayaba para determinar el contenido de compuestos bioactivos, y plantearon que la harina obtenida posterior a la extracción de aceite de estas semillas puede ser una fuente importante de compuestos funcionales como ácido ascórbico, fibra insoluble y polifenoles. Asimismo, encontraron que el aceite de guayaba contiene un 87,06 % de ácidos grasos insaturados, donde predominan el ácido oleico y linoleico, lo cual indica que podría ser un aceite de interés para la industria alimentaria como aceite comestible.

Por otro lado, el estudio realizado por Castro, Rodríguez y Parada (2011) es, hasta el momento, el único en emplear un método más amigable con el medio ambiente para la extracción de aceite de semilla de guayaba. En el estudio, emplearon un sistema de extracción con dióxido de carbono supercrítico como alternativa al uso de hexano. El

rendimiento y perfil de ácidos grasos fueron similares en comparación al empleo de métodos como extracción de Soxhlet.

Bajo este contexto, en el presente trabajo se evaluó la utilización del residuo de generado por una industria nacional que elabora mermelada de guayaba, para extraer su aceite, empleando una extracción asistida con ultrasonido y una extracción convencional por lote para determinar las condiciones óptimas de extracción, junto con un disolvente que genere menor impacto ambiental que el hexano. Se evaluó el uso de acetato de etilo como disolvente para la extracción, ya que se ha observado que éste puede ser una buena alternativa al uso del hexano, al ser más seguro para la salud humana y generar menor impacto ambiental (Bera *et al.*, 2006). Además, para la extracción de lípidos se considera que tiene características químicas y físicas que se asemejan al hexano, con lo cual se pueden obtener rendimientos de extracción similares. Tal es el caso del estudio realizado por Lohani, Fallahi y Muthukumarappan (2015), donde el rendimiento y calidad del aceite extraído de diversas fuentes vegetales con acetato de etilo fue comparable a lo obtenido utilizando hexano.

En la operación de extracción de aceite existen diferentes variables de proceso que se pueden controlar como el tamaño de partícula, el tiempo, la relación disolvente/sustrato, la temperatura, el nivel de agitación, entre otros. Éstas variables tienen un efecto directo sobre el rendimiento de extracción del aceite, la velocidad con que se realiza la extracción y la calidad del producto obtenido. A nivel industrial es importante optimizar estas variables, donde el objetivo es emplear una combinación de todos estos factores de operación que resulte en un proceso eficiente, lo cual se ve reflejado en los costos de producción y determina su impacto a nivel ambiental (Pichai y Krit, 2015).

La temperatura es un factor muy importante, ya que tiene efectos sobre la reducción de la viscosidad del disolvente y el aceite, facilitando la difusión desde las células hasta el extracto. No obstante, el uso de altas temperaturas también puede tener efectos negativos sobre la calidad del aceite, como la extracción de sustancias no

deseadas o la degradación térmica de los lípidos (Efthymiopoulos *et al.*, 2018). Por otro lado, un aumento en la proporción del disolvente respecto al sustrato, aumenta también la tasa de difusión del aceite hacia el disolvente, al tenerse más moléculas que interactúan con la superficie y que penetran los poros de la biomasa. Sin embargo, esto conlleva a una mayor inversión en disolventes, la cual no solo tiene implicaciones económicas, sino que posteriormente requiere su respectiva recuperación y tratamiento (Pichai y Krit, 2015).

La cantidad de disolvente disponible para extraer los lípidos también determina el punto de equilibrio de la extracción, donde se alcanza el máximo de extracción del aceite. Inicialmente, los aceites se solubilizan rápidamente debido a la baja concentración de los mismos en el disolvente; posteriormente disminuye drásticamente la velocidad con la que se logra extraer más lípidos. Conocer el momento en que se dan estos fenómenos puede ayudar a encontrar el tiempo óptimo que debe estar en contacto el sistema sustrato-disolvente en el extractor (Saxena, Sharma y Sambhi, 2011).

Además de realizar el proceso de optimización de la extracción de aceite de semillas de guayaba, en el presente trabajo se realizó la determinación de las propiedades fisicoquímicas del aceite obtenido, entre ellas la densidad, índice de yodo, índice de saponificación, índice de peróxido y composición de ácidos grasos. La evaluación de estas propiedades no solo tiene como objetivo caracterizar el aceite obtenido, sino que también busca establecer, especialmente con las propiedades químicas, la condición y su calidad como aceite comestible. La información será muy útil para futuros procesos de refinado, para determinar las posibles aplicaciones que tenga el aceite en la industria de acuerdo con su perfil nutricional, y para establecer su vida útil, la cual está definida principalmente por la estabilidad oxidativa del mismo (Nyam *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Evaluar el proceso de extracción con acetato de etilo del aceite de semilla de guayaba (*Psidium guajava* L.) para la determinación de sus propiedades fisicoquímicas.

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar el rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba mediante extracción convencional (EC) y asistida por ultrasonido (EAU) a un tiempo determinado.
- Determinar las condiciones de la operación de extracción con acetato de etilo que permitan la obtención del mayor rendimiento de aceite de guayaba.
- Evaluar la calidad del aceite de semilla de guayaba obtenido por extracción convencional mediante la determinación de sus parámetros fisicoquímicos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de la guayaba

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es un fruto nativo de Centroamérica, México y la parte norte de Suramérica (Medina y Herrero, 2016). Pertenece a la familia *Myrtaceae*, y se considera de los frutos más importantes del género *Psidium*. Estos frutos aromáticos crecen en árboles pequeños en países de zonas tropicales y subtropicales. Botánicamente, la guayaba es una baya, con un peso aproximado entre 100 y 250 g y un diámetro de 5 a 10 cm. Son cotizadas debido a su aporte nutricional, ya que son ricas en vitaminas (especialmente vitamina C), minerales como hierro y calcio, antioxidantes y fibra dietética (Singh, 2011; Gómez, 2013).

La guayaba se incluye en el grupo de frutas tropicales minoritarias, junto con el maracuyá, lychee, rambután y durián, los cuales representan solo el 25 % de la producción de frutas tropicales a nivel mundial (FAO, 2003). Sin embargo, para el 2011, los 10 principales países productores de guayaba a nivel mundial, reportaron una producción total de 33 millones de toneladas métricas (The Daily Records, 2018). En el Cuadro I se presentan los países con mayor producción a nivel mundial.

Cuadro I. Producción de guayaba en toneladas métricas por los diez países con mayor producción (Pariona, 2017).

País	Producción de guayaba (TM)
India	17 650 000
China	4 366 300
Tailandia	2 550 600
Pakistán	1 784 300
México	1 632 650
Indonesia	1 313 540
Brasil	1 188 910
Bangladesh	1 047 850
Filipinas	825 676
Nigeria	790 200

La guayaba es una de las frutas tropicales que se prefiere para procesamiento industrial, debido a su sabor fuerte y único. Aunque en algunos lugares se comercializa como producto fresco o en presentaciones listas para consumir, se presenta el inconveniente de lograr un correcto balance entre la madurez de la fruta y la vida útil. En cambio, a nivel de procesamiento, no suelen presentarse problemas relacionados con la textura, forma o pardeamiento de la pulpa. La guayaba usualmente se procesa para obtener jugos, concentrados, purés, néctares, fruta enlatada, mermeladas, barras de frutas y fruta en polvo (Medina y Pagano, 2003; Singh, 2011).

3.1.1. Composición general de la guayaba

Según Lim (2012) y Medina y Herrero (2016), el fruto de la guayaba maduro, al igual que muchas otras frutas, se caracteriza por tener un alto contenido de humedad (74,0-87,17 %) y un bajo contenido de carbohidratos (9,50-14,32 %), de los cuales la fibra dietética puede encontrarse en un rango de 2,80 a 5,50 % y los azúcares entre un 6,24 a 13,10 %, dependiendo de su grado de madurez. También posee un bajo contenido de grasa (0,10-0,95 %), pocas proteínas (0,8-2,55 %) y un contenido de cenizas entre 0,5 y 1,39 %.

Además del perfil nutricional de los componentes mayoritarios, el consumo del fruto de la guayaba maduro se recomienda por su aporte nutricional de vitaminas, minerales y antioxidantes. Se ha determinado que la guayaba es fuente de taninos, fenoles, flavonoides, aceites esenciales, triterpenos, carotenoides, saponinas, lectinas, y ácidos grasos. Posee un contenido de vitamina C mayor que los limones, y contiene cantidades considerables de vitamina A, tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina (B₃) y ácido pantoténico (B₅). En cuanto a minerales, contiene fósforo, calcio, hierro, potasio y sodio (Medina y Herrero, 2016).

3.1.1.1. *Composición general de las semillas de guayaba*

Las semillas constituyen entre un 6 y 12 % del peso de la guayaba, dependiendo del tamaño y variedad de la fruta (Prasad y Azeemoddin, 1994). Pocos autores reportan

la composición de estas semillas; sin embargo, se han analizado muestras de semillas secas de guayabas procedentes de India y Brasil para determinar su composición proximal y otros compuestos bioactivos presentes. En el Cuadro II se muestra la composición de las semillas analizadas.

Cuadro II. Composición proximal de las semillas de guayaba.

Componente*	Contenido (g/ 100 g BS)	
	Prasad y Azeemoddin (1994)	Uchôa-Thomaz <i>et al.</i> (2014)
Humedad	4,10	6,68
Aceite	16,00	13,93
Proteína	7,60	11,19
Fibra cruda	61,40	63,94
Cenizas	0,93	1,18
Carbohidratos	N.R.	3,08
Pectina	N.R.	0,58
Fructosa	N.R.	0,29
Almidón	N.R.	0,17

*Todos los componentes se reportan en base seca con excepción del contenido de humedad.

N.R.: No Reportado

En cuanto a micronutrientes, las semillas de guayaba contienen calcio, magnesio, azufre, hierro, manganeso, zinc, sodio, potasio y fósforo. También, se ha determinado que las semillas contienen gran cantidad de vitamina C (87,44 mg/ 100 g) y carotenoides (Uchôa-Thomaz *et al.*, 2014).

3.1.2. Propiedades de la guayaba

En la medicina tradicional, la guayaba es considerada una planta medicinal. Desde siglos atrás se ha hecho uso de las raíces, flores, corteza del árbol, ramas, hojas y frutos para tratar distintos padecimientos (Medina y Herrero, 2016). Dada la presencia de la gran cantidad de fitoquímicos mencionados anteriormente, a diferentes partes del árbol de guayaba se le han adjudicado numerosas propiedades, entre las que se destacan hepatoprotector, antialérgico, antimicrobiano, hipoglicémico, antidiarreico, antimutagénico, antiviral, prebiótico, analgésico, cardioprotector, entre muchas otras funciones beneficiosas para la salud (Lim, 2012).

El fruto de la guayaba es una gran fuente de antioxidantes, y se considera que puede ser más beneficioso y económico el consumo de esta fruta que el de suplementos comerciales de vitaminas y antioxidantes. Al proteger el cuerpo contra el daño oxidativo bajo diferentes condiciones, se considera que se puede retardar el proceso de envejecimiento y reducir la incidencia de enfermedades como artritis, arterosclerosis, cáncer, inflamación, enfermedades en el corazón y cerebro. Según estudios epidemiológicos, existe una asociación entre un alto consumo de frutas como la guayaba y una baja probabilidad de padecer enfermedades crónicas (Medina y Herrero, 2016).

3.1.3. Producción de guayaba y subproductos de su procesamiento en Costa Rica

Según el Censo Nacional Agropecuario (INEC, 2014), en Costa Rica hay un total de 4696 fincas dedicadas al cultivo de guayabas, con una cantidad de 83324 plantas dispersas en 403,6 hectáreas. A pesar que no se tienen datos concretos sobre la producción total de guayaba en el país, la Asociación de Pequeños Productores Agroindustriales de Guayaba reporta una producción que ronda las 690 toneladas de pulpa procesada de guayaba al año (Jiménez-Quirós, 2018).

Existen alrededor de 100 variedades de guayaba en el mundo; sin embargo, en el país la variedad más encontrada es la llamada guayaba criolla o de pulpa rosada. Se trata de árboles con un carácter más silvestre que se siembran en fincas. En los últimos años, se han tratado de desarrollar híbridos que posean características tanto para consumo directo como para industrialización. Se ha obtenido dos productos: la B8-27, la cual es una guayaba de pulpa blanca; y la R1-22, la cual posee pulpa rosada (Bogantes-Arias y Mora-Newcomer, 2010).

En la zona pacífica del país se introdujeron en el año 1996, seis variedades nuevas de origen taiwanés: Pai-bar, Lay-a-bar, Am-a-bar, Siglo XX, Taiwan-yeh-bar y Tai-kuo-bar. Todas estas variedades poseen pulpa blanca o verdosa, y suelen tener un tamaño mayor a la guayaba criolla. La variedad Tai-kuo-bar es la que actualmente se explota

para su comercialización, la cual se caracteriza por tener un peso entre 400 y 800 g, una pulpa blanca y que se consume como producto fresco. (MAG, s.f.; PROCOMER, 2007).

Las guayabas de pulpa blanca tienen un bajo contenido de azúcares y una textura arenosa, por lo que no se han considerado adecuadas para ser procesadas industrialmente. Por el contrario, la guayaba pulpa rosada tiene una baja comercialización como fruta fresca, y a pesar de ser más pequeña, su contenido de azúcares es mayor, por lo cual se ha preferido para la industrialización (PROCOMER, 2007). Al ser un producto altamente perecedero, éstas se deben procesar inmediatamente después de su cosecha, mediante la elaboración de productos como jugos, néctares, concentrados, mermeladas, jaleas, bocadillos o rellenos (Medina y Pagano, 2003; CNP, 2014).

En el proceso del despulpado de las guayabas, se obtiene un rendimiento aproximado del 85 %, por lo que el 15 % restante representan desechos que no se utilizan (Armijo, 2016). En esta operación, se utilizan mallas o tamices cuyo tamaño de apertura hace que se separen las semillas, partes de la corteza y células pétreas (Medina y Pagano, 2003). Según Fontanari *et al.* (2006) estos componentes pueden tener un alto potencial para la extracción de compuestos de importancia biológica, como proteína, fibra y aceite.

3.2. Aceites vegetales

El mercado de aceites y grasas vegetales se ha incrementado en los últimos años; y representa un 85 % de la producción total de estos productos, superando por mucho el 15 % que se extrae de fuentes animales. Para el 2013, se estimó que la producción total de los aceites y grasas vegetales principales ascendió a los 158 millones de toneladas. Los aceites extraídos de la palma y la soya son los que predominan en la producción mundial, aunque aceites extraídos de la colza y el girasol han cobrado

fuerza (Gunstone, 2013). En el Cuadro III se presentan los aceites y grasas vegetales de mayor producción en el mundo.

Cuadro III. Producción estimada anual de los aceites y grasas vegetales mayoritarios en millones de toneladas (Gunstone, 2013).

Fuente de aceite	Producción (millones de toneladas)
Palma	52,77
Soya	43,62
Colza (canola)	23,52
Girasol	14,52
Semillas de algodón	5,24
Maní	5,37
Coquito de palma	6,09
Coco	3,52
Oliva	3,09

Estos productos se usan principalmente en la industria de alimentos, aunque parte de la producción de los frutos oleaginosos y su aceite también se emplea en alimentación animal. Por otro lado, los aceites y grasas vegetales también se pueden utilizar para la producción de jabones y surfactantes, en la elaboración de biodiesel y para la producción de energía.

3.2.1 Generalidades y composición

Los lípidos, grupo al cual pertenecen los aceites y grasas vegetales, están conformados por una gran cantidad de compuestos orgánicos, entre los cuales se destacan los ácidos grasos, monoacilgliceroles, diacilgliceroles, fosfolípidos y triacilgliceroles. Además, se pueden encontrar otros componentes como eicosanoides, docosanoides, resolvinas, esteroides, alcoholes terpénicos, tocoferoles, compuestos fenólicos, ésteres de esteroides, carotenoides, vitaminas liposolubles, alcoholes grasos, hidrocarburos, pigmentos, ceras, entre otros (FAO, 2008; Romero, 2015). Aunque muchos de estos compuestos son solubles en disolventes orgánicos, la definición actual los describe como moléculas hidrófobas o anfifílicas, que pueden originarse a través de condensaciones de tioésteres o unidades de isopreno (FAO, 2008).

Por lo general, un aceite está constituido por un 96-98 % de triacilgliceroles, los cuales están compuestos por tres ácidos grasos esterificados en una molécula de glicerol (Gupta, 2017). Lo más común es que estos triacilgliceroles estén compuestos de dos o tres ácidos grasos diferentes; y no se suele encontrar en la naturaleza triacilgliceroles simples, o formados por tres ácidos grasos iguales (Badui, 2006).

Los ácidos grasos se clasifican de acuerdo con su estructura química en dos grupos: saturados e insaturados. Los ácidos grasos saturados presentan cadenas de carbonos unidos únicamente por enlaces simples. Por otro lado, los ácidos grasos insaturados se dividen en monoinsaturados, los cuales presentan en su cadena un doble enlace *cis*, y los poliinsaturados; los cuales tienen en su cadena de carbonos dos o más dobles enlaces *cis* (Tiwari y Troy, 2015). Los ácidos grasos más comúnmente encontrados en aceites y grasas van desde los 4 carbonos hasta los 24 átomos de carbono. El comportamiento físico y químico de estas sustancias depende del tamaño de la cadena de carbonos: a mayor tamaño, presentan menor solubilidad en agua y mayor punto de fusión; sin embargo, en el caso de los ácidos grasos insaturados, su punto de fusión disminuye conforme aumenta el número de insaturaciones en su cadena de carbonos (Badui, 2006).

Como se mencionó, la clasificación más común de ácidos grasos establece su división en saturados, insaturados y poliinsaturados. En el Cuadro IV se muestra la nomenclatura de los ácidos grasos más comunes y más importantes encontrados en la naturaleza.

Cuadro IV. Ácidos grasos más comunes y de mayor importancia en la naturaleza.

Tipo de ácido graso	Nomenclatura	Nombre común
Saturado	12:0	Ácido láurico
	14:0	Ácido mirístico
	16:0	Ácido palmítico
	18:0	Ácido esteárico
Monoinsaturado	16:1(9)	Ácido palmitoleico
	18:1(9)	Ácido oleico
	18:1(tr9)	Ácido elaídico
Poliinsaturado	18:2(9,12)	Ácido linoleico
	18:3(9,12,15)	Ácido α -linolénico
	18:3(6,9,12)	Ácido γ -linolénico
	20:4(5,8,11,14)	Ácido araquidónico
	20:5(5,8,11,14,17)	Ácido eicosapentaenoico
	22:5(7,10,13,15,19)	Ácido docosapentaenoico
	22:6(4,7,10,13,15,19)	Ácido docosaheptaenoico

*Adaptado de Lichtenstein (2013).

Es de especial importancia la presencia de ácido linoleico y ácidos linolénicos en un aceite. Estos ácidos grasos poliinsaturados omega 6 (ω -6) y omega 3 (ω -3) son ácidos grasos esenciales, ya que el cuerpo humano no es capaz de sintetizarlos, por la ausencia de las enzimas requeridas. Por lo tanto, deben ser consumidos en la dieta, ya que estos son los precursores de otros ácidos grasos importantes para llevar a cabo funciones en el organismo (Kostik, Memeti y Bauer, 2013).

3.2.2. Propiedades fisicoquímicas de los aceites

Las características físicas y químicas de los aceites dependen de su composición de ácidos grasos. Algunos factores que influyen en estas propiedades son el tipo y la concentración de los diferentes tipos de ácidos grasos presentes, su distribución en la molécula de glicerol, así como la presencia de otros lípidos. Mediante diversos análisis se pueden evaluar estas propiedades físicas y químicas de las grasas y aceites, con los cuales se puede obtener información sobre la naturaleza, origen, comportamiento y calidad en diferentes condiciones de procesamiento y almacenamiento (Badui, 2006).

3.2.2.1. Densidad

La densidad se define como la masa del lípido en un volumen determinado. En los aceites y grasas, la densidad puede variar dependiendo de su composición de ácidos grasos, de otros componentes presentes y la temperatura, pero usualmente se encuentra entre 0,88 y 0,99 g/mL. Existen diversos métodos para determinar la densidad; uno de ellos, consiste en utilizar un picnómetro, el cual es un recipiente de vidrio calibrado, donde se mide una masa de agua destilada y una masa del líquido, en este caso aceite, con una alta precisión a una temperatura estándar (Medina, 2010).

Con los datos experimentales obtenidos, se determina la densidad del aceite por medio de la ecuación (1):

$$\rho_o = \rho_w \left(\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right) \quad (1)$$

Donde:

ρ_o : densidad del aceite a la temperatura de medición

ρ_w : densidad del agua a la temperatura de medición

m_2 : masa en gramos del picnómetro con aceite

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío

3.2.2.2. Índice de acidez

El índice de acidez es un indicador de la calidad de un aceite, el cual refleja la cantidad presente de ácidos grasos libres, los cuales pueden estar presentes de forma natural o haber sido producidos por deterioro e hidrólisis de los triacilgliceroles presentes. Se define como los miligramos de hidróxido de potasio requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en un gramo de lípido (Kardash y Tur'yan, 2005).

El proceso de formación de ácidos grasos libres es normal en un aceite o grasa crudo, ya que estos se originan progresivamente a partir de procesos químicos, enzimáticos y microbiológicos por la acción de lipasas, en presencia de agua. Estos procesos se dan posteriormente a la cosecha de una semilla o fruto; por lo tanto, los ácidos grasos libres están presentes de forma natural en las grasas y aceites (Hamm, Hamilton y Calliau, 2013; Gupta, 2017). La mayoría de aceites extraídos de semillas deberían contener solo entre un 0,5 y 1,5 % de ácidos grasos libres (Gupta, 2017). Sin embargo, el manejo y el almacenamiento del producto, si se realizan de forma deficiente, influyen en la generación de una alta cantidad de ácidos grasos libres.

3.2.2.3. Índice de peróxidos

La oxidación de un lípido comprende una serie de reacciones indeseables que involucran la presencia de oxígeno y que afectan negativamente la calidad de un aceite, pues involucra la aparición de olores y sabores desagradables en el producto. Algunos factores que aumentan la velocidad de oxidación de los ácidos grasos son la temperatura, luz, disponibilidad de oxígeno, la presencia de humedad y algunos metales (Semb, 2012).

El índice de peróxidos es un indicador de la calidad del aceite, ya que cuantifica la producción de compuestos primarios de la oxidación, como hidroperóxidos y otros compuestos derivados de los hidroperóxidos, a partir de los ácidos grasos insaturados (Semb, 2012). Su limitante como indicador es que la producción y descomposición de productos primarios de la oxidación, se puede dar de forma simultánea, por lo que no se puede saber con certeza en cuál etapa del proceso de oxidación se encuentra una muestra de lípido, debido a que inicialmente ocurre una etapa de inducción, luego aumenta la cantidad de hidroperóxidos hasta alcanzar un punto máximo, y finalmente decrecen a medida que reaccionan para formar otros compuestos como se muestra en la Figura 1 (Badui, 2006; Belitz *et al.*, 2009).

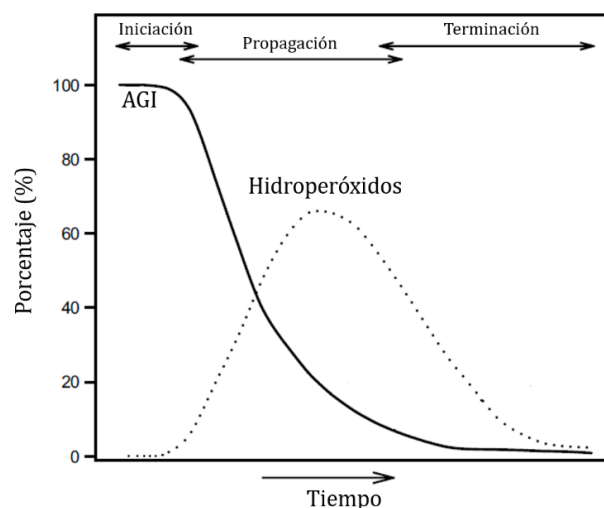


Figura 1. Oxidación de ácidos grasos insaturados (AGI) y formación y descomposición de hidroperóxidos, como compuestos primarios de la oxidación. Adaptado de Morales y Przybylski (2013).

La determinación del índice de peróxidos consiste en añadir a una muestra de lípido un exceso de yoduro de potasio, el cual reacciona con los peróxidos presentes en la muestra. El yodo que se forma se cuantifica por medio de una valoración con tiosulfato de sodio, utilizando almidón como indicador. Este índice se reporta como miliequivalentes de yodo o peróxidos por kilogramos de lípido (Popa *et al.*; 2017).

3.2.2.4. Índice de refracción

El valor del índice de refracción puede dar un indicativo de la masa molar del lípido, el tamaño de las cadenas de los ácidos grasos, el grado de insaturación y de la presencia de conjugaciones. Además, conociendo el índice de refracción de un tipo de aceite, se puede estimar su pureza y grado de hidrogenación (O'Brien, 2009). Se define como la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz al atravesar la muestra de lípidos a una temperatura específica. Para su determinación se utiliza un refractómetro; en el caso de los aceites suele hacerse entre 20 y 25 °C y para grasas a 40 °C, de forma tal que estén en estado líquido (O'Brien, 2009; Conejo, 2016).

3.2.2.5. Índice de saponificación

El índice de saponificación es la cantidad en miligramos de hidróxido de potasio requeridos para saponificar los triacilgliceroles en un gramo de lípidos. Este valor se utiliza para determinar si el aceite posee ácidos grasos de cadena corta o cadena larga: su valor es alto para grasas y aceites que contienen gran cantidad de ácidos grasos de cadena corta, mientras que es bajo para grasas y aceites que contienen gran cantidad de ácidos grasos de cadena larga; es decir, el índice obtenido es inversamente proporcional a la masa molar de la materia saponificable del aceite o grasa (Ramakrishnan, Prasannan y Rajan, 2004).

3.2.2.6. Índice de yodo

El índice de yodo provee una medida de la cantidad de insaturaciones que poseen los ácidos grasos de un aceite o grasa. Su valor es mayor a medida que aumenta el número de dobles enlaces o insaturaciones en los triacilgliceroles presentes en el aceite. Este índice es utilizado para determinar la pureza e identidad de un aceite. Este se reporta como la cantidad de centigramos de yodo que reacciona con un gramo de triacilgliceroles (O'Brien, 2009).

La determinación consiste en añadir a la muestra de lípido (disuelto en cloroformo) una cantidad previamente conocida y en exceso de un reactivo halogenante (IBr o ICl), el cual va a reaccionar con los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados. Posteriormente, se agrega una cantidad de yoduro de potasio, el cual reacciona con el exceso de agente halogenante, generando yodo como consecuencia. La reacción produce la oxidación del ion yoduro, el cual se libera como yodo, el cual es cuantificado por medio de una valoración con tiosulfato de sodio. Existe una relación directa entre un alto índice de yodo y un alto contenido de ácidos grasos insaturados en un lípido, así, una disminución en este valor podría indicar cierto grado de enranciamiento en un lípido (Rodríguez-Vinasco, 2013).

3.2.2.7. Perfil de ácidos grasos

La determinación del perfil de ácidos grasos es un análisis químico que permite determinar cuáles ácidos grasos están presentes en una determinada muestra de lípido y conocer la proporción en la que se encuentran. El método más comúnmente utilizado es la cromatografía de gases con detector de ionización de llama. La determinación consiste en derivar los ácidos grasos a sus respectivos ésteres metílicos, los cuales se volatilizan y se eluyen a través de una columna cromatográfica (Akoh, 2017).

Los ácidos grasos se separan de acuerdo con su coeficiente de partición producto de la interacción entre cadena alifática y columna, y según las condiciones del equipo empleadas. Se utiliza un detector que convierte la concentración del ácido graso en una señal eléctrica, la cual se registra en un programa como un pico con una forma de distribución de Poisson. Los tiempos de retención se relacionan con los tiempos de elusión de muestras patrón (Mc Donald y Mossoba, 1997; Christie y Han, 2010).

3.2.2.8. Coeficientes de extinción K_{232} y K_{270}

Durante la formación de radicales peroxilos e hidroperoxilos, ocurren cambios en la configuración de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados, la cual provoca la aparición de enlaces conjugados. Estos enlaces muestran absorción en el espectro ultravioleta a 232 nm para dienos conjugados (coeficiente K_{232}) y 270 nm para trienos conjugados (coeficiente K_{270}). Por lo tanto, la medición de estos parámetros brindan información relevante sobre el estado de oxidación primario del lípido (Morales & Przybylski, 2013).

La interpretación de los resultados de la medición de estos coeficientes debe ir acompañada del índice de peróxidos, ya que se ha encontrado una buena correlación entre estos dos parámetros de calidad. Una limitante de este método es que es poco específico y poco sensible, ya que por ejemplo, de haber presencia de carotenoides,

estos también se cuantificarán, porque absorben la luz ultravioleta a la longitud de onda de 232 nm (Lalas, 2008).

3.2.2.9. Tocoferoles

Los tocoferoles son compuestos antioxidantes encontrados de forma natural en los aceites vegetales, los cuales incluyen 4 isómeros denominados como alfa, beta, gamma y delta. Al ser antioxidantes, demoran la oxidación lipídica en los alimentos, al estabilizar los peróxidos y otros radicales libres; también se habla de que pueden mejorar el sabor de los aceites. Sin embargo, si se encuentran en concentraciones muy altas, pueden presentar el efecto opuesto, promoviendo la oxidación de los ácidos grasos insaturados. Los aceites de semillas son la mayor fuente de tocoferoles naturales, los cuales también tienen su función fisiológica como vitamina E, para evitar la oxidación lipídica dentro del organismo humano (O'Brien, 2009).

3.2.2.10. Calidad de los aceites

Durante el procesamiento de los aceites, así como en etapas posteriores a las que se someten para su aplicación en la industria, se deben realizar diferentes controles que tienen como objetivo identificar los atributos físicos y químicos, detectar adulteraciones y caracterizar la calidad del aceite en comparación a límites establecidos por normas internacionales. Para la mayoría de los aceites, los parámetros de calidad corresponden al contenido de humedad, impurezas, ácidos grasos libres y la cantidad de peróxidos presentes. Además, como parámetros de calidad se toma en cuenta la concentración de oligoelementos y metales pesados. Los límites de estos parámetros se establecen de acuerdo con el criterio de si el aceite está sin refinar, es refinado o parcialmente refinado (Medina, 2010). En el Cuadro V se muestran los parámetros de calidad establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius y sus respectivos límites que deben cumplir los aceites comestibles para considerarse aptos para su comercialización y consumo.

La norma hace énfasis en tres tipos de aceite: los vírgenes, prensados en frío y los refinados. Los aceites vírgenes, son aquellos aceites obtenidos por extracción mecánica o calor, y solo pueden haber sido purificados por medio de centrifugación, lavado, filtración o sedimentación. Dentro de los aceites vírgenes, se encuentran los aceites prensados en frío, los cuales solo pueden ser obtenidos por medio de acción mecánica sobre un sustrato (Codex Alimentarius, 1999). Por otro lado, el concepto de aceite refinado que también se indica en la norma, se refiere al aceite que ha sido sometido a operaciones físicas o químicas para eliminar sabores u olores indeseables, aumentar su estabilidad oxidativa, ser apto para fritura y tener un mejor aspecto en general para su comercialización (FAO, 1997).

Cuadro V. Parámetros de calidad con sus respectivos límites máximos establecidos para aceites comestibles (Codex Alimentarius, 1999).

Parámetro	Tipo de aceite	Nivel máximo
Materia volátil a 105 °C	N.E.	0,2 % m/m
Impurezas insolubles	N.E.	0,05 % m/m
Contenido de jabón	N.E.	0,005 % m/m
Hierro	Aceite refinado	0,1 mg/ kg
	Aceite virgen	5,0 mg/ kg
Cobre	Aceite refinado	0,1 mg/ kg
	Aceite virgen	0,4 mg/ kg
Índice de acidez	Aceite refinado	0,6 mg KOH/ g aceite
	Aceites vírgenes y prensados en frío	4,0 mg KOH/ g aceite
	Aceite virgen de palma	10,0 mg KOH/ g aceite
Índice de peróxidos	Aceite refinado	10 meq O ₂ / kg aceite
	Aceites vírgenes y prensados en frío	15 meq O ₂ / kg aceite

N.E: no especificado

3.2.3. Aceite de semillas de guayaba

Como se comentó anteriormente, del procesamiento industrial de la guayaba para la elaboración de pulpas y conservas, se genera un residuo formado, en su mayor parte, por una gran cantidad de semillas de guayaba que se desechan, agravando el problema

de la disposición de residuos. Las semillas son una fuente potencial de aceite con un alto contenido de ácidos grasos insaturados (Prasad y Azeemoddin, 1994; Uchôa-Thomaz *et al.*, 2014). A pesar que el contenido de materia grasa en las semillas de guayaba es mucho menor en comparación a semillas oleaginosas, éstas podrían ser empleadas como una fuente no convencional de aceite. Además, dependiendo del tipo de extracción que se realice, se puede obtener un aceite con una alta capacidad antioxidante (Castro, Restrepo y Parada, 2010).

Uchôa-Thomaz *et al.* (2014) reportaron en su estudio, un contenido de aceite del $13,93 \pm 0,03$ g/100 g de residuo de guayaba. El aceite obtenido se caracteriza por su alto contenido en ácidos grasos insaturados, que a nivel de alimentación humana es favorecedor, al jugar un papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares. En el Cuadro VI se muestra el perfil de ácidos grasos obtenido. De acuerdo con Arain *et al.* (2017), la proporción de los ácidos grasos encontrados puede variar dependiendo de la ubicación geográfica y otros factores del cultivo; sin embargo, se destaca que se caracteriza por un alto contenido de ácido linoleico, el cual es un AG esencial.

Cuadro VI. Perfil de ácidos grasos principales del aceite obtenido del residuo de semillas de guayaba (Uchôa-Thomas *et al.*, 2014).

Ácido graso	Nomenclatura abreviada	Promedio
Ácido láurico	C12:0	$0,07 \pm 0,00$
Ácido mirístico	C14:0	$0,10 \pm 0,00$
Ácido palmítico	C16:0	$8,00 \pm 0,04$
Ácido margárico	C17:0	$0,07 \pm 0,00$
Ácido esteárico	C18:0	$0,48 \pm 0,17$
Ácido oleico	C18:1	$9,42 \pm 0,26$
Ácido linoleico	C18:2	$77,35 \pm 0,35$
Ácido araquídico	C20:0	$0,12 \pm 0,00$
Ácido gondoico	C20:1	$0,14 \pm 0,00$
Ácido α -linolénico	C18:3	$0,15 \pm 0,00$
Ácido behénico	C22:0	$0,10 \pm 0,00$
Total saturados		12,94
Total insaturados		87,06
Total monoinsaturados		9,56
Total poliinsaturados		77,50

Además, las semillas de guayaba contienen carotenoides (como licopeno), glicósidos, flavonoides y compuestos fenólicos. Durante la extracción del aceite, algunas de estas sustancias pueden extraerse también, si poseen carácter liposoluble. La presencia de estos compuestos, junto con el alto contenido de ácidos grasos insaturados, muestran su posible potencial para un gran número de aplicaciones a nivel nutricional, en la industria cosmética y médica (Arain, 2017).

Actualmente, se pueden encontrar productos de aceite de semillas de guayaba en el mercado, como el que se muestra en la Figura 2. Este aceite de guayaba se ofrece en presentaciones pequeñas, a un costo elevado (hasta \$4,36 por 5 mL), para uso tópico. Se destacan entre las propiedades del producto su contenido de vitaminas y antioxidantes para mejorar la apariencia de la piel, cabello y reducir el envejecimiento, así como su propiedad humectante.



Figura 2. Presentación comercial de aceite de semillas guayaba (Best Nature's Cosmetic, 2018).

3.3. Extracción de aceites

La extracción de aceites comprende el aislamiento de la parte lipídica de un tejido animal; frutos carnosos, como las aceitunas y la palma; y de semillas oleaginosas, como

el algodón, la soya, el maní o el sésamo. En la extracción, se usan tres métodos principales: “rendering”, un método poco utilizado que consiste en apilar los tejidos animales o frutos carnosos ya tratados para que naturalmente suelten sus aceites; por acción mecánica con equipos de prensado o extrusión en el caso de semillas y nueces con alto contenido de aceite, y la extracción con disolventes volátiles, la cual se emplea a mayor escala para obtener la extracción completa de los lípidos presentes en el sustrato (Mariod, Mirghani y Hussein, 2017).

3.3.1. Extracción mecánica

La extracción mecánica de aceites a partir de semillas es la técnica utilizada más antigua. Las semillas se colocan dentro de dos barreras permeables y se aumenta la presión con un medio mecánico, que al reducir el volumen disponible para el sustrato produce la extracción del aceite. A nivel del equipo empleado, suelen haber dos tipos de extracción mecánica: una mediante el uso de una prensa hidráulica uniaxial, o con el uso de equipo, tipo extrusor, que utiliza para el prensado un tornillo sin fin, el cual permite aumentar el rendimiento de extracción y, a la vez, funciona de forma continua. En general, con la extracción mecánica se producen aceites de alta calidad; sin embargo, se obtienen rendimientos relativamente bajos, ya que el aceite residual en la torta puede llegar hasta un 20 %, por lo cual se reserva para plantas de menor capacidad o como una primera etapa previa a la extracción con disolventes (Arişanu, 2013).

3.3.2. Extracción con disolventes

La extracción con disolventes comprende el proceso de separación donde los lípidos son transferidos de la materia prima sólida hacia un disolvente, por medio de disolución y difusión. Es actualmente la técnica más utilizada en la industria debido a que el proceso es muy eficiente. El proceso de obtención del aceite consiste en cuatro etapas principales: la extracción física del aceite en el extractor, el secado de la torta desgrasada, la destilación del extracto para remover el disolvente del aceite y la

recuperación del disolvente para su reutilización en el extractor. Una buena extracción con disolvente es capaz de dejar alrededor de un 0,75 a 1,5 % de aceite remanente en la torta desgrasada. En el caso de materias primas con contenido de aceite mayor al 30 %, se emplea previamente una etapa de extracción mecánica (Chemat, 2017).

Los disolventes usualmente utilizados, se caracterizan por ser compuestos orgánicos volátiles y provenientes de fuentes no renovables como las fósiles, los cuales en algunos casos pueden ser tóxicos y dañinos para el ambiente. Tal es el caso del hexano, el cual a nivel industrial es el disolvente más utilizado para la extracción de aceites por su bajo costo y su buen rendimiento para la extracción de aceite (Li, Pordesimo y Weiss, 2004; Sicaira *et al.*, 2015).

En la Figura 3 se muestra una gráfica de una cinética general de la operación de extracción con disolvente. Esta operación ocurre en dos fases: en la primera, llamada de lavado, se produce una interacción entre la superficie del sustrato y el disolvente, donde se da una primera extracción del aceite por disolución, la cual se efectúa en un tiempo muy corto; la segunda etapa, denominada de difusión, es la extracción que se produce por medio de diferentes procesos de penetración del disolvente en el sustrato como capilaridad, difusión de las moléculas, entre otros (Sicaira *et al.*, 2015).

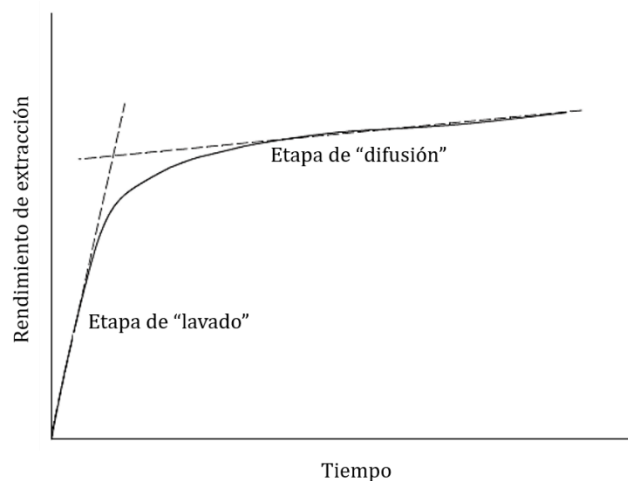


Figura 3. Etapas en las que se divide la cinética de una extracción con disolvente. Tomado de Chan, Yusoff y Ngoh (2014).

A nivel industrial existen dos tipos de extractores: de percolación y de inmersión. El extractor tipo percolador, es un equipo continuo que emplea una corriente ininterrumpida de disolvente, que pasa a través de una cama con los frutos o semillas oleaginosas, en el que el aceite se disuelve. El extracto sale del percolador de forma continua, para permitir la entrada de nuevo disolvente. Por otro lado, el sistema de inmersión se realiza por lotes, donde la totalidad de sustrato está en contacto con el disolvente. Al ser estático, requiere de agitación para ser eficiente, lo cual puede causar abrasión en las partículas del material que se extrae y el extracto tiene que filtrarse (Chemat, 2017).

3.3.3. Variables que influyen en el proceso de extracción de aceite con disolventes

En el proceso de extracción con disolventes existen diferentes parámetros de operación que se pueden modificar o controlar, debido a que tienen un efecto directo sobre la eficiencia, rendimiento y funcionalidad del aceite obtenido. Entre ellas se mencionan el tipo de disolvente seleccionado, el tiempo de extracción, la temperatura utilizada, la relación de disolvente/sustrato y el tamaño de partícula del sustrato (Shao *et al.*, 2012).

3.3.3.1. Relación disolvente/sustrato (R_{ds})

El gradiente de concentración entre los compuestos de interés presentes en el sustrato y el disolvente es la fuerza motriz que produce la transferencia de masa en una extracción (Takeuchi *et al.*, 2009). Por lo tanto, se espera que el rendimiento de una extracción de aceite aumente si el proceso se realiza empleando una mayor proporción de disolvente respecto a la biomasa (Shao *et al.*, 2012). El aumentar la R_{ds} que se emplea en una extracción involucra un aumento en el costo al utilizar una mayor cantidad de disolvente, lo cual tiene repercusiones directas sobre el costo del proceso de extracción, que además implica el costo energético de recuperación del disolvente en la etapa de concentración del extracto. Por ello, es de suma importancia analizar y optimizar esta variable (Quirós, 2016).

3.3.3.2. Temperatura (T)

La temperatura es un factor muy importante en el proceso de extracción de un aceite. Usualmente, al utilizar hexano se emplean temperaturas entre 61 y 69 °C; es decir, bajo condiciones cerca del punto de ebullición de este disolvente (Anderson, 2011). El uso de altas temperaturas aumenta la solubilidad de los lípidos en el disolvente, debido a que puede debilitar interacciones de cohesión y adhesión entre las moléculas de aceite y entre las moléculas de aceite y la matriz, lo cual provoca una mayor difusión del aceite en el medio (Efthymiopoulos *et al.*, 2018).

Por otro lado, las propiedades del disolvente también se ven afectadas, ya que las altas temperaturas disminuyen las fuerzas intermoleculares del disolvente, así como su viscosidad, lo cual resulta en una mejor penetración de la matriz. Además, se disminuye la tensión superficial, y puede lograrse una mejor interacción entre el disolvente y la materia prima, con lo cual la velocidad de extracción aumenta. Finalmente, la disminución en la tensión superficial promueve la formación de cavidades en la matriz, facilitando la solubilidad de las moléculas lipídicas en el medio. El inconveniente de emplear temperaturas muy altas en una extracción de aceite es que se puede dar la degradación de lípidos por el calor. Como consecuencia, se puede obtener un menor rendimiento de extracción o, por el contrario, el rendimiento de extracción aumenta, pero se debe a la extracción de lípidos ligados a otras macromoléculas como carbohidratos o proteínas o impurezas de la matriz (Efthymiopoulos *et al.*, 2018).

3.3.3.3 Tiempo (t)

El tiempo de extracción influye sobre el rendimiento de esta operación, debido a que los procesos de disolución o lavado y de difusión requieren de un cierto tiempo operativo. El tiempo requerido en una extracción de aceite va a depender de la clase de semilla, los tratamientos previos a los que se sometió el sustrato y el equipo utilizado. En términos generales, un mayor tiempo de extracción conlleva la obtención de un

mayor rendimiento. Sin embargo, el factor económico en muchos casos es lo que limita el tiempo de una extracción (Ixtaina, 2010).

3.3.3.4. *Tamaño de partícula*

El tamaño de partícula es un factor que afecta especialmente la velocidad con la que se alcanza el punto de equilibrio en una extracción con disolvente. La reducción del tamaño de partícula comprende una etapa de preparación de la materia prima que contribuye a que exista mayor área superficial y por ende, mayor contacto entre los lípidos y el disolvente (Akoh, 2017).

En la industria se suelen aplicar distintas operaciones de reducción de partícula al sustrato, con el fin de lograr una mayor exposición de los tejidos que contienen aceite. Entre ellos, se menciona el descascarado de frutos oleaginosos, donde la cáscara se remueve ya que no contiene aceite y dificulta la penetración del disolvente, además que puede contener componentes que disminuyen la calidad del aceite. En algunos casos como la soya, es posible realizar un laminado de la semilla oleaginosa, por medio de un molino laminador, de forma que las fibras se rompen y se facilita la liberación del aceite. Finalmente, está la operación de triturado, que se realiza a través de molinos quebradores o trituradores, y tiene como fin reducir en gran medida el tamaño de partícula (Ixtaina, 2010). Este último es el método que se utiliza en casos como las semillas de guayaba.

La capacidad de extracción de aceite de partículas grandes de biomasa (mayor a 0,75 mm) es inferior en comparación a utilizar un tamaño de partícula pequeño. Las partículas grandes presentan menor área superficial, por lo que se vuelven más resistentes a la penetración del disolvente, lo cual causa una menor difusión del aceite. Por lo tanto, los rendimientos que se pueden obtener son mayores cuando se utiliza un tamaño de partícula pequeño, porque es mayor la cantidad de aceite que logra transferirse desde el interior de la partícula hacia el disolvente (Sayyar *et al.*, 2009).

3.3.4. Disolventes alternativos

Es de gran importancia para la industria y la academia la investigación sobre disolventes más amigables con el medio ambiente, menos tóxicos e incluso biodegradables. Para su búsqueda, hay diversos factores que deben ser tomados en cuenta. En primer lugar, está la solubilidad de los componentes del aceite que se desea obtener en el disolvente; lo ideal es que sea capaz de extraer los triacilgliceroles, aunque también se extraigan compuestos como fosfolípidos; sin embargo, es indeseable que se extraigan ceras, proteínas o carbohidratos (Sicaira *et al.*, 2015; Akoh, 2017).

Según Sicaira *et al.* (2015), se espera que un disolvente alternativo posea otros parámetros como puntos de ebullición y fusión bajos, baja viscosidad, baja toxicidad y que la energía requerida para evaporar el disolvente sea baja también. Las propiedades técnicas del disolvente son importantes no solo para la extracción de diferentes compuestos, sino para la implementación del proceso a diferentes escalas.

3.3.4.1 *Acetato de etilo como disolvente*

Con el desarrollo del concepto del uso de disolventes verdes para la extracción de aceite y otras sustancias, se ha destacado el uso del acetato de etilo, ya que es un disolvente aprobado para su uso en la industria alimentaria. Además, provee rendimientos aceptables, y es menos dañino para el medio ambiente que el hexano (Silva, Garcia y Zanette, 2016). Según Lohani, Fallahi y Muthukumarappan (2015), el acetato de etilo tiene características físicas y químicas que se asemejan al hexano, como su masa molar, punto de ebullición, entalpía de evaporación y tensión superficial, por lo que se considera que puede ser un buen sustituto para la extracción de aceite y otros compuestos. Desde el punto de vista de seguridad, el acetato de etilo es menos peligroso y menos inflamable que el hexano. Además, se estima que un litro de acetato de etilo puede costar un 33 % menos que un litro de hexano.

En la investigación realizada por Lohani, Fallahi y Muthukumarappan (2015), se determinó que el rendimiento y la calidad del aceite obtenido de diferentes fuentes (canola, camelina, linaza y mostaza) utilizando acetato de etilo son comparables con los obtenidos para el aceite extraído con hexano. Por otro lado, en la extracción de aceite de semilla de chía, también se realizó una comparación con la extracción con hexano y se obtuvieron rendimientos muy similares. En cuanto a la extracción de otros componentes, Norshazila *et al.* (2017) indican que es de interés encontrar alternativas de disolventes para la extracción de carotenoides. Los autores, realizaron un estudio donde compararon la cantidad total de carotenoides totales extraídos utilizando etanol, ácido acético, acetato de etilo y aceite de coco. Obtuvieron que la concentración de carotenoides fue significativamente mayor en el caso del acetato de etilo.

3.4. Ultrasonido, aplicación en la industria alimentaria

El término ultrasonido (US) se refiere a ondas de sonido que poseen una frecuencia mayor al umbral del oído humano (mayor a 16 kHz), y los equipos de generación utilizados proporcionan frecuencias que van desde los 20 kHz a los 10 MHz. Existen dos tipos de sonicación: de alta intensidad y de baja intensidad. La sonicación de alta intensidad utiliza altas potencias, las cuales han sido utilizadas para alterar física o químicamente células, de forma tal que su empleo comprende una alternativa para procesar y conservar alimentos. Algunos de los procesos estudiados, donde se ha aplicado el uso del ultrasonido, han sido la separación y extracción de componentes biológicos, inactivación de enzimas y microorganismos, emulsificación y cristalización, debido a un aumento en la tasa de transferencia de masa, entre otros. Por otro lado, el ultrasonido de baja intensidad es más utilizado para conocer sobre propiedades físicas y químicas de los alimentos (Baysal y Demirdoven, 2011).

3.4.1. Principios del uso de ultrasonido

El principio básico en el cual se basa el uso de ondas ultrasónicas es la deformación elástica provocada en materiales piezoeléctricos, como resultado de la aplicación de un

campo eléctrico de alta frecuencia. La deformación en el transductor piezoeléctrico es convertida en vibraciones mecánicas y amplificada antes de ser transmitida a una sonda que se encuentra en contacto con el medio donde se propagarán las ondas. Las ondas se transmiten por medio de la alternación de ciclos de compresión y expansión de forma transversal. Estas oscilaciones tienen un efecto mecánico sobre las partículas en el medio donde se propagan (Thyagarajan, 2012).

Durante los ciclos de compresión y expansión se generan cambios de presión, que dan lugar a la formación de pequeñas burbujas de aire en el medio. Estas burbujas se comprimen durante la etapa de mayor presión, pero al darse el cambio a una presión mucho menor durante el siguiente ciclo, las burbujas se expanden hasta que se produce una implosión. Este proceso es conocido como el fenómeno de cavitación (ver Figura 4). La cavitación produce un rápido aumento de la temperatura y presión en las inmediaciones, donde el calor, fuerzas de cizalla y radicales libres crean una disrupción en las moléculas del medio (Thyagarajan, 2012).

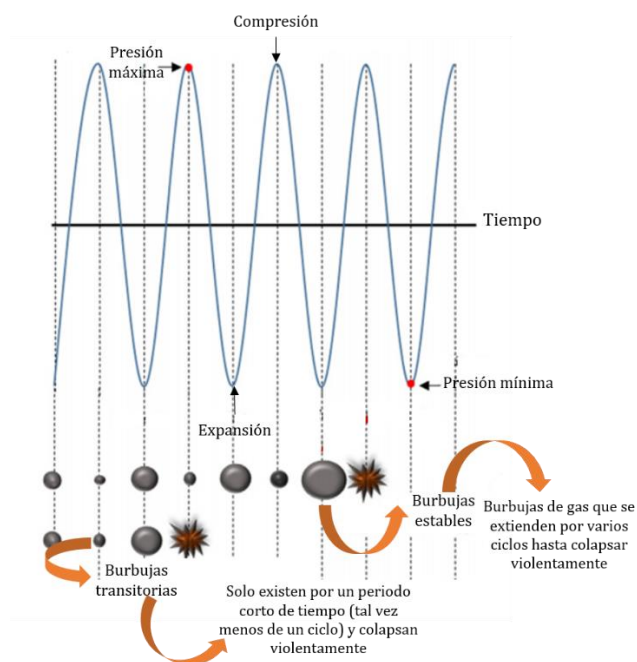


Figura 4. Fenómeno de cavitación generado por el ultrasonido (Tomado de Rutkowska, Namieśnik y Konieczka, 2017).

3.4.2. Extracción de aceite asistida por ultrasonido (EAU)

La extracción asistida por ultrasonido implica el empleo de un sistema de ultrasonido en una etapa previa (como pretratamiento) o durante las extracciones con disolventes ya existentes, con la mínima alteración del proceso (Vilkju *et al.*, 2008). De acuerdo con Takeuchi *et al.* (2009), los equipos de ultrasonido pueden clasificarse en continuos y discontinuos, donde según la forma la forma de generar la cavitación, se pueden clasificar en sistemas de ultrasonido directo o indirecto. Los equipos de US directo poseen una sonda generadora, que se coloca en contacto directo con la muestra que recibe las ondas; mientras que en la aplicación del ultrasonido indirecto, la muestra se encuentra en un recipiente, el cual se sumerge en un baño de líquido que recibe la sonicación y transmite las ondas.

Cuando la operación de extracción de aceite es asistida por ultrasonido, se obtienen los beneficios de una mayor transferencia de masa, una mejor penetración del disolvente en los tejidos y un efecto de capilaridad. El colapso de las burbujas de cavitación cerca de las paredes celulares de los tejidos vegetales produce la ruptura de las células; todos estos efectos se traducen en un mayor acceso del disolvente al aceite (Da Porto, Porretto y Decorti, 2013).

La extracción de aceite con disolventes asistida por ultrasonido está cobrando importancia para su aplicación en la industria de aceites comestibles, pues se aumenta la eficiencia y se reducen los tiempos de extracción. En contraste con la maceración y extracciones convencionales de aceite, el aplicar ultrasonido puede reducir la dependencia hacia los disolventes tradicionales como el hexano, abriendo la posibilidad del uso de disolventes alternativos, los cuales son atractivos por su costo, impacto ambiental y su impacto en la salud de las personas (Baysal y Demirdoven, 2011).

Existen numerosos estudios que han demostrado los beneficios de utilizar el ultrasonido como pretratamiento o durante la extracción con disolventes. Entre los

beneficios que se destacan está el uso de condiciones de temperatura inferiores y menores tiempos de proceso a las empleadas usualmente. En 2013, un estudio realizado por Bimakr *et al.*, determinó que las mejores condiciones de EAU para la extracción de aceite de semillas de calabaza china con etanol como disolvente son un tiempo de 40 minutos, a una temperatura de 55 °C y una amplitud del 75 %, para obtener rendimientos comparables a una extracción por el método de Soxhlet, e incluso obteniendo con la EAU un extracto de mejor calidad y con mayor capacidad antioxidante.

En otro estudio, donde se evaluó el efecto del ultrasonido sobre el rendimiento de aceite y polifenoles obtenidos a partir de semillas de uvas (Da Porto, Porretto y Decorti, 2013) se encontró que con el empleo de EAU a una frecuencia de 20 kHz, 150 W de potencia, por 30 minutos y una temperatura inferior a 30 °C, se obtiene un rendimiento similar a una extracción Soxhlet por 6 h.

Asimismo, otros autores han reportado buenos rendimientos en procesos de extracción de aceite implementando el uso del ultrasonido, utilizando diferentes disolventes, desde acuosos hasta orgánicos. En estos estudios se ha trabajado con semillas de diferentes fuentes como papaya (Samaram *et al.*, 2015), jatrofa (Shah, Sharma y Gupta, 2005), linaza (Zhang *et al.*, 2008), arándanos rojos (Thyagarajan, 2012), semillas de *Calophyllum inophyllum* (Fuad, Karim y Mat Don, 2016), entre otras.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización

Las pruebas experimentales para realizar la molienda, extracción y caracterización del aceite de semilla de guayaba, así como la determinación de humedad del residuo, se realizaron en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos. La extracción de aceite en un equipo de mayor escala de 10 L se realizó en el Laboratorio de Análisis Microbiológicos del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA)

El análisis de la composición química del aceite obtenido se realizó en el Laboratorio de Química del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). El secado inicial y almacenamiento de la materia prima tuvo lugar en la Planta Piloto del CITA. Todas estas instituciones se ubican en la Sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica.

4.2. Materia Prima

Para la realización de las pruebas experimentales de la investigación, se utilizó el residuo obtenido del despulpado de guayaba de la empresa Productos Ujarrás S.A., ubicada en Tres Ríos de Cartago. Este residuo comprende alrededor del 15 % m/m de la guayaba que se despulpa y contiene semillas, cáscaras, ramas pequeñas y restos de pulpa (Armijo, 2016). El residuo de guayaba se transportó en baldes a las instalaciones del CITA y se almacenó en congelación a -18 °C hasta el momento de procesamiento.

4.3. Preparación de la materia prima

Para la extracción de aceite se requiere un sustrato con bajo contenido de humedad. Por lo tanto, el residuo de guayaba se descongeló, y se deshidrató a 50 °C en un secador de cabina de aire caliente por convección (The National Drying Machinery Company Inc., Pennsylvania), hasta obtener un producto con una humedad final cercana al 10 %

(m/m). El producto seco se almacenó en baldes con tapa hermética en una cámara de refrigeración a 5 °C hasta su uso.

Posteriormente, previo a las pruebas de extracción, se realizó un tamizado de las semillas enteras con el fin de remover partículas gruesas y finas de residuo de guayaba que no corresponden a semillas. Para ello, se utilizaron 3 tamices de la serie US Standard, n° 8 (apertura de 2,36 mm), n° 14 (apertura de 1,40 mm), y n° 16 (apertura de 1,18 mm). La fracción que se utilizó para la molienda fueron las semillas retenidas en el tamiz n° 14, y manualmente se agregaron semillas retenidas del tamiz n° 8 (sin impurezas). Una vez separada la fracción de interés, se realizó la molienda del subproducto en un molino ultracentrífugo ZM 200 (Restch, Alemania), utilizando una malla con un tamaño de apertura de 1 mm. En la Figura 5, se muestra el diagrama de bloques de la preparación del residuo de guayaba previo al proceso de extracción de su aceite.

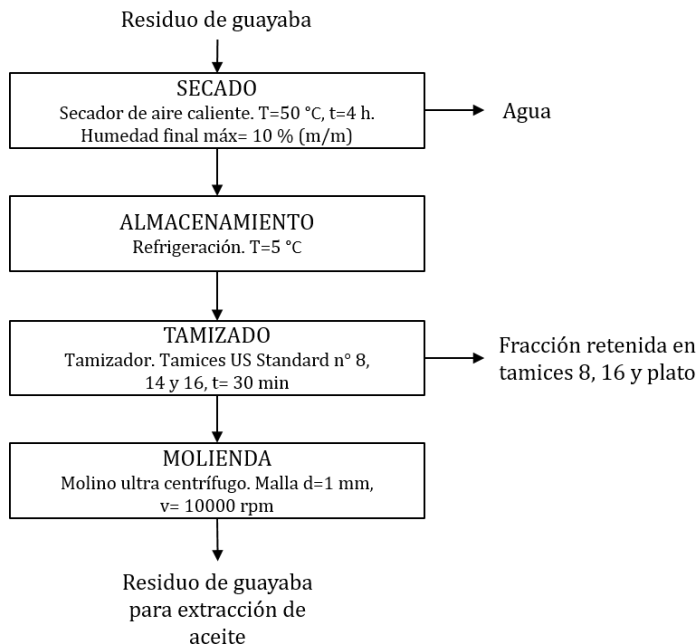


Figura 5. Diagrama de bloques de la preparación del residuo de guayaba previo a la extracción de su aceite.

4.4. Caracterización de la materia prima

Es importante verificar que el contenido de agua presente en el residuo sea bajo (inferior al 10 %) para evitar la interferencia de la humedad en el proceso de extracción. Para ello, se realizó la determinación por triplicado del contenido de humedad del subproducto en polvo obtenido de la molienda, utilizando el método descrito en la Sección 4.8.1. Se determinó, por duplicado, el tamaño de partícula promedio mediante un análisis de tamizado, empleando el método descrito en la Sección 4.8.3. Finalmente, se determinó el contenido de grasa por triplicado por el método de Soxhlet, con el método de la Sección 4.8.2. Los valores obtenidos se reportaron como el promedio junto con su intervalo de confianza al 95 %. El contenido de grasa se reporta en base seca.

4.5. Comparación del rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido

Se realizaron dos tipos de extracción: una convencional (EC), donde el sustrato y el disolvente se mezclan por agitación en un recipiente por determinado tiempo, y una extracción asistida con ultrasonido (EAU), la cual emplea las mismas condiciones de la primera más la aplicación de US, por medio de una sonda inserta en el recipiente de extracción. Se realizaron tres repeticiones de cada tipo de extracción. Se calculó y comparó el rendimiento de aceite para ambas extracciones, para determinar cuál de los dos métodos permite extraer mayor cantidad de aceite, bajo las condiciones establecidas a nivel de laboratorio.

4.5.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño irrestricto aleatorio unifactorial con dos niveles (EAU y EC). La variable respuesta utilizada fue el valor de rendimiento de aceite respecto a la masa de residuo utilizada. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

4.5.2. Procedimiento

4.5.2.1. Extracción asistida por ultrasonido

Para las extracciones correspondientes a las asistidas con ultrasonido se utilizaron las condiciones descritas en el Cuadro VII. Estas se establecieron de acuerdo con lo indicado en la literatura para EAU de aceite de sustratos similares (Li *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Samaram *et al.*, 2015).

Cuadro VII. Condiciones de operación utilizadas durante la EAU de aceite de semilla de guayaba.

Parámetro de operación	Valor
Temperatura	20 °C
Masa de extracción (disolvente+sustrato)	500 g
Frecuencia de salida	20 kHz
Amplitud de ultrasonido	60 %
Proporción disolvente/ sustrato	5,5 g disolvente/g residuo seco
Tiempo	15 min

Se escogió no calentar la mezcla de extracción, ya que una de las ventajas atribuidas al empleo de la EAU es que permite realizar la operación a temperaturas menores; por tanto, se empleó 20 °C, pues es la temperatura ambiente del laboratorio. El tiempo de extracción, bastante bajo, se seleccionó para observar la posible diferencia entre los rendimientos por ambos métodos, ya que en la literatura se destaca que la EAU permite obtener mayores rendimientos de extracción en tiempos menores de proceso a la extracción con disolvente convencional.

El proceso de extracción de aceite asistida por ultrasonido de la mezcla sustrato/disolvente se realizó en un recipiente de metal rectangular de boca ancha, colocado en un baño de agua con control de temperatura. Se empleó un agitador Eurostar 20 (IKA, Alemania) con una propela de tipo Rushton para suministrar una velocidad de agitación constante de 250 rpm, un termómetro para medir la temperatura del disolvente con el sustrato y la sonda emisora de ultrasonido como se muestra en la Figura 6. Se utilizó un procesador ultrasónico CP-750 (Cole-Parmer,

EUA), de 750W de potencia, que permite regular el nivel de amplitud de vibración de la sonda (0-100%) y el tiempo de sonicación, conectado a una sonda sólida de alta ganancia de 1 pulgada de diámetro (Cole-Parmer, EUA), que permite trabajar volúmenes hasta de 1 litro.

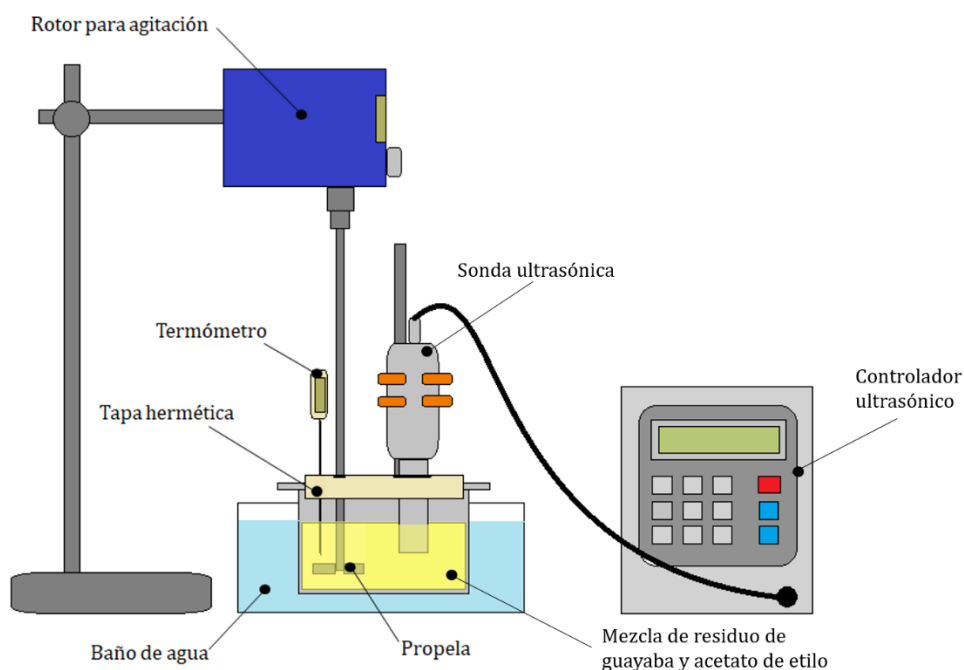


Figura 6. Esquema del sistema de extracción de aceite asistida con ultrasonido (elaboración propia).

Una vez finalizado el tiempo de extracción, la mezcla de extracción se centrifugó, en un equipo modelo 5810 R (Eppendorf, Alemania) por 15 min a una velocidad de 3200 gravedades a temperatura ambiente y se decantó el líquido sobrenadante. El extracto líquido se filtró con embudo Büchner al vacío, con papel filtro Whatman grado 5. Una vez filtrado, se vertió el extracto en un balón de boca esmerilada, para evaporar el disolvente en un rotavapor modelo R-114 (Büchi, Alemania) con calentamiento del baño a 60 °C y una presión de vacío de 21 mm Hg (2,80 kPa). El residuo obtenido se secó en estufa a 100 °C hasta eliminar todo el disolvente y alcanzar masa constante (ver Figura 7).

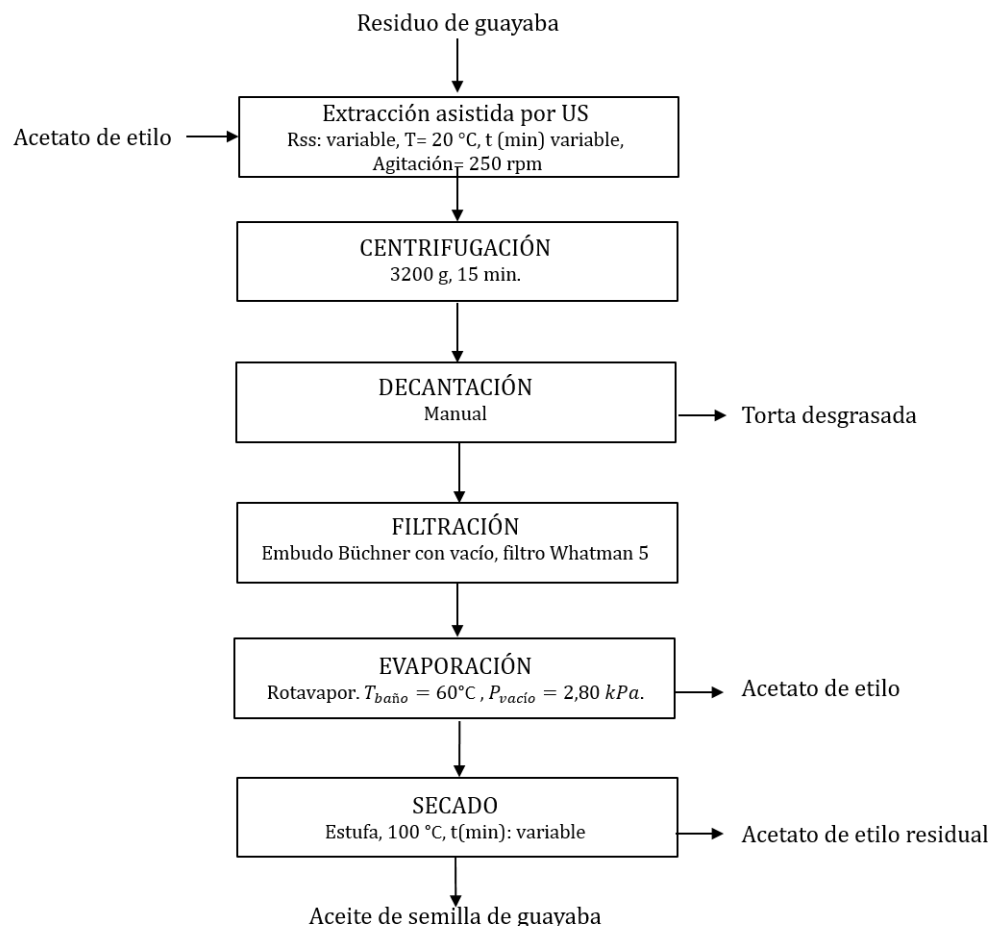


Figura 7. Diagrama de flujo de proceso de recuperación del aceite extraído en la extracción asistida por ultrasonido.

Finalmente, el aceite se almacenó en refrigeración a 5°C en frascos color ámbar, con una capacidad tal que se tuviera el menor espacio de cabeza posible, para prevenir la posible oxidación del aceite.

4.5.2.2. Extracción convencional

Los mismos parámetros de proporción disolvente/residuo, masa total en el recipiente y temperatura (ver Cuadro VII) se trabajaron para la extracción convencional. Para el proceso de extracción convencional de aceite se empleó el mismo equipo y procedimiento que el utilizado en la EAU descrito en la Sección 4.5.2.1, con la

única diferencia que no se empleó el sistema de ultrasonido, por lo que se colocó un tapón en el sitio de la sonda para mantener el recipiente hermético. El diagrama de equipo utilizado se muestra en la Figura 8.

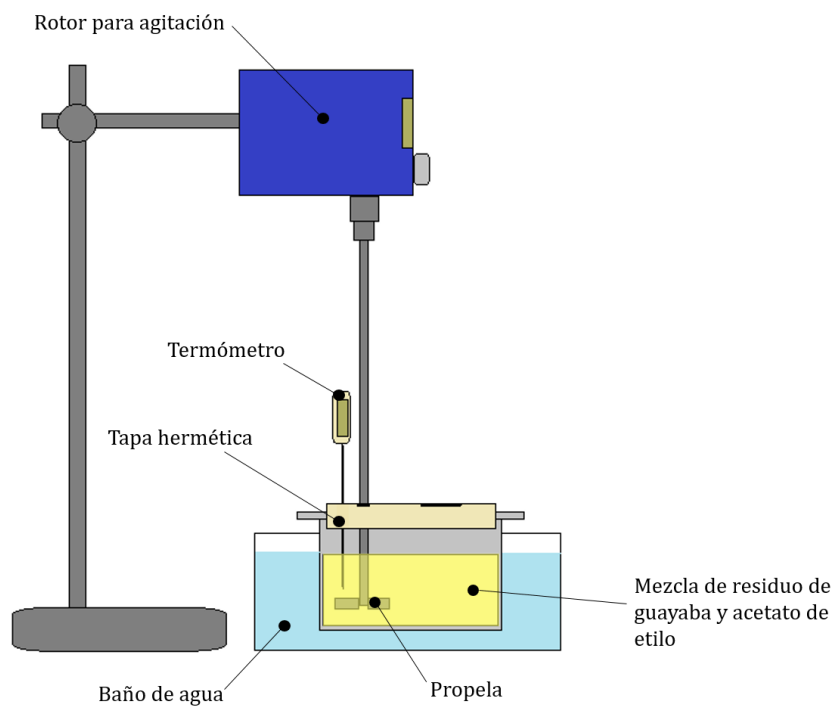


Figura 8. Esquema del sistema de extracción de aceite convencional (elaboración propia).

Para la separación y purificación del aceite, se siguió el mismo procedimiento mostrado en la Figura 7.

El rendimiento del aceite de semillas de guayaba se obtuvo utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{rendimiento} = \frac{m_{\text{aceite obtenida}}}{m_{\text{muestra de residuo}}} \times 100 \quad (2)$$

4.5.3. Análisis estadístico

Para analizar los resultados obtenidos, se realizó un ANDEVA con el programa Xlstat Excel® (Microsoft, 2013) de un solo factor, con el objetivo de determinar la existencia de diferencias significativas en el rendimiento de aceite de semilla de guayaba entre los dos tipos de extracción. La prueba se realizó utilizando un valor de confianza del 95 %.

4.6. Determinación de las condiciones óptimas de extracción

4.6.1. Diseño experimental

Debido a que el ultrasonido no produjo una mejora significativa en el rendimiento de extracción, el proceso de determinación de las condiciones óptimas de extracción se realizó utilizando la extracción convencional con acetato de etilo. Para determinar las condiciones de extracción que permitieran una mayor extracción de aceite, se utilizó un diseño central compuesto rotatable (DCCR) de tres factores, con el fin de evaluar el efecto de la proporción de disolvente/sustrato, tiempo y temperatura sobre el rendimiento de la extracción de aceite de semilla de guayaba. Los factores independientes del diseño son la proporción disolvente/sustrato (3 a 7 g acetato de etilo/g residuo de guayaba seco), la temperatura (20 a 40 °C) y el tiempo (10 a 60 min), cada uno con cinco niveles codificados como se muestra en el Cuadro VIII. La única variable respuesta a determinar es el rendimiento del aceite. Los resultados obtenidos se evaluaron analizando los parámetros estadísticos del modelo de regresión de segundo orden y empleando la metodología de superficie de respuesta.

Cuadro VIII. Variables independientes y niveles empleados en el DCCR para la optimización del proceso de extracción de aceite a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de guayaba.

Variable independiente	Niveles codificados				
	-1,682	-1	0	1	1,682
	Niveles naturales				
Proporción disolvente/ sustrato (g disolvente/g residuo seco)	3,0	3,8	5,0	6,2	7,0
Tiempo (min)	10	20	35	50	60
Temperatura (°C)	20	24	30	36	40

Para determinar el número de puntos experimentales del DCCR se emplea la siguiente ecuación (Montgomery, 2004):

$$N = 2^k (\text{puntos factoriales}) + 2k (\text{puntos axiales}) + n_o (\text{puntos centrales}) \quad (3)$$

Donde:

N= número de puntos experimentales

k= número de factores independientes del diseño experimental

n_o = número de puntos centrales del diseño experimental

Para este diseño experimental $k= 3$ y $n_o= 6$; por lo tanto, se obtuvieron 20 puntos experimentales. En el Cuadro IX se muestran los distintos ensayos realizados, con los valores codificados. Los ensayos fueron realizados de forma aleatoria.

Cuadro IX. Ensayos del diseño central compuesto de tres factores con valores codificados para la optimización del proceso de extracción de aceite a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de guayaba.

Ensayo	Relación disolvente/sustrato	Temperatura	Tiempo
1	-1 (3,8)	-1 (24 °C)	-1 (20 min)
2	-1 (3,8)	-1 (24 °C)	1 (50 min)
3	-1 (3,8)	1 (36 °C)	-1 (20 min)
4	-1 (3,8)	1 (36 °C)	1 (50 min)
5	1 (6,2)	-1 (24 °C)	-1 (20 min)
6	1 (6,2)	-1 (24 °C)	1 (50 min)
7	1 (6,2)	1 (36 °C)	-1 (20 min)
8	1 (6,2)	1 (36 °C)	1 (50 min)
9	-1,6820 (3,0)	0 (30 °C)	0 (35 min)
10	1,6820 (7,0)	0 (30 °C)	0 (35 min)
11	0 (5,0)	-1,682 (20 °C)	0 (35 min)
12	0 (5,0)	1,682 (40 °C)	0 (35 min)
13	0 (5,0)	0 (30 °C)	-1,682 (10 min)
14	0 (5,0)	0 (30 °C)	1,682 (60 min)
15	0 (5,0)	0 (30 °C)	0 (35 min)
16	0 (5,0)	0 (30 °C)	0 (35 min)
17	0 (5,0)	0 (30 °C)	0 (35 min)
18	0 (5,0)	0 (30 °C)	0 (35 min)
19	0 (5,0)	0 (30 °C)	0 (35 min)
20	0 (5,0)	0 (30 °C)	0 (35 min)

Para la predicción de la variable respuesta, se utilizó un modelo de segundo orden de la forma:

$$Re = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 R_{ds} + \beta_3 t + \beta_4 T^2 + \beta_5 R_{ds}^2 + \beta_6 t^2 + \beta_7 T \cdot R_{ds} + \beta_8 T \cdot t + \beta_9 t \cdot R_{ds} \quad (4)$$

Donde Re es el valor del rendimiento de aceite de semillas de guayaba, los valores β_0 - β_9 representan los coeficientes de regresión de cada una de las variables, mientras que T, t y R_{ds} representan las variables de temperatura, tiempo, y la relación disolvente/sustrato respectivamente.

4.6.2. Procedimiento de extracción

Se utilizó la metodología de extracción descrita en la Sección 4.5.2.2. Se cambió el recipiente metálico utilizado por un recipiente cilíndrico de vidrio con capacidad de 800 mL, para tener un mejor control sobre la agitación y temperatura del extracto. Además, se colocó un condensador en la tapa del recipiente para evitar la evaporación del disolvente en el caso de los tratamientos que requirieron un aumento de temperatura. La masa de residuo de guayaba y disolvente a utilizar se calculó considerando una masa total de 500 g, y las relaciones de disolvente/sustrato establecidas en el Cuadro VII. La agitación se mantuvo constante para todos los tratamientos a 250 rpm. Se seleccionó la velocidad de agitación que mantuvo todas las partículas en suspensión para la relación disolvente/residuo menor.

En la Figura 9 se muestra el esquema del equipo utilizado para las extracciones correspondientes a los tratamientos del diseño central compuesto.

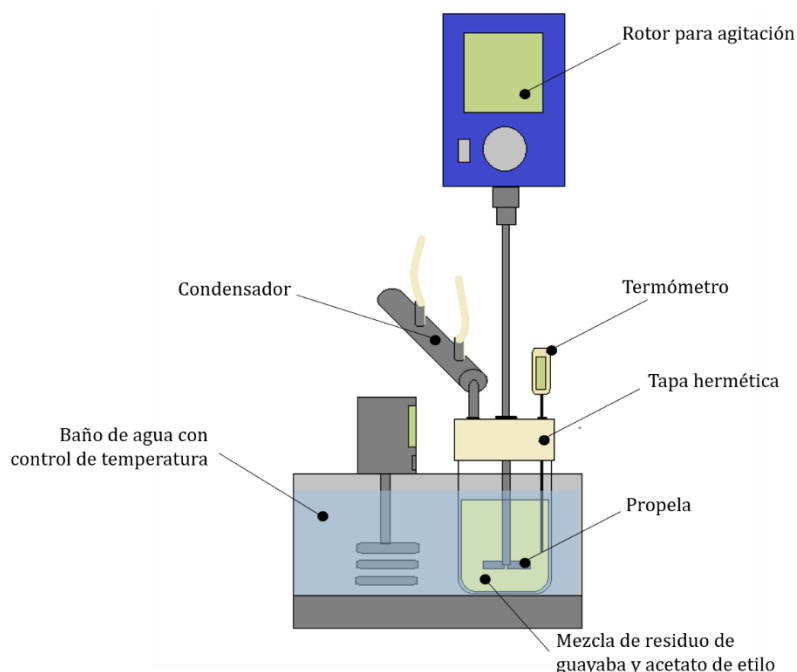


Figura 9. Esquema del sistema de extracción de aceite convencional para los tratamientos de la superficie de respuesta (elaboración propia).

4.6.3. Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de regresión con el fin de calcular los coeficientes del modelo cuadrático que relaciona los factores evaluados con la variable respuesta. Mediante un ANDEVA, se evaluó la significancia de los términos obtenidos del modelo. Para la generación de la ecuación del modelo, solo se tomaron en cuenta los coeficientes de los parámetros que resultaron ser significativos.

La región de las superficies de respuesta donde se presentan los valores máximos, se utilizó para predecir la combinación de los factores que corresponden a la obtención de un mayor rendimiento de aceite. Con el fin de evaluar el ajuste y la significancia del modelo matemático generado, se tomó en cuenta el coeficiente de determinación (R^2), coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj), probabilidad del modelo (p), probabilidad de la falta de ajuste (p_{fa}) y la distribución de residuos. El tratamiento de datos se realizó con el paquete informático Statistica 7.0 (Statsoft®, USA).

4.6.4. Validación del punto óptimo

Para validar el modelo, se llevaron a cabo ensayos de verificación en dos condiciones, por triplicado. Se utilizaron las condiciones de extracción del punto óptimo obtenidas del modelo matemático de la superficie de respuesta y las condiciones seleccionadas que se considera predijeron un rendimiento comparable al punto óptimo. Para estas corridas de verificación, se utilizó el mismo procedimiento de extracción convencional descrito en la Sección 4.5.2.2. Para determinar la validez del modelo, se analizó la concordancia de los valores de rendimiento promedio obtenidos experimentalmente con el intervalo de confianza de los valores predichos por el modelo.

4.7. Cinéticas de extracción

Adicionalmente a los objetivos del proyecto, se realizó una cinética de extracción del aceite de semilla de guayaba, posterior a la selección de las mejores condiciones de operación, con el fin de analizar el comportamiento de la extracción de aceite en el

tiempo. Las condiciones seleccionadas para esta extracción fueron: una relación disolvente/sustrato de 6,2 y una temperatura de 36 °C, para un tiempo de evaluación de 60 minutos, durante el cual se tomaron muestras de extracto a los 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 min.

Para esto, se llevaron a cabo dos extracciones en un reactor Bio-Flo New Brunswick (Eppendorf, Alemania) de 10 L de capacidad. En cada lote se utilizó 1,4 kg de residuo de guayaba seco y molido y 8,7 kg de acetato de etilo. Para la toma de muestra, se detuvo la agitación con el fin de sedimentar la parte de sólidos más gruesa, y se tomó una muestra de extracto de aproximadamente 25 g con una pipeta de boca ancha. La muestra se centrifugó con el mismo procedimiento de separación de aceite descrito en las secciones anteriores. Se determinó el promedio de la concentración del aceite en el extracto para cada medición y su respectivo intervalo de confianza. Esta concentración se graficó respecto al tiempo.

4.8. Evaluación de la calidad del aceite obtenido utilizando parámetros fisicoquímicos

Bajo las condiciones óptimas de extracción convencional por lote establecidas en el apartado anterior, se realizó la extracción de aceite de guayaba para la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas. Las extracciones se llevaron a cabo en un reactor BioFlo New Brunswick (Eppendorf, Alemania) de 10 L de capacidad. Para la separación del aceite, se utilizó el mismo procedimiento descrito en la Sección 4.5.2.1. Los parámetros de calidad medidos al aceite obtenido fueron: densidad, índice de refracción, índice de saponificación, índice de yodo, índice de acidez, índice de peróxidos, coeficientes de extinción K_{232} y K_{270} , y contenido de tocoferoles. Los métodos utilizados se detallan en la Sección 4.9.

4.9. Métodos de análisis físicos y químicos

4.8.1. Humedad

La determinación se basó en el método AOAC 920.151 (AOAC, 2005a). Se pesaron muestras de 5 g en cápsulas metálicas. Se colocaron en una estufa de aire caliente a 105 °C por varias horas hasta llegar a masa constante. La determinación del contenido de humedad se realizó por diferencia de masa.

4.8.2. Grasa total

El procedimiento se basó en el método AOAC 920.39 (AOAC, 2005b). Se realizaron las siguientes modificaciones: se pesó una muestra de 5 g en un cartucho de celulosa. El cartucho con la muestra se colocó en un extractor Soxhlet por 4 horas. Se realizó la determinación utilizando el disolvente del método, éter de petróleo, y adicionalmente se repitió el procedimiento utilizando acetato de etilo. Se empleó el acetato de etilo para comparar su capacidad de extracción de grasa con el éter de petróleo. El aceite se recuperó por destilación al vacío del disolvente en un rotavapor R-124 (Büchi, Alemania) y la determinación del contenido de grasa se realizó por diferencia de masa.

4.8.3. Tamaño de partícula promedio

Se utilizó un tamizador Ro-Tap RX-29 (W.S. Tyler, EUA) por vibración y la serie de tamices US Standard (tamices n° 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 100 y 120). Inicialmente, se pesa una muestra de 300 g del producto en polvo que se tamiza en el equipo por periodos de 15 minutos hasta que la masa de los tamices con el subproducto fuera constante. El tamaño de partícula promedio se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\overline{D_p} = \sum_{n=1}^{n=x} (D_{p_n} * Fr. ret_n) \quad (5)$$

Donde:

\overline{Dp} : Diámetro de partícula promedio

Dp_n : Diámetro de apertura del tamiz en mm

$Fr. ret_n$: Fracción de producto retenido en el tamiz n

4.8.4. Perfil de ácidos grasos

Se utilizó el método P-SA-MQ-034 del CITA “Ácidos grasos saturados, insaturados, *trans* y omegas por CG” (CITA, 2015), basado en los métodos AOAC 996.06 (AOAC, 2001) y AOCS Ce 1e-91 (AOCS, 2000).

Los ácidos grasos presentes en la muestra son derivatizados a sus ésteres metílicos, que son compuestos volátiles, los cuales se determinan por cromatografía de gases. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases GC-2014 con autoinyector AOC-20i y una columna cromatográfica SPTM-2560 100 m x 0,25 mm x 0,2 μm de alta polaridad, estacionaria de poli-biscianopropilsiloxano (Supelco, EUA).

4.8.5. Densidad

La medición de la densidad del aceite obtenido se llevó a cabo con el procedimiento descrito por Lohani, Fallahi y Muthukumarappan (2015), el cual consiste en la medición de la masa de aceite en un picnómetro con capacidad de 50 mL, calibrado con agua a (20,0 ±0,1) °C.

4.8.6. Índice de refracción

Se utilizó un refractómetro de Abbé IT (ATAGO, Japón), siguiendo el método oficial de la AOAC 921.08 “Índice de refracción de aceites y grasas” (AOAC, 2005c).

4.8.7. Índice de saponificación

Para determinar el índice de saponificación, se utilizó el método oficial AOAC 920.160 “Índice de Koettstorfer para aceites y grasas” (AOAC, 2005d) con las siguientes modificaciones:

- Se empleó un tiempo de una hora de calentamiento de la muestra para asegurar que la reacción de saponificación se complete.

4.8.8. Índice de yodo

Para determinar el índice de yodo por el método de Hanus, se siguió el procedimiento del método oficial de la AOAC 920.158 “Número de absorción de yodo para aceites y grasas” (AOAC, 2005e) con las siguientes modificaciones:

- El procedimiento indica agregar 100 mL de agua destilada. Sólo se agregaron 50 mL y se emplearon matraces con capacidad de 250 mL.

4.8.9. Índice de acidez

Se utilizó el método oficial de la AOAC 940.28 “Ácidos grasos libres en aceites crudos y refinados” (AOAC, 2012).

4.8.10. Índice de peróxidos

Se utilizó el método oficial de la AOAC 965.33 “Índice de peróxidos para aceites y grasas” (AOAC, 2005f) con las siguientes modificaciones:

- Se pesó directamente 1 g de aceite en los erlenmeyer y se disolvió con una pequeña cantidad de cloroformo.

4.8.11. Determinación de coeficientes de extinción K_{232} y K_{270} (dienos y trienos conjugados)

Se utilizó el procedimiento utilizado por Martínez (2010) y Quiroga (2013):

-Se emplea una muestra de 0,2 g de aceite para dienos conjugados y 0,9 g para trienos conjugados.

-Se disuelven cada muestra de aceite en 6 mL de hexano.

-Se mide la absorbancia de los dienos conjugados a 232 nm y de los trienos conjugados a 270 nm en un espectrofotómetro (UV-V), utilizando hexano como blanco.

-El resultado se reporta como coeficiente de extinción de la muestra E (1%, 1cm), utilizando la siguiente fórmula (Quirantes-Piné *et al.*, 2009):

$$\varepsilon = \frac{A}{C \cdot b} \quad (6)$$

Donde:

ε = coeficiente de extinción

A= absorbancia de la muestra a 232 nm y 270 nm

C= concentración del aceite (g/100 mL)

b= espesor de la cubeta de medida (cm)

4.8.12. Tocoferoles

Se realizó la determinación mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), utilizando el método descrito por Firestone (2009). La muestra se diluye en isopropanol y se eluye de forma isocrática con una mezcla de etanol y agua 95:5 % m/m. Se realizaron las siguientes modificaciones:

- Se utilizó una presión de 7000 kPa, un flujo de 1 mL/min, una temperatura constante de 50 °C y un tiempo de 20 min.

La señal se detectó a una longitud de onda de 295 nm, y la concentración se reportó como mg de α -tocoferol en 100 g de muestra.

4.8.13. Reporte de resultados

Para cada parámetro fisicoquímico se reportó el promedio de los resultados de las tres réplicas con su respectivo intervalo de confianza, con un nivel de confianza del 95 %, utilizando el paquete estadístico JMP 7.0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar la extracción de aceite de semillas de guayaba, como método para valorizar el subproducto obtenido a partir del despulpado de la fruta fresca. Para esto, se evaluaron dos técnicas de extracción: una convencional y una asistida por ultrasonido. El disolvente empleado, acetato de etilo, responde a la necesidad de sustituir las extracciones de aceite con hexano, para reducir la contaminación al ambiente y la peligrosidad que conlleva el uso de este disolvente. A partir del método de extracción más eficiente, se optimizaron las condiciones de extracción analizando tres variables diferentes. Por último, se analizó la calidad del aceite obtenido, por medio de la determinación de sus propiedades físicas y químicas.

5.1. Caracterización del residuo de semillas de guayaba seco

Se determinó el contenido de humedad, el tamaño de partícula promedio y el contenido lipídico en base seca del residuo de guayaba utilizado para las extracciones de aceite. En el Cuadro X se presentan los resultados obtenidos.

Cuadro X. Contenido de humedad y grasa y tamaño de partícula promedio del residuo de guayaba seco utilizado para las extracciones de aceite.

Análisis		Resultado
Humedad (g/100 g residuo)		5,86 ± 0,07
Tamaño de partícula promedio (µm)**		447
Contenido de grasa por Soxhlet (g/100 g residuo BS)	Éter de petróleo	14,3 ± 0,9
	Acetato de etilo	12,4 ± 0,6

*Valores expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95 % (n=3). **n=2.

El contenido de humedad del residuo de semillas de guayaba es el apropiado para realizar la extracción de aceite, ya que según Chandrasekaran y Shine (2013), la humedad del sustrato debe reducirse al menos a un contenido entre 10 y 12 %, en primer lugar, para evitar problemas de deterioro microbiológico en las semillas durante el almacenamiento como fermentaciones y producción de micotoxinas; y luego, porque facilita la operación de reducción de tamaño. Para efectos de la

extracción, se ha visto que un alto contenido de humedad provoca que el rendimiento de una extracción de aceite disminuya, debido a que se dificulta al disolvente penetrar los tejidos; además, el agua puede afectar la capacidad del disolvente de disolver los lípidos (Nagy y Simándi, 2008; Conejo, 2016).

Da Silva *et al.* (2009) reportan un contenido de aceite de 11,7 g/100 g BS en las semillas de guayaba, mientras que otros autores como Uchôa-Thomaz *et al.* (2014), reportan un rendimiento de 13,93 g/100 g BS en las semillas (6,68 % de humedad). Los contenidos de aceite determinados con el método de Soxhlet en el presente trabajo fueron similares a los contenidos reportados en las referencias citadas.

La determinación de contenido de grasa por el método de Soxhlet de una matriz alimentaria se realiza con disolventes no polares, como hexano o éter de petróleo, para lograr recuperar la máxima cantidad de aceite posible (Giuffrè, Zappia y Capocasale, 2017). Se realizó la determinación utilizando éter de petróleo, el cual es el disolvente establecido por el método AOAC, y acetato de etilo que fue el disolvente seleccionado para las extracciones de la presente investigación, para así evaluar las diferencias en el rendimiento por un método estándar.

Como se observa en los resultados, utilizando éter de petróleo se logra extraer una mayor cantidad de aceite. La diferencia en el rendimiento fue en promedio un 1,9 g/100 g residuo BS, lo cual, considerando el contenido total de aceite en el residuo de guayaba, es una cantidad considerable (13 %) que el acetato de etilo no logró extraer. En la investigación realizada por Silva, Garcia y Zanette (2016), se evaluó la extracción de aceite de semillas de chía con diferentes disolventes, incluyendo acetato de etilo y hexano. Determinaron que con el acetato de etilo se logró extraer un $29,04 \pm 0,73$ % de aceite, mientras que con hexano el rendimiento fue de $33,55 \pm 0,06$ %, un resultado significativamente mayor. Por otro lado, en un estudio en que se evaluó la extracción de aceite de semillas de tomate, se evaluó el uso de éter de petróleo y acetato de etilo por el método de Soxhlet. Los investigadores obtuvieron que con el acetato de etilo se extrajo un $13,47 \pm 0,48$ % de aceite y un $21,19 \pm 0,24$ % utilizando éter de petróleo

(Giuffrè, Zappia y Capocasale, 2017). Estos resultados encontrados en las investigaciones mencionadas indican una mayor recuperación de aceite al emplear disolventes no polares como éter de petróleo y hexano, y coinciden con los resultados obtenidos en el presente estudio. Al estar los aceites constituidos mayoritariamente por triacilgliceroles, los cuales son moléculas que contienen grandes grupos no polares, son más afines a solubilizarse en medios no polares como el éter de petróleo, el cual es una mezcla de hidrocarburos. El éter de petróleo presenta un índice de polaridad de 0,1 en tanto que el acetato de etilo 4,4; por ello, en este caso, el acetato de etilo al presentar mayor polaridad, tiene una menor afinidad hacia el aceite (Giuffrè, Zappia y Capocasale, 2017).

Según los autores, otro factor que influye es la constante dieléctrica de los disolventes. Esta constante se asocia de forma inversamente proporcional a la fuerza que se requiere para separar dos iones en una distancia dada en el líquido, y también se relaciona con la polaridad del disolvente; en el caso de los disolventes orgánicos no polares, esta fuerza es muy alta; por lo que sus constantes dieléctricas son bajas. El acetato de etilo tiene una constante dieléctrica de 6,02; mientras que en los aceites su magnitud es baja con valores entre 2 y 4. Por lo tanto, es claro que el éter de petróleo, con una constante dieléctrica entre 1,4 a 1,9; puede proporcionar un mayor rendimiento de aceite, a pesar que con el acetato de etilo también puedan obtenerse buenos rendimientos (Gilbert, y Martin, 2016; Silva, Garcia y Zanette, 2016; Giuffrè, Zappia y Capocasale, 2017).

5.2. Comparación del rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido

Para la comparación del rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba por dos métodos, convencional y asistida por ultrasonido directo, se emplearon las condiciones descritas en el Cuadro VII. En varios estudios, como el de Zhang *et al.* (2008) y el de Goula (2013), se menciona que el empleo del ultrasonido directo provoca mejores efectos cuando se emplean condiciones de extracción que son poco

favorables en una extracción convencional. Lo anterior incluye temperaturas bajas y tiempos cortos (inferiores a 40 minutos), en los cuales se pueden observar mejores rendimientos de extracción.

El calentamiento del medio de extracción puede generar efectos negativos en una extracción asistida por ultrasonido: cuando se aumenta la temperatura del medio a más de 30 °C, la presión de vapor del disolvente es mayor, por lo que las burbujas del fenómeno de cavitación colapsan con menor intensidad; además, la tensión superficial del líquido disminuye, lo que provoca que la generación de las burbujas de gas se vea afectada negativamente (Zhang *et al.*, 2008). Por otro lado, se utilizó un tiempo de 15 minutos, el cual se considera un tiempo corto para una extracción convencional. En el Cuadro XI se muestran los rendimientos promedio obtenidos para ambos métodos de extracción.

Cuadro XI. Rendimientos promedio de aceite de semillas de guayaba obtenido por dos métodos diferente de extracción

Método de extracción	Rendimiento (g aceite/100 g residuo BH)*
Convencional	9,1 ±0,5
Asistida por ultrasonido	9,3 ±0,3

*Los valores numéricos son expresados como promedio ± intervalo de confianza al 95 %, n=3.

Los resultados del rendimiento de extracción entre ambos métodos no son estadísticamente diferentes, lo cual indica que el ultrasonido no contribuye a obtener un mayor rendimiento de aceite en el tiempo de extracción evaluado y a las condiciones de operación estudiadas. De acuerdo con resultados obtenidos en otras investigaciones de extracción de aceite, entre ellas Li, Pordesimo y Weiss (2004), Abdullah y Koc (2013), Samaram *et al.* (2015) y Liu *et al.* (2017), se obtienen mejoras en el rendimiento con la aplicación del ultrasonido. Por este motivo, se esperaba encontrar diferencias significativas entre la cantidad de aceite extraída de forma convencional y asistida con ultrasonido al tiempo seleccionado.

Una extracción con disolvente se caracteriza por presentar dos etapas: una de “lavado”, la etapa más rápida, en la cual el disolvente entra en contacto con el sustrato. La segunda etapa es de “difusión”, donde influyen otros factores para que el disolvente penetre la estructura del sustrato, la cual se caracteriza por ser una etapa más lenta. Teóricamente, el uso del ultrasonido crea microcanales en las partículas del sustrato, lo que aumenta la penetración del disolvente y la transferencia de masa al existir una mayor área superficial. Esto aplica durante la etapa de “lavado”, mas no se ha visto que tenga algún efecto sobre la etapa de difusión. Lo que se destaca en este caso de la extracción asistida por ultrasonido, es el acortamiento del tiempo de extracción; sin embargo, en algunos casos puede no producirse un efecto positivo en comparación a la técnica convencional, situación que se presentó en el caso de la EAU de semillas de guayaba en este estudio (Chan, Yusoff y Ngoh, 2014).

Previo a la selección de las condiciones finales del ultrasonido para la EAU, se probaron distintas condiciones de extracción para así determinar si en algún caso se podía obtener una diferencia significativa en el rendimiento de extracción entre los dos métodos, donde fuera evidente la ventaja del ultrasonido. Entre las pruebas realizadas se destaca el uso de la máxima amplitud del equipo, es decir, la mayor potencia suministrada al extracto, el empleo de un sistema sin agitación mecánica y la variación de los tiempos de extracción; en su mayoría se realizaron extracciones a tiempos cortos. Sin embargo, no fue posible determinar bajo ninguna de las condiciones mencionadas, que el ultrasonido tuviera un efecto positivo sobre el rendimiento de la extracción estudiada.

La preparación del sustrato juega un papel muy importante en la velocidad en que cada una de las etapas se produce. En las etapas de preparación del sustrato, como la molienda, existe una proporción entre células del tejido que se rompen y otras que quedan intactas (Chan, Yusoff y Ngoh, 2014). En el caso del residuo de guayaba, la reducción del tamaño de partícula de la semilla entera a un polvo se realizó en un molino de laboratorio que funciona por fuerza centrífuga. Se utilizó una malla con una

apertura de 1 mm, la cual brindó como resultado un tamaño de partícula promedio en el residuo de 447 μm . Es decir, todas las partículas del residuo utilizadas para extraer aceite presentaron un tamaño de partícula inferior a 1 mm.

Tomando lo anterior en consideración, el tamaño de partícula pequeño del residuo de guayaba molido podría ser el motivo por el cual no se logró observar una diferencia significativa en el rendimiento obtenido para los dos métodos de extracción. Según Stanisavljević, Lazić y Veljković (2007), la aplicación de ultrasonido en una extracción puede no tener efecto o ser mínimo cuando se utiliza un sustrato molido con un tamaño de partícula muy pequeño. El ultrasonido en parte realiza la función de romper la estructura del sustrato; esto indica que, en el caso de las semillas de guayaba, esta acción posiblemente no tuvo un mayor efecto debido a la molienda fina del sustrato realizada previamente.

El problema de reducir considerablemente el tamaño de partícula de un sustrato es que hay mayor probabilidad de extraer compuestos no deseados, como pectinas, lo cual puede producir que el aceite se vea turbio; además, se pueden presentar partículas suspendidas remanentes que pueden dificultar los procesos de purificación y clarificación de los extractos (Cissé *et al.*, 2012; Rodríguez-Miranda *et al.*, 2014). En la Figura 10 se observa una muestra del aceite obtenido, donde la apariencia coincide con lo descrito anteriormente; un aceite turbio y con cierto grado de sedimentación, cuya naturaleza no se tiene clara, tomando en cuenta la gran cantidad de sustancias que se encuentran en las semillas de guayaba.



Figura 10. Apariencia del aceite obtenido por extracción convencional con acetato de etilo.

5.3. Determinación de las condiciones óptimas de extracción

5.3.1. Análisis de los resultados del diseño central compuesto

Debido a que el efecto del ultrasonido empleado en la extracción resultó no significativo, el proceso de optimización de extracción de aceite se realizó utilizando el método convencional de extracción con disolvente. Los resultados del diseño experimental, donde se evaluaron las condiciones de temperatura, tiempo y relación disolvente/sustrato en el rendimiento de la extracción de aceite de semillas de guayaba, se presentan en el Cuadro XII.

Cuadro XII. Efecto de la temperatura, tiempo de extracción y relación de masa disolvente/residuo sobre el rendimiento de extracción de aceite de semillas de guayaba con acetato de etilo.

Variables independientes			Variable dependiente
Proporción disolvente/ sustrato (g disolvente seco/g residuo seco)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Rendimiento* (g aceite/ 100 g residuo seco)
3,8 (-1)	24 (-1)	20 (-1)	8,69
3,8 (-1)	24 (-1)	50 (+1)	8,99
3,8 (-1)	36 (+1)	20 (-1)	8,93
3,8 (-1)	36 (+1)	50 (+1)	8,93

Cuadro XIII (continuación). Efecto de la temperatura, tiempo de extracción y relación de masa disolvente/residuo sobre el rendimiento de extracción de aceite de semillas de guayaba con acetato de etilo.

Variables independientes			Variable dependiente
Proporción disolvente/ sustrato (g disolvente seco/g residuo seco)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Rendimiento* (g aceite/ 100 g residuo seco)
6,2 (+1)	24 (-1)	20 (-1)	8,90
6,2 (+1)	24 (-1)	50 (+1)	9,29
6,2 (+1)	36 (+1)	20 (-1)	9,70
6,2 (+1)	36 (+1)	50 (+1)	10,53
3,0 (-1,682)	30 (0)	35 (0)	8,23
7,0 (+1,682)	30 (0)	35 (0)	10,02
5,0 (0)	20 (-1,682)	35 (0)	8,32
5,0 (0)	40 (+1,682)	35 (0)	9,76
5,0 (0)	30 (0)	10 (-1,682)	9,28
5,0 (0)	30 (0)	60 (+1,682)	10,12
5,0 (0)	30 (0)	35 (0)	9,21
5,0 (0)	30 (0)	35 (0)	9,09
5,0 (0)	30 (0)	35 (0)	9,11
5,0 (0)	30 (0)	35 (0)	9,00
5,0 (0)	30 (0)	35 (0)	9,50
5,0 (0)	30 (0)	35 (0)	9,38

Los valores entre paréntesis representan las variables de manera codificada para el diseño central compuesto rotatable. *Los valores de rendimiento se reportan respecto a la masa de residuo utilizada para la extracción.

Con los resultados del diseño experimental utilizado es posible encontrar la combinación de variables, en el modelo cuadrático obtenido, con las cuales se obtiene la mayor extracción de aceite, la cual fue la única variable respuesta en análisis.

5.3.2. Evaluación del modelo de regresión cuadrático

Se empleó un diseño central compuesto rotatable (DCCR) y se aplicó la metodología de superficie de respuesta para evaluar las condiciones óptimas de extracción de aceite de semilla de guayaba. Los parámetros de ajuste obtenidos para la variable respuesta en el modelo cuadrático obtenido, como el coeficiente de correlación (R^2), coeficiente de correlación ajustado (R^2 -adj), probabilidad del modelo, probabilidad de falta de ajuste y distribución de los residuos, se presentan en el Cuadro XIII.

Cuadro XIV. Parámetros de ajuste y adecuación para evaluar el modelo generado.

Variable respuesta	R^2	R^2 ajustado	p del modelo	p falta de ajuste	Gráfico de residuos
Rendimiento	0,90	0,86	<0,001	0,368	Aleatorio

De acuerdo con el coeficiente de determinación y el coeficiente de determinación ajustado, el modelo de regresión cuadrático obtenido presenta un buen ajuste, ya que se espera que el coeficiente de correlación de la variable respuesta sea mayor a 0,80 (Montgomery, 2004; Koocheki *et al.*, 2009). Ya que el R^2 puede variar dependiendo de la cantidad de parámetros que se agreguen al modelo, e incluso aumentar a medida que aumentan el número de parámetros, se considera que el R^2 -adj es un mejor indicador de la adecuación del modelo, ya que solo aumenta si de verdad las variables mejoran el modelo (Koocheki *et al.*, 2009). De la misma forma, se obtuvo que este valor es alto, por lo que se considera un buen ajuste del modelo. El coeficiente de determinación indica que el 90 % de la variación de los resultados a nivel experimental pueden ser explicados por el modelo generado (Baş y Boyacı, 2007). A pesar de esto, puede haber otros factores que influyeran en los resultados obtenidos, al presentarse un 10 % de los resultados que no pueden explicarse por el modelo generado.

La probabilidad del modelo resultó ser significativa, la falta de ajuste no fue significativa y el gráfico de residuos muestra los datos de forma aleatoria. Estos parámetros son requisitos para determinar que el modelo obtenido es confiable. La falta de ajuste no significativa indica que no hay una gran desviación entre las

respuestas observadas experimentalmente y las predichas por el modelo, lo cual es una prueba importante para evaluar si el modelo se puede verificar (Bezerra *et al.*, 2008).

Al generar el modelo cuadrático del diseño central compuesto rotatable, se debe analizar la significancia de las variables sobre la variable respuesta, ya que no siempre todas las variables influyen realmente en los resultados que se obtienen. Para ello, se toman en cuenta solo los parámetros cuya probabilidad de ajuste sea significativa; en este caso todos aquellos cuyo valor de probabilidad sea menor a $\alpha=0,05$ (Zeboudj, Belhanèche-Bensemra y Belabbès, 2005). En el Cuadro XIV se muestran las variables que resultaron significativas en el modelo, junto con su coeficiente de regresión y la probabilidad de ajuste en el modelo.

Cuadro XV. Análisis de significancia de los factores en el modelo generado que describe el rendimiento de extracción de aceite de semillas de guayaba.

Factor	Coeficiente de regresión	p ajuste*
Intercepto	9,132	<0,0001
R _{ds} (l)	0,431	0,0004
T (l)	0,340	0,001
t (l)	0,215	0,009
R _{ds} (c)	-0,042	0,442
T (c)	-0,072	0,211
t (c)	0,172	0,018
Interacción R _{ds} (l)* T (l)	0,232	0,018
Interacción R _{ds} (l)* t (l)	0,115	0,148
Interacción t (l)* T (l)	0,018	0,805

*La probabilidad de los coeficientes de regresión resaltados en negrita fue significativa ($p<0,05$). R_{ds}: Relación disolvente/sustrato, T: temperatura, t: tiempo de extracción, (l): lineal, (c): cuadrático.

Empleando únicamente los coeficientes de regresión significativos, se generó la siguiente ecuación que describe el rendimiento de extracción de aceite:

$$R_e = 9,132 + (0,431 * R_{ds}) + (0,340 * T) + (0,215 * t) + (0,172 * t^2) + (0,232 * R_{ds} * T)$$

Donde:

R_e = rendimiento de extracción

R_{ds} = Relación disolvente/ sustrato (g disolvente/ g residuo seco)

T = temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

t = tiempo de extracción (min)

Como se observa, los factores de efecto lineal relación disolvente/sustrato y temperatura son los que mayor influencia tienen sobre el rendimiento de extracción de aceite, mientras que el tiempo, aunque resultó ser significativo, tiene menor efecto. Asimismo, el tiempo es el único factor que en su forma cuadrática tiene cierto efecto sobre la variable respuesta y la única interacción que presentó un efecto fue entre la temperatura y la relación disolvente/sustrato. También, se observa que el valor de la probabilidad asociada a cada coeficiente de regresión resulta más pequeño conforme el efecto de la variable es mayor, con lo cual se tiene una menor probabilidad de cometer un error estadístico tipo I.

5.3.3. Evaluación de las superficies de respuesta de la extracción convencional de aceite de semilla de guayaba con acetato de etilo

La Figura 11 muestra los gráficos de contornos de las superficies de respuesta obtenidas. Se encuentra que lo descrito en el Cuadro XIV se puede relacionar con lo que se presenta gráficamente. En la Figura 11a se muestra el efecto de la interacción de las variables R_{ds} y T_e , respecto al rendimiento de aceite de semilla de guayaba.

Se observa que es necesaria una alta temperatura junto con una alta relación de disolvente respecto al sustrato, para lograr obtener los mejores rendimientos de extracción de aceite. Esto concuerda con lo publicado por Sayyar *et al.* (2009), quienes evaluaron el efecto de las variables temperatura y relación disolvente/sustrato sobre la extracción de aceite de jatrofa y obtuvieron una tendencia similar, en la que el rendimiento de extracción aumenta conforme se aumenta la temperatura del

disolvente, sin llegar a su temperatura de ebullición. De la misma forma, sucede con la relación del disolvente sustrato, donde un aumento produce rendimientos mayores.

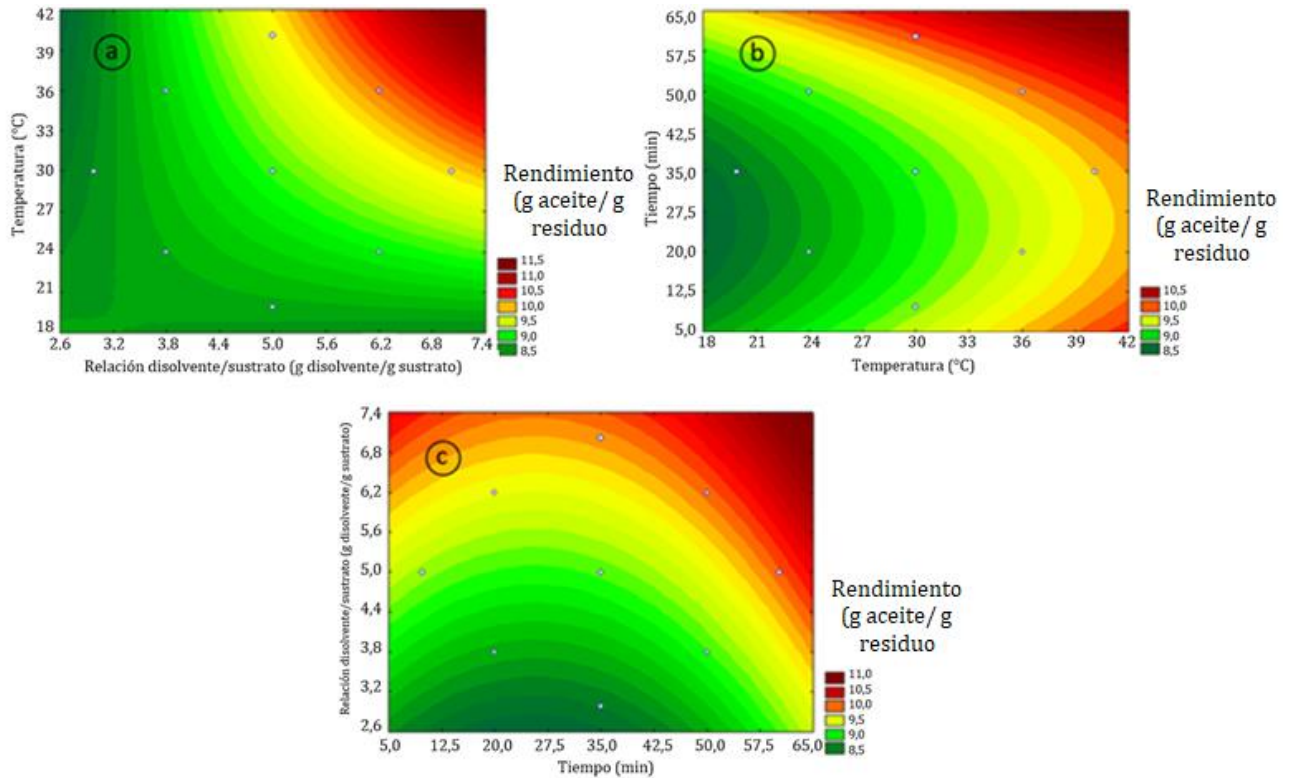


Figura 11. Superficie de respuesta del efecto de los factores analizados sobre el rendimiento de extracción de aceite de semillas de guayaba. El tercer factor en cada gráfico se fijó en el valor del punto central.

Estas dos variables son las que tienen una mayor influencia sobre el rendimiento. Una mayor cantidad de disolvente por unidad de masa de sustrato permite que, constantemente, las moléculas del disolvente entren en contacto con el sustrato y permitan una mejor extracción del aceite debido al gradiente de concentración entre el sólido y el líquido. Por otro lado, si se tiene una baja relación de este factor, es normal que el disolvente se sature y se dificulte la extracción (Sayyar *et al.*, 2009; Sinha, Haldar y Majumdar, 2015). En el caso de emplearse una mayor proporción de disolvente, contribuye a que se requiera de menos potencia para lograr una buena agitación de los sólidos del sustrato en el medio.

Respecto a la variable temperatura, al aumentarse se disminuye la viscosidad de la materia grasa, además que se promueve la ruptura de emulsiones dentro del tejido, y por ende resulta más fácil su solubilización en el medio (Shao *et al.*, 2012; Rodríguez-Miranda *et al.*, 2014). Además, el movimiento del aceite y su tensión superficial disminuyen; por lo que es de esperar que aumente la velocidad con que se extrae el aceite. No obstante, en el caso de la temperatura, es importante considerar la volatilidad del disolvente, y que mientras mayor sea la temperatura de extracción, existe una mayor probabilidad de deterioro de la calidad del aceite obtenido. Precisamente, el rango de temperatura empleado para la superficie de respuesta se seleccionó considerando lograr la extracción del aceite a una temperatura inferior a los 40 °C.

Como se mencionó anteriormente, el tiempo es la variable que tiene menor influencia sobre el rendimiento de extracción de aceite. Al observar las Figuras 10b y 10c, se observa que el tiempo presenta un comportamiento diferente a las otras dos variables: el área con el color rojo más intenso, que representa el mayor rendimiento de aceite, corresponde al tiempo máximo estudiado. Sin embargo, también existe una zona con un color rojo, donde se obtienen mayores rendimientos de extracción, con tiempos bajos de extracción, mientras se aumenta la R_{ds} o la temperatura. Esto concuerda con lo expuesto por Rodríguez-Miranda *et al.* (2014), ya que exponen en su estudio que puede haber cierta interacción ya que cuando se aumenta la proporción de disolvente respecto al sustrato, se puede acortar considerablemente el tiempo de extracción.

5.3.4. Condiciones de extracción para maximizar el rendimiento de aceite

De acuerdo con lo observado en la Figura 11, las zonas correspondientes a las respuestas máximas alcanzadas (color rojo oscuro) se presentan en un rango de temperatura de 36-40 °C, relación disolvente/sustrato entre 6,2 y 7,0; y tiempo de 50 a 60 min. Las condiciones óptimas son de máxima temperatura (40 °C) y relación disolvente/sustrato (7,0 g disolvente/ g sustrato) (Figura 11a). En los otros gráficos

(Figuras 11b y 11c) se presentan valores altos de rendimiento tanto para bajos como para altos tiempos de extracción.

Para establecer las condiciones de proceso que producen un máximo rendimiento, se utilizó la función del perfil de deseabilidad en el paquete estadístico utilizado. Ésta es una técnica de optimización, en la que se busca un óptimo global del proceso por medio de la optimización individual de las variables. Se define una escala de 0,00 a 1,00 para evaluar esta función, donde el valor de 1,00 corresponde a la combinación de factores que producen un punto máximo en la variable respuesta, es decir, el valor más deseable (Bacio, 2007). En el Cuadro XV se presentan dos combinaciones de los factores de relación disolvente/sustrato, temperatura y tiempo que producen el mayor rendimiento de aceite de semillas de guayaba, estimado por el modelo.

Cuadro XVI. Análisis de los valores de deseabilidad máximos de la superficie de respuesta para los factores analizados.

Factores evaluados			Valor de deseabilidad	Rendimiento estimado por el modelo (g aceite/ 100 g residuo seco)
Relación disolvente/sustrato (g sol/ g residuo seco)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)		
7,0	40	60	1,00	11,93
6,2	36	10	0,88	10,26

Nótese que efectivamente, para obtener el rendimiento máximo que corresponde al valor de deseabilidad 1,00, tienen que emplearse los valores máximos de cada variable. Estas condiciones no son lo ideal por su costo, debido a que implican un mayor consumo de disolvente, mayor aplicación de energía al sistema y un tiempo de proceso alto. Por lo tanto, se evaluaron diferentes combinaciones de las variables, con reducción de sus valores, con las que se puede obtener un valor de deseabilidad aceptable. La combinación seleccionada se muestra en el Cuadro XV. De acuerdo con Bacio (2007) un valor de deseabilidad entre 0,80 y 1,00 sigue siendo muy bueno y puede representar un alto desempeño en un proceso.

Se determinó que disminuyendo la relación de acetato de etilo/residuo de guayaba a 6,2, la temperatura a 36 °C y el tiempo a 10 min, se logra un valor de deseabilidad de 0,88. En este caso, se sacrifica un poco la cantidad de aceite extraído, pero se logra una reducción en la magnitud de todas las variables, especialmente en el tiempo de proceso, lo cual se traduce en una gran cantidad de energía que se puede ahorrar durante la extracción.

5.3.5. Verificación del modelo de superficie de respuesta

Con el fin de determinar si los resultados generados por la ecuación del modelo cuadrático obtenido, expresado en las superficies de respuesta, son confiables y representan lo que se obtiene a nivel experimental, se realizaron corridas de extracción adicionales, bajo dos condiciones diferentes, para comparar los rendimientos experimentales con las predicciones de rendimiento de aceite de semillas de guayaba hechas por el modelo. Las condiciones seleccionadas para este apartado corresponden a las mismas descritas en el Cuadro XV del análisis de la función de deseabilidad. En el Cuadro XVI se presentan los resultados de las corridas de extracción realizadas para la verificación del modelo.

Cuadro XVII. Rango de rendimientos de extracción de aceite de semillas de guayaba experimentales y predichos por el modelo para dos condiciones de extracción.

Condiciones de verificación	Rango de rendimientos (g de aceite/100 g residuo BH)	
	Resultado predicho*	Resultado experimental**
Punto 1 ($R_{ds}=7,0/60 \text{ min}/40 \text{ °C}$)	11,2-12,6	10,4-11,7
Punto 2 ($R_{ds}=6,2/10 \text{ min}/36 \text{ °C}$)	9,81-10,71	10,05-10,22

* Intervalos de la respuesta predicha la ecuación del modelo al -95 % y al +95 % de confianza.

** Intervalos de las respuestas experimentales expresados como intervalo de confianza al 95 % (n=3).

Los rangos de valores obtenidos de forma experimental están contenidos en los rangos de los valores predichos por el modelo, en ambos puntos de análisis, lo cual

verifica que el modelo de superficie de respuesta obtenido brinda resultados confiables. Según los resultados obtenidos, se concluye que el modelo generado es capaz de predecir el comportamiento de la variable respuesta con un 95 % de confianza.

El rendimiento experimental promedio obtenido para las condiciones del punto 2 fue de 10,14 g/100 g residuo BH, corresponde a un 86,7 % del contenido de aceite determinado por el método de Soxhlet con el mismo disolvente (11,7 g/100 g residuo BH) y un 75,1 % respecto al Soxhlet con éter de petróleo (13,5 g/100 g residuo BH). Estos valores siguen siendo rendimientos altos para una extracción por lote. Al ser la operación de extracción con acetato de etilo de una sola etapa, es de esperar que quede aceite retenido en las partículas del residuo de guayaba. Generalmente, el sustrato absorbe disolvente, y aún después de la operación de centrifugación puede contener hasta 30 g de disolvente por 100 g del residuo desgrasado, que a su vez contiene cierta cantidad de aceite. Por este motivo, es que las condiciones seleccionadas de extracción no lograron equipar el rendimiento de extracción de aceite por Soxhlet.

A nivel industrial, las extracciones con disolvente tienen un alto rendimiento y son capaces de dejar un remanente de solo 0,5 % de aceite en la torta de los sustratos vegetales. Estos altos rendimientos se deben a que se suelen emplear equipos continuos, los cuales tienen un funcionamiento similar al equipo de Soxhlet. En este caso, se realizan varios lavados a la torta para remover casi la totalidad de aceite presente en el sustrato, ya que en una extracción de una etapa, el disolvente se satura y no es capaz de extraer más aceite; es decir, la extracción llega a su punto de equilibrio (Kemper, 2005). En el caso de las semillas de guayaba, se podría considerar una segunda extracción de 10 minutos para aumentar el rendimiento de aceite extraído. Según Giufrè, Zappia y Capocasale (2017) en una extracción por lote, el total de aceite recuperado aumenta conforme aumenta el número de extracciones con las mismas condiciones.

5.3.6. Evaluación de la cinética de extracción

Posterior a la optimización de las condiciones de extracción de aceite de semillas de guayaba con acetato de etilo, se decidió elaborar una cinética, empleando las condiciones de extracción seleccionadas ($R_{ds}=6,2$ y $T=36$ °C), con el fin de evaluar el comportamiento de la extracción de aceite en el tiempo, durante 1 hora. El objetivo de realizar la cinética fue determinar si efectivamente la extracción de aceite se realizaba de forma rápida, como se indica en las superficies de respuesta. El comportamiento de la concentración de aceite en el extracto respecto al tiempo se muestra en la Figura 12.

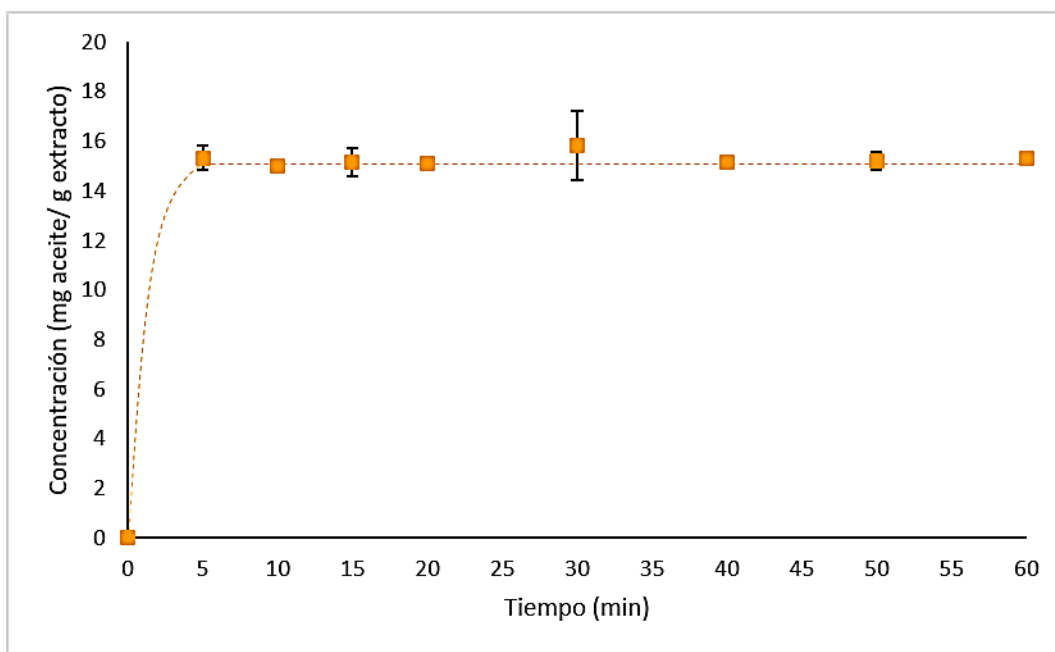


Figura 12. Cinética de extracción del aceite de semilla de guayaba con acetato de etilo, empleando $R_{ds}= 6,2$ g disolvente/g residuo seco, $T= 36$ °C, $n=2$. Las barras de error indican el intervalo de confianza al 95 % del promedio de los valores.

Como se observa, ya en un tiempo de extracción tan corto como 5 minutos, se obtiene una concentración de 15 mg de aceite por gramo de extracto, la cual luego de ese tiempo mantiene un comportamiento estable alrededor de esa concentración. Por tanto, se comprueba que, bajo las condiciones empleadas, el proceso de extracción se realiza de forma muy rápida. Este resultado sirve para confirmar el resultado obtenido

en el primer objetivo (Sección 5.2), donde se encontró que el empleo del US no mejora el rendimiento de extracción en un tiempo de 15 minutos. La extracción del aceite de las semillas de guayaba con el acetato de etilo se realiza de forma tan rápida que no se requiere la ayuda del US para mejorar la velocidad de extracción.

Al ser prácticamente constante la concentración del aceite en el extracto, luego de 5 minutos de operación, puede considerarse que la extracción alcanzó el equilibrio a un tiempo muy corto. Los resultados obtenidos son poco esperados para una extracción convencional por lote; no obstante, pueden relacionarse con lo descrito en un estudio realizado por Qu, Pan y Ma (2010), donde se evaluó la influencia de los parámetros de extracción sobre las cinéticas y actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de residuos de cáscara y semillas de granada. Los investigadores determinaron que reduciendo el tamaño de partícula de 3,2 mm a 0,2 mm, se puede reducir el tiempo de extracción de 90 min a 2 min. Esta misma tendencia fue reportada por Nagy y Simándi (2008), para la extracción de aceite de paprika, donde concluyeron que disminuyendo el tamaño de partícula de 1,5 mm a 0,2 mm se obtiene un 45 % más de rendimiento de aceite en un tiempo dado.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la etapa de difusión en la extracción de aceite de semillas de guayaba realizada con acetato de etilo es muy corta, ya que no se observa con claridad en la cinética. En el proceso de extracción de compuestos antioxidantes de hojas de bálsamo realizado por Herodež *et al.* (2003), se determinó que, al analizar el efecto del tamaño de partícula, esta no tiene efecto sobre la velocidad de extracción en la etapa de inicial, pero sí afecta el rendimiento total en un tiempo dado. Esto indica que se aumenta la tasa de difusión del aceite hacia el disolvente en etapas tardías de la extracción, para alcanzar el equilibrio de la extracción de forma más rápida. En este caso, la etapa que se considera tardía pudo haberse presentado entre los 0 y 5 min de extracción. Para poder determinar este comportamiento, se deben realizar mediciones a cada minuto desde el inicio de la extracción. No obstante, existen otros factores que pueden influenciar el tiempo al cual el equilibrio de la

extracción se alcanzó, no solo el tamaño de partícula, sino también la difusión del aceite en el acetato de etilo, y la estructura interna de las semillas de guayaba (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2014).

Entre más pequeño sea el tamaño de partícula, más se puede acortar el tiempo de extracción y se puede obtener el máximo rendimiento de extracción. Rodríguez-Miranda *et al.* (2014) indican que emplear un tamaño de partícula promedio de 500 μm produce una rápida recuperación de aceite. En la presente investigación, no se seleccionó un rango de tamaño de partícula en específico, ya que se deseaba aprovechar la totalidad del residuo; sin embargo, cuando se realizó la molienda se generaron partículas de todo tamaño inferiores a 1 mm e incluso muy finas. Como se indica en el Cuadro X, el tamaño de partícula promedio fue de 447 μm . Esta condición del sustrato provoca que la transferencia de masa se produzca en una distancia menor y que exista una gran área superficial para la disolución del aceite en el acetato de etilo. En este caso, se debe considerar si el tiempo corto de extracción compensa la energía y el tiempo requeridos para reducir el tamaño de partícula a ese nivel (Qu, Pan y Ma, 2010).

5.4. Evaluación de la calidad del aceite

Con las condiciones de optimización seleccionadas, se realizó la extracción de un lote de aceite como se describe en la Sección 4.7. Al aceite extraído, se le realizaron las determinaciones del perfil de ácidos grasos y de sus parámetros físicos y químicos. La importancia de la medición de estos parámetros reside en que permite evaluar la calidad y la pureza de una grasa o aceite, las cuales deben ser aceptables para su comercialización. A nivel de mercado, la determinación de la pureza es muy importante en el caso de aceites de mayor costo que se diferencian por alguna propiedad nutricional o medicinal, ya que se pueden dar casos de adulteración. En el aspecto de la calidad, uno de los factores más importantes es que el aceite posea una vida útil larga y que no presente indicios de oxidación que afecten el aspecto sensorial del producto (Quirantes-Piné *et al.*, 2009).

El Cuadro XVII muestra el perfil de ácidos grasos obtenido para el aceite, con su respectiva clasificación según el tipo de ácido graso.

Cuadro XVIII. Composición química de ácidos grasos del aceite de semillas de guayaba extraído con acetato de etilo (n=1).

Tipo de grasa	Contenido (g/100g aceite)	Ácido graso	Contenido en el aceite (g AG/ 100 g aceite)
Saturada	11,90	Ácido mirístico C14:0	0,06
		Ácido palmítico C16:0	7,56
		Ácido margárico C17:0	0,06
		Ácido esteárico C18:0	3,79
		Ácido araquídico C20:0	0,34
		Ácido behénico C22:0	0,09
Monoinsaturada	7,21	Ácido palmitoleico C16:1	0,06
		Ácido oleico C18:1 (ω -9)	6,61
		Ácido vaccénico C18:1	0,42
		Ácido <i>cis</i> -11-eicosanoico C20:1 (ω -9)	0,11
Poliinsaturada	80,9	Ácido linoleico C18:2 (ω -6)	80,69
		Ácido α -linolénico C18:3 (ALA, ω -3)	0,13
		Ácido <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentanoico C20:5 (EPA, ω -3)	0,07
Grasas <i>trans</i>	<0,01 g	N.A.	N.A.

N.A.: no aplica

Los usos que pueda tener un aceite en la industria alimentaria dependen de sus características físicas, químicas y sus propiedades nutricionales, las cuales están estrechamente ligadas a su composición de ácidos grasos (Hamm, Hamilton y Calliau, 2013). A nivel nutricional, los ácidos laúrico, mirístico y palmítico son considerados aterogénicos; es decir, aumentan el nivel de colesterol sérico, debido a que interfieren con la función normal de los receptores de lipoproteínas de baja densidad, aumentando su concentración en el plasma. De los tres ácidos grasos mencionados, el ácido mirístico

se considera el principal promotor del aumento de colesterol en sangre. (Castro-Bolaños, Herrera Ramírez y Lutz-Cruz, 2005).

Se puede observar que el aceite de semillas de guayaba obtenido no posee una cantidad detectable de ácido láurico, contiene una mínima cantidad de ácido mirístico y la proporción de ácido palmítico en la muestra es menor a la presente en el aceite de oliva (Hamm, Hamilton y Calliauw, 2013). Al contener en su mayoría ácidos grasos insaturados, junto con un bajo contenido de ácidos grasos aterogénicos, el aceite de semillas de guayaba muestra tener potencial para actuar como un aceite con acción protectora cardiovascular. La proporción ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados del aceite obtenido (0,135) se asemeja a la que poseen aceites comerciales provenientes de la soya, maíz y girasol, los cuales son conocidos por su contribución en la reducción del riesgo de desarrollar enfermedades coronarias (Castro-Bolaños, Herrera-Ramírez y Lutz-Cruz, 2005).

Los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linolénico, el cual es un ácido graso omega 3 (ω -3) y el ácido linoleico, el cual es un ácido graso omega 6 (ω -6), son ácidos grasos esenciales, ya que el cuerpo humano no es capaz de sintetizarlos, por la ausencia de las enzimas requeridas. Por lo tanto, deben ser consumidos en la dieta, ya que son los precursores de otros ácidos grasos importantes para llevar a cabo funciones en el organismo (Kostik, Memeti y Bauer, 2013). El aceite obtenido en el presente estudio se caracteriza por tener un alto contenido de ácido linoleico, pero una cantidad baja de ácido linolénico. Algunos estudios han demostrado la importancia del consumo de estos ácidos grasos, no solo para promover una buena salud coronaria, sino que también contribuyen en la prevención del cáncer, enfermedades inflamatorias, autoinmunes y trombosis, hipertensión, diabetes tipo II, enfermedades renales, artritis reumatoidea, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (Orsavova *et al.*, 2015). El único aspecto negativo de la composición obtenida es que al casi no tener ácido linolénico, la cantidad de omega 6 que presenta respecto al omega 3 es muy alta. Se recomienda que en un aceite comestible la relación ω -6/ ω -3 sea máximo de 11:1,

por lo que en el caso del aceite de semilla de guayaba, se presenta una deficiencia de ácidos grasos omega 3. No obstante, el aceite puede tener potencial para ser utilizado no solo en la industria alimenticia, sino también en la industria farmacéutica y cosmética (Sheppard y Cheatham, 2018).

Orsavova *et al.* (2015) analizaron en su investigación la composición de los aceites obtenidos de diferentes fuentes vegetales. En la investigación se determinó que el ácido graso poliinsaturado de mayor abundancia es el ácido linoleico, con concentraciones desde 54,3 % en aceite de semillas de calabaza, hasta 79,1 % en semillas de cártamo, lo cual coincide con los resultados obtenidos.

El Cuadro XVIII muestra una comparación, de los principales ácidos grasos encontrados en el aceite de guayaba obtenido en el presente trabajo, respecto al reportado en otros estudios.

Cuadro XIX. Contenido promedio (en porcentaje) de los principales ácidos grasos presentes en muestras de diferentes investigaciones sobre aceite de semillas de guayaba.

Ácido graso	Presente estudio	Cerón, Hurtado y Ayala, 2016,	Uchôa-Thomaz <i>et al.</i> , 2014	Arain <i>et al.</i> , 2017	Opute, 1978
Palmítico C16:0	7,56	10,68	8,00	14,81	9,7
Esteárico C18:0	3,79	3,12	4,48	9,08	3,4
Oleico C18:1	6,61	7,76	9,42	12,57	7,8
Linoleico C18:2	80,69	78,06	77,35	60,03	79,1

No se han realizado numerosas investigaciones sobre el aceite de semillas de guayaba; sin embargo, hay algunas que han tenido interés por reportar el perfil de ácidos grasos que se resume en el cuadro anterior. En general, se tiene para todas las investigaciones que el ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1) y ácido linoleico (C18:2) representan el grueso de los componentes del aceite. En su mayoría, el perfil de ácidos grasos es similar en todos, y se observa que el ácido graso mayoritario es el linoleico, con un porcentaje que ronda el 80%, con excepción

de la composición reportada por Arain *et al.* (2017) que indican un menor contenido de ácido linoleico y una mayor proporción de ácidos grasos saturados.

El Cuadro XIX muestra los resultados de los propiedades físicas y químicas que presenta el aceite de semillas de guayaba extraído con acetato de etilo, y su comparación con valores reportados para el aceite de semillas de guayaba en otras investigaciones. También, en el cuadro se presentan propiedades de aceites obtenidos de semillas con una composición de ácidos grasos similar, para así realizar una comparación de los resultados para los parámetros evaluados.

Cuadro XX. Características fisicoquímicas del aceite de semillas de guayaba extraído con acetato de etilo y otros aceites de composición similar.

Parámetro	Presente estudio	Semillas de uva ¹	Semillas de cártamo ²	Semillas de guayaba ³	Semillas de guayaba ⁴
Densidad relativa 20 °C (g/ mL)	0,93±0,04	0,920-0,926	0,9219-0,921	NR	0,9207*
Índice de refracción (n _{20 °C})	1,4768±0,0003	1,475-1,485	1,470-1,473	NR	1,4849
Índice de saponificación (mg KOH/ g TAG)	202±1	188-194	211,5-218,4	190,74±0,04	196
Índice de yodo (cg I ₂ / g TAG)	93,5±0,8	128-150	143-147	120,55±0,05	134

¹Codex Alimentarius, 1999; ²Khalid *et al.*, 2017; ³Arain *et al.*, 2017; ⁴Prasad y Azeemoddin, 1994.

NR: no reportado. *Medición realizada a 30 °C.

Los parámetros mostrados se utilizan normalmente como punto de referencia para determinar la identidad y la calidad de un aceite. Por ejemplo, cada tipo de aceite tiene un rango definido en el que se encuentra su índice de refracción. Este parámetro, por lo general, se relaciona con el grado de insaturaciones de un aceite y el largo de las cadenas de ácidos grasos, donde conforme un aceite es más insaturado y posee ácidos grasos de cadenas largas, su índice de refracción es mayor (Cho, Kim y Gil, 2013). El índice de refracción del aceite de guayaba es alto al compararlo con el que presenta un aceite con un alto contenido de ácidos grasos saturados como el aceite de coco, cuyo

índice de refracción no supera el valor de 1,450 (Codex Alimentarius, 1999). Los aceites de semillas de uva y cártamo, pueden contener entre un 78 % y un 83 % de ácido linoleico respectivamente, ácido graso que se encuentra en proporción similar en el aceite de semillas de guayaba, por lo que el índice de refracción obtenido concuerda con los datos presentados en el cuadro.

Al comparar con los valores de densidad de los aceites de semillas de cártamo y uva, se obtuvo una densidad mayor promedio del aceite de semillas de guayaba extraído con acetato de etilo, incluso mayor también al compararlo con el valor reportado por Prasad y Azeemoddin (1994). No obstante, los resultados fueron similares a los valores indicados para el aceite de semillas de uva y de cártamo. Es importante mencionar que pueden darse cambios en la densidad entre el aceite crudo y el obtenido luego de procesos de refinamiento, donde normalmente la densidad disminuye levemente (Nieblas y Moreno, 1993). Además, como se mencionó anteriormente (Sección 5.2), durante la extracción se pueden haber obtenido otros compuestos más densos, así como partículas pequeñas del residuo de las semillas, lo cual puede afectar el valor obtenido.

El índice de saponificación (I_s) da un indicio sobre el largo de la cadena de los ácidos grasos que componen el aceite, y brinda una idea de la masa molar de éstos. Como se determinó, el aceite de semillas de guayaba contiene mayoritariamente ácidos grasos de 16 y 18 carbonos en su cadena. En comparación con el aceite de semillas de guayaba de los otros estudios, muestra un I_s ligeramente mayor, lo cual puede deberse a pequeñas diferencias en la composición de los aceites, en su proporción de sustancias saponificables con masas molares grandes. En comparación con índice de saponificación de los otros tipos de aceite mostrados en el Cuadro XIX, el que presenta el aceite de guayaba es mayor al del aceite de semilla de uva, pero menor al de semilla de cártamo.

El promedio de la cantidad de insaturaciones en un aceite está dado por el índice de yodo. Se espera que un aceite con una alta cantidad de ácidos grasos insaturados

presente un índice de yodo alto, como muestran los datos de la literatura para los aceites de semillas de uva, cártamo y guayaba. Sin embargo, para el aceite extraído en el presente estudio, se obtuvo un índice de yodo promedio de 93,5 cg I₂/ g TAG, el cual se considera bajo para el alto contenido de ácido linoleico que presenta.

De acuerdo con la literatura, el índice de yodo del aceite de semilla de guayaba es similar al que se obtendría para un aceite con un alto contenido de ácido oleico como el de oliva o aguacate (Dymińska *et al.*, 2017). Uno de los posibles motivos por los cuales se obtuvo un valor tan bajo del índice de yodo en comparación a los presentados por otros estudios, puede deberse a que el método de análisis en sí es propenso a que ocurran errores durante la determinación. Por otro lado, el índice de yodo también está relacionado con la estabilidad oxidativa del aceite. En este caso, puede ser indicativo que el aceite presenta cierto grado de oxidación (Knothe, 2002).

Como parte de la evaluación de las propiedades fisicoquímicas del aceite de semillas de guayaba, también se determinaron los siguientes parámetros: índice de acidez, índice de peróxidos, los coeficientes de extinción K₂₃₂ y K₂₇₀, y contenido de vitamina E expresado como α -tocoferol. Los primeros tres parámetros se utilizan para evaluar la calidad del aceite respecto al estado de oxidación después de la extracción. Los resultados se muestran en el Cuadro XX.

Cuadro XXI. Características químicas de calidad del aceite de semillas de guayaba.

Parámetro		Presente estudio	Otros estudios
Índice de acidez (mg KOH/g TAG)		3,29±0,03	3,74±0,07 ¹
Índice de peróxidos (meq peróxidos/kg TAG)		13±2	4,13±0,02 ¹
Coeficientes de extinción (mL/g·cm)	K ₂₃₂	0,50±0,02	NR
	K ₂₇₀	0,50±0,01	NR
Vitamina E (mg eq α -tocoferol/100 g aceite)		33,70	14,2 ²

¹Arain *et al.* (2017), ²Da Silva y Jorge (2014). NR: no reportado.

Según El-Adawy y Taha (2001), se ha establecido que un aceite crudo o no refinado puede contener una cantidad de ácidos grasos libres equivalentes a 4 mg KOH/g aceite. Para el aceite de semillas de guayaba extraído con acetato de etilo se obtuvo un valor promedio de 3,29 mg KOH/ g aceite, muy similar al reportado por Arain *et al.* (2017). Giuffrè, Zappia y Capocasale (2017) mencionan que los disolventes orgánicos con cierto nivel de polaridad, como el acetato de etilo, pueden extraer mayor cantidad de ácidos grasos libres que los disolventes no polares.

Los ácidos grasos libres se generan por la degradación hidrolítica de los triacilglicerolos; por lo tanto, son compuestos que se encuentran naturalmente en los aceites crudos. Sin embargo, éstos también se han asociado a los fenómenos de oxidación, primero por su actividad prooxidante y porque se ha visto que sufren de autooxidación a una mayor velocidad que sus respectivos metil ésteres (Paradiso *et al.*, 2010). Los ácidos grasos libres también disminuyen la tensión superficial del aceite y aumentan la tasa de difusión de oxígeno hacia el mismo, aumentando las reacciones de oxidación (Choe y Min, 2006). Si bien es cierto que durante el proceso de refinado de un aceite se logra disminuir el índice de acidez por la neutralización de los ácidos grasos libres, es indeseable que desde un inicio se tenga un alto valor en el índice de acidez, ya que la concentración de ácidos grasos libres aumentará durante el almacenamiento, además que puede promover los procesos de oxidación del aceite de semillas de guayaba.

Como se mencionó anteriormente, la desventaja de que un aceite presente un contenido alto de ácidos grasos insaturados es que lo hace muy susceptible a la oxidación. El índice de peróxidos del aceite obtenido corresponde a un valor de 13 ± 2 meq peróxidos/ kg TAG, el cual supera el límite de 10 meq peróxidos/kg TAG establecido para aceites comerciales, y se encuentra muy cerca del límite máximo permitido para aceite vírgenes como el de oliva (15 meq peróxidos/kg TAG) (Codex Alimentarius, 1999). En función de los otros parámetros medidos, el alto valor para el índice de peróxidos coincide con el bajo índice de yodo obtenido. La susceptibilidad a

la formación de radicales aumenta con la cantidad de insaturaciones, y debido al alto contenido de ácido linoleico, es posible que el aceite obtenido presentara cierto grado de oxidación (Semb, 2012).

Una de las etapas de la recuperación del aceite a partir del extracto de acetato de etilo consiste en la evaporación del disolvente con presión de vacío y baja temperatura, en un rotavapor. Este proceso no tiene la capacidad para remover por completo el disolvente del aceite, por lo que se requirió calentarlo en una estufa a 100 °C por dos horas y someterlo a agitación a temperatura ambiente para remover el acetato de etilo en su totalidad. Este proceso de recuperación del aceite, libre de disolvente, es un proceso lento por la baja capacidad del equipo. Los factores como la alta temperatura, la exposición a la luz y al oxígeno y la presencia de prooxidantes como los ácidos grasos libres, entre otros; influyen mucho en la velocidad con la que un aceite se oxida, pudieron estar presentes durante estas etapas y en otras como la molienda (Semb, 2012). Se considera que el proceso de recuperación del aceite utilizado pudo contribuir en cierta medida a la oxidación del aceite, previo a obtener el producto final, que luego fue almacenado en un recipiente ámbar y en refrigeración, por lo que se recomienda utilizar un equipo con mayor capacidad o un método de separación que no afecte la calidad del aceite.

La autooxidación de los ácidos linoleico y linolénico produce compuestos conjugados. Este tipo de compuestos se evalúan midiendo la absorbancia del aceite en el espectro ultravioleta a 232 y 270 nm. Para la muestra analizada, se obtuvo un valor de $0,50 \pm 0,01$ mL/g·cm para dienos conjugados (K_{232}). En el caso del aceite de oliva, se permite un máximo de 2,50 mL/g·cm para el K_{232} , por lo que se observa al comparar con el límite máximo, que el valor obtenido es bajo.

Por otro lado, los trienos conjugados (K_{270}), absorben en el rango de 268-270 nm, y representan productos secundarios de la oxidación (Romero, 2015). Para el aceite de oliva, se tiene un límite máximo para el K_{270} de 0,50 mL/g·cm. Para la muestra analizada, se obtuvo un resultado de $K_{270} = 0,50 \pm 0,02$ mL/g·cm, que corresponde al

límite máximo permitido, lo cual puede indicar que en el aceite de guayaba, al momento de la medición, ya se habían formado compuestos secundarios, a partir de la oxidación de los dobles enlaces de ácidos grasos insaturados.

Romero (2015) indica que la presencia de compuestos conjugados en un aceite puede deberse a una mala manipulación del aceite. En este caso, la presencia de estos compuestos podría deberse a la exposición al oxígeno y temperatura que sufrió el aceite durante la remoción del acetato de etilo residual, como se mencionó anteriormente. Aunado a esto, el valor obtenido para el índice de peróxidos concuerda con el indicio de la presencia de compuestos conjugados dado por el alto valor obtenido para el índice de trienos conjugados. Todo indica que el aceite presentó cierto grado de oxidación.

El último análisis realizado corresponde a la determinación del α -tocoferol, que representa el isómero más activo de la vitamina E encontrado naturalmente. El α -tocoferol es un producto muy empleado en la industria de alimentos por sus propiedades antioxidantes, las cuales se atribuyen a la protección de los ácidos grasos poliinsaturados contra la oxidación. Además, dentro del cuerpo humano también ocupa una función antioxidante en la parte lipídica de las membranas celulares (FAO/WHO, 2001).

El contenido de α -tocoferol encontrado en el aceite del presente estudio es alto, ya que contiene aproximadamente el doble de α -tocoferol reportado por Da Silva y Jorge (2014) para este aceite (14,2 mg eq α -tocoferol/100 g aceite). Inicialmente, se considera como buen atributo del aceite por su actividad antioxidante y su acción como vitamina E dentro del organismo; sin embargo, algunos estudios han encontrado que así como este compuesto tiene propiedades protectoras en la oxidación de un aceite, en algunas ocasiones también puede actuar como prooxidante. Se ha encontrado que altos niveles de tocoferoles en un aceite no contribuyen a aumentar su estabilidad oxidativa, sino que más bien promueven la propagación de radicales libres (Choe y Min, 2006; Morales y Przybylski, 2013).

De acuerdo con Martin-Rubio *et al.* (2018), en el caso del aceite de soya, las altas concentraciones de α -tocoferol no solo exhiben acción prooxidante, sino que además son capaces de modificar las rutas de las reacciones de oxidación. Este hecho afecta no solo la velocidad de aparición de productos de la oxidación que se generan, sino también su naturaleza y concentración. En dicho estudio, se encontró presencia de aldehídos y monoepóxidos derivados de ácido linoleico, en estados tempranos de oxidación inducida por calor. Bakır *et al.* (2013) también encontraron en su estudio un comportamiento prooxidante de los tocoferoles, en este caso en sistemas que involucran ácido ascórbico. Como se mencionó anteriormente, el alto contenido de ácido linoleico y α -tocoferol podrían causar la oxidación prematura del aceite, considerando los resultados obtenidos para los índices de acidez, peróxidos y coeficientes de extinción.

No obstante, es complicado lograr correlacionar todos los parámetros medidos para determinar el estado de oxidación en que encontraba el aceite. Por un lado, en algunos parámetros físicos evaluados como el índice de refracción, no se ve reflejado un resultado fuera de lo esperado, ya que según Fekarurhobo, Obomanu y Maduelosi (2009) el índice de refracción de un aceite se vería alterado si está en una etapa avanzada de deterioro. Por otra parte, los coeficientes de extinción dan indicios de que el aceite puede estar en una segunda etapa de oxidación. Como se conoce, con la determinación de un valor del índice de peróxidos por sí solo, no se puede determinar el estado de oxidación del aceite.

Por tanto, se debería complementar el estudio de la calidad del aceite de semillas de guayaba con una curva del contenido de compuestos peróxidos en el tiempo. También, se puede emplear el índice de *p*-anisidina para evaluar la presencia de compuestos secundarios de oxidación, considerando que se detectó la presencia de compuestos conjugados con el índice K_{270} . Es importante que se emplee una forma más rápida y eficiente de separar el aceite del disolvente para evitar su exposición al oxígeno, a altas temperaturas y a la luz para lograr obtener un aceite con una alta

calidad. Las propiedades encontradas para el aceite de semillas de guayaba indican que su calidad no es la mejor para su uso, por lo que se deben mejorar las condiciones de recuperación.

6. CONCLUSIONES

6.1. Comparación del rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba mediante extracción convencional y asistida por ultrasonido

- El rendimiento de extracción del aceite de semilla de guayaba obtenido al emplear acetato de etilo como disolvente con el método Soxhlet, produce un rendimiento menor que el obtenido al emplear éter de petróleo.
- El uso de una extracción asistida por US no provoca una mejora en el rendimiento de obtención de aceite de guayaba al compararla con el método de extracción convencional, a las condiciones evaluadas.
- El tamaño de partícula pequeño del residuo de guayaba empleado parece que provoca una la velocidad de extracción del aceite alta, al aplicar ambos métodos.

6.2. Determinación de las condiciones óptimas de extracción

- Las variables relación disolvente/sustrato, la temperatura y el tiempo de extracción, tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba.
- Según la cinética de extracción elaborada, se alcanza el equilibrio de la extracción de aceite en un tiempo de 5 min, empleando las condiciones de extracción seleccionadas de la optimización.
- Bajo las condiciones evaluadas, el mayor rendimiento de aceite se obtiene cuando se emplea una relación acetato de etilo/residuo de guayaba seco de 7,0, una temperatura de 40 °C y un tiempo de extracción de 60 minutos.
- Las condiciones de extracción de aceite de semillas de guayaba: temperatura de 36 °C, tiempo de 10 min y una relación acetato de etilo/residuo de guayaba seco de 6,2 producen un rendimiento de $10,14 \pm 0,09$ g aceite/ g residuo.

6.3. Evaluación de la calidad del aceite obtenido utilizando parámetros fisicoquímicos

- El aceite de semilla de guayaba es un aceite con un alto contenido de ácidos grasos insaturados, compuesto principalmente por ácido linoleico (80,69 %), ácido palmítico (7,56 %), ácido oleico (6,61 %) y ácido esteárico (3,79 %).
- Los valores obtenidos para el índice de refracción ($1,4768 \pm 0,0003$) y la densidad relativa a 20 °C ($0,93 \pm 0,04$ g/ mL) indican que los ácidos grasos del aceite presentan una gran cantidad de insaturaciones.
- El índice de saponificación encontrado en el aceite (202 ± 1 mg KOH/ g TAG) indican que está compuesto por ácidos grasos de cadena larga como ácido linoleico, ácido oleico y ácido esteárico.
- El aceite presenta un índice de peróxidos alto (13 ± 2 meq peróxidos/ kg TAG), y un valor de trienos conjugados alto ($0,50 \pm 0,02$ mL/ g·cm) los cuales sugieren la presencia de cierto grado de oxidación.
- Se determinó un alto contenido de tocoferoles en el aceite (33,70 mg eq α -tocoferol/100 g aceite), el cual pudo contribuir con la oxidación del aceite al actuar como un prooxidante.
- De acuerdo con la evaluación de propiedades químicas de calidad, el aceite extraído presenta cierto grado de oxidación debido a las condiciones adecuadas de recuperación, por lo que esta etapa se debe modificar para mejorar la calidad del producto final. No obstante, el aceite tiene gran potencial para su uso en diferentes industrias como alimentaria y cosmética.

7. RECOMENDACIONES

1. Utilizar un sustrato (semillas molidas) con tamaño promedio de partícula mayor al empleado ($447\ \mu\text{m}$), obtenido por quebrado de las semillas o una molienda gruesa, para evaluar la eficacia del uso del ultrasonido sobre este sustrato.

2. Evaluar el costo económico que puede tener, a nivel industrial, la operación de reducción del tamaño de partícula de las semillas de guayaba y su factibilidad como método para reducir costos en el proceso, mediante la reducción del tiempo de extracción.

3. Evaluar la extracción de aceite de semillas de guayaba en dos etapas con las condiciones seleccionadas.

4. Realizar la evaluación de una cinética de extracción, tomando muestras del extracto cada minuto, al menos durante los primeros cinco minutos de extracción.

5. Realizar una comparación del rendimiento, propiedades fisicoquímicas y la estabilidad oxidativa del aceite de semillas de guayaba extraído con acetato de etilo respecto a un aceite de semillas de guayaba extraído con hexano.

6. Elaborar una curva de concentración de peróxidos en el aceite respecto al tiempo, junto con la medición del índice de *p*-anisidina, para tener conocimiento del proceso de oxidación del aceite.

7. Implementar un método para la recuperación del aceite en el extracto de acetato de etilo, que no someta al producto a condiciones a alta temperatura y agitación por tiempos prolongados.

8. Evaluar el efecto de la operación de recuperación del aceite con alta temperatura y agitación sobre los parámetros que indican su nivel de oxidación: índice de peróxidos, K_{232} y K_{270} .

9. Una vez establecido un método más eficiente para la separación y purificación del aceite del disolvente, realizar un estudio de vida útil para evaluar su calidad oxidativa, y por lo tanto su idoneidad para comercializarse como un aceite alternativo.

8. REFERENCIAS

- ABDULLAH, M. y KOC, B. 2013. Oil removal from waste coffee grounds using two-phase solvent extraction enhanced with ultrasonication. *Renewable Energy*, 50: 965-970.
- AKOH, C. 2017. *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*. CRC Press, Estados Unidos.
- ANDERSON, 2011. *Solvent Extraction*. Crown Iron Works Company. INTERNET: <http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40337>. (Recuperado: 20 de Julio, 2018).
- AOAC. 2001. *Official Methods of Analysis*. Method 996.06. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- AOAC. 2005a. *Official Methods of Analysis*. Method 920.151. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- AOAC. 2005b. *Official Methods of Analysis*. Method 920.39. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- AOAC. 2005c. *Official Methods of Analysis*. Method 921.08. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- AOAC. 2005d. *Official Methods of Analysis*. Method 920.160. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- AOAC. 2005e. *Official Methods of Analysis*. Method 920.158. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- AOAC. 2005f. *Official Methods of Analysis*. Method 965.33. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.

- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis. Method 940.28. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- AOCS. 2000. Method Ce 1e-91 Fatty Acid Composition by capillarity GC. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, Illinois.
- ARAIN, A.; SHERAZI, T.; MAHESAR, S. y SIRAJUDDIN. 2017. Spectroscopic and chromatographic evaluation of solvent extracted guava seed oil. *International Journal of Food Properties*, 20(1): 556-563.
- ARIŞANU, A.O. 2013. Mechanical continuous oil expression from oilseeds: oil yield and press capacity. En International Conference "Computational Mechanics and virtual engineering", 5°, Braşov, Rumania.
- ARMIJO, O. 2014. Valorización de los subproductos de la industrialización de palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes*) para la elaboración de un producto en polvo con alto contenido de fibra dietética. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- ARMIJO. 2016. Comunicación personal. Información sobre el procesamiento de la guayaba en la empresa Productos Ujarrás S.A. La Unión, Cartago.
- BACIO, L. 2007. Optimización multi-objetivo en el problema de Metodología de Superficie Multi-respuesta. Tesis para optar por el grado de Maestría de Ciencias con especialidad en probabilidad y estadística. CIMAT. Guanajuato, México.
- BADUI, S. 2006. Química de los alimentos. 4 ed. Pearson Educación. México.
- BAKİR, T.; BEKER, B.Y.; SÖNMEZOĞLU, İ.; İMER, F. y APAK, R. 2013. Antioxidant and prooxidant effects of α -tocopherol in a linoleic acid-copper (II)-ascorbate system. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 115: 372-376.

- BAŞ, D. y BOYACI, İ. 2007. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78: 836-845.
- BAYSAL, T. y DEMIRDOVEN A. 2011. Ultrasound in Food Technology. En CHEN, D.; SHARMA, S. & MUDHOO, A. eds. *Handbook of applications of ultrasound: sonochemistry for sustainability*. CRC Press, Estados Unidos.
- BELITZ, H.; GROSCH, W. y SCHIEBERLE, P. 2009. *Food Chemistry*. 4 ed. Springer, Berlín.
- BERA, D.; LAHIRI, D.; LEONARDIS, A. DE; DE, K. y NAG, A. 2006. A Novel Azeotropic Mixture Solvent for Solvent Extraction of Edible Oils. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. Manuscript FP 06 005. 8:1-6.
- BEST NATURE'S COSMETIC. 2018. Guava seed oil organic. INTERNET: <https://bestnatures.com/search?q=guajava> (Recuperado: 19 de Julio, 2018).
- BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S. y ESCALEIRA, L.A. 2008. Response Surface Methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76: 965-977.
- BIMAKR, M.; RAHMAN, R.A.; SALEENA, F.; ADZAHAN, N.M.; ISLAM, S. y GANJLOO, A. 2013. Ultrasound-assisted extraction of valuable compounds from winter melon (*Benincasa hispida*) seeds. *International Food Research Journal*, 20(1): 331-338.
- BOGANTES-ARIAS, A. y MORA-NEWCOMER, E. 2010. Evaluación de cuatro patrones para injertos de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Agronomía Mesoamericana*, 21(1): 103-111.
- CASTRO, H.; RESTREPO, L. y PARADA, F. 2010. Semillas de guayaba: ¿residuo o subproducto? En MORALES, A. Y MELGAREJO, L. eds. *Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba (Psidium guajava L.) para el*

fortalecimiento de la cadena productiva. Universidad Nacional de Colombia, Panamericana Formas e Impresos S.A.

CASTRO, H.; RODRÍGUEZ, L. y PARADA, F. 2011. Guava (*Psidium guajava* L.) seed oil obtained with a homemade supercritical fluid extraction system using supercritical CO₂ and co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 56: 238-242.

CASTRO-BOLAÑOS, M.; HERRERA-RAMÍREZ, C. y LUTZ-CRUZ, G. 2005. Composición, caracterización y potencial aterogénico de aceites, grasas y otros derivados producidos o comercializados en Costa Rica. *Acta méd. costarric*, 47(1), ISSN 0001-6012.

CERÓN, L.; HURTADO, A. y AYALA, A. 2016. Efecto de la presión y temperatura de extracción con CO₂ supercrítico sobre el rendimiento y composición de aceite de semillas de guayaba (*Psidium guajava*). *Información Tecnológica*, 27(6): 248-258.

CHAN, C.; YUSOFF, R. y NGOH, G. 2014. Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, 92: 1169-1186.

CHANDRAPALA, J., OLIVER, C., KENTISH, S. y ASSHOKUMAR, M. 2012. Ultrasonics in food processing-Food quality assurance and food safety. *Trends in Food Science and Technology*. 26: 88-98.

CHANDRASEKARAN, M. y SHINE, K. 2013. Seed oils. En CHANDRASEKARAN, M. ed. *Valorization of Food Processing by-Products*. CRC Press. Estados Unidos.

CHEMAT, S. 2017. *Edible oils: extraction, processing and applications*. CRC Press, Estados Unidos.

CHO, Y.; KIM, T. y GIL, B. 2013. Correlation between refractive index of vegetable oils measured with surface plasmon resonance and acid values determined with the AOCS official method. *LWT- Food Science and Technology*, 53: 517-521.

- CHOE, E. y MIN, D. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5: 169-186.
- CHRISTIE, W. y HAN, X. 2010. *Lipid analysis: isolation, separation identification and lipidomic analysis*. 4 ed. Woodhead Publishing Limited. Reino Unido.
- CISSÉ, M.; BOHUON, P.; SAMBE, F.; KANE, C.; SAKHO, M. y DORNIER, M. 2012. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, 109: 16-21.
- CITA 2015. Ácidos grasos saturados, insaturados, trans y omegas por CG, P-SA-MQ-034. Emisión n° 7. San José, Costa Rica.
- CNP. 2014. Ficha técnica: Industrialización de la guayaba (*Psidium guajava* L.). INTERNET. http://www.cnp.go.cr/biblioteca/fichas/Guayaba_FTP.pdf (Recuperado: 26 de abril, 2016).
- CODEX ALIMENTARIUS. 1999. Standard for Named Vegetable Oils. CODEX STAN 210-1999. FAO/WHO.
- CONEJO, V. 2016. Extracción de aceite de semilla de mora (*Rubus adenotrichos*), utilizando isopropanol como disolvente y evaluación de sus propiedades fisicoquímicas, de calidad y estabilidad oxidativa. Tesis de grado para optar por el título de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- DA PORTO, C.; PORRETTO, E. y DECORTI, D. 2013. Comparison of ultrasound- assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20: 1076-1080.
- DA SILVA, A. y JORGE, N. 2014. Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. *Food Research International*, 66: 493-500.

- DA SILVA, E.; DA SILVA, D.; RABELLO, C.; LIMA, R.; LIMA, M. y LUDKE, J. 2009. Physicochemical composition and energy and nutritional characteristics of guava and tomato residues for free range broilers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(6): 1051-1058.
- DYMIŃSKA, L.; CALIK, M.; ALBEGAR, A.; ZAJĄC, A.; KOSTYŃ, K.; LORENC, J. y HANUZA, J. 2017. Quantitative determination of the iodine values of unsaturated plant oils using infrared and Raman spectroscopy methods. *International Journal of Food Properties*, 20(9): 2003-2015.
- EFTHYMIOPOULOS, I.; HELLIER, P.; LADOMMATOS, N.; RUSSO-PROFILI, A.; EVELEIGH, A.; ALIEV, A.; KAY, A. y MILLS-LAMPTEY, B. 2018. Influence of solvent selection and extraction temperature on yield and composition of lipids extracted from spent coffee grounds. *Industrial Crops & Products*, 119: 49-56.
- EL-ADAWY, T. y TAHA, K. 2001. Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*, 74: 47-54.
- FAO. 1997. *Grasas y aceites en la nutrición humana*. FAO/OMS. Roma, Italia.
- FAO. 2003. *Medium-term prospects for agricultural commodities*. FAO. Roma, Italia.
- FAO. 2008. *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana*. FAO. Ginebra, Suiza.
- FAO/WHO. 2001. *Human vitamin and mineral requirements*. FAO. Roma, Italia.
- FEKARURHOB, G.K.; OBOMANU, F.G. y MADUELOSI, J. 2009. Effects of short-term exposure to sunlight on the quality of some edible vegetable oils. *Research Journal of Applied Sciences*, 4(5): 152-156.
- FIRESTONE, D. 2009. *Official methods and recommended practices of the American Oils Chemists' Society*. 6 ed. American Oils Chemists' Society, Estados Unidos.

- FONTANARI, G.G.; BATISTUTI, J.P.; BANNACH, G.; PASTRE, I.A.; IONASHIRO, E.Y. y FERTONANI, F.L. 2006. Thermal study and physico-chemical characterization of some functional properties of guava seeds protein isolate (*Psidium guajava*). Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 83(3): 709-713.
- FUAD, F.; KARIM, K. y MAT DON, M. 2016. Ultrasound-assisted extraction of oil from *Calophyllum inophyllum* seeds: statistical optimization using Box-Behnken Design. Journal of Physical Science, 27(2): 103-121.
- GILBERT, J. y MARTIN, S. 2016. Experimental Organic Chemistry: a miniscale & microscale approach. 6 ed. Cengage, Reino Unido.
- GIUFFRÈ, A.M.; ZAPPIA, C. y CAPOCASALE, M. 2017. Tomato seed oil: a comparison of extraction systems and solvents on its biodiesel and edible properties. Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse, 94: 149-160.
- GÓMEZ, M. 2013. Identificación, frecuencia y distribución geográfica de *Meloidogyne* spp. y hongos de raíz en *Psidium guajava* L., en las principales zonas productoras de Costa Rica. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotecnia. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- GOULA, A. 2013. Ultrasound assisted extraction of pomegranate seed oil- Kinetic modeling. Journal of Food Engineering. 117: 492-498.
- GRASSO, F. 2013. Diseño del proceso: Pretratamiento enzimático para la extracción de aceites vegetales en un extractor de columna. Tesis de Doctorado en Ingeniería. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina.
- GUNSTONE, F.D. 2013. Composition and Properties of edible oils. En HAMM, W.; HAMILTON, R. & CALLIAUW, G. eds. Edible Oil Processing. John Wiley & Sons, Ltd. Reino Unido.

- GUPTA, 2017. Practical Guide to Vegetable Oil Processing. 2 ed. Elsevier, Estados Unidos.
- HAMM, W.; HAMILTON, R. y CALLIAUW, G. 2013. Edible Oil Processing. John Wiley & Sons, Ltd. Reino Unido.
- HERODEŽ, Š.S; HADOLIN, M.; ŠKERGET, M. y KNEZ, Ž. 2003. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. Food Chem., 80(2): 275-282.
- INEC. 2014. VI Censo Nacional Agropecuario: cultivos agrícolas, forestales y ornamentales. San José, Costa Rica.
- ISLAM, M N.; SABUR, A.; AHMMED, R. y HOQUE, M. E. 2015. Oil extraction from pine seed (*Polyalthia longifolia*) by solvent extraction method and its properties analysis. Procedia Engineering, 105: 613-618.
- IXTAINA, V. 2010. Caracterización de la semilla y aceite de chía (*Salvia Hispanica* L.) obtenido mediante distintos procesos. Aplicación en Tecnología de Alimentos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.
- JIMÉNEZ-QUIRÓS, P. 2018. Producción de jocote y guayaba susceptibles a mosca de la fruta. INTERNET: <https://www.sfe.go.cr/Prensa2018/CP-03%20Producci%C3%B3n%20de%20jocote%20y%20guayaba%20susceptible%20a%20la%20mosca%20de%20la%20fruta.pdf> (Recuperado: 26 de junio, 2018).
- KARDASH, E. y TUR'YAN, K. 2005. Acid value determination in vegetables oils by indirect titration in aqueous-alcohol media. Croatica Chemica Acta, 78 (1): 99-103.
- KEMPER, T. 2005. Oil Extraction. En SHAHIDI, F. ed. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 6 ed. John Wiley & Sons, Inc, Estados Unidos.

- KHALID, N.; KHAN, R.S.; HUSSAIN, M.I.; FAROOQ, M.; AHMAD, A. y AHMED, I. 2017. A comprehensive characterisation of safflower oil for its potential applications as a bioactive food ingredient: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 66: 176-186.
- KNOTHE, G. 2002. Structure indices in FA chemistry, how relevant is the iodine number? *JAACS*, 79(9): 847-854.
- KOOCHEKI, A.; TAHERIAN, A.; RAZAVI, S. y BOSTAN, A. 2009. Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. *Food Hydrocolloids*, 23: 2369-2379.
- KOSTIK, V.; MEMETI, S. y BAUER, B. 2013. Fatty acid composition of edible oils and fats. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 4: 112-116.
- LALAS, S. 2008. Quality of frying oil. EN SUMNU, S. & SAHIN, S. *Advances in deep-fat frying of foods*. CRC Press, Estados Unidos.
- LERAY, C. 2014. *Lipids: Nutrition and Health*. CRC Press, Estados Unidos.
- LEY N° 8839. 2010. Ley para la gestión integral de residuos. La Gaceta n°135, San José, Costa Rica.
- LI, H.; PORDESIMO, L. y WEISS, J. 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37: 731-738.
- LICHTENSTEIN, A. 2013. *Biochemical Sciences*. 3 Ed. Elsevier, Estados Unidos.
- LIM, T.K. 2012. *Edible Medicinal and Non-medicinal Plants: Volume 3, Fruits*. Springer Science+Business Media B.V., Estados Unidos.
- LIU, P.; XU, Y.; GAO, X.; ZHU, X.; DU, M.; WANG, Y.; DENG, R. y GAO, J. 2017. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of oil from the seed kernels and isolation of

monoterpene glycosides from the oil residue of *Paeonia lactiflora* pall. *Industrial Crops & Products*, 107: 260-270.

LOHANI, U.; FALLAHI, P. y MUTHUKUMARAPPAN, K. 2015. Comparison of Ethyl Acetate with Hexane for Oil Extraction from Various Oilseeds. *Journal of American Oil Chemists Society*, 92:743-754.

MAG. s.f. El cultivo de la guayaba. INTERNET:

http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_guayaba.pdf.

(Recuperado: 18 de julio, 2018).

MARIOD, A.A.; MIRGHANI, M.E.S. y HUSSEIN, I. 2017. *Unconventional oilseeds and oil sources*. Elsevier, Reino Unido.

MARTIN-RUBIO, A.S.; SOPELANA, P.; IBARGOITIA, M.L. y GUILLÉN, M. 2018. Prooxidant effect of α -tocopherol on soybean oil. Global monitoring of its oxidation process under accelerated storage conditions by ^1H nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry*, 245: 312-323.

MARTÍNEZ, C. y CEBALLOS, C. 2012. Determinación de actividad antioxidante en aceite de semillas de uva Isabella (*Vitis labrusca*) extraído con CO_2 supercrítico. Tesis de grado de Ingeniería de Alimentos. Universidad del Valle. Valle del Cauca, Colombia.

MARTÍNEZ, M. 2010. Extracción y caracterización de aceite de nuez (*Juglans regia* L.): influencia del cultivar y de factores tecnológicos sobre su composición y estabilidad oxidativa. Tesis de doctorado en Ciencias de la Ingeniería. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

MC DONALD, R. y MOSSOBA, M. 1997. *New techniques and applications in lipid analysis*. AOCS Press, Estados Unidos.

- MEDINA, G. 2010. Aceites y grasas comestibles. Universidad de Antioquía. INTERNET: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/424/Gilma_Medina/Grasasyaceites/Documento_Grasas_y_aceites.pdf (Recuperado: 2 de julio, 2018).
- MEDINA, M.L. y PAGANO, F. 2003. Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo “Criollo Roja”. Rev. Fac. Agron., 20: 72-86.
- MEDINA, N.N.R. y HERRERO, J.V.I. 2016. Guava (*Psidium guajava* L.) Cultivars: An Important Source of Nutrients for Human Health. EN SIMMONDS, M.S.J. y PREEDY, V.R. eds. Nutritional composition of fruit cultivars. Elsevier, Reino Unido.
- MONTGOMERY, D.C. 2004. Diseño y análisis de experimentos. 2 ed. Limusa, México.
- MORALES, M. y PRZYBYLSKI, R. 2013. Olive oil oxidation, EN APARICIO, R. & HARWOOD, J. Handbook of olive oil: Analysis and Properties. Springer, New York, Estados Unidos.
- NAGY, B. y SIMÁNDI, B. 2008. Effect of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika. J. of Supercritical Fluids, 46: 293-298.
- NIEBLAS, M.O. y MORENO, L.V. 1993. Caracterización fisicoquímica del aceite crudo y refinado de la semilla de *Proboscidea parviflora*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 44(1): 30-34.
- NORSHAZILA, S.; KOY, C.N.; RASHIDI, O.; HO, L.H.; AZRINA, I.; NURUL, RA. y ZARINAH, Z. 2017. The effect of time, temperature and solid to solvent ratio on pumpkin carotenoids extracted using food grade solvents. Sains Malaysiana, 46(2): 231-237.

- NYAM, K.L.; TAN, C.P.; LAI, O.M.; LONG, K. y CHE MAN, Y.B. 2009. Physicochemical properties and bioactive compounds of selected seed oils. *LWT- Food Science and Technology*, 42: 1396-1403.
- O'BRIEN, R. 2009. *Fats and Oils: formulating and processing for applications*. 3 ed. Taylor & Francis. Estados Unidos.
- OPUTE, F.I. 1978. The component fatty acids of *Psidium guajava* seeds fats. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 29: 737-738.
- ORSAVOVA, J.; MISURCOVA, L.; AMBROZOVA, J.; VICHA, R. y MLCEK, J. 2015. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 12871-12890.
- PARADISO, V.; GOMES, T.; NASTI, R.; CAPONIO, F. y SUMMO, C. 2010. Effects of free fatty acids on the oxidative processes in purified olive oil. *Food Research International*, 43: 1389-1394.
- PARIONA, A. 2017. Top guava producing countries in the world. *Worldatlas*. INTERNET: <https://www.worldatlas.com/articles/top-guava-producing-countries-in-the-world.html>. (Recuperado: 17 de Julio, 2018).
- PICHAJ, E. y KRIT, S. 2015. Optimization of solid-to-solvent ratio and time for oil extraction process from spent coffee grounds using response surface methodology. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, 10(16): 7049-7052.
- POPA, M.; GLEVITZKY, I.; DUMITREL, G., GLEVITZKY, M. y POPA, D. 2017. Study on peroxide values for different oils and factors affecting the Quality of sunflower oil. *Scientific Papers. Series E. Land Reclamation, Earth Observation & Surveying, Environmental Engineering*, 6: 137-140.

- PRASAD, N.B.L. y AZEEMODDIN, G. 1994. Characteristics and composition of Guava (*Psidium guajava* L.) seed and oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, 71(4): 457-458.
- PROCOMER. 2007. Perfil producto: guayaba. Dirección de Estudios Económicos y Estrategia. INTERNET:
<http://servicios.procomer.go.cr/aplicacion/civ/documentos/Perfil%20de%20Guayaba.pdf> (Recuperado: 18 de julio, 2018).
- QU, W.; PAN, Z. y MA, H. 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*, 99:16-23.
- QUIRANTES-PINÉ, R.; DOMÍNGUEZ-CORONA, J.J.; SEGURA-CARRETERO, A. y FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. 2009. Aceite de oliva: tesoro de Andalucía. Fundación Unicaja. España.
- QUIROGA, P. 2013. Evaluación de aceites esenciales y monoterpenos como agentes conservantes de las propiedades químicas y sensoriales de los alimentos. Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- QUIRÓS, A. 2016. Obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de mora. Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- RAMAKRISHNAN, S.; PRASANNAN, K.G. y RAJAN, R. 2004. Textbook of medical biochemistry. 3 ed. Orient Longman. India.
- RESTREPO, M. 2006. Producción más limpia en la Industria Alimentaria. *Producción + Limpia*. 1(1): 87-101.
- RODRÍGUEZ-MIRANDA, J.; HERNÁNDEZ-SANTOS, B.; HERMAN-LARA, E.; GÓMEZ-ALDAPA, C.; GARCÍA, S. y MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, C. 2014. Effect of some

variables on oil extraction yield from Mexican pumpkin seeds. *CyTA-Journal of Food*, 12(1):9-15.

RODRÍGUEZ-VINASCO, J. 2013. Implementación del análisis cuantitativo de índice de yodo para aceite de palma, aceite de pescado y sebo, en la Compañía Industrial de Productos Agropecuarios (CIPA S.A.). Tesis para optar por el grado de Tecnólogo Químico. Universidad Tecnológica de Pereira. Risaralda, Colombia.

ROMERO, I. 2015. Evaluación de indicadores de la calidad del aceite de oliva virgen: fortalezas, debilidades y oportunidades. Tesis para optar por el grado de Doctora en Química. Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

RUTKOWSKA, M.; NAMIEŚNIK, J. y KONIECZKA, P. 2017. Ultrasound-assisted extraction. En PENA-PEREIRA, F. y TOBISZEWSKI, M. eds. *The application of Green solvents in separation processes*. Elsevier, España.

SAMARAM, S.; MIRHOSSEINI, H.; TAN, C.; GHAZALI, Z.; BORDBAR, S. y SERJOUIE, A. 2015. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: Oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability. *Food Chemistry*. 172: 7–17.

SAYYAR, S.; ABIDIN, Z.; YUNUS, R. y MUHAMMAD, A. 2009. Extraction of oil from *Jatropha* seeds: optimization and kinetics. *American Journal of Applied Sciences*, 6(7): 1390-1395.

SAXENA, D.; SHARMA, S.K. y SAMBI, S.S. 2011. Comparative extraction of cottonseed oil by n-Hexane and Ethanol, *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, 6(1): 84-89.

SEMB, T.N. 2012. Analytical methods for determination of the oxidative status in oils. Tesis para optar por el título de Biotecnólogo. Norwegian University of Science and Technology. Trondheim, Noruega.

- SHAH, S.; SHARMA, A. y GUPTA, M.N. 2006. Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by combination of ultrasonication and aqueous enzymatic oil extraction. *Bioresource Technology*, 96: 121-123.
- SHAO, D.; ATUNGULU, G.; PAN, Z.; YUE, T.; ZHANG, A. y LI, X. 2012. Study of optimal extraction conditions for achieving high yield and antioxidant activity of tomato seed oil. *Journal of Food Science*, 77(8): 202-208.
- SHEPPARD, K. Y CHEATHAM, C. 2018. Omega-6/omega-3 fatty acids intake of children and older adults in the U.S.: dietary intake in comparison to current dietary recommendations and the Healthy Eating Index. *Lipids in Health and Disease*, 17(1): doi: 10.1186/s12944-018-0693-9.
- SICAIRA, A.; VIAN, M.; FINE, F.; JOFFRE, F.; CARRÉ, P.; TOSTAIN, S. y CHEMAT, F. 2015. Alternative bio-based solvents for extraction of fats and oils: solubility prediction, global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing. *Int. J. Mol. Sci*, 16: 8430-8453.
- SILVA, C.; GARCIA, V.A.S y ZANETTE, C.M. 2016. Chia (*Salvia hispánica* L.) oil extraction using different organic solvents: oil yield, fatty acids profile, and technological analysis of defatted meal. *International Food Research Journal*, 23(3): 998-1004.
- SINGH, S. 2011. Guajava (*Psidium guajava* L.). En YAHIA, E. ed. *Postharvest biology and Technology of tropical and subtropical fruits*. Vol. 3. Woodhead Publishing, Cambridge, Reino Unido.
- SINHA, L.; HALDAR, S. y MAJUMDAR, G. 2015. Effect of operating parameters on mechanical expression of solvent-soaked soybean-grits. *J Food Sci Technol.*, 52(5): 2942-2949.

- STANISAVLJEVIĆ, I.; LAZIĆ, M.L. y VELJKOVIĆ, V.B. 2007. Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14: 646-652.
- TAKEUCHI, T.M.; PEREIRA, C.G.; BRAGA, M.E.; MARÓSTICA, M.R.; LEAL, P.F. y MEIRELES, A.A. 2009. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. En MEIRELES, A.A. ed. *Extracting bioactive compounds for food products*. CRC Press, Estados Unidos.
- THE DAILY RECORDS. 2018. Top 10 largest guava producing countries in the world. INTERNET: <http://www.thedailyrecords.com/2018-2019-2020-2021/world-famous-top-10-list/world/largest-guava-producing-countries-world-fruits-states/6566/>. (Recuperado: 17 de Julio, 2018).
- THYAGARAJAN, P. 2012. Evaluation and optimization of cranberry seed oil extraction methods. Tesis para optar por el grado de Máster en Ingeniería de biorecursos. McGill University. Montreal, Canadá.
- TIWARI, B. 2015. Ultrasound: a clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*. 71: 100-109.
- TIWARI, B. y TROY, D. 2015. *Seaweed Sustainability: Food and non-food applications*. Elsevier. Estados Unidos.
- UCHÔA-THOMAZ, A.M.A.; SOUSA, E.C.; CARIOCA, J.O.B.; MORAIS, S. DE; LIMA, A. DE; MARTINS, C.G.; ALEXANDRINO, C.D.; FERREIRA, P.A.T.; RODRIGUEZ, A.L.M.; RODRIGUES, S.P.; THOMAZ, J.C.; SILVA, J. y RODRIGUES, L.L. 2014. Chemical composition, fatty acid profile and bioactive compounds of guava seeds (*Psidium guajava* L.). *Food Sci. Technol. Campinas*. 34(3): 485-492.

- VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L. y BATES, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry- A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9: 161-169.
- ZEBOUDJ, S.; BELHANÈCHE-BENSEMRA, N. y BELABBÈS, R. 2005. Use of surface response methodology for the optimization of the concentration of the sweet orange essential oil of Algeria by wiped film evaporator. *Journal of Food Engineering*, 67: 507-512.
- ZHANG, Z.; WANG, L.; LI, D.; JIAO, S.; CHEN, X. y MAO, Z. 2008. Ultrasound assisted-extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*. 62: 192-198.

9. APÉNDICE

Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta

Cuadro XXII. Análisis de varianza para el modelo generado en la superficie de respuesta de rendimiento de aceite (g/ 100 g residuo) de semillas de guayaba.

Fuente de variación	SS	df	MS	F	p
Regresión	5,613	5	1,123	154,76	<0,001
Residual	0,643	14	0,046		
Falta de ajuste	0,461	9	0,051	1,413	0,368
Error puro	0,182	5	0,036		
Total SS	6,256	19			
R2	0,90				

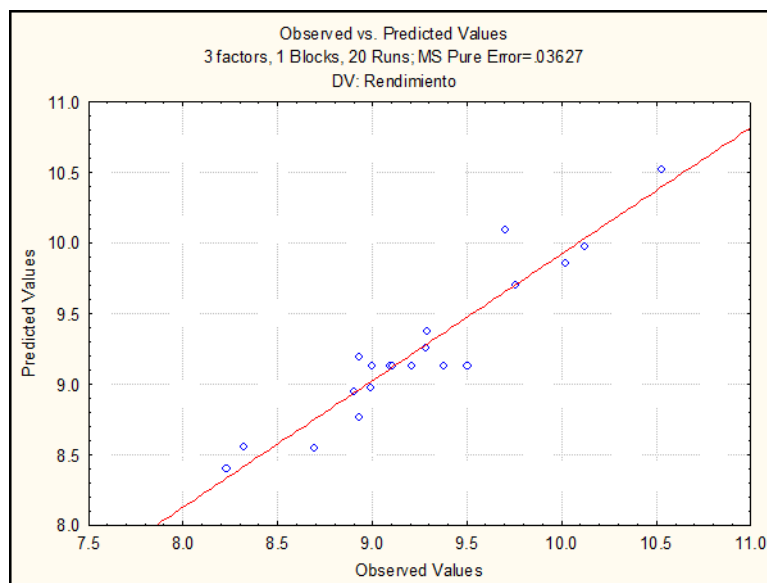


Figura 13. Relación entre los residuos predichos y los observados para el rendimiento de extracción de aceite de semilla de guayaba.

Resultados empleados para la elaboración de la cinética de extracción de aceite de semillas de guayaba

Cuadro XXIII. Concentración de aceite en 25 g de extracto para la construcción de la cinética de extracción de aceite.

Tiempo (min)	Concentración (mg/25 g)	
	Repetición 1	Repetición 2
0	0	0
5	15,580	15,068
10	15,012	14,952
15	15,432	14,876
20	15,188	15,06
30	15,116	16,54
40	15,288	15,048
50	15,388	15,028
60	15,288	15,324

Resultado del análisis de perfil de ácidos grasos del aceite obtenido



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

1 de 2
SAQ-1732-2018
R-SA-029 Emisión 8 17/07/17

PROGRAMA DE APOYO TECNOLÓGICO A LA INDUSTRIA ALIMENTARIA
REPORTE DE ANALISIS QUÍMICO

TIPO DE SOLICITUD:	PIN	SOLICITANTE:	Eduardo Thompson
OFERTA N°:	SAQ-1732	EMPRESA O PROYECTO:	B3-102
FECHA ENTRADA:	09/04/2018	DIRECCIÓN:	ETA
FECHA ANÁLISIS:	23/04/2018	TELÉFONO:	2511-7232
FECHA EMISIÓN:	09/05/2018	FAX:	---

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS POR NÚMERO DE MUESTRA
(Simbología: *ensayo acreditado, **ensayo no acreditado)

* ver alcance en: www.eca.or.cr

# MUESTRA	SAQ-1732-1	MÉTODO EMPLEADO
DESCRIPCIÓN	Aceite crudo	
ANÁLISIS		
GRASA SATURADA (g/100 g)	11,90	996.06 AOAC y Ce 1e-91, AOCS, CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC-FID), P-SA-MQ-034*
Ácido Mirístico C14:0	0,06	
Ácido Palmítico C16:0	7,56	
Ácido Margárico C17:0	0,06	
Ácido Estearico C18:0	3,79	
Ácido Araquídico C20:0	0,34	
Ácido Behénico C22:0	0,09	
GRASA MONOINSATURADA (g/100 g)	7,21	
Ácido Palmítico C16:1	0,06	
Ácido Oleico C18:1 (ω-9)	6,61	
Ácido Vaccénico C18:1	0,42	
Ácido cis-11-eicosenoico C20:1 (ω-9)	0,11	
GRASA POLIINSATURADA (g/100 g)	80,90	
Ácido Linoleico C18:2 (ω-6)	80,69	
Ácido α-linolenico C18:3 (ALA, ω-3)	0,13	
Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico EPA C20:5 (ω-3)	0,07	
GRASA TRANS (g/100 g)	<0,01	
VITAMINA E (mg equivalentes de α-tocoferol/100 g)	33,70	HPLC-PDA, FASE REVERSA (C8), DETECCIÓN A 295 nm**



LABORATORIOS CON ENSAYOS QUÍMICOS Y SENSORIALES ACREDITADOS
POR EL ENTE COSTARRICENSE DE ACREDITACIÓN - ECA-
DE ACUERDO CON LA NORMA INTE-ISO/IEC 17025:2005

CENTRO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TEL: 2511-7223, FAX: 2253-3762
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio 100 m oeste detrás de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias



Laboratorio de Ensayo
Alcance de Acreditación N°: LE-035
Acreditado a partir de: 11.09.2006
Alcance disponible en www.eca.or.cr