



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DEL ACEITE DE LA SEMILLA
DE

ANNONA PURPUREA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

LIZBETH ALEJANDRA OLVERA GARIBAY



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. Lucio Antonio Reyes Chumacero

VOCAL: Dr. Benito Reyes Trejo

SECRETARIO: Dra. Rocío Pozas Horcasitas

1er. SUPLENTE: Prof. Agustín Reyo Herrera

2° SUPLENTE: Dr. Lino Joel Reyes Trejo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química UNAM.
Laboratorios L-208 de Química Orgánica y L-111 de Fisicoquímica.

Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de
Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Benito Reyes Trejo

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Lino Joel Reyes Trejo

SUSTENTANTE:

Lizbeth Alejandra Olvera Garibay

Este trabajo de tesis generó tres contribuciones científicas presentadas en distintos foros científicos que se detallan a continuación:

- a) Obtención de biodiesel a partir del aceite de la semilla de *Annona purpurea*, presentado en el 2^{do} Congreso Nacional de Investigación en Cambio Climático, llevado a cabo los días 15 al 19 de octubre del 2012, el cual se exhibió en la sede de Ciudad Universitaria.
 - b) Obtención de Biodiesel a partir de las semillas de *Annona purpurea*, presentado en el 30 Congreso Latinoamericano de Química 2012, llevado a cabo del 27 al 31 de octubre de 2012, en Cancún, Quintana Roo, México.
 - c) 2° Congreso de Ecología y Medio Ambiente del Colegio de Ciencias y Humanidades con el título: Obtención de biodiesel a partir del aceite de la semilla de *Annona purpurea*, presentado los días 21 y 22 de marzo de 2013 en las instalaciones del CCH Vallejo de la Universidad Nacional Autónoma de México, D.F.
-

Índice

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos Particulares	3
1.2. Hipótesis	3
2. Marco teórico	4
2.1 Biocombustible	5
2.1.1 Biocombustibles de primera generación	8
2.1.2 Biocombustibles de segunda generación	8
2.1.3 Biocombustibles de tercera generación	9
2.2 Producción de hidrocarburos en México	9
2.3 Biomasa	14
2.4 Biodiesel	15
2.5 Antioxidantes	21
2.6 Reacción de transesterificación	23
2.7 Annonaceas	25
2.7.1 <i>Annona purpurea</i>	25
2.8 Acetogeninas en <i>Annonaceae</i>	26

Índice

2.8.1	Acetogeninas de <i>A. purpurea</i>	27
2.9	Ciclopéptidos	28
3.	Metodología	30
3.1	Parte experimental	31
3.2	Materia prima	31
3.3	Equipo y reactivos	31
3.4	Caracterización de la semilla de <i>A. purpurea</i>	32
3.5	Métodos de extracción	33
3.5.1	Extracción por Soxhlet	33
3.5.2	Maceración	34
3.6	Obtención del biodiesel	36
3.7	Pruebas de calidad del aceite y el biodiesel	38
3.7.1	Densidad relativa	38
3.7.2	Viscosidad	38
3.7.3	Índice de Acidez	39
3.7.4	Índice de yodo	40
3.7.5	Entalpía de combustión	41
3.7.6	Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del biodiesel	43
3.8	Extracción de acetogeninas	43
3.8.1	Acetogeninas del bagazo de maceración de la almendra de la semilla de <i>A. purpurea</i>	43

Índice

3.8.2	Acetogeninas del bagazo de maceración de la cáscara de la semilla de <i>A. purpurea</i>	44
3.9	Extractos de Partición de acetogeninas	44
3.9.1	Partición de hexano	44
3.9.2	Partición de diclorometano	45
3.9.3	Partición de acetato de etilo	45
3.9.4	Fase acuosa	45
3.9.5	Resonancia Magnética Nuclear	47
3.10	Detección de ciclopéptidos	47
3.10.1	Síntesis de 2,5-piperazindiona	47
3.10.2	Dilución de los extractos, aminoácidos y ciclopéptido.	48
3.10.3	Solución de Ninhidrina (detección de péptidos y aminoácidos)	48
3.10.4	Sistema de revelado con Cl_2/o -tolidina (detección de ciclopéptidos)	49
3.11	Modelado molecular de la reacción de transesterificación	50
4.	Resultados y discusión	51
4.1	Materia prima	51
4.1.1	Características físicas de las semillas de <i>Annona purpurea</i>	51
4.2	Obtención del aceite	52
4.2.1	Pruebas de calidad del aceite	55
4.3	Obtención del biodiesel	59
4.3.1	Pruebas de calidad del biodiesel	61

Índice

4.4	Acetogeninas y Extractos de Partición	68
4.5	Detección de aminoácidos, péptidos y ciclopéptidos	72
4.5.1	Síntesis de ciclopéptido	73
4.5.2	Extractos revelados con solución de ninhidrina	73
4.5.3	Extractos revelados con solución de ninhidrina y Cl ₂ /o-tolidina	76
4.6	Aprovechamiento de los nuevos residuos	77
4.7	Estudio computacional de la transesterificación en medio básico	78
5.	Conclusiones	82
6.	Bibliografía	84
7.	Anexo	91

Índice

Índice de tablas

Tabla		Pág.
1.	Características de las generaciones de biocombustibles.	6
2.	Diferentes tipos de biocombustibles.	7
3.	Datos del consumo de petrolíferos en México 2010 y 2011.	13
4.	Ventajas y desventajas del uso del biodiesel.	17
5.	Ácidos grasos más comunes en el biodiesel.	18
6.	Composición de ácidos grasos de los aceites más utilizados para hacer biodiesel	19
7.	Algunos parámetros de calidad de los aceites comerciales más comunes y de la <i>Jatropha</i> .	19
8.	Diferencias fisicoquímicas del diesel y biodiesel con respecto a las normas existentes.	20
9.	Antioxidantes empleados para biodiesel.	22
10.	Ventajas y desventajas de los tipos de transesterificación.	24
11.	Porcentaje correspondiente a cada fracción de los 4 kg de semilla de <i>A. purpurea</i> .	51
12.	Resultados de las dimensiones y peso de la semilla de <i>A. purpurea</i> .	52
13.	Rendimiento de la extracción de aceite de la semilla de <i>A. purpurea</i> .	52
14.	Resultados de las pruebas de calidad del aceite de la semilla de <i>A. purpurea</i> .	57
15.	Rendimiento del aceite de la <i>A. purpurea</i> y del aceite comercial 123 en la reacción de transesterificación.	60
16.	Comparación del biodiesel de otras anonas estudiadas en el laboratorio.	61
17.	Resultados de las pruebas de calidad realizadas al biodiesel obtenido a través de la extracción del aceite de la almendra de <i>A. purpurea</i> .	62
18.	Parámetros determinados del aceite comercial 123 y su biodiesel.	63

Índice

19.	Composición porcentual de los ácidos grasos de varias especies anonáceas y el obtenido de <i>A. purpurea</i> .	67
20.	Resultados de la extracción de acetogeninas con metanol en bagazo de almendra y cáscara.	69
21.	Peso de los extractos de partición obtenidos del extracto metanólico de la semilla de <i>A. purpurea</i> en diferentes disolventes.	70
22.	Código para conocer la posible presencia o ausencia de ciclopéptidos, utilizando el método de los reveladores de ninhidrina y Cl ₂ / <i>o</i> -tolidina	77
23.	Composición proximal de las semillas de <i>Annona diversifolia</i> .	78
24.	Resultados de la cromatografía de gases de los ésteres metílicos del biodiesel de la almendra de <i>A. pupurea</i> .	92

Índice de diagramas

Diagrama		Pág.
1.	Estrategia general experimental.	30
2.	Extracción del aceite de la semilla de <i>A. purpurea</i> por el método de Soxhlet y maceración.	35
3.	Obtención del biodiesel a partir del aceite de la almendra de <i>A. purpurea</i> .	37
4.	Extracción de acetogeninas del bagazo de la almendra de <i>A. purpurea</i> y sus particiones en los disolventes.	46

Índice

Índice de gráficas

Gráficas	Pág.
1. Distribución del consumo de energía en México.	11
2. Consumo final de petrolíferos en México 2010 y 2011.	13
3. Temperatura contra el tiempo de combustión del aceite de la almendra de <i>A. purpurea</i>	42
4. Contenido de aceite de semillas de diferente materia prima.	54
5. Comparación de los parámetros del aceite de <i>A. purpurea</i> obtenido por maceración tiempo después.	58
6. Comparación del índice de acidez del aceite de <i>A. purpurea</i> diez meses después.	59
7. Comparación del biodiesel obtenido de la maceración de la almendra de <i>A. purpurea</i> 1) 5 meses y 2) 10 meses después de haber hecho la extracción del aceite	62
8. Comparación de las entalpías de combustión del biodiesel de las anonas y el diesel petroquímico.	64
9. Composición porcentual de ésteres metílicos de ácidos grasos del biodiesel de <i>A. purpurea</i> .	66

Índice de espectros

Espectro	Pág.
1. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-'H, CDCl ₃ , 300 MHz) del extracto de partición de diclorometano de las acetogeninas de la almendra de las semillas de <i>A. purpurea</i> .	71
2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-'H, CDCl ₃ , 300 MHz) del extracto de partición de acetato de etilo de las acetogeninas de la almendra de las semillas de <i>A. purpurea</i> .	72

Índice de figuras

Figura		Pág.
1.	Producción de hidrocarburos en México.	10
2.	Producción de petrolíferos en México.	10
3	Mercado 2011-2026 de la turbosina en México.	12
4.	Utilización de la biomasa para generar biocombustibles.	14
5.	Gráficas de las emisiones de A) carbono orgánico (CO) y B) carbono elemental (CE) de las mezclas de biodiesel de aceite de soya.	16
6.	Reacción de transesterificación catalizada en medio alcalino.	23
7.	Árbol de <i>Annona purpurea</i> y el fruto.	26
8.	Estructura de una acetogenina de Annonaceae.	27
9.	Acetogeninas aisladas de <i>A. purpurea</i> .	27
10.	Cicloreticulín B de <i>Annona reticulata</i>	28
11.	Determinación de las medidas de la semilla mediante un vernier.	32
12.	Extracción del aceite por el método de Soxhlet.	33
13.	Diagrama de la bomba de combustión.	42
14.	Reacción para la formación del ciclopéptido.	48
15.	a) Seguimiento de la reacción de transesterificación por cromatografía de capa fina y b) apariencia física de biodiesel y glicerina.	60
16.	Aspecto de la cromatoplaqueta analítica de a) Extracto metanólico (MeOH), b) Partición de hexano (P.Hex), c) Partición de acetato de etilo (P.AE) d) Partición de diclorometano (P.DM) y e) Fase acuosa (FA) del extracto metanólico del bagazo de la almendra de las semillas de <i>A. purpurea</i> , comparada con cinco aminoácidos y el péptido comercial aspartame.	74

Índice

17.	Aspecto de la cromatoplaaca analítica de la glicina y del cicopéptido sintetizado a) revelada con ninhidrina y b) revelado con Cl_2/o -tolidina.	75
18.	Aspecto de la cromatoplaaca analítica del extracto metanólico del bagazo de las semillas de <i>A. purpurea</i> y sus particiones a) revelado con ninhidrina y b) revelado solución de Cl_2/o -tolidina.	76
19.	Mapa del potencial electrostático de los monoglicéridos correspondientes a los ácidos grasos más abundantes en el biodiesel.	78
20.	Esquema de la reacción de transesterificación con metóxido	79
21.	Geometrías optimizadas de los puntos estacionarios de la reacción de transesterificación básica con metanol para obtener palmitato de metilo: (1) monoglicérido del ácido palmítico, (2) TS1, (3) Intermediario tetraédrico, (4) TS2.	80
22.	Mapa del potencial electrostático de los puntos estacionarios de la reacción de transesterificación básica con metanol para obtener palmitato de metilo: (1) monoglicerido del ácido palmítico, (2) TS1, (3) Intermediario tetraédrico, (4) TS2.	80
23.	Cromatografía de gases de los ésteres metílicos presentes en el biodiesel de la almendra de <i>Annona purpurea</i> .	91

1. INTRODUCCIÓN

En este proyecto, se trabajó con las semillas del fruto de *Annona purpurea* para obtener biodiesel a partir del aceite de estas. El fruto es comestible, es escasamente cosechado, por lo general sólo es conocido a nivel local, comúnmente se le llama Cabeza de negro en México y Sancoya en otros países. Este fruto proviene de las anonáceas que constituyen una familia con un gran número de especies frutales y productoras de aceites esenciales (León, 1969). Las cuales también se conocen porque contienen acetogeninas. Debido a que no forma parte de la dieta habitual, el uso de las semillas no representa un problema ético. A las semillas (cáscara y almendra) de *A. purpurea*, se le extrajo el aceite para probarlo como materia prima para la producción de biodiesel, mediante la reacción de transesterificación en medio básico. Se le realizaron las pruebas más comunes para conocer que tan viable es el proceso, la calidad del aceite y biodiesel obtenido. Una vez que fue extraído el aceite y transformado a biodiesel, se identificó la presencia de acetogeninas en el bagazo de la semilla. Al bagazo libre de aceite y de acetogeninas, se identificaron la presencia de ciclopéptidos, para poder tener un panorama más amplio sobre el uso que se le puede dar a este nuevo “residuo” generado. Y tener un aprovechamiento de toda la parte de la semilla, para conocer si es viable su uso en el ámbito energético, farmacéutico y hasta cosmético.

En la actualidad, la humanidad se enfrenta a una gran demanda de energéticos, el alto costo debido a que no hay un abastecimiento sustentable de los recursos y las consecuencias de la contaminación producida por los combustibles fósiles que dañan el ambiente (agua, suelo y aire) y la salud de los seres vivos. La escasez del combustible fósil, es un problema que puede hacerse más evidente en unos pocos años, debido a la demanda de energéticos que aumenta a medida que la población lo hace. La mayoría de los yacimientos de petróleo en todo el mundo ya han sido explotados y no hay un abastecimiento sustentable. Los recursos se acaban, esto se predecía desde hace mucho tiempo, pero se esperaba que pasara en un futuro muy lejano,

pero ya es parte de nuestro presente. La energía que se utiliza en el planeta proviene en su mayoría de combustibles fósiles, y esta representa alrededor del 80%, por eso el hombre se ha encaminado en la búsqueda de nuevas alternativas de recursos energéticos renovables para satisfacer las necesidades que aumentan con el desarrollo de la población. Para enfrentar la demanda que existe de estos recursos naturales y tratar de minimizar la sobreexplotación del planeta, se desea encontrar la independización del hombre del petróleo, encontrando nuevas fuentes para la producción de combustibles y energía en general.

En el contexto industrial, las semillas de los frutos, resultan ser un desperdicio, debido a que sólo se aprovecha la parte comestible del fruto en su procesamiento, pero si las semillas no son desechadas de manera correcta, ya sea utilizada para sembrar o hacer compostas, generan más basura en el planeta. Una opción para no contribuir con el problema de la contaminación y ayudar a la escases del combustible fósil, es proporcionarle otro uso a las semillas de los frutos. Uno de los usos que se le puede dar, es utilizar estos “desechos” para extraer aceite, y mediante pruebas, ver la posibilidad de su transformación a biocombustible para remplazar un porcentaje del combustible fósil en las maquinarias (si el aceite resultante no es apto para consumo humano). Esta puede ser una solución para ayudar a minimizar los problemas ocasionados por la basura generada por las actividades humanas, actividades industriales y principalmente de las actividades agrícolas. Así como para ayudar con la demanda de combustible fósil y no contribuir con el aumento de los gases de efecto invernadero.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener biodiesel a partir del aceite de la semilla *Annona purpurea*.

1.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Extraer el aceite de las semillas de *Annona purpurea* (cáscara y almendra).
- Realizar las pruebas de calidad del aceite obtenido.
- Llevar a cabo la reacción de transesterificación con el aceite para obtener el biodiesel.
- Evaluar la calidad del biodiesel.
- Identificar acetogeninas y ciclopéptidos en bagazo.

1.2 HIPÓTESIS

El biodiesel obtenido de las semillas de *Annona purpurea* tendrá propiedades fisicoquímicas adecuadas para ser utilizado potencialmente en motores de combustión interna por compresión.

2. MARCO TEÓRICO

En los últimos 200 años, ha habido un sorprendente aumento en el uso de energía en todo el mundo; esto ha ocasionado diferentes consecuencias, entre las más importantes está el calentamiento global. En el planeta las energías renovables en el 2010 representaban alrededor del 14% del consumo total, la biomasa era el principal contribuyente con el ~10% (Kumar *et al.*, 2011). En una investigación de Deng *et al* (2012), se señala que la principal fuente de energía hasta la fecha es la energía hidráulica, proporcionando casi el 15% del consumo de electricidad en todo el mundo. Diversos estudios se han enfocado a la investigación de las energías sustentables, siendo la biomasa la que presenta más artículos de referencia en un periodo de 30 años (1979-2009) con el 56% de publicaciones, seguido de la energía solar con 26%, eólica 11%, geotérmica 5% y finalmente hidráulica 2%(Manzano *et al.*, 2013). Con la diversidad de fuentes renovables que existen, hay evidencia que sugiere que deberíamos ser capaces de satisfacer por completo nuestra demanda de energía procedente de estas fuentes, pero no es así, estas sólo representan un pequeño porcentaje del consumo total.

En estas últimas décadas se ha hecho más evidente que la forma en que se suministra la energía, es insostenible tanto a corto como a largo plazo, por lo que la seguridad energética se ve perturbada por la gran demanda. Principalmente la energía se destina a tres sectores fundamentales: la industria, los edificios y el transporte, representando el ~85% del consumo total de energía (Deng *et al.*, 2012). También se cree que es posible un sistema de energía mundial completamente renovable, pudiendo llegar a un 95% del consumo de energía procedente de fuentes sustentables para el año 2050. Esto es prometedor debido al agotamiento de las fuentes no renovables.

2.1 BIOCOMBUSTIBLE

A partir de la crisis del combustible fósil de la década de los setentas, varios países tuvieron un especial interés en el desarrollo de tecnologías para la producción de biocombustible para utilizarlo en el sector de transporte. La utilización de biocombustible para el transporte también ayudaría a una disminución considerable de las emisiones de CO₂ hacia la atmósfera. En general, el biocombustible apareció como una solución para enfrentar los problemas del mundo actual. Entre ellos destaca la reducción de gases de efecto invernadero, el desarrollo de las economías agrícolas regionales, la independencia de la economía en base a combustible fósil (Ganduglia, 2009).

Una problemática para el desarrollo de nuevas alternativas para la producción de biocombustible, es la materia prima, de manera que incentivar la utilización de cultivos energéticos para la producción de estos, es prioritario debido a que en muchos lugares del mundo se enfrenta una escasez de alimentos, por lo que resulta un problema ético el uso de fuentes alimentarias como materia prima o el uso de suelo para la cosecha de materia para la producción de combustible, debido a que esto traería como consecuencia una disminución de los recursos y un desabasto en algún momento al destinarse los recursos para satisfacer las demandas energéticas y para el consumo humano. Por lo que es necesaria la implementación de un sistema que impulse el consumo y la producción de biocombustibles utilizando suelo que no es aprovechado y el uso de materia prima no comestible como biocombustible para no ocasionar un aumento en los precios de los alimentos. La producción regulada de biocombustibles evitará los impactos negativos sobre la biodiversidad, los ecosistemas y las áreas con alto valor para la conservación, minimizará los impactos negativos sobre la seguridad alimentaria dando particular preferencia a los residuos y desperdicios como materia prima (una vez que sean económicamente viables), a las tierras degradadas, marginadas, subutilizadas como fuentes para no perjudicar los rendimientos que mantienen los suministros de alimentos existentes (Ganduglia, 2009).

La producción a gran escala de biocombustibles ofrece una oportunidad para algunos países en desarrollo para reducir su dependencia de las importaciones de petróleo (Demirbas *et al.*, 2011) además de que muchos de estos países cuentan con suelos que pueden ser utilizados para cosechar la materia prima para la producción. Pero uno de los inconvenientes con los que se enfrenta, es el alto costo de producción comparado con el combustible derivado del petróleo. Por lo cual es necesario promover esta parte para hacer el proceso más viable en primer lugar para reducir los costos de producción y en segundo lugar hacerlo más competitivo frente al combustible fósil. Por lo que es necesario disminuir el costo de la materia prima, ya sea utilizando como materia las de menor costos de producción o a partir de la utilización de residuos. Los biocombustibles se pueden clasificar en diferentes categorías, una de estas es dependiendo del tipo de materia prima que se utilice para su producción. En la tabla 1, se muestra de forma sintetizada esta información.

Tabla 1. Características de las generaciones de biocombustibles.

Clasificación	Materia prima	Proceso	Tipo de biocombustible
Primera generación	Cultivos energéticos	Transesterificación/hidrogenación	Biodiesel
		Fermentación	Etanol
Segunda generación	Residuos de cosechas, material orgánico.	Fermentación	Etanol
		Digestión anaerobia	Metano
		Transesterificación	Biodiesel
Tercera generación	Algas	Rutas foto-bioquímicas	Biodiesel

Como se puede observar hay diferentes tipos de biocombustibles y cada uno de ellos puede sustituir una porción o el 100% de los combustibles fósiles con algunas variaciones en el equipo. También la forma de obtención es distinta y se parte de diferente materia prima para su producción. En la tabla 2 que se muestra a continuación, se enlistan los biocombustibles más comunes.

Tabla 2. Diferentes tipos de biocombustibles.

Biocombustible	Bioetanol	Biodiesel	Biogás
Fuente de obtención	Azúcares (caña de azúcar, sorgo, remolacha, dulce, etc.) Almidones (maíz, yuca, etc.) Celulosa (residuos agrícolas, boscosos, etc.)	Plantas oleaginosas (cártamo, girasol, higuera, <i>Jatropha</i> y aceite de palma). Grasa animal. Aceites usados.	Desechos orgánicos. Excrementos de ganado.
Proceso de obtención	Fermentación	Transesterificación	Digestión anaerobia
Combustible a sustituir	Gasolina	Diesel	Gas natural
Porcentaje de sustitución*	5 al 20%	20%	100%

* Sin modificación del motor.

2.1.1 Biocombustibles de primera generación

Son los combustibles generados que utilizan como materia prima para su producción los cultivos alimentarios como es el maíz, caña de azúcar, soya, semillas de girasol, sorgo, entre otros para producir biodiesel (por transesterificación del aceite extraído) y etanol (por fermentación) son los principales biocombustibles utilizados comercialmente debido a que ya tienen una tecnología establecida para su producción a gran escala. Estos pueden ayudar a mejorar la seguridad energética nacional. Sin embargo, existe la preocupación sobre el abastecimiento de materias primas, incluyendo el impacto que puede tener sobre la biodiversidad y el uso de la tierra y la competencia con los cultivos alimentarios. Este tipo de materia prima representa un problema para la seguridad alimentaria como ya se ha mencionado antes (Singh *et al.*, 2011).

2.1.2 Biocombustibles de segunda generación

Los combustibles de segunda generación son los que utilizan como materia prima fuentes no comestibles. Como son los restos de cosecha, bagazo de caña, madera, plantas y oleaginosas no comestibles, residuos orgánicos en general. De estos desechos generalmente se obtiene etanol al fermentar los azúcares con ayuda de enzimas, metano por medio de digestión anaerobia, biodiesel por transesterificación de aceites de oleaginosas no comestibles. Estos procesos son costosos debido a que las tecnologías aun se encuentran en investigación para su desarrollo. Pero es una fuente muy viable para la producción de biocombustibles, debido a que se parte de “desechos” y no compiten por la utilización de suelos agrícolas. Los biocombustibles y bioproductos producidos a partir de la biomasa vegetal mitigan el calentamiento global. Esto es debido a que el CO₂ liberado en la combustión es igual al CO₂ capturado por las plantas durante la fotosíntesis y por lo tanto no aumenta el contenido neto de CO₂ en la atmósfera (Naik *et al.*, 2010). Los materiales lignocelulósicos, son los más baratos y abundantes, disponibles a partir de plantas, pero la producción de combustibles a partir de estos no es rentable.

2.1.3 Biocombustibles de tercera generación

Los biocombustibles de tercera generación se encuentran en desarrollo, se obtiene biodiesel a partir del aceite extraído de algas. Las algas son consideradas como un “petróleo” biológico, al ser un recurso renovable que absorbe CO₂ en un ciclo sin fin (Arky, 2007). Magara *et al* (2012), han demostrado por extrapolación que de una pequeña producción a partir de algas, señalan que podría obtener más de 8 veces (>5000 galones/hectárea en un año) de lo que se obtiene por la misma área de producción del aceite de palma. Pero solo es una especulación de lo que se puede lograr.

2.2 PRODUCCIÓN DE HIDROCARBUROS EN MÉXICO

Los petrolíferos son los productos derivados del petróleo, que se refiere a los combustibles que comúnmente se conocen. Los hidrocarburos son compuestos de carbono e hidrógeno, y estos pueden ser Alifáticos (saturados e insaturados), cíclicos o aromáticos. Como se conoce, todos los tipos de petróleo se componen de hidrocarburos y otros compuestos como oxígeno, azufre, nitrógeno y varios elementos metálicos que dependen de la región geográfica donde se formo. El 5 de octubre 2012, se anunció el hallazgo de importantes reservas de crudo ligero en aguas profundas del Golfo de México. Con esto, según Pemex dará otros 10 años más de producción petrolera actual en nuestro país. Como se puede apreciar en la figura 1, que corresponde a las gráficas de Pemex sobre la producción de hidrocarburos, a partir del 2008 hubo disminución de estos, por lo que la producción de los combustibles fue afectada, como se muestra en la figura 2.

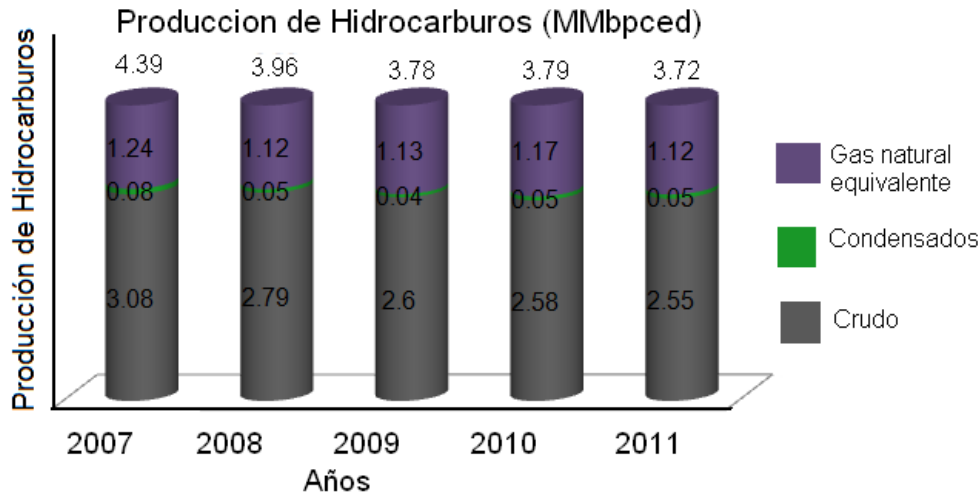


Figura 1. Producción de hidrocarburos en México (Pemex abril 2012).

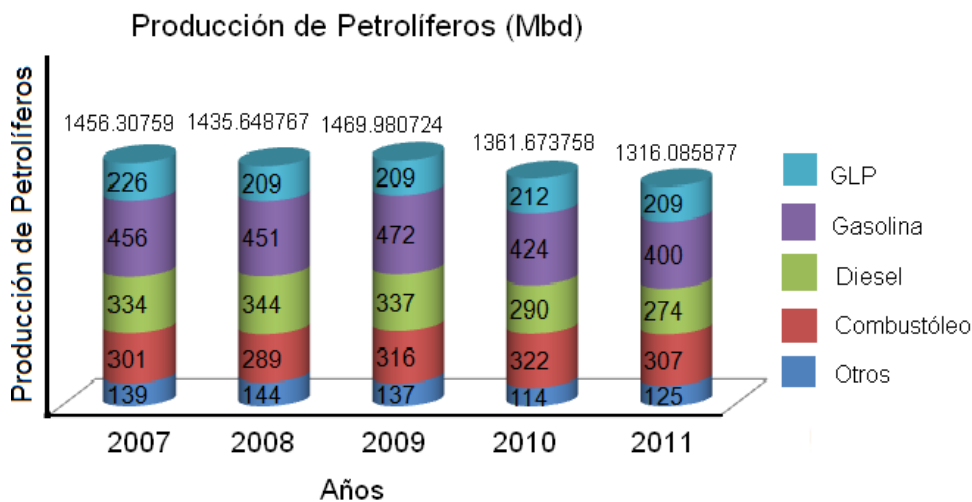
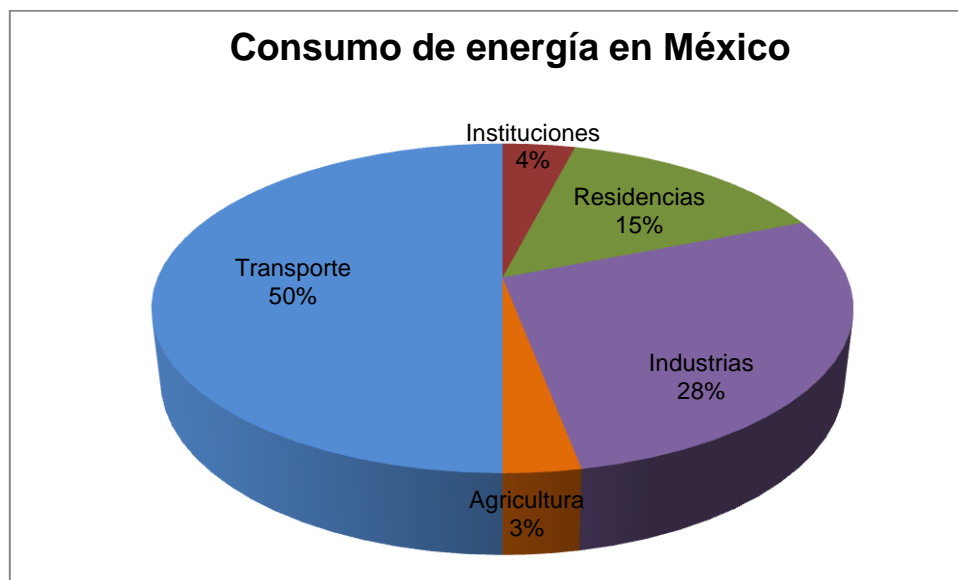


Figura 2. Producción de petrolíferos en México (Pemex abril 2012).

El hecho de contar con nuevas reservas de petróleo en México, no asegura el abasto de estos recursos. Al ser recursos no renovables, se terminarán y tardarán miles de años en volver a generarse. Por lo que es indispensable contar con otras alternativas renovables para la generación de combustibles, para asegurar el suministro de estos energéticos. Y contribuir a la disminución de los gases de efecto invernadero ocasionados por la quema de los hidrocarburos de petróleo.

El consumo de energía en México reportado por Rosas *et al* (2011), muestra que la mayor parte de esta energía va dirigida al sector del transporte con el 50% (gráfica 1). Por lo que la utilización de biocombustibles no solo puede

ayudar a solucionar la demanda de los recursos energéticos de petróleo sino a minimizar el impacto que estos producen al medio ambiente.



Gráfica 1. Distribución del consumo de energía en México.

En julio del año pasado se inauguró en Cintalapa Chiapas, la primera planta extractora de aceite de *Jatropha curcas* del país. El aceite es enviado a la planta de biodiesel instalada en Puerto Chiapas para transformarlo a biodiesel (La Jornada, 11 julio 2012). En este estado, actualmente se está empleando biodiesel para el transporte turístico, como “combustible limpio” para disminuir la emisión de gases de efecto invernadero.

El transporte aéreo también representa una preocupación en cuanto a los recursos energéticos. La turbosina es una mezcla de hidrocarburos parafínicos y aromáticos, que se obtienen del petróleo. Se utiliza como combustible en motores de aviación a turbina. En México se contaba con la producción suficiente para abastecer la demanda del sector aéreo nacional, pero a partir del 2011 se registraron las primeras importaciones para cubrir la demanda de este combustible que aumento con las actividades aeronáuticas del país en estos últimos años. Los datos de la figura 3 tomados del periódico Milenio (22 octubre 2012) se ve que la demanda de la turbosina sobrepasa la producción

de esta. Por lo que es importante contar con otras alternativas para producir combustible para abastecer la demanda nacional.

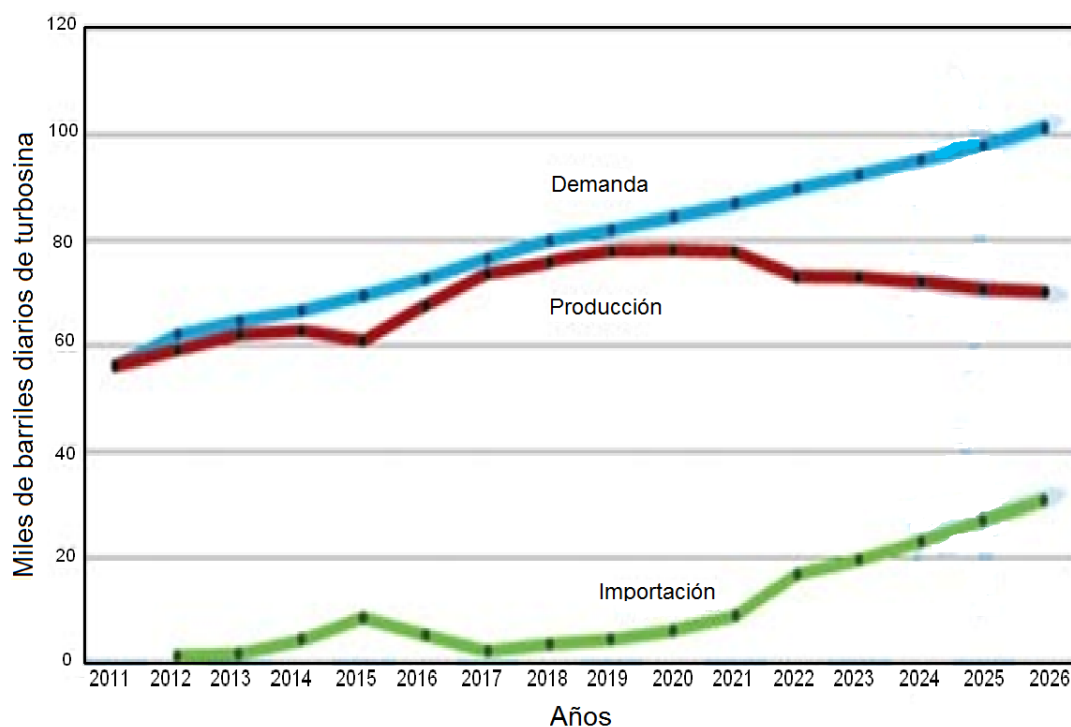
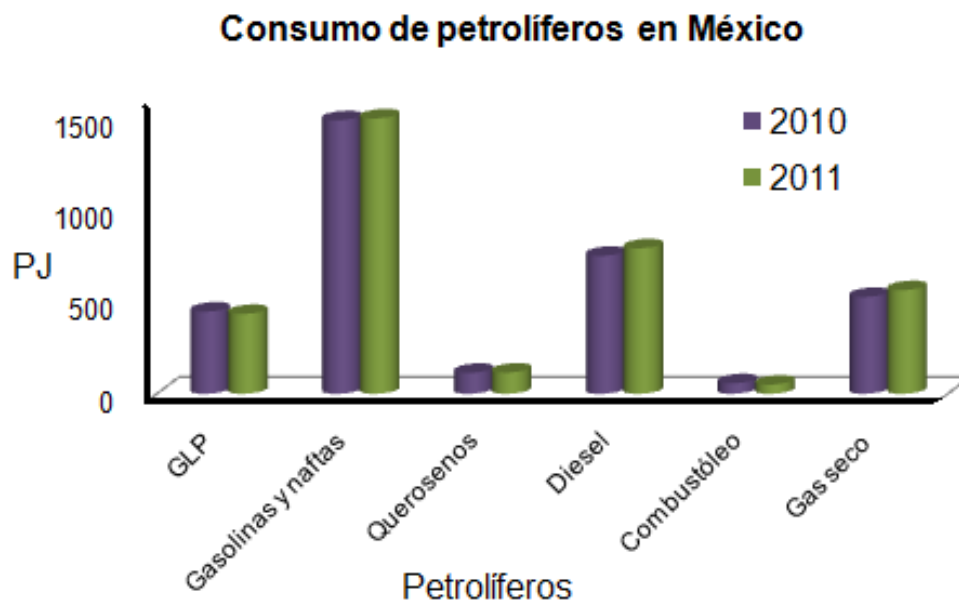


Figura 3. Mercado 2011-2026 de la turbosina en México.

El uso de la biomasa en México como fuente primaria de energía ha disminuido desde 1965, cuando constituía el 15,3% del suministro total de energía primaria. A partir del año 2005, este porcentaje representa sólo el 5,3%. Mientras tanto, el uso de combustibles de hidrocarburos ha ido en constante aumento y representa el 87,7% de la oferta bruta de energía primaria (Islas *et al.*, 2007).

Se puede apreciar de la gráfica 2, que el consumo de gasolinas y diesel aumentó del 2010 al 2011. Estos combustibles representan los 2 petrolíferos que más se utilizan en el sector de transporte. La quema de estos contribuye a generar contaminación al medio ambiente. Por lo que la sustitución de estos por fuentes renovables ayudaría a la disminución de los gases de efecto invernadero, ayudando por una parte al medio ambiente y por otra a la seguridad energética del país.



Fuente: Sistema de Información Energética.

Gráfica 2. Consumo final de petrolíferos en México 2010 y 2011.

Tabla 3. Datos del consumo de petrolíferos en México 2010 y 2011.

Petrolíferos / año	2010	2011
GLP	448.612 PJ	435.739 PJ
Gasolinas y naftas	1492.274 PJ	1502.283 PJ
Querosenos	114.566 PJ	115.536 PJ
Diesel	752.877 PJ	793.777 PJ
Combustóleo	57.888 PJ	50.511 PJ
Gas seco	528.842 PJ	565.294 PJ

2.3 BIOMASA

La biomasa es la forma más abundante y versátil de las energías renovables en el mundo. La producción de bioenergía a partir de residuos de los cultivos es compatible tanto con la producción de alimentos como con la producción de energía (Valdéz *et al.*, 2010). La biomasa al ser quemada produce calor y electricidad, pero también puede emplearse para la producción de biocombustibles líquidos. Por lo que es vista como una prometedora fuente de materia prima para los combustibles, como se muestra en la figura 4. Una parte de los residuos generados de las cosechas y otras prácticas agrícolas son utilizados como parte de la dieta de los animales, pero algunos de estos no les proporcionan todos los requerimientos nutrimentales, debido a su baja calidad nutricional, por lo que se necesita adicionarle vitaminas y utilizarlos con otro tipo de alimento especial para ajustar la dieta.

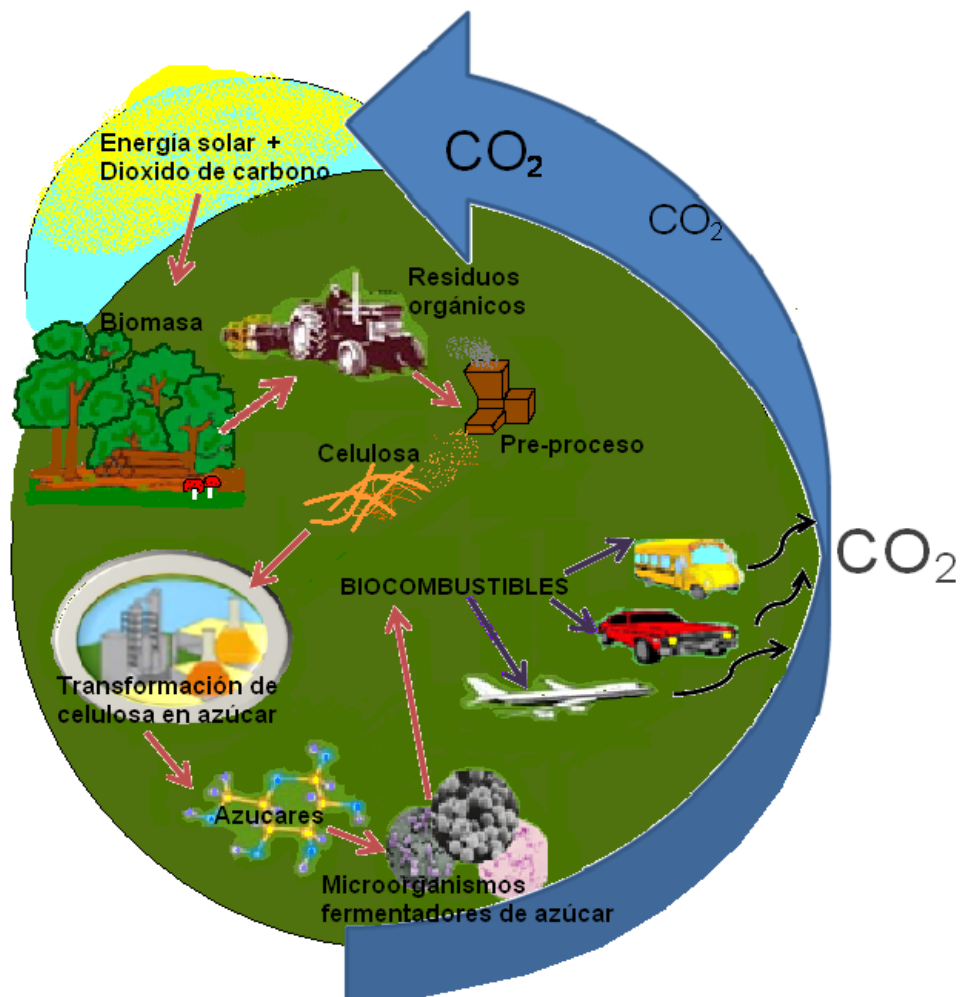


Figura 4. Utilización de la biomasa para generar biocombustibles.

Por todo, la biomasa es considerada como una buena opción para el suministro de combustible en el futuro, por ser una fuente de energía renovable, por lo general fácilmente disponible, económica y sustentable. Durante la combustión, emite la misma cantidad de CO₂ que fue absorbida durante su crecimiento, por lo que ayuda a reciclar el CO₂ de la atmósfera y no contribuye al aumento de gases de efecto de invernadero (Valdez *et al.*, 2010). Otro factor importante que se debe considerar es que muchos de los residuos que se producen del sector agrícola no se aprovecha, solo un pequeño porcentaje se destina como forraje que se utiliza como alimento para el ganado. La otra parte es considerada “basura” y es quemada como un medio para deshacerse de ella. Lo que ocasiona contaminación al medio ambiente. Por eso se propone utilizar esta “biomasa” para generar diferentes tipos de biocombustible. La utilización de esta “basura” ayudará en gran medida al impacto ambiental y a la seguridad energética del mundo.

2.4 BIODIESEL

El biodiesel se deriva de aceites vegetales y grasas animales, es biodegradable y no tóxico. Químicamente el biodiesel son los ésteres metílicos de ácidos grasos, que se obtiene a través de un proceso químico llamado transesterificación. En cambio, el diesel de petróleo está constituido por una mezcla de hidrocarburos parafínicos, olefínicos y aromáticos, derivados del procesamiento del petróleo crudo. El biodiesel es uno de los mejores sustitutos del diesel de petróleo, debido a que presenta características muy similares a este. Es un combustible alternativo líquido ecológico que se puede utilizar en los motores diesel sin modificación (casi siempre), se puede mezclar en cualquier porcentaje con diesel de petróleo. Actualmente se emplean mezclas de diesel y biodiesel en motores de combustión, así la nomenclatura de uso de biodiesel al 100% se denomina B100 y la mezcla de 20 partes de biodiesel con 80 partes de diesel se conoce como B20. Se han reportado que las mezclas de biodiesel de hasta B20 se puede utilizar en casi todos los equipo diesel y no

requieren generalmente de modificaciones en el motor. Mezclas más altas, incluso B100, se puede utilizar en motores con poca o ninguna modificación (Balat, 2011). Los motores modernos diesel son muy sensibles a la calidad del combustible. Por lo que es importante mantener una buena calidad del biodiesel, para el crecimiento de esta industria (Kargbo, 2010).

El uso de biodiesel en los motores reduce las emisiones de hidrocarburos, aromáticos, CO, sulfatos, partículas en suspensión, es biodegradable, posee baja toxicidad y bajo contenido de azufre, reduce las emisiones por el escape, y la mayor parte se produce a partir de recursos renovables. A medida que aumenta el porcentaje de biodiesel en la mezcla, las emisiones de los contaminantes disminuyen. Pero ciertos estudios han demostrado que solo hasta cierto porcentaje de adición las emisiones de contaminantes orgánicos se reducen.

Por otro lado, una investigación de Magara *et al* (2012) reportaron que la tasa de emisión de carbono orgánico para la mezcla de biodiesel del aceite de soja B25, B50 y B75 tenía una reducción del 20 % al 30 % de emisiones comparado con el diesel de petróleo, pero el biodiesel B100 tiene un 40 % más de emisiones que el diesel de petróleo. En la figura 5 se muestran los datos que se obtuvieron de esa investigación. PM_{2.5} hace referencia a la masa de la partícula.

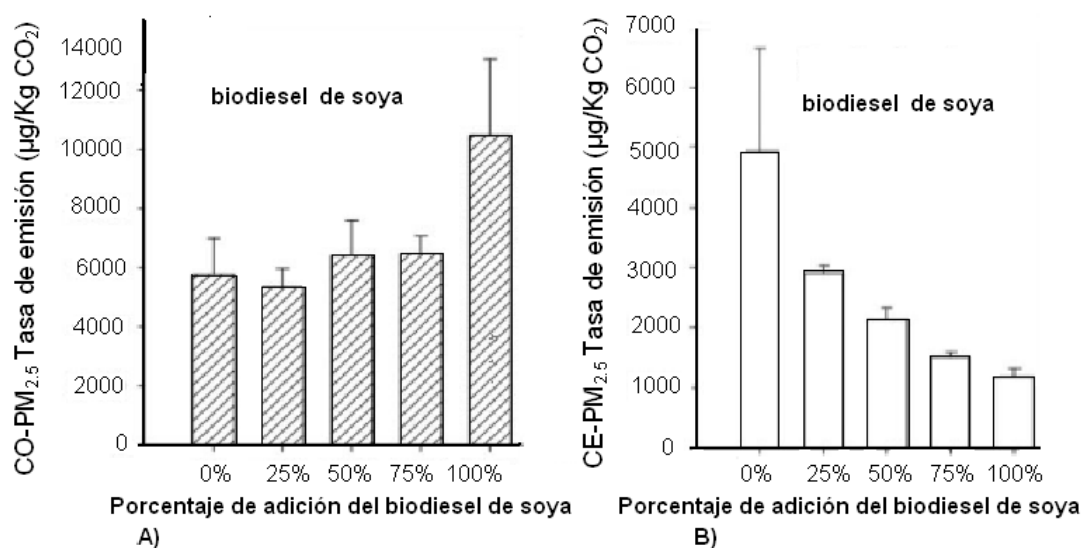


Figura 5. Gráficas de las emisiones de A) carbono orgánico (CO) y B) carbono elemental (CE) de las mezclas de biodiesel de aceite de soja (Magara *et al*, 2012).

El biodiesel contiene menor porcentaje de carbono e hidrógeno comparado con el diesel de petróleo, debido a que el oxígeno representa aproximadamente el 11% de su composición. Esto da como resultado que la energía del biodiesel se vea disminuida, siendo más baja comparada con la energía producida del diesel de petróleo. En la tabla 4, se muestran las ventajas y desventajas del uso del biodiesel en los motores. De las más importantes destaca que es un recurso renovable y no contribuye con la generación de gases de efecto invernadero.

Tabla 4. Ventajas y desventajas del uso del biodiesel.

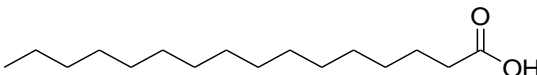
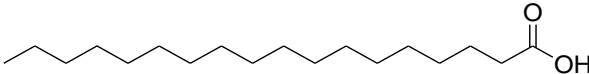
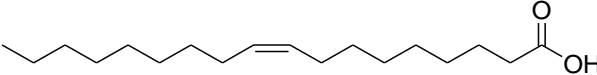
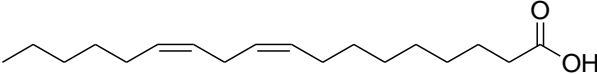
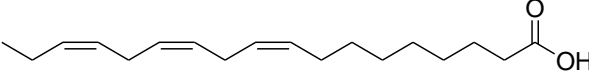
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none">• Renovable.• Biodegradable.• Almacenamiento seguro.• Fácil transportación.• Mayor índice de cetano.• Menor contenido de azufre y aromáticos.• Bajas emisiones de CO, partículas e hidrocarburos no quemados.	<ul style="list-style-type: none">• Mayor viscosidad.• Menor contenido energético.• Mayor desgaste del motor.• Mayor cantidad de NO_x.• Alto precio.• Inestable a la oxidación.

El costo de biodiesel varía en función de la materia prima, área geográfica, los precios del metanol, y la variabilidad estacional de la producción de los cultivos (Demirbas, 2011). En la actualidad hay un aumento en el interés y la demanda de biodiesel, por los altos costos del combustible fósil, el impacto ambiental por las emisiones de los contaminantes, la dependencia de las importaciones entre otros. Una problemática que enfrenta el desarrollo del biodiesel son los altos costos de producción. La materia prima, constituye entre el 70% y 85% del costo de producción en general. La reducción de los costos, podría significar la competitividad con el diesel debido al alto costo de este. Por lo que se ha optado por el uso de otras alternativas que puedan disminuir el costo y no perjudicar a la seguridad alimentaria, como son los cultivos no comestibles como la *Jatropha*, grasas animales y residuos aceite de cocina (Kargbo, 2010).

La elaboración de biodiesel a partir de fuentes comestibles, el agotamiento de los recursos ecológicos debido a las prácticas agrícolas intensivas de los cultivos, es la causa principal del aumento de los precios de los alimentos.

En los Estados Unidos, la materia prima utilizada para hacer biodiesel es el aceite de soya, en Europa el aceite de colza y aceite de palma en el sureste de Asia. Son destinadas estas materias debido a que no representan una fuente principal de alimento para esas regiones, por lo que no se ve comprometida la seguridad alimentaria. Se ha demostrado que la calidad del biodiesel depende de la composición de los ácidos grasos de la materia prima (aceite o grasa). La composición de ácidos grasos más común presente en los aceites vegetales utilizados para la producción de biodiesel, se muestra en la tabla 5 y algunos ejemplos de estos aceites en la tabla 6. Siendo dominante los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, saturados e insaturados. Las propiedades físicas del biodiesel (número de octano, el flujo en frío, estabilidad oxidativa) generalmente son determinados por la relación del contenido de los ácidos grasos (Kargbo, 2010).

Tabla 5. Ácidos grasos más comunes en el biodiesel.

Nombre común	Fórmula molecular	Abreviación	Estructura molecular
Acido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	16:0	
Acido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	18:0	
Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	18:1	
Ácido linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$	18:2	
Ácido linolénico	$C_{18}H_{30}O_2$	18:3	

La composición de los ácidos grasos de los aceites utilizados comúnmente para la producción de biodiesel, tienen un porcentaje alto de ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico) para poder operar en clima frío. El uso de aditivos es importante para retardar las reacciones de oxidación (Karavalakis *et al.*, 2011).

Tabla 6. Composición de ácidos grasos de los aceites más utilizados para hacer biodiesel

	Aceite de soya (%)	Aceite de colza (%)	Aceite de Girasol (%)
Acido palmítico (C16:0)	11.75	3.49	6.08
Ácido esteárico (C18:0)	3.15	0.85	3.26
Acido oleico (C18:1)	23.26	64.40	16.93
Acido linoleico (C18:2)	55.53	22.30	73.73
Ácido linolénico (C18:3)	6.31	8.23	0.00

*(Costa *et al.*, 2010)

En la tabla 7 se presenta algunos de los parámetros de calidad de los aceites más comunes utilizados para hacer biodiesel. Estos aceites cumplen con el porcentaje que marca la norma europea en cuanto al contenido de esteres y ácido linolénico (menor a 12%).

Tabla 7. Algunos parámetros de calidad de los aceites comerciales más comunes y de la *Jatropha*.

Aceite	Índice de yodo (g de I ₂ /100 g de aceite)	Densidad relativa (20°C/agua 20°C)	Ácidos grasos libres (%)
Canola	110-126	0.914-0.925	0.05
Soya	118-139	0.919-0.925	0.05
Maíz	107-135	0.917-0.925	0.05
Palma*	50-56	0.891-0.899	Máx. 5.0
<i>Jatropha</i>	95-110	0.916	Máx. 8.0

Datos obtenidos de NMX-F-475-SCFI-2011, NMX-F-252-SCFI-2011, NMX-F-030-2005, NMX-F-590-SCFI-2009 y NMX-F-019-SCFI-2012. *aceite crudo de palma.

En la tabla 8 se muestran los parámetros más comunes con los que el biodiesel debe de cumplir de acuerdo a las normas que existen. Cabe destacar que en México no existe una norma que regule la calidad del biodiesel que se produce. Por lo cual nos podemos basar en las reportadas para asegurar la calidad. Como se ha mencionado antes una de las tantas ventajas con las que cuenta el biodiesel sobre el diesel de petróleo es su punto de inflamación, debido a que este es más alto, lo cual ayuda a su estabilidad durante su manejo y almacenamiento (Kiss *et al.*, 2008).

Tabla 8. Diferencias fisicoquímicas del diesel y biodiesel con respecto a las normas existentes.

Propiedades del combustible	Diesel*	Biodiesel	Biodiesel
Norma	ASTM D975	ASTM D6751	EN 14214
Composición	Hidrocarburos C ₁₀ -C ₂₁	Esteres metílicos de ácidos grasos C ₁₂ -C ₂₂	----
Viscosidad cinemática (mm ² /s, 40°C)	1.3-4.1	1.9-6.0	3.5-5.0
Gravedad específica (Kg/L)	0.85	0.88	0.86-0.90
Punto de inflamación (°C)	60-80 min	93 min	101min
Índice de cetano	40-55 min	47 min	51 min
Índice de acidez (mg KOH/g)		0.5 máx.	0.5 máx.
Ester metílico de ácido linolénico %		12 máx.	12 máx.

*(Kiss *et al.*, 2008)

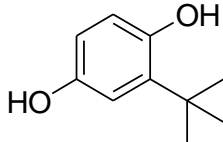
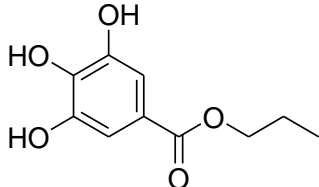
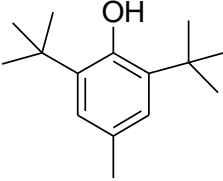
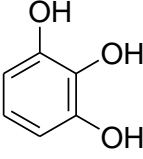
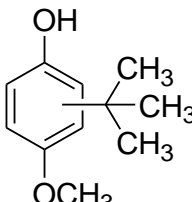
2.5 ANTIOXIDANTES

Uno de los problemas que enfrenta el biodiesel con respecto a la composición de ácidos grasos insaturados es su estabilidad frente a la oxidación. Esto provoca problemas para su almacenamiento y comercialización, lo cual es una desventaja con respecto al diesel de petróleo y está determinada desde la composición de ácidos grasos del aceite. Si el biodiesel es almacenado por períodos largos comienza la oxidación o la auto-oxidación, por las condiciones en las que se puede encontrar, como puede ser la exposición al oxígeno y al agua que influyen en la rapidez de las reacciones de oxidación. La calidad del biodiesel depende directamente de las condiciones de almacenamiento, influyendo desde el contacto con el aire y luz, hasta el material del depósito. Si este no se encuentra en condiciones óptimas, su estabilidad se ve comprometida. Durante periodos largos de almacenamiento, hay modificaciones en el biodiesel como es el aumento de la viscosidad y el índice de acidez. Esto se debe a los compuestos que se van formando durante la oxidación, los compuestos de alto peso molecular pueden conducir a la formación de depósitos en el motor, ocasionando problemas en el inyector. Estos problemas que presenta el biodiesel pueden “solucionarse ” con el uso de aditivos.

Los antioxidantes son sustancias que se encuentran en forma natural en los alimentos, que tienen la capacidad de evitar o reducir la intensidad de las reacciones de oxidación (Badui, 1999). Halliwell propuso como definición: “Un antioxidante es cualquier sustancia que, cuando se encuentra presente en concentraciones pequeñas en relación con las de un sustrato oxidable, demora significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato”. El uso de antioxidantes puede ayudar a retrasar el proceso de degradación en cierta medida. Los esteres grasos poliinsaturados son mucho más reactivos que los monoinsaturados al tener más sitios reactivos que son susceptibles al ataque por radicales libres.

En los aceites vegetales se producen antioxidantes de forma natural como tocoferoles, esteroides y tocotrienoles. Pero su concentración se ve afectada por el proceso de producción del biodiesel. Por lo que la adición de antioxidantes se puede considerar como una necesidad para tener un biodiesel estable. Los antioxidantes comúnmente utilizados para biodiesel son: ter-butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), ter-butilhidroquinona (TBHQ), propilgalato (PG) y pirogalol (PA) cuyas estructuras se muestran en la tabla 9 (Karavalakis *et al.*, 2011).

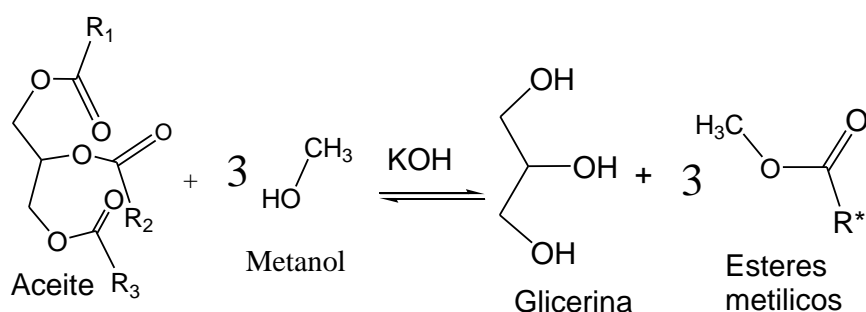
Tabla 9. Antioxidantes empleados para biodiesel.

Antioxidante	Estructura	Antioxidante	Estructura
TBHQ		PG	
BHT		PA	
BHA			

Los antioxidantes retardan la degradación oxidativa de las muestras de biodiesel en cierta medida, dependiendo de la composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados, si es una mezcla de biodiesel-diesel o es puro, algunos antioxidantes tienen un mejor desempeño cuando se trata de mezclas (biodiesel-diesel) y otros presentan mayor estabilidad en el biodiesel puro. Por lo que es importante investigar con cual funciona mejor.

2.6 REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN

La reacción de transesterificación consiste en hacer reaccionar un triglicérido y un alcohol para obtener como productos principales glicerina y ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiesel). En este proceso, un alcohol (metanol, etanol, butanol) se hace reaccionar con el aceite vegetal (triglicérido: molécula de glicerol esterificada por tres moléculas de ácidos grasos) o grasa animal en presencia de un catalizador, principalmente alcalino o ácido (KOH, NaOH, H₂SO₄, H₂PO₄) para producir biodiesel y glicerol, esta reacción se muestra en la figura 6. La finalidad del proceso de transesterificación es disminuir la viscosidad y el contenido de oxígeno del aceite vegetal (Demirbas, 2011).



R* = R₁, R₂ y R₃.

Figura 6. Reacción de transesterificación catalizada en medio alcalino.

Durante la última etapa de la reacción de transesterificación, la separación eficiente de la glicerina del biodiesel es importante dado que puede ser utilizada por la industria, para la fabricación de cosméticos y formulaciones farmacéuticas (Kargbo, 2010). Las ventajas de utilizar un catalizador básico en esta reacción como es el KOH o NaOH, es el costo relativamente barato de estos, son ampliamente disponibles, la rapidez de la reacción y los rendimientos altos. Pero se puede presentar la formación de jabón incluso si había poca agua y ácidos grasos libres. Mientras que utilizando catalizadores ácidos, se obtiene un rendimiento ligeramente menor y el tiempo de reacción es mayor. Sin embargo a estos no les afecta la cantidad de ácidos grasos libres

y el contenido de agua. En la tabla 10 se muestran las ventajas y desventajas del tipo de reacciones de transesterificación.

Los tiempos de reacción de la transesterificación se pueden acortar mediante el aumento de la temperatura y la adición de enzimas. Se probó que la adición de 9-17% de la enzima lipasa disminuye significativamente los tiempos de la reacción de la transesterificación (Kargbo, 2010).

Tabla 10. Ventajas y desventajas de los tipos de transesterificación.

Tipo	Características de la transesterificación	Ventajas	Desventajas
Alcalina	Cantidad apreciable de operaciones unitarias para separar los productos. Reacción en condiciones atmosféricas. Requiere catalizador alcalino.	Es la más utilizada. Tiempos de reacción relativamente cortos. Condiciones moderadas de presión y temperatura.	El aceite debe contener baja cantidad de agua y ácidos grasos libres (<3%) para evitar la formación de jabones.
Ácida	Se realiza un proceso de pre-esterificación. Requiere un catalizador ácido.	Puede procesar materias primas con altos niveles de ácidos grasos libres.	Tiempos de reacción más grandes.
Enzimática	Adición de adipasas	Condiciones suaves de operación. Selectividad.	Costoso

2.7 ANNONACEAS

Las anonáceas son una familia de plantas tropicales (entre árboles y arbustos), originaria del Hemisferio Occidental (Díaz, 2004). Familia con aproximadamente 130 géneros y 3200 especies. En México se encuentran 8 géneros y alrededor de 20 especies (Kelly, 2000). Esta familia se caracteriza por ser una gran productora de frutos comestibles y de aceites esenciales (León, 1969). Las especies más representativas de este género comprenden la *Annona cherimolla* (chirimoya), *A. muricata* (guanábana) y *A. diversifolia* (ilama). El uso de los árboles como productores de madera, solo tiene importancia a nivel local. Esta familia de plantas, también es popular porque se utilizan en remedios tradicionales, como para el tratamientos de infecciones sépticas, tos, hepatomegalia, hepatoesplenomegalia, diarrea y cánceres (Reen-Yen *et al.*, 2002). Por lo que el aislamiento de ciertos compuestos se han estudiado para el desarrollo de fármacos.

2.7.1 *Annona purpurea*

De familia de las anonáceas la *Annona purpurea* se extiende desde México hasta Venezuela y Trinidad, por el oriente, hasta el ecuador por el occidente (Patiño, 2002). Es un árbol bajo (altura 6 a 10 m, diámetro 23 cm) de follaje espaciado, sus hojas son grandes y delgadas de 15 a 30 cm. Las flores son grandes, con los pétalos externos de 4 a 5 cm, son amarillentos con manchas violetas en el lado interno. El fruto es ovoide a esférico, mide de 10 a 14 cm de ancho, está cubierto de prominencias piramidales muy desarrolladas, la pulpa es dura, de amarilla a anaranjada, es aromática. Contiene numerosas semillas, de forma elíptica, de color café claro, miden de 2.5 a 3 cm de largo. Las semillas tienen una viabilidad media, solo el 30 al 40% de semillas frescas germinan. Los frutos maduran entre junio y septiembre. Es un árbol que no es ampliamente cosechado, por lo general se encuentra de manera silvestre. Se desarrolla en climas de secos a húmedos, se adapta a gran variedad de suelos, pero no tolera los anegados. La multiplicación se realiza por semilla y por injerto. El árbol en general tiene varios usos, la madera se utiliza para

construcciones comúnmente, implementos agrícolas, cajas y la pulpa para papel (Salazar *et al.*, 2001) y varias partes del árbol también se emplean en la medicina tradicional. El zumo de fruta es un remedio para la fiebre, escalofríos e ictericia, la decocción de la corteza interior se prescribe en los casos de disentería y edema. El polvo de las semillas fueron reportados como insecticida y el extracto de CH_2Cl_2 de las hojas exhibió fuertes toxicidad hacia larvas del crustáceo *Artemia salina* (*Artemia*) y actividad pronunciada en contra de larvas del mosquito que produce la fiebre amarilla (Cepleanu *et al.*, 1993). También en las hojas se ha encontrado actividad antiplaquetaria (Fang-Rong, 1996). Un aspecto de la parte aérea y frutas se muestra en la figura 7.



Figura 7. Árbol de *Annona purpurea* y el fruto.

2.8 ACETOGENINAS EN ANNONACEAE

Las acetogeninas son características de la familia *Annonaceae*. Estos metabolitos hacen que el aceite de las semillas de estos frutos no sea apto para el consumo humano, debido a su toxicidad a altas concentraciones. Se conoce que estos compuestos también presentan actividad biológica importante como: antiparasitaria, insecticida, antimicrobiana, antifúngica y antitumoral. Actualmente están en estudio por su actividad anticancerígena. Ya que representan una oportunidad para encontrar un tratamiento menos agresivo para combatir el cáncer, por lo que es importante la extracción de estos metabolitos del bagazo de las semillas para su aprovechamiento para la industria farmacéutica. Las acetogeninas de anonáceas ejercen un efecto citotóxico y antitumoral mediante la inhibición del proceso de fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial. Reducen el abasto de energía necesario para el crecimiento y desarrollo celular, también inhiben la NADH-ubiquinona

reductasa de las membranas plasmáticas de las células cancerosas (Chávez, 1998).

La estructura de las acetogeninas aisladas de *annonaceae*, consiste en una cadena alifática de 32 ó hasta 34 átomos de carbono con una γ -lactona insaturada o saturada, como la mostrada en la figura 8. También pueden tener anillos tetrahidrofuranos (THF) o tetrahidropiranos (THP), como dobles o triples enlaces. Se forman de la ruta del acetato-malonato y están consideradas dentro del grupo de los policétidos que junto con los ácidos grasos son los principales compuestos originarios a partir de acetil-CoA (Luna, 2009). Las acetogeninas son solubles en diferentes compuestos orgánicos. Para identificarlas se han utilizado técnicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), infrarrojo (IR) y espectrometrías de masas (EM).

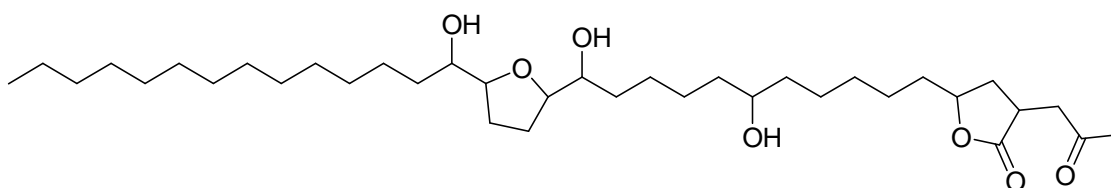


Figura 8. Estructura de una acetogenina de *Annonaceae*.

2.8.1 Acetogeninas de *A. purpurea*

Se han realizado aislamientos de acetogeninas de la semilla de *A. purpurea*, de las cuales ya se conocen sus estructuras por ayuda de los métodos de EM y RMN. En la figura 9 se muestran dos de las acetogeninas aisladas de *A. purpurea* (Chávez, 1998).

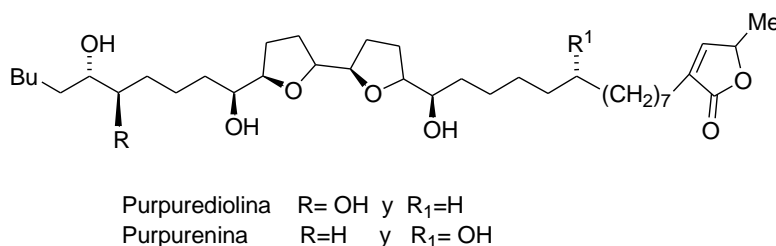


Figura 9. Acetogeninas aisladas de *A. purpurea*.

2.9 CICLOPÉPTIDOS

Los ciclopéptidos comprenden una clase de moléculas de origen natural que presentan actividades biológicas, por lo que hay especial utilidad desde el punto de la biogenética. Desde la década los 1940s, cuando se descubrió el primer ciclopéptido, hubo un gran interés en estos biocompuestos. Recientemente se han aislado de plantas superiores como: *Amaranthaceae*, *Annonaceae*, *Caryophyllaceae*, *Compositae*, *Linaceae*, *Rutaceae*, y *Rubiaceae* (Morita *et al.*, 2010). Y otras fuentes como hongos: *Amanita*, *Conocybe*, *Lepiota*, *Galerina* y especies *Omphalotus*. Los ciclopéptidos son compuestos de interés debido a su bioactividad y al desafío que plantean su aislamiento, purificación, y en especial, su elucidación estructural. Se han descrito en animales, plantas, hongos, bacterias, insectos y seres humanos, con una variedad de actividades, como: citotóxica, citostática, antifúngica, antiviral, antibacteriana, estimulante de las plantas, anti-malárica, estrogénica, sedante, antimicrobiano, nematocida, insecticida, inmunosupresora e inhibidora enzimática. Normalmente estos compuestos se les asociaban para una respuesta tóxica en mamíferos. Los ciclopéptidos pueden estar formados por *L*- α -aminoácidos proteínogénicos, y también, por isómeros *D* y aminoácidos no proteínicos. En la figura siguiente se muestra la estructura de un ciclopéptido aislado de una anonácea (Wélé *et al.*, 2008).

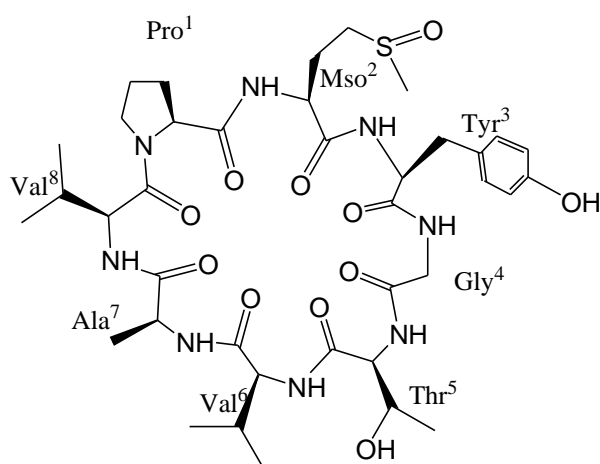


Figura 10. Cicloreticulín B de *Annona reticulata*.

En la naturaleza los ciclopéptidos y un gran número de péptidos lineales que contienen aminoácidos no proteinogénicos, no son sintetizados dentro de los ribosomas mediante la biosíntesis de proteínas, sino más bien, mediante complejos multienzimáticos, que activan a los aminoácidos como tiolésteres (Battista *et al.*, 2010).

3. METODOLOGÍA

El material vegetal fue proporcionado por el M. en C. José Alfredo Ríos Montejo, investigador del SENASICA, Cintalapa, Chiapas. Dicho material fue almacenado bajo refrigeración a 5 °C hasta su tratamiento posterior. En el diagrama 1, se muestra el procedimiento general seguido para el estudio de este recurso fitogenético como fuente de biodiesel. En diagramas posteriores, se detalla con mucha precisión la extracción del aceite, preparación de biodiesel, y otros aspectos relevantes de esta investigación.

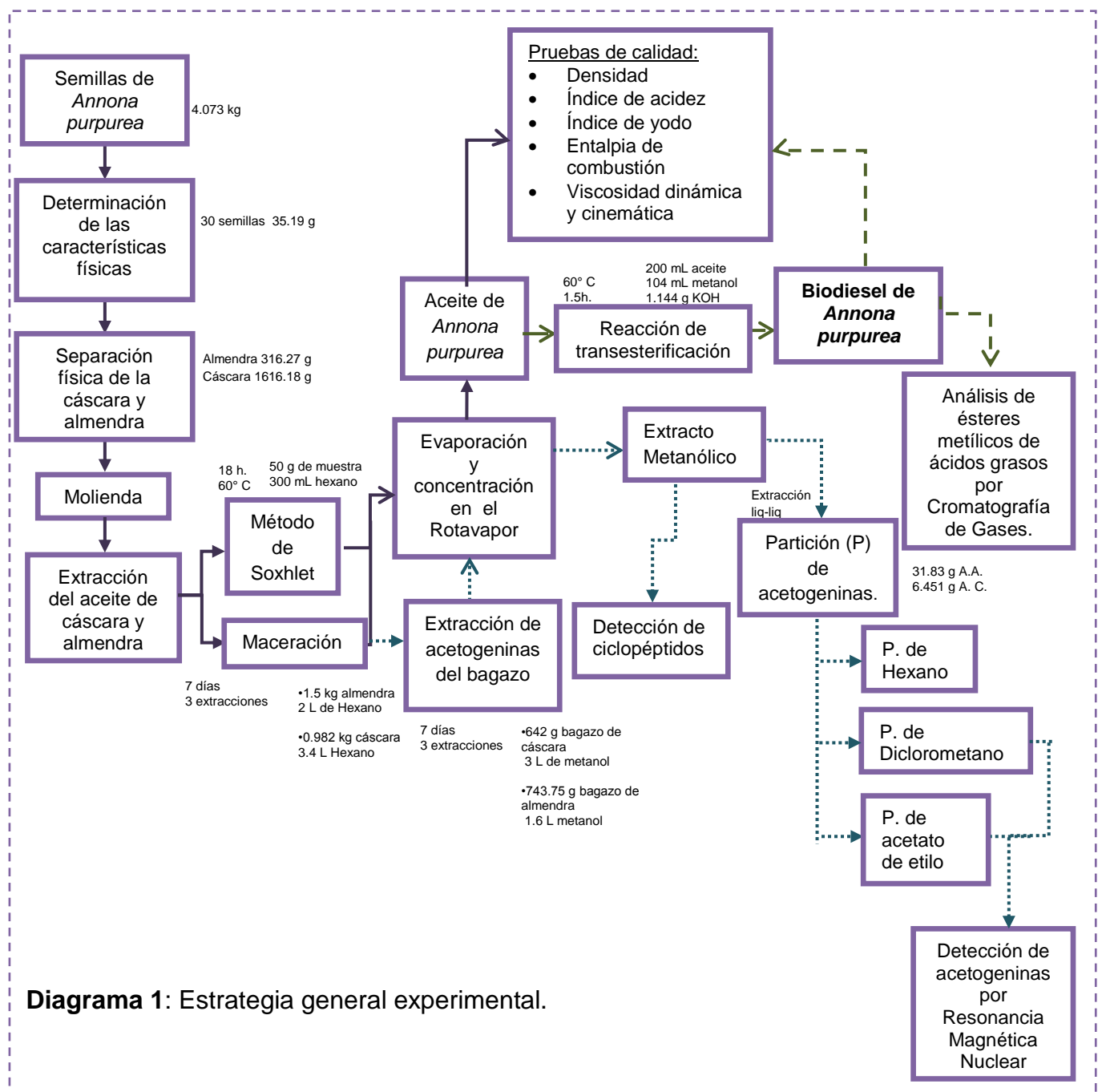


Diagrama 1: Estrategia general experimental.

3.1 PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental se dividió en cuatro etapas fundamentales.

- ◆ Extracción del aceite de la semilla (cáscara y almendra).
- ◆ Obtención del biodiesel.
- ◆ Pruebas de calidad (aceite y biodiesel).
- ◆ Identificación de acetogeninas y ciclopéptidos en el bagazo.

3.2 MATERIA PRIMA

Se trabajó con 4 kg de semillas secas de *Annona purpurea* colectadas de Cintalapa Chiapas, cosecha de noviembre de 2011.

3.3 EQUIPO Y REACTIVOS

Equipo

- Balanza analítica Galaxy 160 OHAUS
- Termómetro digital Equipar ERTco-HART, modelo 850
- Parr 1341EB Oxigen Bomb Calorimeter
- Waterbath B-480 BÜCHI
- Rotavapor R-124 BÜCHI
- Equipo de Anton Paar SM3000 Stabinger Viscometer
- RMN Varian Unity No. 729 a 300 MHz
- Licuadora marca Proctor Silex
- Parrilla eléctrica CORNING 6795-220
- Termómetro ambiental
- Bomba recirculadora de agua

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, grado QP, excepto las placas de silica gel.

Reactivos

- Hexano
- Na₂SO₄ anhidro
- Diclorometano
- KOH
- Metanol
- Reactivo de wijs
- Acetato de etilo
- Etilenglicol
- Carbón activado
- Glicina
- NaOH
- Fenolftaleína
- Tiosulfato de Sodio
- Almidón soluble
- Yoduro de potasio
- Acido cítrico
- TLC silica gel 60 F₂₅₄ MERCK

3.4 CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA DE *ANNONA PURPUREA*

Una muestra de 30 semillas de *A. purpurea* fue tomada al azar, a las cuales se les determinó su peso y las medidas con un vernier (largo, ancho y grosor) ver figura 11. Posteriormente fueron abiertas empleando una pinza mecánica, resultando una almendra a la que se le determinó su peso y medidas como a la semilla completa, el peso de la cáscara se estableció por diferencia entre la semilla completa y la almendra. Se procedió con la separación de cáscara y almendra al resto de las semillas y se molió en una licuadora para efectuar diversos análisis.



Figura 11. Determinación de las medidas de la semilla mediante un vernier.

3.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

3.5.1 Extracción por Soxhlet

La extracción por soxhlet consiste en un método general de extracción de grasas de distintos orígenes o de solubilidades muy diferentes en una mezcla, por ejemplo se puede emplear en la extracción de colorantes utilizando agua, de grasas empleando hexano, éter de petróleo o éter etílico, algunas particularidades de este método se enuncian a continuación.

- Método semicontinuo de extracción.
- Una cantidad de disolvente rodea la muestra y se calienta a ebullición.
- El líquido condensado llega a cierto nivel y por medio del sifón regresa al matraz de ebullición.

En la extracción del aceite de semillas de *A. purpurea*, se prepararon cartuchos de papel filtro con 50 g de muestra molida, 300 mL de hexano en un matraz bola de fondo plano con perlas de ebullición, se mantuvo a reflujo en una parrilla eléctrica durante 18 horas (figura12). Se utilizó una bomba para recircular el agua. Una vez terminado el tiempo de la extracción, se secó el disolvente-aceite con Na_2SO_4 anhidro y se filtró. Esta operación se efectuó por triplicado tanto para la almendra como para la cáscara.

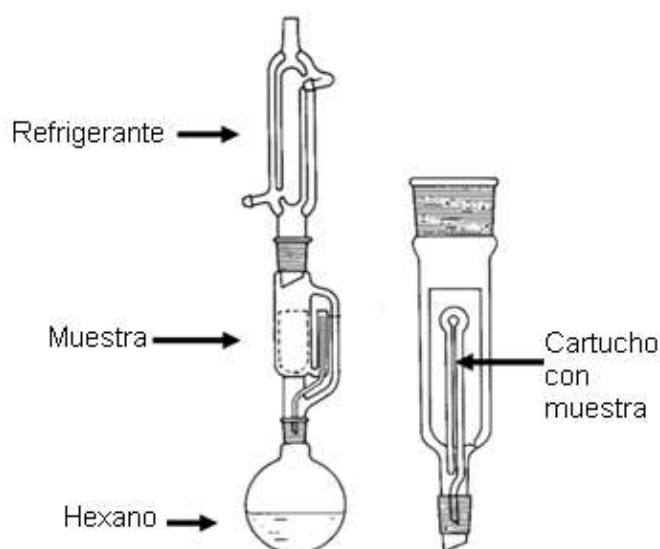


Figura 12. Extracción del aceite por el método de Soxhlet.

Evaporación y concentración del aceite en Rotavapor:

El disolvente empleado en la extracción del aceite de semillas de *A. purpurea* se eliminó por medio de un rotavapor, lo que consiste en una destilación simple a presión reducida. El sistema cerrado conectado a una bomba de vacío hace más eficiente la evaporación, al reducir la temperatura y el tiempo. Se utilizó la bomba para recircular el agua del refrigerante.

3.5.2 Maceración

La maceración consiste en un proceso extractivo estático, que habitualmente se realiza a temperatura ambiente con disolventes orgánicos, dejando reposar por varios días el producto sólido molido. Mientras menor tamaño tenga la partícula, mayor área de contacto, por lo cual será más eficiente la extracción (Villegas *et al.*; 2006).

- Almendra de la semilla de *Annona purpurea*

Se molió 1.5 kg de almendra de *A. purpurea*, se colocó en un frasco de vidrio con 2.5 L de hexano, se dejó durante 10 días agitando ocasionalmente, se realizaron 4 extracciones (debido a la cantidad de aceite), se filtró con papel para evitar que el bagazo pase al disolvente de extracción.

- Cáscara de la semilla de *Annona purpurea*

Para la cáscara, se molieron 982 g de cascara de *A. purpurea*, se añadió 3.4 L de hexano y se efectuaron 3 extracciones durante un periodo de 7 días. En ese periodo de tiempo también se agitó regularmente. En cada extracción, se volvió añadir disolvente, para continuar con la extracción. Una vez terminadas todas las extracciones de cada muestra (almendra y cáscara molida), se evaporó y se concentró el aceite en el Rotavapor, ver diagrama 2.

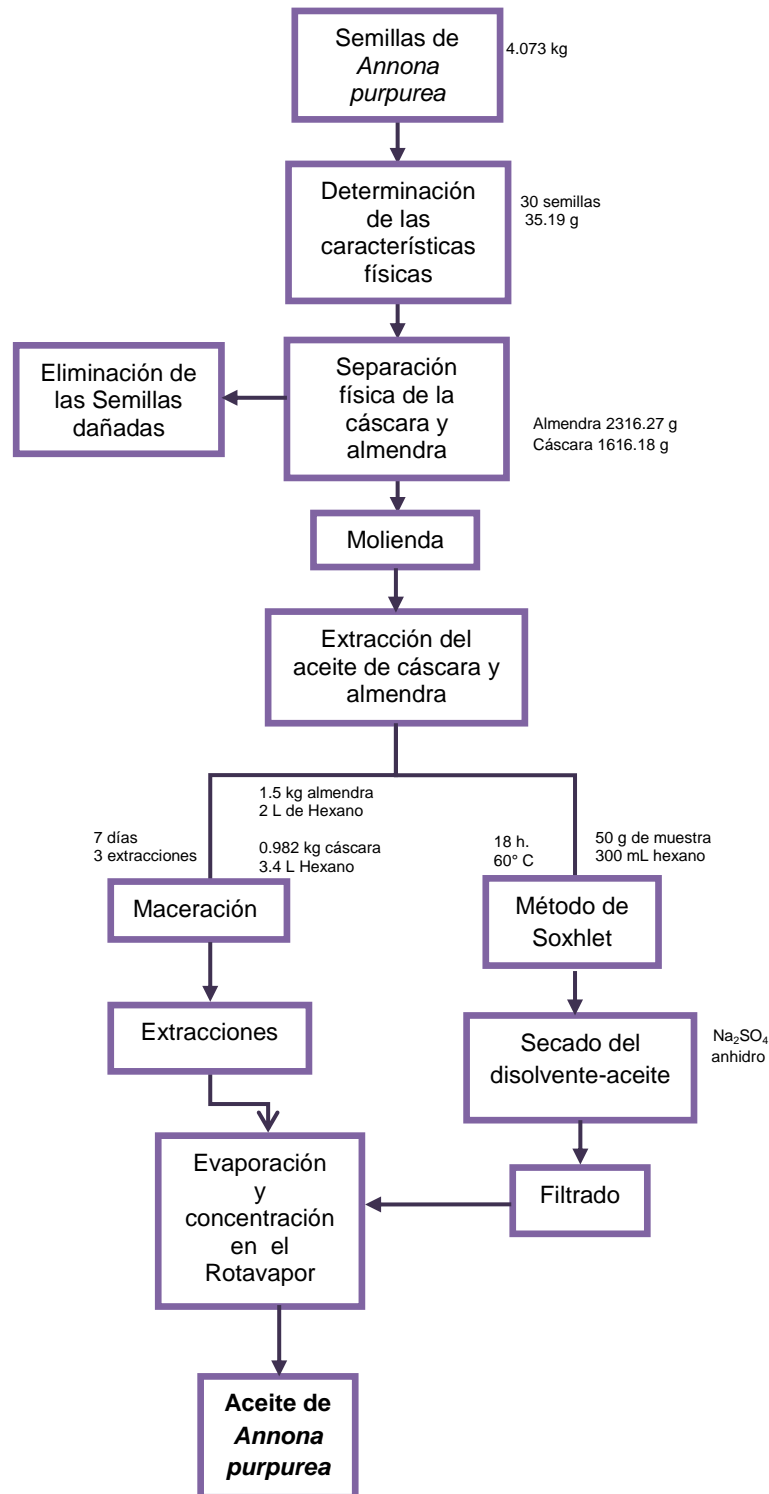


Diagrama 2. Extracción del aceite de la semilla de *A. purpurea* por el método de Soxhlet y maceración.

3.6 OBTENCIÓN DEL BIODIESEL

Para la obtención de biodiesel a partir del aceite de *Annona purpurea*, se llevó a cabo la reacción de transesterificación en medio básico. Para favorecer el desplazamiento de la reacción hacia la formación de productos el metanol se encontraba en exceso, se obtuvo una relación molar de 1:12 aceite/metanol de acuerdo a lo descrito por Sharman *et al* (2008). Para el aceite de almendra obtenido por maceración, se disolvieron 1.59 g (0.039 mol) de KOH con 104 mL (2.57 mol) de metanol en un matraz de bola de fondo plano, una vez disuelto, se añadieron 200 mL de aceite (0.209 mol) y se puso a reflujo con agitación constante en una parrilla eléctrica y la reacción se monitoreó por medio de cromatoplasmas analíticas, usando como eluyente una mezcla de Hexano/Acetato de etilo/Ácido acético (12:1:0.1) y revelando en una cámara de vapores de yodo. Cuando se terminó la reacción, se pasó a un embudo de separación y se dejó reposar una noche y se separó la glicerina del biocombustible. Al biodiesel se le realizó dos lavados con 25 mL de ácido cítrico al 1% y posteriormente dos lavados de 50 mL de agua a 60° C. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se midió su volumen para obtener el rendimiento. Para el aceite de almendra obtenido por soxhlet, se hizo el mismo procedimiento anterior, pero debido a la cantidad obtenida, para este se utilizó: 6 mL de aceite de *Annona purpurea*, 0.0699 g de KOH y 3.2 mL de metanol. Para los lavados, se utilizó 5 mL de ácido cítrico (2 lavados) y 10 mL de agua a 60° C (2 lavados). En el diagrama 3 se muestran los pasos para la obtención del biodiesel.

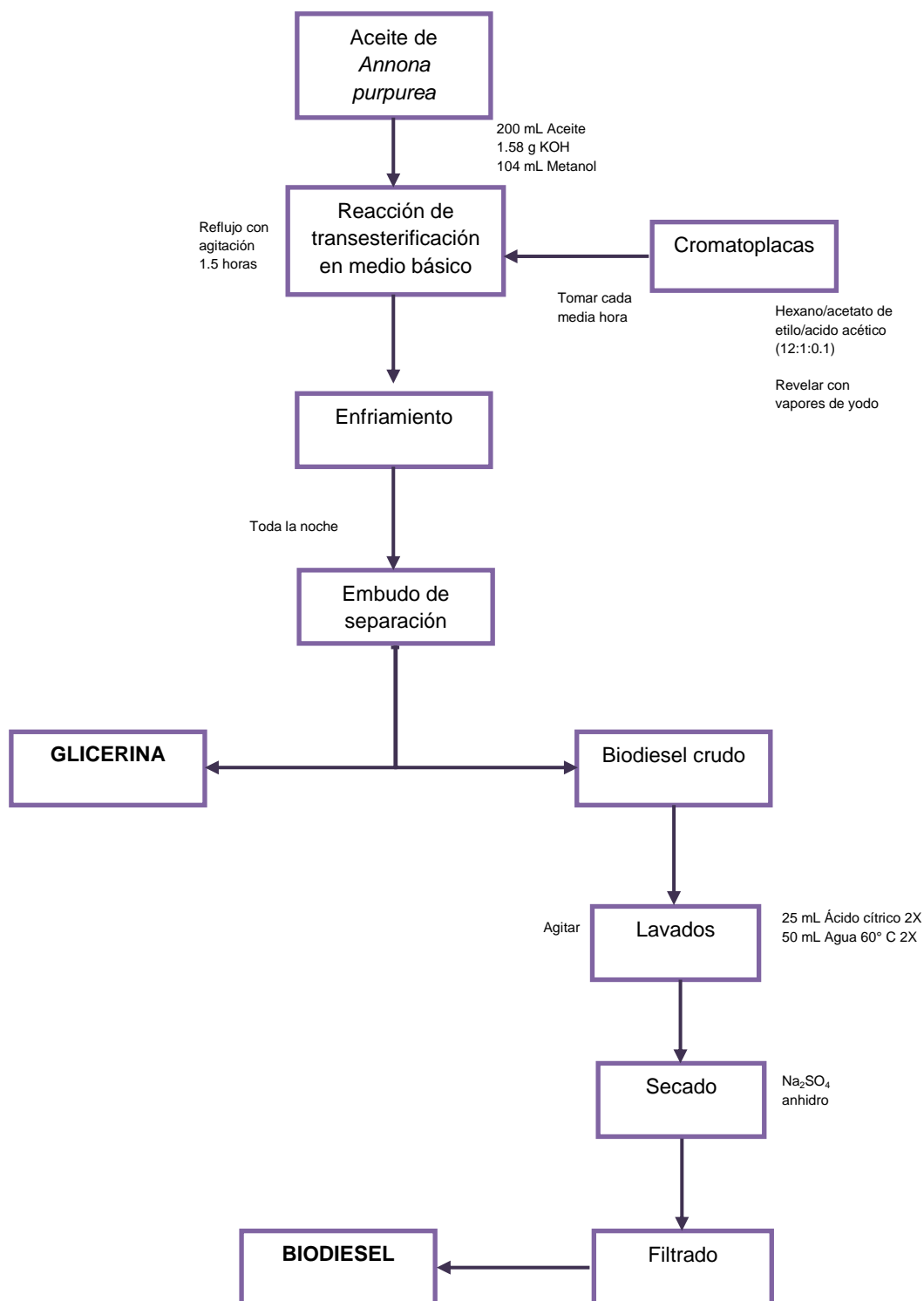


Diagrama 3. Obtención del biodiesel a partir del aceite de la almendra de *A. purpurea*.

3.7 PRUEBAS DE CALIDAD DEL ACEITE Y EL BIODIESEL

3.7.1 Densidad relativa

Esta prueba se basa en la relación que existe, entre el peso de un volumen de una sustancia y el peso del mismo volumen de agua a una temperatura dada (20°C).

Para la determinación de las densidades el aceite de las almendras de la semilla de *Annona purpurea* obtenido por el método de soxhlet y por maceración, y el biodiesel (obtenido del aceite de la almendra por maceración), se siguió el procedimiento que estipula los métodos generales de análisis MGA 0251 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2008), se realizó por triplicado para cada muestra.

Para obtener la densidad se utilizó la siguiente ecuación:

$$DR = \left(\frac{D}{C} \right)$$

DR = densidad relativa de la muestra.

D = peso de la muestra en gramos.

C = peso del agua en gramos.

3.7.2 Viscosidad

Las determinaciones de viscosidad dinámica y cinética se efectuaron empleando un viscosímetro-densitrómetro marca Anton Paar “Stabinger SM3000” (propiedad de UACH), tanto al aceite de la almendra de *A. purpurea* obtenido por maceración, soxhlet, como al biodiesel correspondiente, además del aceite de la marca comercial “123” y al biodiesel obtenido de este aceite. Este análisis se realizó a una temperatura de 40 °C, utilizando muestras de 3.5 a 4 mL, para realizar dos inyecciones y tener un único valor con repetitibilidad. Los datos obtenidos de la densidad determinados por el método general de análisis MGA 0251 se corroboraron con los estimados con este equipo.

3.7.3 Índice de Acidez

El índice de acidez es la cantidad en miligramos de hidróxido de potasio, necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres en un gramo de muestra. Para el aceite de las almendras obtenido por el método de soxhlet, maceración y para el biodiesel de maceración y soxhlet de la almendra se efectuaron por triplicado, se realizó de la siguiente manera.

Se pesó 1 g de muestra (aceite o biodiesel obtenido de la almendra de *A. purpurea*) en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, se adicionaron 10 mL de etanol y 2 gotas de fenolftaleína, con agitación constante se tituló con KOH 0.00839 N hasta observar el vire. Para el aceite obtenido de maceración de la cáscara, se utilizó una menor cantidad, debido a la cantidad de muestra obtenida, se mezcló 0.2 g de aceite en 5 mL de etanol, 2 gotas de fenolftaleína y se tituló con KOH 0.000839 N y se realizaron los cálculos. (Se substituyó la mezcla de 10 mL de etanol-éter (1:1) que marcaba la MGA 0001 (Farmacopea de los Estados Unidos mexicanos, 2008) por etanol absoluto).

Calculo

$$\left(\frac{0.00839 \text{ mEq KOH}}{\text{mL}}\right) \times \left(\frac{1 \text{ mmol KOH}}{1 \text{ mEq KOH}}\right) \times \left(\frac{56.1 \text{ mg KOH}}{1 \text{ mmol KOH}}\right) = 0.4706 \frac{\text{mg KOH}}{\text{mL}}$$

$$\text{IA} = 0.4706 \left(\frac{\text{V}}{\text{m}}\right)$$

IA = Índice de acidez.

V = mililitros de solución de hidróxido de potasio.

0.4706 = son los mili equivalentes de la solución.

de 0.00839N de hidroxido de potasio.

m = peso en gramos de la muestra.

Se substituye en la ecuación de índice de acidez el volumen de hidróxido gastado para cada muestra y su masa correspondiente.

3.7.4 Índice de yodo

Para la determinación de índice de yodo tanto de los aceites como del biodiesel obtenido se realizó de la siguiente manera: se pesó de 0.1 a 0.2 gramos del aceite obtenido de la almendra de *A. purpurea* o biodiesel en un matraz de yodo de 250 mL, se cubrió el matraz con papel aluminio, dejando la boquilla destapada, se le añadió 10 mL de diclorometano para disolver el aceite, se agitó fuertemente, después se le adicionó 10 mL del reactivo de wijs, se le colocó el tapón, se agitó y se guardó en un lugar oscuro durante 30 min. Una vez transcurrido ese tiempo, se sacó el matraz del lugar oscuro y se le adicionó 10 mL de una solución de yoduro de potasio al 10%. Se tituló con una solución de tiosulfato de sodio 0.1 N previamente valorada, hasta obtener un color amarillo paja. Una vez obtenida la coloración, se le adicionó 1 mL de una solución de almidón y se continuó titulando hasta que desapareciera la coloración azul. Se comparó con un blanco, que se realizó con la cantidad de los reactivos marcados, menos la muestra y sin esperar los 30 min, se tituló de la misma forma. Con los mililitros de tiosulfato de sodio gastados en el blanco, los mililitros de las muestras y sus pesos, se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el índice de yodo.

$$IY = \frac{\left(100 \times (V_B - V_M) \times \frac{X \text{ moles Na}_2\text{SO}_3}{1000\text{mL}} \times \frac{1 \text{ mol I}}{1 \text{ mol Na}_2\text{SO}_3} \times \frac{127\text{gI}}{1 \text{ mol I}}\right)}{m}$$

V_B = volumen de Na_2SO_3 gastado en el blanco.

V_M = volumen de Na_2SO_3 gastado en la muestra.

$X \text{ moles Na}_2\text{SO}_3 / 1000\text{mL}$ = molaridad de tiosulfato de sodio.

m = masa de la muestra expresada en gramos.

100 = para expresar lo que esta en 100 g de muestra.

3.7.5 Entalpía de combustión

Se determinó la entalpía de combustión del aceite comercial “123” y el obtenido de las semillas de *A. purpurea*, así como el biodiesel obtenido por transesterificación, en una bomba calorimétrica marca Parr modelo 1341EB de la siguiente manera: primero se lavó y seco la bomba, el porta muestra y la cápsula, se pesó 1 g de muestra en la cápsula y se acomodó en el porta muestra, se colocó el alambre de tal manera que solo tocara la muestra, sin tocar las paredes de la cápsula. Se Agregó 1 mL de agua destilada en la bomba calorimétrica, se cerró y purgó con oxígeno, y se llevó a 30 Atm. Se conectaron los electrodos y se sumergió la bomba en 2000 g de agua destilada. Se cerró y registró la temperatura ambiente y de la bomba, la diferencia no tenía que ser mayor a 1.5° C. La temperatura se registró cada 30 s por 2 min con un termómetro digital. Concluido ese tiempo, se puso en agitación y se registró la temperatura cada 30 s por 5 min. Al término de ese tiempo se llevó a cabo la ignición y se registró la temperatura cada 20 s hasta que se mantuvo constante o cuando empezó a disminuir, a partir de ese momento se tomó la temperatura cada 30 s por 5 min más. Se apagó la agitación y se desconectaron los electrodos, se liberó poco a poco el oxígeno restante, se abrió la bomba y se midió lo que quedo del alambre de ignición con la escala del porta-alambre. La figura 13 muestra las partes del calorímetro. Se construyeron gráficos de tiempo contra la temperatura como se muestra en el gráfico 3, y se efectuaron los cálculos, empleando la ecuación siguiente:

$$\Delta H = \frac{(K \times \Delta T - e)}{m}$$

ΔH = entalpía de combustión.

K = constante del calorímetro $\left(\frac{\text{cal}}{^{\circ}\text{C}}\right)$.

e = correlación en calorías.

m = masa en gramos de la muestra.

ΔT = diferencia de temperatura.

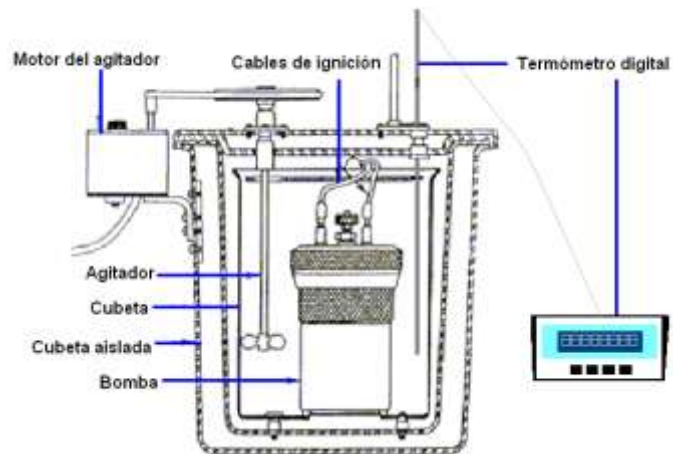


Figura 13. Diagrama de la bomba de combustión.

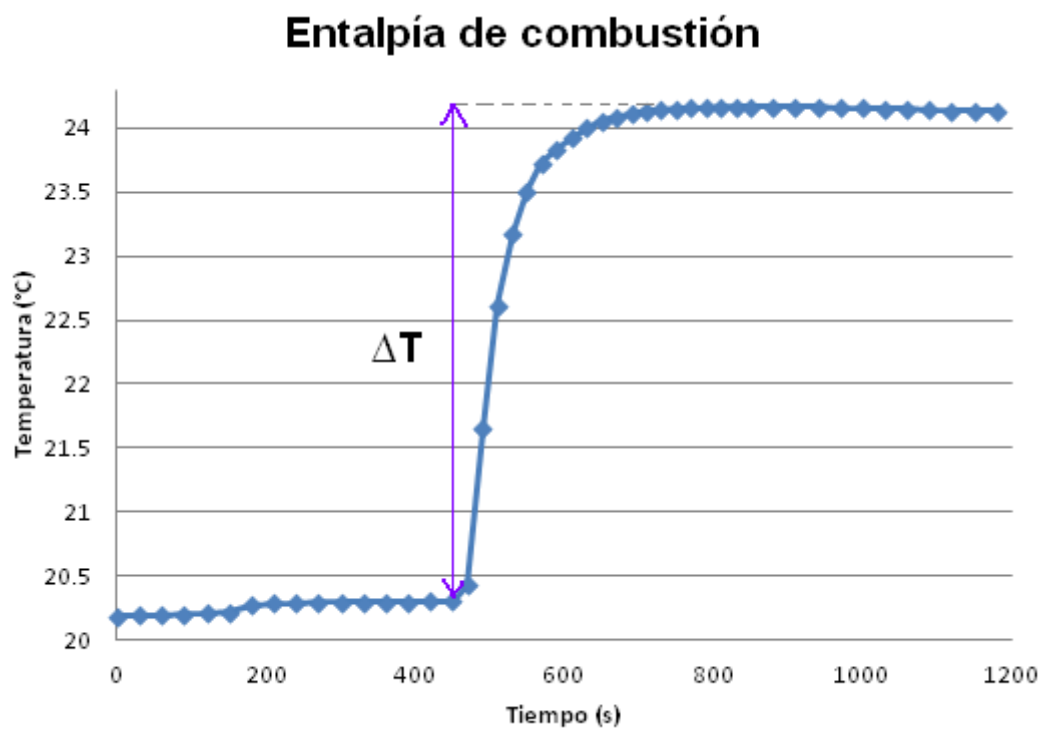


Gráfico 3. Temperatura contra el tiempo de combustión del aceite de la almendra de *A. purpurea*.

3.7.6 Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del biodiesel

La composición porcentual de los ésteres metílicos del biodiesel obtenido del aceite de la almendra de *A. purpurea* se efectuó por medio de un análisis por cromatografía de gases, empleando un cromatografo Agilent 6890, con el método de control Ésteres FAME2, método de análisis FAME, Certificado por la norma ISO 9001:2000 RSGC 238 con las siguientes condiciones:

- Columna FAME 30 mx.25mm.25um espesor de película.
- Horno temperatura inicial 180°C 15 min 10°/min temperatura final 230°C.
- Flujo hidrógeno 1.8 ml/min.
- Temperatura detector 275 °C e inyector 250°C.

3.8 EXTRACCIÓN DE ACETOGENINAS

3.8.1 Acetogeninas del bagazo de maceración de la almendra de la semilla de *A. purpurea*

Al bagazo resultante de la extracción por maceración del aceite de la almendra molida de *A. purpurea* (1500.5 g) se extendió y secó por un periodo de 7 días. Ya seco, se tomó una parte del bagazo (743 g) y se colocó en un frasco de vidrio, adicionando 1.6 L de metanol, se dejó reposar una semana con agitación ocasional, en ese transcurso de los 7 días se realizaron 3 extracciones. Utilizando una malla para evitar que el bagazo se pasara al disolvente, se filtró con papel y se adicionó metanol para continuar con la extracción. Una vez recolectadas las extracciones se procedió a la concentración y evaporación en un Rotavapor.

3.8.2 Acetogeninas del bagazo de maceración de la cáscara de la semilla de *A. purpurea*

Al bagazo resultante de los 982 g de la cáscara molida de *A. purpurea* utilizadas para la extracción del aceite por maceración con hexano, se secó y se tomaron 642 g, se colocaron en un frasco de vidrio y se adicionaron 3 L de metanol, se dejó en reposo durante una semana, agitando ocasionalmente, se realizaron 3 extracciones, las cuales se filtraron, se juntaron, se concentraron y evaporaron los extractos metanólico en un Rotavapor.

3.9 EXTRACTOS DE PARTICIÓN DE ACETOGENINAS

Del extracto metanólico concentrado obtenido del bagazo de almendra y cáscara de semillas de *A. purpurea*, se utilizó una porción para preparar las particiones de hexano, diclorometano y acetato de etilo, como se describe a continuación.

3.9.1 Partición de hexano

Se pesaron 31.83 g del extracto metanólico de la almendra de la semilla de *A. purpurea*, se transfirieron a un embudo de separación de 250 mL, se adicionó 50 mL de agua destilada y 70 mL de hexano, se agitó fuertemente y se separó la fase hexanica, esta operación se repitió 2 veces más con la misma cantidad de hexano. Se reunieron las 3 particiones de hexano, se evaporó y concentró en Rotavapor. La fase acuosa se dejó en el embudo para hacer las siguientes particiones.

Para el extracto de cáscara de la semilla de *A. purpurea*, se tomó 6.4511 g de del extracto metanólico, se adicionó 150 mL de agua para poderlas mantener en suspensión, se agitó fuertemente y se hicieron 3 extracciones con 15 mL de

hexano cada una. La fase acuosa se guardó y las fases orgánicas se juntaron, se evaporaron y concentraron en el Rotavapor.

3.9.2 Partición de diclorometano

A la fase acuosa resultante de la extracción de acetogeninas en almendra procedentes de *A. purpurea*, se le efectuaron 3 lavados con 100 mL de diclorometano, se juntaron las 3 fases orgánicas y se concentraron y evaporaron en el Rotavapor. Para la parte de acetogeninas en cáscara, se utilizó 15 mL para cada extracción. La fase acuosa se separó, se juntaron las fases orgánicas de diclorometano, se concentraron y evaporaron en el Rotavapor.

3.9.3 Partición de acetato de etilo

A la fase acuosa final procedente de la partición de diclorometano de *A. purpurea* se le hicieron los 3 lavados con 100 mL de acetato de etilo. De igual modo se juntó las 3 fases, se concentró y se evaporó en el Rotavapor. Para la parte de acetogeninas en cáscara de semillas de *A. purpurea*, se utilizó 15 mL de acetato de etilo para cada extracción.

3.9.4 Fase acuosa

A la fase acuosa final resultante de la extracción de las acetogeninas en cáscara y almendra de *A. purpurea*, se colocaron en platos anchos y planos para la evaporación del agua. Se determinó su peso y el de cada partición, para obtener el porcentaje de cada una. Como se muestra en el diagrama 4.

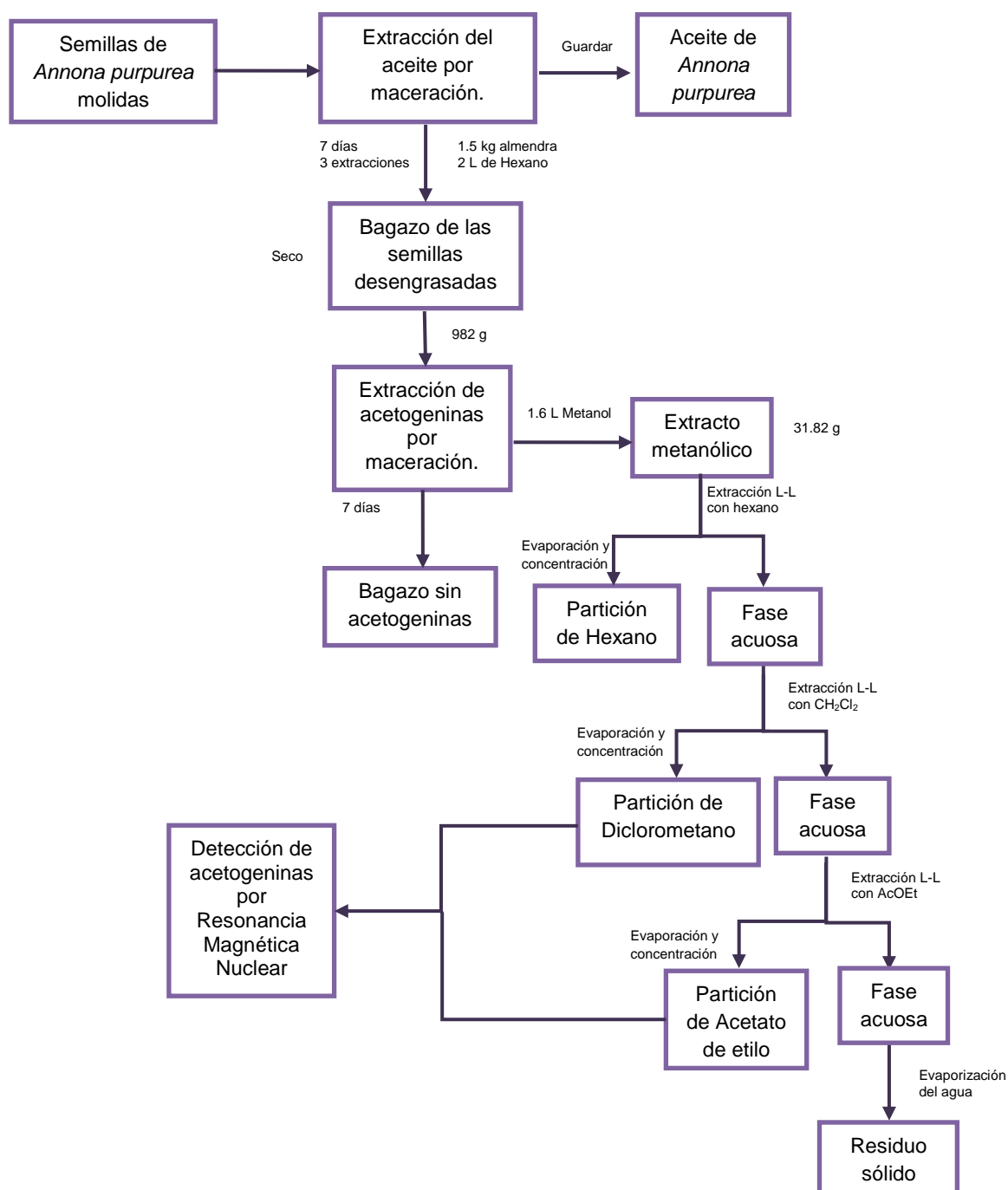


Diagrama 4. Extracción de acetogeninas del bagazo de la almendra de *A. purpurea* y sus particiones con los disolventes.

3.9.5 Resonancia Magnética Nuclear

El método instrumental de análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), principalmente proporciona información del tipo de hidrógenos que contiene un compuesto orgánico (RMN-¹H) y el número y clase de carbonos en tales compuestos (RMN-¹³C) (Weininger *et al.*, 1988). Para comprobar la presencia de acetogeninas en el bagazo de la almendra de *A. purpurea* se recurrió a un análisis por RMN-¹H, debido a que ya se contaba con estudios previos de otra Annonacea con espectros (Peralta, 1998). Por lo cual se sometieron a un análisis la partición de diclorometano y de acetato de etilo. Este análisis fue realizado en el posgrado de la Facultad de Química, con un equipo Varian Unity No. 729 a 300 MHz, para comparar las estructuras características de las acetogeninas en el espectro con la literatura. El disolvente utilizado para el análisis fue cloroformo deuterado.

3.10 DETECCIÓN DE CICLOPÉPTIDOS

Para la detección de ciclopéptidos en semillas de *A. purpurea*, se recurrió a la cromatografía en capa delgada. Para esto, se necesitaba un ciclopéptido para tenerlo de referencia y poder comparar con los extractos. Por lo que se procedió en hacer una síntesis de un ciclopéptido sencillo como la 2,5-piperazindiona y preparar los reveladores que nos indiquen la presencia o ausencia de ciclopéptidos en el extracto metanólico.

3.10.1 Síntesis de 2,5-piperazindiona

La preparación de la 2,5-piperazindiona se efectuó de acuerdo con el procedimiento descrito por Furniss *et al* (1989) de la manera siguiente: Se pesó 1 gramo de glicina y se colocó en un matraz pera de 50 mL, se le adicionó 10 mL de etilenglicol y se mantuvo sobre un vaso de precipitados de 150 mL en la parrilla con agitación magnética y flujo de aire a 175°C durante una hora. Al término de ese tiempo se dejó enfriar y se guardó en refrigeración toda la

noche. Al día siguiente se procedió a decantar. El sólido se lavó con 150 mL de metanol, se solubilizó en 10 mL de agua destilada hirviendo, se colocó en un baño de hielo y se indujo la cristalización, se filtró en un embudo buchner colocado en una campana con vacío. El sólido se hirvió durante 3 minutos con 0.4 g carbón activado y 10 mL de agua destilada, pasado este tiempo, se filtró nuevamente con ayuda del embudo buchner dentro de la campana, para retirar el carbón activado. Se colocó en un baño de hielo para inducir la cristalización y nuevamente se filtró y se secó el sólido resultante (2,5-piperazindiona) y se calculó su rendimiento, de acuerdo con la reacción mostrada en la figura 14.

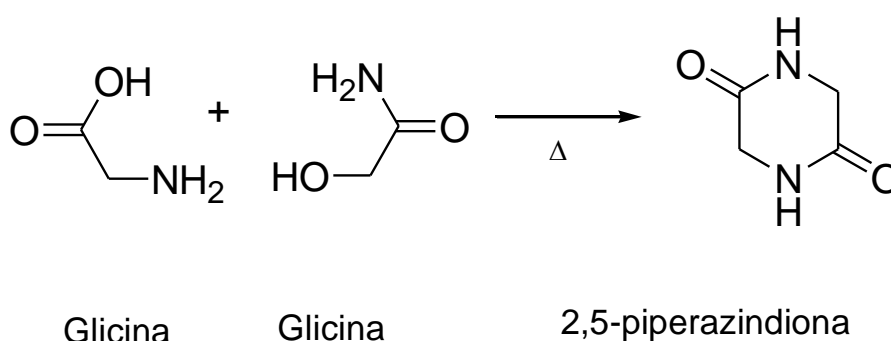


Figura 14. Reacción para la formación del ciclopéptido.

3.10.2 Dilución de los extractos, aminoácidos y ciclopéptido.

Se tomó una pequeña muestra de cada uno de los extractos (metanólico y sus particiones), aminoácidos y ciclopéptido, se pasó a un vial pequeño, al cual se le adicionó el disolvente en el cual son solubles (aminoácidos y el ciclopéptido con etanol, partición de hexano con hexano, etc.), para poderlos utilizar en las cromatoplacas.

3.10.3 Solución de Ninhidrina (detección de péptidos y aminoácidos)

Se pesó 30 mg de ninhidrina en un matraz Erlenmeyer de 25 mL, se añadió 10 mL de n-butanol y 0.30 mL de ácido acético glacial.

Se desarrollaron diferentes cromatoplasmas para ser reveladas con ninhidrina, colocando los extractos (metanólico y sus particiones) y algunos aminoácidos de referencia, un péptido comercial (Aspartame) y otros con el ciclopéptido con ayuda de un capilar. Se eluyeron en cloroformo/metanol/agua (5:4:1), se dejaron secar y se rociaron con la solución de ninhidrina. Se llevaron a un parilla y se calentaron por algunos minutos. La presencia de manchas moradas, indican una prueba positiva, porque reacciona con el grupo amino terminal del péptido. Esta prueba da negativa para los ciclopéptidos.

3.10.4 Sistema de revelado con Cl_2 /o-tolidina (detección de ciclopéptidos)

Se pesaron 160 mg de o-tolidina y se disolvieron en 30 mL de ácido acético glacial, se añadieron 500 mL de agua destilada y 1 g de yoduro de potasio. Se realizaron las cromatoplasmas, aplicando con un capilar las muestras diluidas de los extractos obtenidos, los aminoácidos de referencia, un péptido comercial (Aspartame) y un ciclopéptido sintetizado (2,5-piperazindiona). Las cromatoplasmas se eluyeron en cloroformo-metanol-agua (5:4:1), se dejaron secar y se colocaron en un vaso de precipitados de 150 mL con vapores de cloro obtenidos de un volumen pequeño de hipoclorito comercial (clorox) sin diluir, se dejó reaccionar la cromatoplasma durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se dejó evaporar el cloro que estaba en exceso a temperatura ambiente por unas horas (5 horas aproximadamente). Una vez eliminado el exceso de cloro se procede a rociar toda la cromatoplasma con la solución de o-tolidina. Es importante comprobar la eliminación completa de los residuos de cloro en toda la cromatoplasma para no tener un falso positivo; en una esquina de la cromatoplasma se le aplicó la solución de o-tolidina, la coloración azul en la esquina de la placa indicaría aún la presencia de cloro.

La presencia de manchas azules en la cromatoplasma revelada con Cl_2 /o-tolidina indica prueba positiva para ciclopéptidos. Es importante mencionar que es necesario comparar el resultado de la cromatoplasma anterior con una

cromatoplaqueta revelada solamente con ninhidrina para establecer la presencia de ciclopéptidos. La ausencia de las manchas azules en la cromatoplaqueta revelada con ninhidrina indica la presencia de ciclopéptidos. Por lo cual se debe de obtener el código: ninhidrina (-), Cl₂/o-tolidina (+) para concluir que hay ciclopéptidos.

3.11 MODELADO MOLECULAR DE LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN

Los métodos mecano-cuánticos se utilizan como una herramienta para estudiar la cinética y el mecanismo de las reacciones químicas. Se realizaron cálculos teóricos para estudiar la reacción de transesterificación en medio básico, con el objetivo de relacionar los datos obtenidos de la simulación computacional con los resultados obtenidos experimentalmente. (Tapanes *et al.*, 2008). Los cálculos se llevaron a cabo con el programa de modelado molecular PcSpartan 08 (Wavefunction, Inc.), implementado en un Servidor Opteron Dual Core. Se estudió la reacción de transesterificación básica con metanol de los triglicéridos, usando como modelo los monoglicéridos de los principales ácidos grasos presentes en el biodiesel empleando el método Semi-empírico PM3 (Kong *et al.*, 2000).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MATERIA PRIMA

Se procedió a separar la cáscara, la almendra, las semillas dañadas y el material ajeno de los 4 kg de semillas. En la tabla 11, se muestra el porcentaje de cada fracción obtenida de la materia prima. Tomando en cuenta el peso total de las semillas en buen estado, se puede ver que más del 58% de peso de las semillas corresponde al peso de la almendra.

Tabla 11. Porcentaje correspondiente a cada fracción de los 4 kg de semilla de *A. purpurea*.

Materia prima	Porcentaje %
Almendra	58.42
Cáscara	40.76
Dañadas	0.58
Desechos*	0.22

*Material ajeno a la semilla.

4.1.1 Características físicas de las semillas de *Annona purpurea*

Las dimensiones determinadas a las semillas colectadas de frutos de *A. purpurea* son de 2.71 cm \pm 0.24 cm, 1.35 cm \pm 0.19 cm y 0.86 cm \pm 0.10 cm de largo, ancho y grosor respectivamente y están de acuerdo con los datos publicados por León (1969), ver tabla 12.

El tamaño de la semilla de *A. purpurea*, comparada con la semilla de *A. muricata* (0.94 cm \times 0.12 cm de largo) (Juárez, 2012) y *A. cherimolla* (1.87 \times 0.13 cm de largo) son más grandes (Marroquín-Andrade et al., 2011), casi el doble que *A. muricata*. La ventaja del tamaño es en relación de la rapidez de la separación de la cáscara cuando se hace de forma manual, debido a que facilita su manejo.

Tabla 12. Resultados de las dimensiones y peso de la semilla de *A. purpurea**

Parámetros	Almendra	Cáscara
Peso (g)	0.69 ± 0.12	0.49 ± 0.07
Largo (cm)	1.79 ± 0.27	2.71 ± 0.24
Ancho (cm)	0.91 ± 0.10	1.35 ± 0.19
Grosor (cm)	0.70 ± 0.08	0.86 ± 0.10

* Promedio de 30 semillas

4.2 OBTENCIÓN DEL ACEITE

Comparando los resultados del rendimiento de la extracción del aceite de la almendra y cáscara de semillas de *Annona purpurea*, que se muestran en la Tabla 13, se pudo observar que la almendra presenta mayor cantidad de aceite ≈33%, siendo 42 veces mayor en comparación con el contenido de aceite de la cáscara que oscila en un ≈0.75%. Por lo que no es muy recomendable extraer el aceite de la cáscara de *A. purpurea* por el bajo rendimiento que presenta.

Tabla 13. Rendimiento de la extracción de aceite de la semilla de *A. purpurea*

Tratamiento	ALMENDRA		CÁSCARA	
	Soxhlet*	Maceración	Soxhlet*	Maceración
Muestra (g)**	50	1500	50	982
Aceite (g)	16.44±0.33	449.7	0.38±0.02	3.54
Rendimiento (%)	32.87±0.67	29.97	0.76±0.03	0.36

* A partir de la extracción por triplicado de aceite. ** Cantidad de materia prima (almendra o cáscara) para hacer la extracción del aceite.

Al realizar la extracción del aceite de la semilla de *A. purpurea* (almendra y cáscara) mediante dos métodos se comprobó que con respecto al rendimiento y el tiempo empleado, es más eficiente realizarlo por el método de extracción por soxhlet debido a que se obtuvo un mayor rendimiento y es más rápido (18 horas) por ser un método extractivo semicontinuo, como el disolvente está en

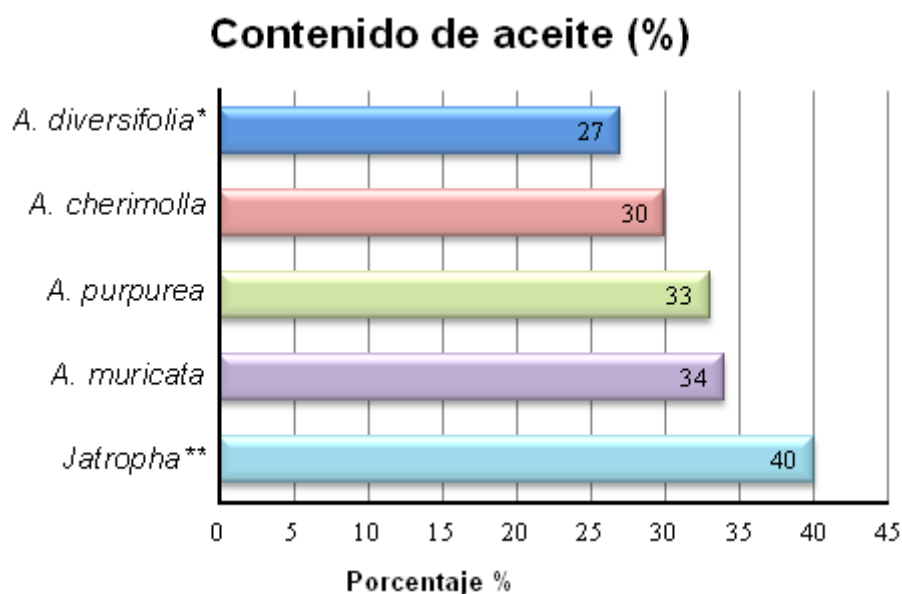
ebullición y rodea a la muestra cuando se condensa, está el disolvente cierto tiempo a una temperatura mucho mayor a la del ambiente hasta que alcanza cierto nivel, y por medio del sifón se regresa al matraz de ebullición arrastrando el aceite de la muestra (Canosa, 2008), por lo que la extracción es más eficiente, a diferencia de la maceración, pero se debe tomar en cuenta que este método necesita la aplicación de calor, por lo que implica un gasto extra y con el equipo que se trabajó sólo se pueden procesar muestras pequeñas.

La maceración es un método de extracción estático y el disolvente esta a temperatura ambiente por lo que este no alcanza extraer todo el aceite, aunque aquí también depende del tamaño de partícula, entre menor sea está, más eficiente será la extracción por la superficie de contacto que es mayor. Pero debido a que en el momento de filtrar, el tamaño de partícula ocasionaría problemas, este fue de un tamaño pequeño, sin llegar a ser polvo, para facilitar el filtrado. Otro inconveniente de este método es que tarda más tiempo (una semana aproximadamente), pero aquí se pueden manejar masas grandes de materia prima. La diferencia entre estos dos métodos de extracción fue de 3% en la almendra. En el caso de la extracción del aceite en la cáscara, se puede observar que la diferencia entre maceración y soxhlet es muy significativa. Debido a que el tamaño de partícula de la cáscara no fue muy pequeño por la dureza que presentó al molerla, al estar el disolvente a temperatura ambiente no pudo extraer el aceite con eficiencia con el método de maceración, por eso se ve esa gran diferencia.

En la gráfica 4 se muestra la comparación del contenido de aceite de la almendra de diferentes anonáceas (Marroquín-Andrade et al, 2011; Juárez, 2012) y el de *Jatropha*. Se puede observar que el porcentaje de aceite de *A. purpurea* es bastante bueno, sin embargo estos son muy similares entre sí (alrededor del 30%). Los datos mostrados de las anonas en la tabla son los resultados obtenidos en el laboratorio respecto a otros proyectos realizados de la misma forma, estos representan un buen porcentaje de aceite que no es aprovechado por la industria. Se puede apreciar que la *Jatropha* es la que presenta mayor porcentaje de aceite, por lo cual está siendo utilizado para la

producción de biodiesel, por lo que se puede destinar a las anonas a este fin, para aprovechar la cantidad de aceite que contienen.

En una investigación desarrollada por Costa *et al.*, (2010), se señala que el contenido de *Annona cherimolla* ronda los 25.1 y 22.4% obtenido por maceración a temperatura ambiente y con disolvente a ebullición respectivamente, utilizando hexano, por lo que los resultados obtenidos en nuestra investigación son semejantes. Se demostró que se obtiene una extracción eficiente utilizando hexano, siendo éste más barato y menos tóxico que el éter de petróleo que también suele utilizarse para la extracción de grasas y aceites.



*Rendimiento reportado Marroquín-Andrade et al (2011). **Rendimiento reportado Karmakar, et al (2010).

Gráfica 4. Contenido de aceite de semillas de diferente materia prima.

4.2.1 Pruebas de calidad del aceite

Para poder llevar a cabo la transformación del aceite a biodiesel, es necesario primero contar con parámetros que nos indiquen en que intervalo de acidez se encuentra el aceite obtenido. Esto es fundamental para conocer si la reacción de transesterificación en medio básico se puede llevar a cabo sin la necesidad de realizar un paso adicional (esterificación). Uno de los parámetros más importantes es el porcentaje de ácidos grasos libres. En los aceites comestibles se permiten 0.05 % máximo, con excepción del aceite crudo de palma y el de la *Jatropha* que es mayor (5 y 8 % respectivamente), por lo que en su proceso para la transformación a biodiesel, requiere un tratamiento para la disminución de estos ácidos. El porcentaje de ácidos grasos mayor al 3% puede llevar a la saponificación del aceite en medio básico si no se realiza un tratamiento previo. Y esto conllevaría a aumentar el precio de producción. Para la reacción de transesterificación se requiere un aceite con gran cantidad de triglicéridos de ácidos grasos insaturados y bajo contenido en ácidos grasos libres, ya que estos provocarían la formación de jabones durante la reacción en porcentajes mayores al 3%.

En el aceite de la almendra de *A. purpurea*, el intervalo de acidez está entre 1.19-1.14%, es mayor a los del aceite comercial, pero entra en el parámetro (<3%) para llevar a cabo la reacción de transesterificación sin ningún problema. En el caso del aceite obtenido de la cáscara, el valor está fuera del límite (mayor al 9%), por lo cual requeriría de un tratamiento previo para reducir el índice de acidez y poder llevar a cabo la reacción en medio básico para la transformación a biodiesel sin que se produzca jabón por el índice tan alto de ácidos grasos libres. Pero como se observó en la tabla 13, el rendimiento no es bueno como para utilizarlo para la producción de biodiesel.

La determinación del índice de yodo indica la presencia de insaturaciones de los ácidos grasos. Si el índice de yodo es alto significa que hay mayor cantidad de ácidos grasos insaturados. Y si es menor, hay mayor cantidad de ácidos grasos saturados y estos tienen un punto de fusión mayor, por lo cual se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente. Lo que indica que no es

bueno en un biodiesel, debido a que este se puede solidificar en un clima templado. Otra información que nos aporta el índice de yodo, es que tan susceptible es el aceite a la oxidación, al presentar mayor porcentaje de insaturaciones está más expuesto a la oxidación. En el aceite de la semilla de *A. purpurea*, los intervalos de índice de yodo se encuentran de 73-100 (tabla 14), lo cual indica mayor contenido en ácidos grasos insaturados, se encuentra cercano a los parámetros de los aceites comerciales que están alrededor de 100 g I₂/ 100 g de muestra. Debemos recordar que este no puede ser demasiado alto debido a que se oxidaría muy rápido por tantos dobles o triples enlaces.

En tanto que la densidad se asocia con la energía térmica, entre mayor sea la densidad, mayor será la energía (Atabani *et al.*, 2012). Los intervalos de densidad de los aceites comestibles abarcan de 0.81 a 0.92 y son muy similares, por lo que la energía térmica en teoría debería de ser análoga. En el caso del aceite de *Annona purpurea* la densidad obtenida utilizando un picnómetro, esta alrededor de 0.90 a 0.92 semejante a los aceites comestibles. Por otro lado, se pudo obtener la densidad del aceite a 40°C, la viscosidad cinemática y dinámica, utilizando un viscosímetro digital, corroborándose el dato de la densidad con el método anterior. Estas son algunas pruebas que también se realizan al biodiesel para poderlo caracterizar. La densidad es ligeramente menor a 40°C, debido a que la viscosidad disminuye al aumentar la temperatura.

Con respecto a la entalpía de combustión (ΔH) indica la energía liberada al quemar 1 gramo de muestra y mientras mayor sea esta, es mucho mejor porque va a dar un alto rendimiento energético en las maquinarias empleadas cuando se transforme a biodiesel. Se puede observar que el ΔH del aceite esta alrededor de 39 kJ/g lo cual es más cercano a la entalpía de combustión del diésel petroquímico (42 kJ/g).

Tabla 14. Resultados de las pruebas de calidad del aceite de la semilla de *Annona purpurea*.

Tratamiento	ALMENDRA		CÁSCARA	
	Soxhlet	Maceración	Soxhlet	Maceración
Densidad ** relativa 20°C	0.92±0.01	0.90±0.01	---	---
Índice de Acidez (g KOH/g)	1.43±0.34	1.19±0.02	9.40±0.02	---
Índice de Yodo (g I ₂ /100 g)	87.68±1.17	89.25±1.05	73.55±0.20	100.39*
Entalpía de combustión (kJ/g aceite)	39.38±0.26	39.76±0.11	---	---
Viscosidad dinámica a 40 °C (mPa.s)	24.79	24.18	---	---
Viscosidad cinemática a 40 °C (mm ² /s)	27.71	27.20	---	---
Densidad (g/cm ²) 40°C	0.89	0.89	---	---

--- No se realizó la determinación por la cantidad de muestra obtenida.

* Solo se realizó una determinación debido a la cantidad de muestra.

** Determinación por MGA a 20° C (FEUM, 2008).

Los resultados de viscosidad (dinámica y cinemática) y densidad a 40 °C del aceite de almendra de *A. purpurea*, se realizaron 5 meses después de haber hecho la extracción del aceite, 5 meses después de haber hecho esta determinación, se repitió para la muestra de maceración (10 meses después de la extracción de aceite), observándose un aumento considerable de estos parámetros, de casi una unidad en el caso de viscosidad, esto se aprecia en la gráfica 5. Lo que nos indica la formación de compuestos de las reacciones de oxidación y polimerización en este lapso de tiempo. En cuanto a la densidad, el

cambio no fue muy notorio, en ese lapso de tiempo (5 meses) solo aumento 2 milésimas.

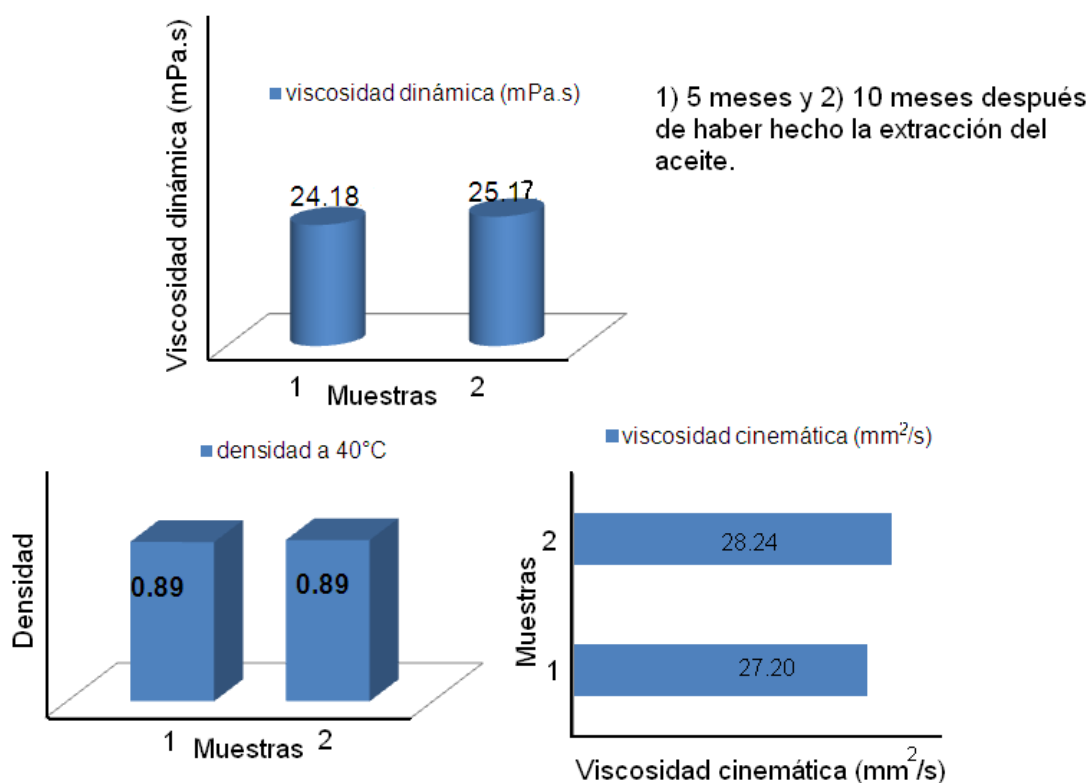
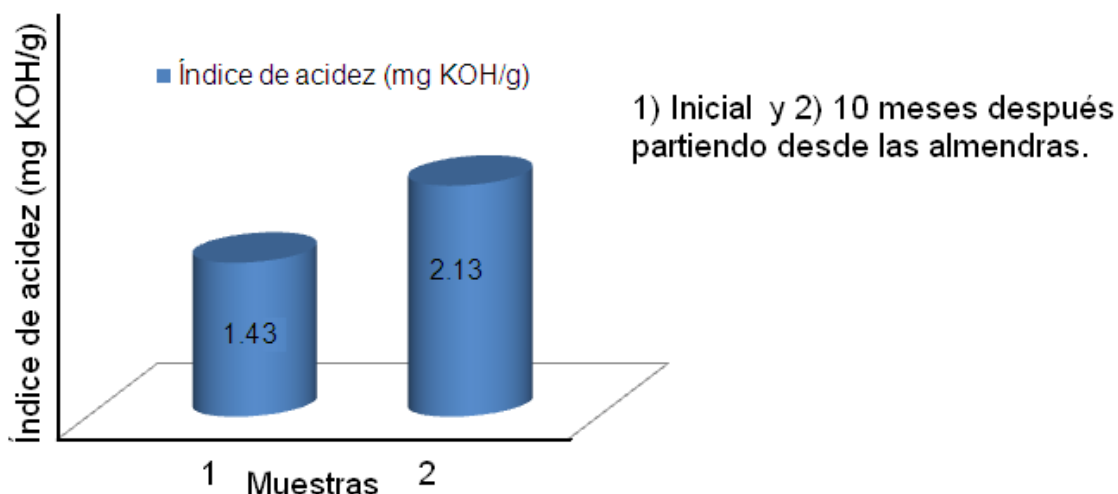


Gráfico 5. Comparación de los parámetros del aceite de *A. purpurea* obtenido por maceración tiempo después.

Con respecto al índice de acidez del aceite de almendra de *A. purpurea* obtenida por el método de soxhlet se comparó el dato con el de una muestra de semillas almacenadas por 10 meses. Después de haber realizado esta determinación, para conocer el cambio que se dio durante este periodo y ver si las condiciones de almacenamiento (semillas guardadas en bolsa de plástico cerrada en un cuarto a temperatura ambiente) afectaron a las semillas. Como se aprecia en la gráfica 6, el índice de acidez aumentó un 49% en un periodo de 10 meses, esto se debe a las reacciones de oxidación y a la humedad presente en la muestra que pudieron hidrolizar a los triglicéridos y liberar una mayor cantidad de ácidos grasos.



Gráfica 6. Comparación del índice de acidez del aceite de *A. purpurea* diez meses después.

4.3 OBTENCIÓN DEL BIODIESEL

El biodiesel procedente de semillas de *A. purpurea*, se obtuvo por la reacción de transesterificación en medio básico al aceite obtenido de Soxhlet y maceración de la almendra, no se empleó el aceite de la cáscara de los dos métodos debido al bajo rendimiento obtenido. Y porque estos hubieran necesitado un proceso adicional, debido al alto índice de acidez que presenta. Para comprobar que la reacción de transesterificación se terminó, se monitoreó por medio de cromatoplasmas (Figura 15), esta finalizó a la hora y media de reacción en las condiciones establecidas (reflujo con agitación constante), en la cromatoplasma se observó que ya no había rastro del aceite, habiendo una separación del biodiesel. El eluyente empleado para las cromatoplasmas fue una mezcla de hexano/ácido acético/acetato de etilo (12:0.1:1) para que la polaridad del eluyente permitiera observar claramente la separación de los compuestos (Pasto *et al.*, 2003). El rendimiento del biodiesel fue superior al 75% para el aceite de almendra de *A. purpurea* extraído por Soxhlet. Es importante mencionar que en el proceso de secado con sulfato de sodio anhidro de este biodiesel, no se hicieron lavados con disolvente para recuperar su remanente. En el caso del biodiesel obtenido por maceración si se realizaron lavados del sulfato de sodio anhidro con diclorometano, por lo tanto el rendimiento de este biodiesel fue mayor (93 %). Siendo superior el rendimiento del biodiesel de *A. purpurea* al rendimiento del biodiesel obtenido

del aceite comercial 123 (80 %) siguiendo la misma metodología y recuperando el biodiesel que quedo en el sulfato de sodio anhidro (tabla 15).

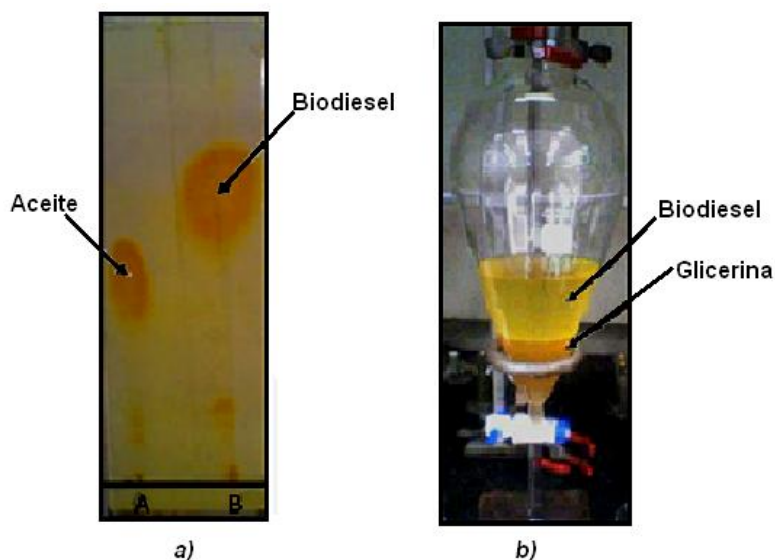


Figura 15. a) Seguimiento de la reacción de transesterificación por cromatografía de capa fina y b) Apariencia física de biodiesel y glicerina.

Tabla 15. Rendimiento del aceite de la *A. purpurea* y del aceite comercial 123 en la reacción de transesterificación.

	Aceite de la almendra <i>A. purpurea</i>		Aceite comercial 123
	SOXHLET	MACERACIÓN	
Cantidad de aceite (mL)	6	200	25
Biodiesel (mL)	4.5	186	20
Rendimiento (%)	75*	93	80

*sin recuperar el biodiesel impregnado en el sulfato de sodio anhidro.

El rendimiento del biodiesel de *A. purpurea*, fue mayor al de las otras anonas (Tabla 16.) con las que se han trabajado. En estudios previos (Oguzhan, 2012), se han reportado valores superiores al 90% de rendimiento con aceite de canola. Por lo que hay una buena viabilidad con esta anonácea en cuanto al rendimiento que se puede obtener. Pero un problema al que se enfrenta esta investigación, es la producción de este fruto. Debido a que no es comúnmente

cosechado, y generalmente se puede encontrar de manera silvestre. Por lo que es necesario promover el consumo de este fruto, no solo a nivel local, sino nacional. Para aprovechar la parte comestible del fruto y utilizar las semillas para la extracción de aceite para realizar la transformación a biodiesel.

Tabla 16. Comparación del biodiesel de otras anonas estudiadas en el laboratorio.

Biodiesel	Rendimiento %
<i>Annona purpurea</i>	75*-93
<i>Annona cherimolla</i> **	82-84%
<i>Annona muricata</i> ***	72.50

*Resultado obtenido sin realizar la extracción del biodiesel que quedo en el Na₂SO₄. **Datos no publicados. *** Datos obtenidos de Juárez (2012).

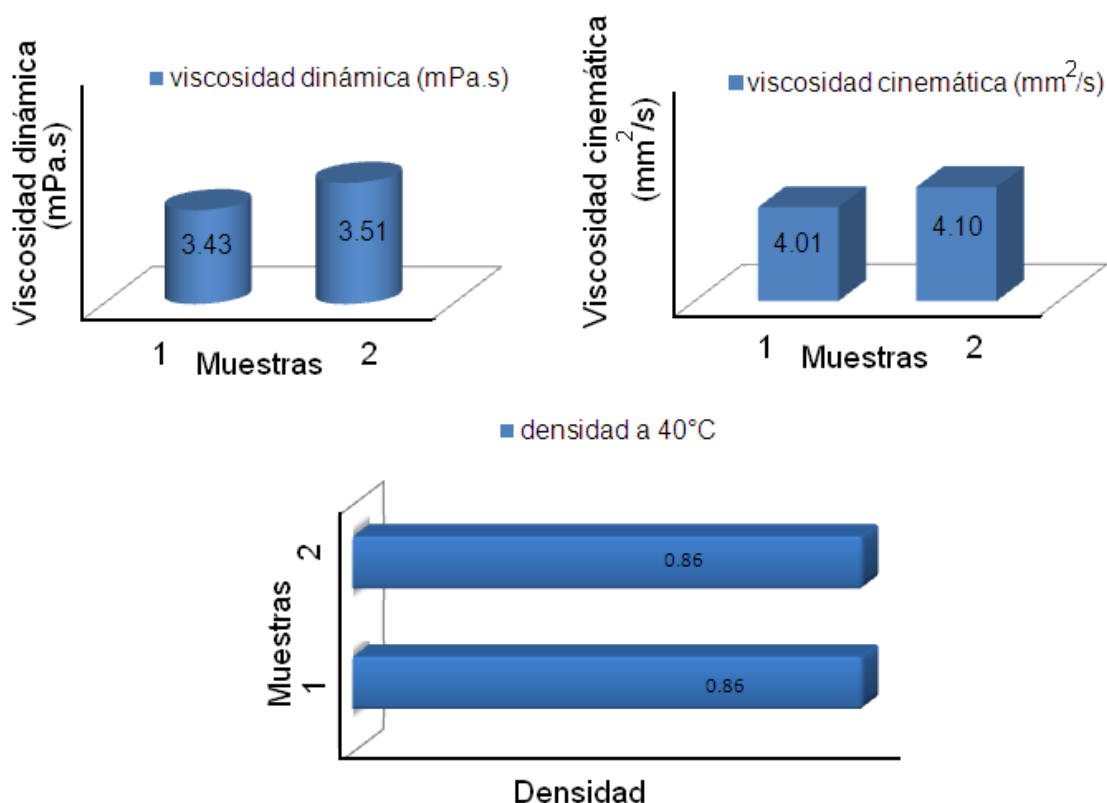
4.3.1 Pruebas de calidad del biodiesel

Al biodiesel obtenido de aceite de la almendra de *A. purpurea* y al aceite 123, se le realizaron las mismas pruebas de calidad a las cuales se sometió el aceite, para tener un panorama general de las características del biocombustible. Los resultados de las pruebas de calidad se muestran en la Tabla 17 y 18 para el biodiesel de *A. purpurea* y el biodiesel del aceite 123 respectivamente. Se puede observar una disminución de la densidad del biodiesel comparado con el aceite de la anona (tabla 14), esta se debe a la ausencia del glicerol, al realizar la reacción de transesterificación ocurre este cambio (disminución de la densidad). El valor de índice de yodo se mantiene en el mismo intervalo que el aceite, aunque presenta una ligera disminución después de la reacción, esto se puede deber al proceso de oxidación. Podemos observar con más detalle en la tabla los parámetros determinados del aceite y biodiesel 123 (tabla 18). En tanto que la entalpía de combustión tuvo un ligero aumento debido a la energía de las nuevas estructuras (ésteres de metilo).

Tabla 17. Resultados de las pruebas de calidad realizadas al biodiesel obtenido a través de la extracción del aceite de la almendra de *A. purpurea*.

Pruebas	MACERACIÓN	SOXHLET
Densidad relativa 20°C	0.87± 0.0006	---
Índice de acidez (mg de KOH/g de muestra)	0.47±0.0012	---
Índice de yodo (g I ₂ /100g de muestra)	82.93±1.30	84.59±0.78
Entalpía de combustión (kJ/ g de muestra)	39.75±0.10	39.82±0.35
Viscosidad dinámica a 40°C (mPa.s)	3.43	3.70
Viscosidad cinemática a °C (mm ² /s)	4.01	4.35
Densidad (g/cm ²) 40°C	0.86	0.86

--- no se realizaron las determinaciones debido a la baja cantidad de muestra obtenida.



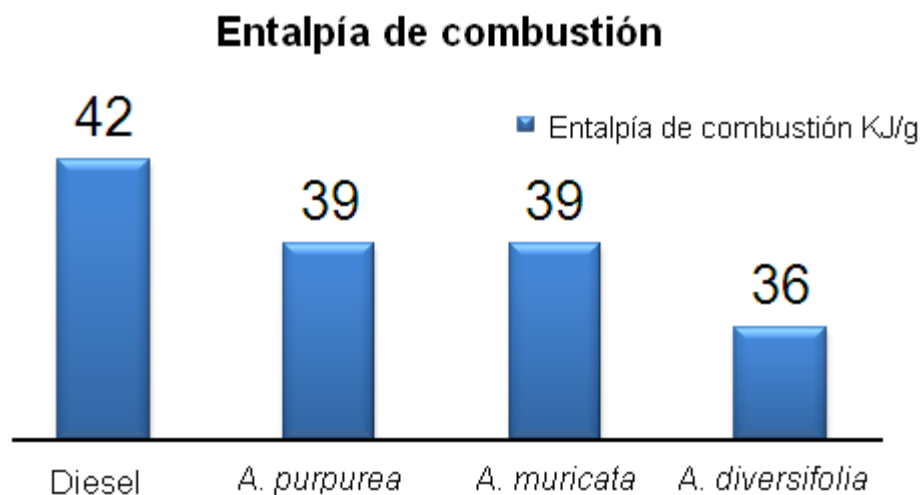
Gráfica 7. Comparación del biodiesel obtenido de la maceración de la almendra de *A. purpurea* 1) 5 meses y 2) 10 meses después de haber hecho la extracción del aceite.

En el caso del biodiesel obtenido por maceración también se realizó nuevamente las determinaciones de viscosidad y densidad a 40°C, se puede ver en este caso (gráfica 7), que el aumento no es tan marcado como en el caso del aceite, por lo que el biodiesel una vez transformado se vuelve un poco más estable que el aceite.

Tabla 18. Parámetros determinados del aceite comercial 123 y su biodiesel.

Parámetros	Aceite 123	Biodiesel
Índice de acidez (g KOH/g de muestra)	0.49±0.10	0.49±0.02
Índice de yodo (g I ₂ /100 g de muestra)	122.56±0.50	113.23±0.17
Entalpía de combustión (kJ/g de muestra)	39.90±0.05	39.99±0.18
Viscosidad dinámica (mPa.s)	69.72	3.87
Viscosidad cinemática (mm ² /s)	76.09	4.47
Densidad (g/cm ³) 40°C	0.92	0.86

Con respecto a la entalpía de combustión del biodiesel, se observa que el obtenido de *A. purpurea* presenta mayor entalpía de combustión (gráfica 8) con respecto a las otras anonáceas que se han investigado en el laboratorio, pareciéndose más a la entalpía generado del diesel de origen petroquímico. Por lo que representa un mayor rendimiento energético y con la consecuente generación de menor cantidad de humo liberado durante la combustión. Ya que se busca que este sea más parecido a la entalpía de combustión generada por el combustible fósil o superior para obtener un mayor rendimiento energético.



Gráfica 8. Comparación de la entalpía de combustión del biodiesel de las anonas y el diesel petroquímico.

En México no existe una norma que regule las especificaciones del biodiesel. Sin embargo se puede tomar como referencia la Norma europea EN14214 o la Internacional ASTM, para los parámetros determinados en este proyecto. La EN14214 establece que la densidad esta en el intervalo de $860-900 \text{ kg/m}^3$ (15° C), lo cual en este caso no se puede comparar, debido a que en este proyecto se manejo un picnómetro calibrado a 20° C , por lo que se requeriría realizar la determinación de densidad con un picnómetro calibrado a 15° C para poder hacer la comparación.

El valor del índice de acidez máximo permitido es de 0.5 mg KOH/g muestra, el biodiesel de la *A. purpurea* entra en el intervalo de acidez (0.4693 ± 0.0012). El índice de yodo indica la norma, que es de máximo de $120 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$ muestra, el cual también está en el intervalo del valor del biodiesel obtenido de *A. purpurea*, con un valor inferior ($82-84 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$ muestra), un valor mayor de índice de yodo se refiere a una mayor proporción de dobles enlaces que supone una mayor tendencia a la oxidación, por lo que es importante no exceder este valor establecido.

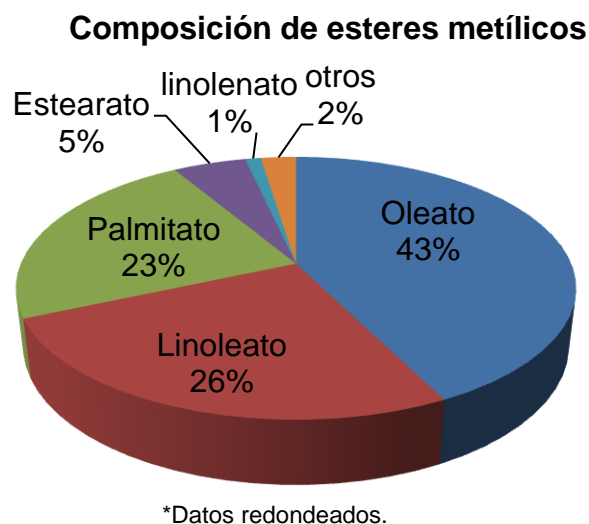
La norma EN14214 establece que los datos de viscosidad tienen que estar entre $3.5-5 \text{ mm}^2/\text{s}$, por lo cual también entra en este parámetro el biodiesel de *A. purpurea* con $4.013 \text{ mm}^2/\text{s}$ de viscosidad cinemática. Esta norma cuenta con

otros parámetros importantes, como el índice de cetano, entre otros que se tendrían que realizar para poder caracterizar el biodiesel obtenido. La alta viscosidad conduce a una mayor resistencia en la bomba de inyección, provocando presión y temperatura altas, lo que ocasiona un aumento de las emisiones de NO_x. Esta es una de las desventajas que presenta el biodiesel con respecto a la contaminación ambiental. Este es uno de los parámetros más importantes ya que afecta el funcionamiento de los equipos por la resistencia que pone al flujo.

Aun cuando no se determinó el índice de cetano, es frecuente asociarlo con la viscosidad y la entalpía de combustión del diesel y biodiesel (Ajiwe y Obika, 2000). El índice de cetano es un parámetro que proporciona una medida de la calidad de la combustión durante la ignición. Por lo general, el índice de cetano en el biodiesel es superior al diesel de petróleo, un mayor índice tiene como efecto una disminución en las partículas de escape del motor. Está asociado con ésteres de metilo de ácidos grasos saturados de cadena larga como el ácido palmítico (C16: 0) y el ácido esteárico (C18: 0) y el índice se ve disminuido por las insaturaciones. Un biodiesel con un índice alto de cetano, es mejor para el arranque en frío del motor ya que permite un calentamiento rápido de este, reduce el ruido y las emisiones de los gases en la atmósfera (Costa, et al. 2010). El contenido de oxígeno es mayor en el biodiesel y tiene como consecuencia la disminución de la entalpía de combustión. Y esta disminución también es debido a las insaturaciones (menos átomos de hidrógeno). Por lo que se necesita mayor cantidad de biodiesel para generar el calor equivalente al de diesel de petróleo. En el caso del biodiesel de *A. purpurea*, su entalpía de combustión es la más cercana de las anonáceas a la entalpía generada del diesel de petróleo.

Uno de los principales problemas asociado con el uso de biodiesel, es su flujo a bajas temperaturas, ya que presenta solidificación y con esto obstrucción de las tuberías de combustible y filtros, lo que ocasiona problemas durante el arranque. Por lo que se necesita que el biodiesel tenga mayor cantidad de ácidos grasos insaturados. Al biodiesel que fue obtenido del aceite por maceración de la almendra de *A. purpurea*, fue analizado en un equipo de

cromatografía de gases para conocer su composición de ácidos grasos. Los resultados obtenidos en el cromatograma 1 (ver anexo) se representan en la gráfica 9, mostrando el área correspondiente a cada éster de metilo separado.



Gráfica 9. Composición porcentual de ésteres metílicos de ácidos grasos del biodiesel de *A. purpurea**

La norma europea EN 14214 (Kiss *et al*, 2008) establece que el biodiesel debe contener un mínimo de 96.5% de ésteres, en el caso del biodiesel obtenido del aceite de *A. purpurea*, se observa que se encuentra dentro del parámetro con 97.57% de ésteres. El biodiesel de *A. purpurea* contiene 1.08% de éster metílico de ácido linolénico, lo cual está de acuerdo con la norma mencionada (menor al 12%). Se puede apreciar en la gráfica 9 que el éster metílico de mayor proporción es el oleato de metilo, esto mismo se ha encontrado en otras anonáceas estudiadas (tabla 19). En esa tabla también es posible observar que en las anonáceas estudiadas incluyendo la *A. purpurea* el segundo ácido más predominante es el linoleato de metilo. Esta última contiene un mayor porcentaje de palmitato de metilo y menor de estearato de metilo al igual que *A. muricata* (5%). En el caso de *A. squamosa* es muy particular considerando las proporciones de sus ácidos grasos siendo muy diferentes a las proporciones de los ácidos grasos de las otras anonáceas.

Tabla 19. Composición porcentual de los ácidos grasos de varias especies anonáceas y el obtenido de *A. purpurea*.

Ácidos grasos	<i>muricata</i>*	<i>cherimola</i>*	<i>squamosa</i>*	<i>purpurea</i>
Oleato de metilo	44%	43%	37%	42.59%
Linoleato de metilo	30%	35%	10.9%	25.83%
Palmitato de metilo	19%	12%	0%	23.03%
Estearato de metilo	5%	8%	9.3%	5.05%
Linolenato de metilo	0.00%	1%	0%	1.08%
Palmitoleato de metilo	2%	0%	0%	--
Araquidato de metilo	0%	1%	3.3%	--
Isoricinoleato de metilo	0%	0%	9.8%	--

* (Ocampo *et al.*, 2007)

Los aceites utilizados comúnmente para la producción de biodiesel tienen un porcentaje alto de ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico), superior al 75%, mientras que en la *A. purpurea* presenta el 68%. El porcentaje correspondiente a los ácidos grasos saturados en los aceites comestibles es menor al 15%, mientras que en la *A. purpurea* se encuentra alrededor del 28%.

La mayor composición del aceite de *A. purpurea* en su contenido de ácidos grasos insaturados puede ayudar a la fluidez del biodiesel en climas templados por el porcentaje de ácidos grasos insaturados, ya que se ha llegado a la conclusión que una composición óptima de biodiesel es aquella que tenga niveles bajos de ácidos grasos saturados que ayuden a minimizar los problemas de flujo en frío, bajos niveles de ácidos grasos poli insaturados para ayudar a la estabilidad oxidativa y alto contenido de ácidos grasos mono insaturados. Siendo el ácido palmitoleico y el ácido oleico una opción que proporcionan una buena estabilidad a la oxidación y el flujo en frío (Magara *et al.*, 2012). El alto grado de insaturaciones que presenta el biodiesel del aceite de *A. purpurea*, lo hace muy susceptible a la oxidación, este es un problema que se puede solucionar con la adición de aditivos. También el contenido de insaturaciones reduce un poco la viscosidad, ayudando disminuir el desgaste del motor.

Para comprobar la eficiencia del biodiesel de *A. purpurea*, es necesario probarlo en un motor, para conocer su rendimiento y las emisiones que produce durante la combustión, con el fin de conocer si es viable utilizarlo como B100 o una mezcla con diesel. En un publicación anterior, se realizaron estudios que demostraron que la combinación de B25, B50, B75 biodiesel de aceite de soya, reducía entre el 20 y 30% las emisiones de contaminantes en comparación con el diesel de petróleo. Pero si se utilizaba el B100 del biodiesel en los motores éste emitía más del 40% de emisiones de contaminantes orgánicos que el diesel (Magara et al, 2012). Por lo que es importante definir en qué porcentaje se puede utilizar el biodiesel de *A. purpurea* en los motores diesel para que tenga un impacto positivo sobre la contaminación, ayudando a mitigar el cambio climático, mejorando la salud de las personas y ayudar con la demanda de combustibles.

4.4 ACETOGENINAS Y EXTRACTOS DE PARTICIÓN

La composición del aceite de *A. purpurea* en cuanto a los ácidos grasos, representa una característica muy buena en cuanto a la industria alimentaria, debido al alto contenido de ácido oleico y linoleico, que son muy importantes en la dieta humana, debido a las propiedades que presentan (disminución: del colesterol, enfermedades cardíacas, y el riesgo de diferentes cánceres). Pero el uso de este aceite para consumo humano se ve impedido por la presencia de acetogeninas. Otro uso que se le puede dar al aceite es en la industria cosmética, por la cantidad de ácidos grasos como el linoleico. Al realizar la extracción de las acetogeninas con metanol del bagazo resultante de la extracción de aceite de las semillas de *A. purpurea*, se partió de diferente cantidad del bagazo de la cáscara y almendra (desengrasadas). Se puede observar en la tabla 20, que la almendra es la parte de la semilla que tiene mayor porcentaje de acetogeninas ($\approx 8\%$). Lo que es importante, debido a que la almendra es la parte de la semilla que contiene más aceite. Por lo que se debe considerar para ocupar el “nuevo residuo” generado después de la extracción del aceite, para hacer el proceso de la extracción de estas, y

aprovecharlo para la industria farmacéutica o cosmética. Al obtener el extracto metanólico de la almendra y cáscara de semillas de *A. purpurea*, se pudo observar que el color del extracto no era el mismo, siendo de color rojo el extracto obtenido de la cáscara y de color amarillo el de la almendra. Lo que da indicio de que no se trata de las mismas acetogeninas o que pudieran estar presentes solo los pigmentos de la semilla.

Tabla 20. Resultados de la extracción de acetogeninas con metanol en bagazo de almendra y cáscara.

Acetogeninas	Almendra	Cáscara
Cantidad de bagazo (g)	743.0	642.0
Extracto metanólico (g)*	63.7	10.9
Porcentaje (%)	8.6	1.7

*Extracto metanólico resultante de la extracción de acetogeninas del bagazo de la almendra y cáscara sin aceite.

La determinación de acetogeninas presentes en las semillas de *Annona purpurea*, se efectuó realizando particiones a partir de la mitad del extracto metanólico. En la tabla 21 están las cantidades y el porcentaje correspondiente a cada partición. Podemos observar que los porcentajes son muy diferentes en las particiones de la cáscara y almendra. La partición de acetato de etilo de almendra es la de menor porcentaje, lo cual indica la poca solubilidad de las acetogeninas en este disolvente que es el de mayor polaridad de los tres utilizados y la partición de diclorometano es la de mayor porcentaje. En el caso de las acetogeninas de la cáscara, estas se encontraban suspendidas por lo que su mayor porcentaje se encuentra en la fase acuosa, debido a la poca solubilidad de los disolventes utilizados y la partición de diclorometano es la que presentó menor solubilidad. En cuanto a las particiones de hexano cabe destacar que el bagazo de las semillas anteriormente había sido tratado con

hexano para la extracción de aceite, por lo que se puede suponer que un porcentaje de acetogeninas solubles en hexano se encuentran en el aceite extraído. Debido a los porcentajes obtenidos de las particiones tanto de la parte de almendra como la de cáscara, se puede deducir que hay una ligera variación en cuanto a la composición de acetogeninas. Ya que la solubilidad de estas no fue la misma en los disolventes, porque se puede tratar de diferentes tipos de acetogeninas.

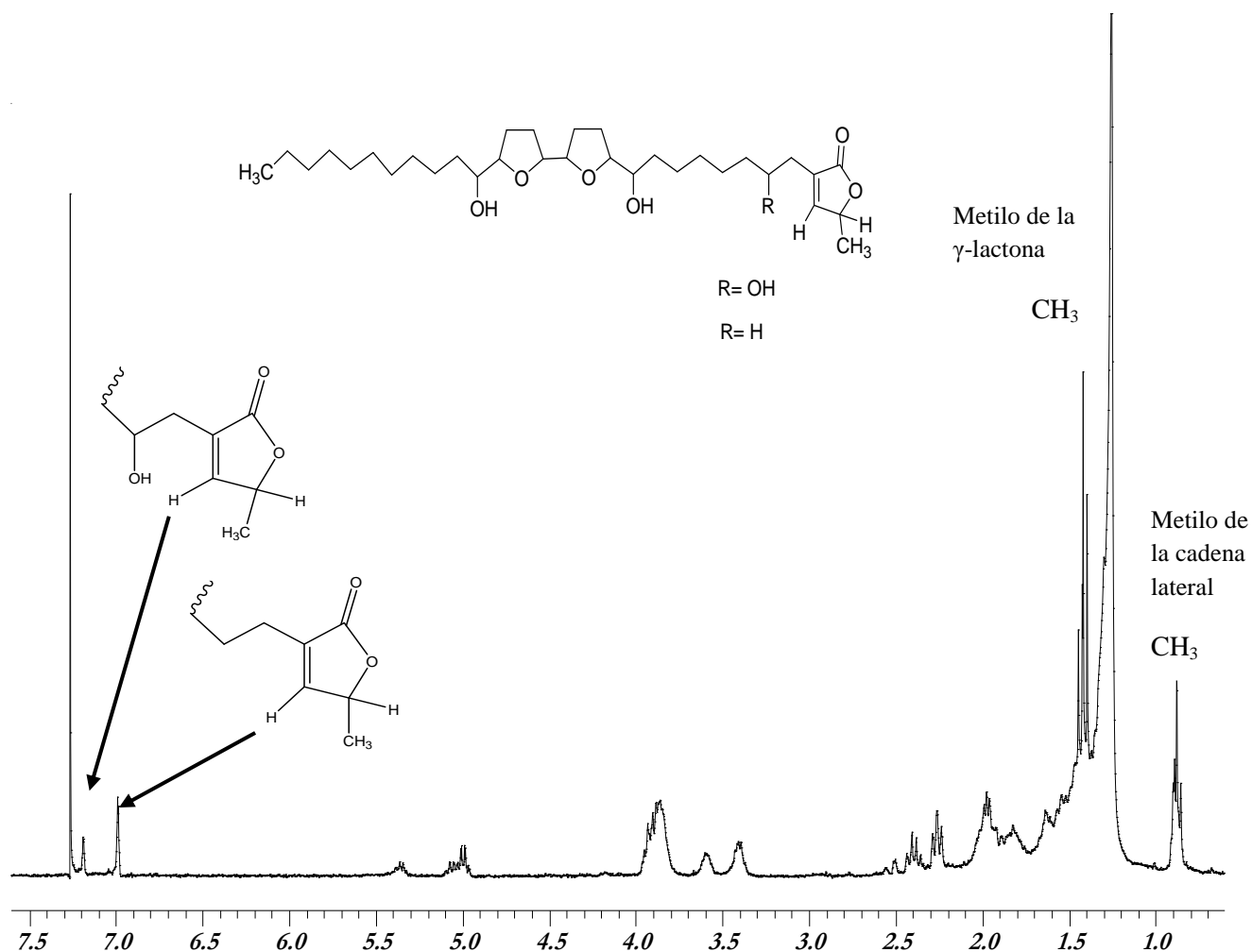
Tabla 21. Peso de los extractos de partición obtenidos del extracto metanólico de la semilla de *A. purpurea* en diferentes disolventes.

Acetogeninas	Almendra 31.83g*		Cáscara 6.45g*	
	Cantidad (g)	Porcentaje (%)	Cantidad (g)	Porcentaje (%)
Extractos de partición				
Partición hexano	1.57	4.98	0.43	6.62
Partición de diclorometano	19.03	59.77	0.20	3.09
Partición de acetato de etilo	1.09	3.41	0.26	4.11
Acuoso	7.32	22.99	3.44	53.37

*Los extractos se partieron de esa masa, que corresponde a la mitad obtenida de la extracción por metanol del bagazo correspondiente a la almendra y cáscara (sin aceite).

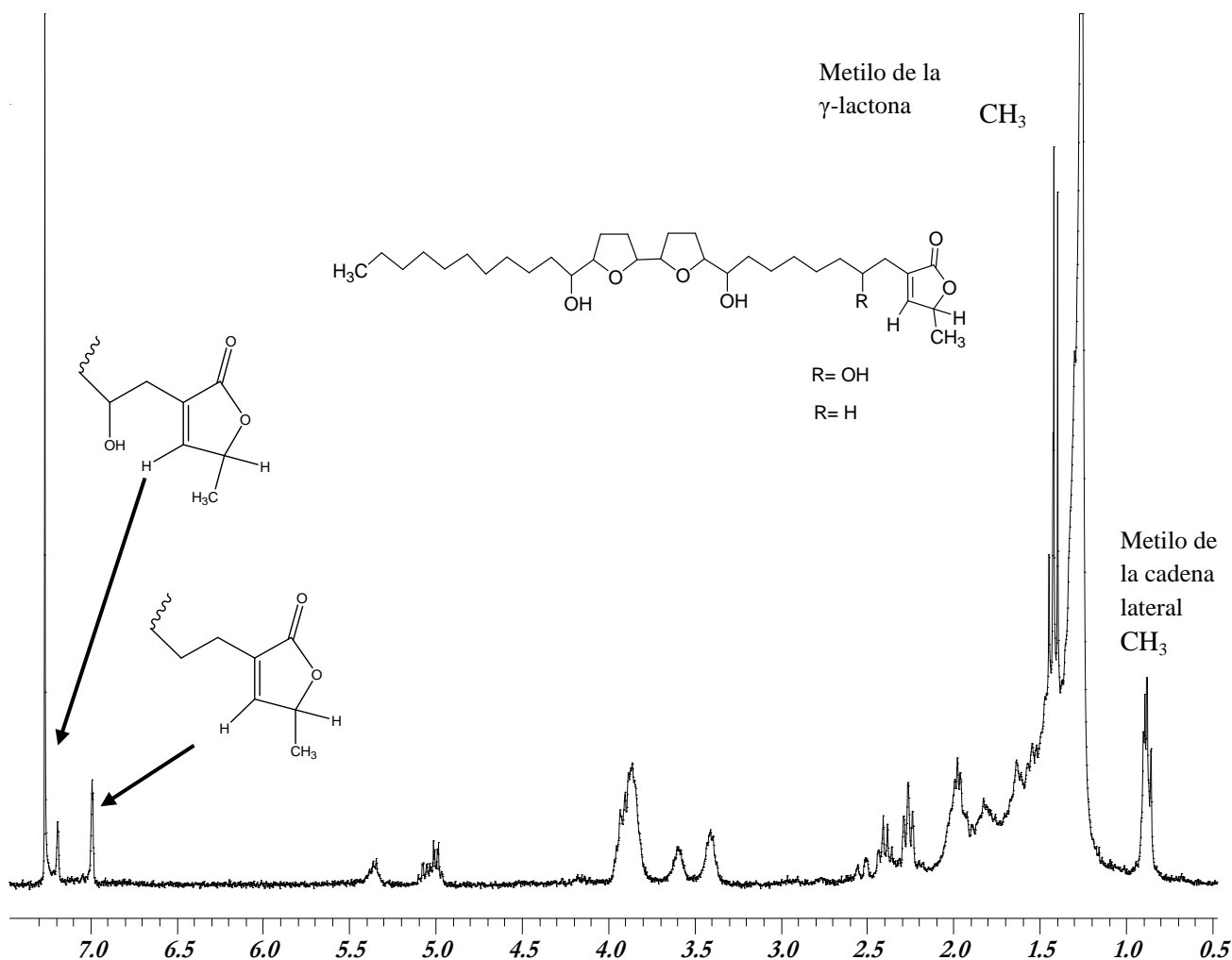
Para establecer la presencia de acetogeninas en las semillas de esta anonácea, se determinó el espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) tanto al extracto de partición de diclorometano y acetato de etilo de la almendra de *A. purpurea* (Espectros 1 y 2). A la partición de hexano no se le determinó su espectro de RMN, debido a que los resultados de las investigaciones previas (Peralta, 1998), mostraron que ésta partición no tiene

actividad biológica. Por medio de ese estudio, se compararon los espectros obtenidos con los reportados en esa investigación, y con esto se pudo observar las señales características de dos tipos principales de acetogeninas en las particiones de acetato de etilo y diclorometano, las cuales se señalan en los espectros. Por lo cual, corroboramos la existencia de acetogeninas en el bagazo de la almendra, para su posterior estudio en otra investigación para conocer la actividad biológica que presenta esta especie.



Espectro 1. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- ^1H , CDCl_3 , 300 MHz) del extracto de partición de diclorometano de las acetogeninas de la almendra de las semillas de *A. purpurea*.

*Los resultados obtenidos de la partición de diclorometano corresponden a una mezcla.



Espectro 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- ^1H , CDCl_3 , 300 MHz) del extracto de partición de acetato de etilo de las acetogeninas de la almendra de las semillas de *A. purpurea*.

*Los resultados obtenidos de la partición de acetato de etilo corresponden a una mezcla.

4.5 DETECCIÓN DE AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y CICLOPÉPTIDOS

Para conocer si hay presencia de ciclopéptidos, se procede a realizar en conjunto dos cromatoplasmas (con los extractos a analizar y con las muestras de referencia), una revelada con la solución de ninhidrina y la otra con la solución de Cl_2 /o-tolidina para descartar o aceptar la posible presencia de ciclopéptidos.

4.5.1 Síntesis de ciclopéptido

Se efectuó la síntesis de 2,5-piperazindiona, utilizando la glicina como reactivo (ver figura 14). Esto tuvo como fin tener un ciclopéptido como referencia para poderlo comparar en la prueba de Cl_2 /o-tolidina. El rendimiento que se encuentra reportado es de 45% y el obtenido fue de 3.57%, el rendimiento tan bajo se pudo deber a la pérdida del producto durante los lavados.

4.5.2 Extractos revelados con solución de ninhidrina

Debido a que la ninhidrina reacciona con el grupo amino terminal de péptidos presentes, se desarrollaron cromatoplasmas de las diferentes particiones del extracto metanólico del bagazo de la almendra de *A. purpurea* y se compararon con 5 aminoácidos y se procedió a revelar con la solución de ninhidrina de la forma que se redacta en la metodología. El extracto metanólico representa la parte total que comprende las particiones y el residuo sólido (ver diagrama 4). Para tener una clara visión de la composición del extracto metanólico del bagazo de la almendra de las semillas de *Annona purpurea*, respecto a sus péptidos y aminoácidos libres, se aplicó dicho extracto y se comparó con algunos aminoácidos conocidos (valina, metionina, glicina, fenilalanina e isoleucina) y el péptido comercial denominado aspartame (edulcorante). Al menos en este extracto se pudo observar de manera preliminar la presencia del aminoácido L-valina abundantemente respecto a otros aminoácidos detectados por el desarrollo de una coloración rosa y la posible presencia de glicina, fenilalanina, isoleucina en la figura 16 (a). Por otro lado la detección de productos de descomposición es advertida en aspartame, por la presencia de 3 manchas en las placas. La detección de ciclopeptidos será discutida más adelante.

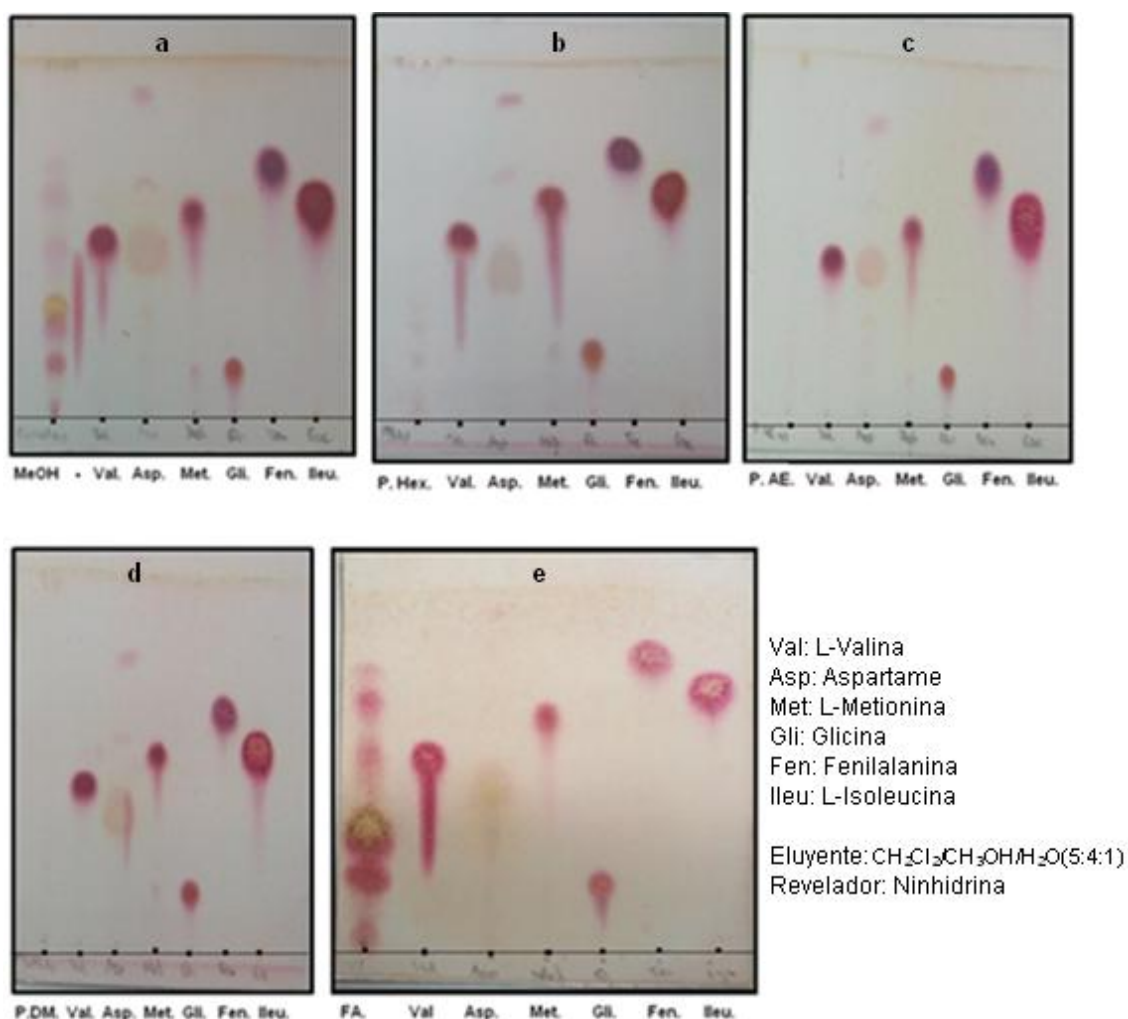
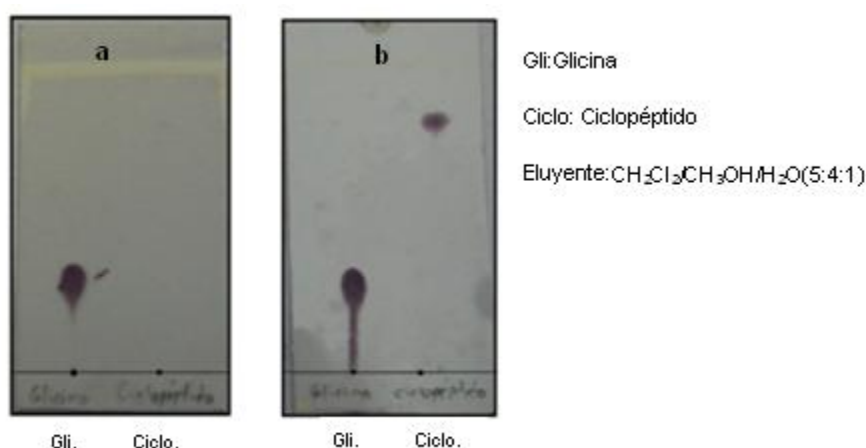


Figura 16. Aspecto de la cromatoplaqa analítica de a) Extracto metanólico (MeOH), b) Partición de hexano (P.Hex), c) Partición de acetato de etilo (P.AE) d) Partición de diclorometano (P.DM) y e) Fase acuosa (FA) del extracto metanólico del bagazo de la almendra de las semillas de *A. purpurea*, comparada con cinco aminoácidos y el péptido comercial aspartame.

En la partición de hexano (b), se puede observar la aparición de 3 manchas muy tenues rosa-moradas, una de ellas coincidió con la posición de la glicina, por lo cual se puede suponer su presencia. En esta prueba se ve la escases de aminoácidos en esta partición (por la falta de manchas) y se puede suponer que estos se encuentran en otra parte del extracto. En la cromatoplaqa correspondiente a la partición de acetato de etilo (c) y la partición de diclorometano (d), al ser reveladas sólo mostraron las manchas correspondientes a los 5 aminoácidos y del péptido, habiendo una ausencia de manchas en las particiones, por lo que se puede suponer que no hay

aminoácidos ni péptidos o que estos están en bajas concentraciones y no pueden ser detectados por este método. La cromatoplaça correspondiente al residuo sólido de la fase acuosa (e) resultante de las particiones del extracto metanólico, se puede ver la aparición de varias manchas muy marcadas, que con respecto a la posición de los aminoácidos utilizados de referencia se puede suponer que se encuentra glicina, valina, metionina y posiblemente isoleucina. Lo que demuestra que en esta parte del extracto metanólico es donde se concentran mayoritariamente los aminoácidos, péptidos y posiblemente los ciclopéptidos.

Se efectuó una prueba comparando el ciclopéptido sintetizado (2,5-piperazindiona) con la glicina. Se eluyó de la misma forma. Una placa se reveló con la solución de ninhidrina y la otra con la solución de Cl_2/o -tolidina. Se puede observar en la figura 17 (a) que corresponde a la cromatoplaça revelada con ninhidrina, que solo reveló para el aminoácido, debido a que el ciclopéptido al estar unido no tiene un grupo amino terminal, por lo cual da prueba negativa. En el caso de la figura 17 (b), que pertenece a la revelada con Cl_2/o -tolidina, dio positivo para el ciclopéptido, lo que corrobora la síntesis del ciclopéptido. Pero también reveló la glicina.



a) Revelador: Ninhidrina b) Revelador: Solución de Cl_2/o -tolidina

Figura 17. Aspecto de la cromatoplaça analítica de la glicina y del ciclopéptido sintetizado a) revelada con ninhidrina y b) revelado con Cl_2/o -tolidina.

4.5.3 Extractos revelados con solución de ninhidrina y Cl_2/o -tolidina

Se analizaron dos cromatoplasmas de las diferentes particiones del extracto metanólico del bagazo de la almendra de *A. purpurea*, se comparó con la glicina y el ciclopéptido, el eluyente empleado fue una mezcla de Diclorometano/metanol/agua (5:4:1), se reveló una con la solución de Cl_2/o -tolidina y otra con la solución de ninhidrina.

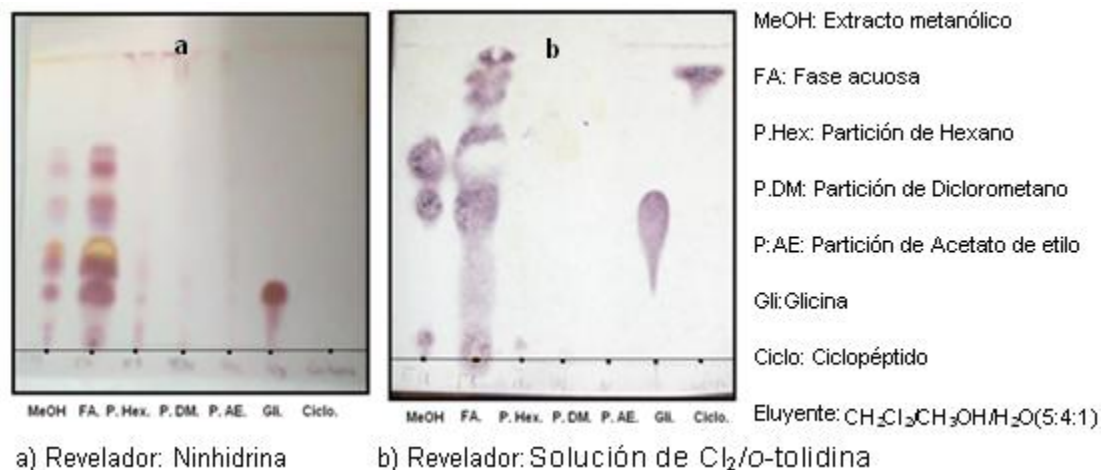


Figura 18. Aspecto de la cromatoplasma analítica del extracto metanólico del bagazo de las semillas de *A. purpurea* y sus particiones a) revelado con ninhidrina y b) revelado con solución de Cl_2/o -tolidina.

En la figura 18 (b), se muestra que dio prueba positiva para el ciclopéptido sintetizado y la presencia de manchas reveladas con solución de Cl_2/o -tolidina en donde se colocó el extracto metanólico, la fase acuosa y la glicina, pero respecto a los resultados anteriores, no todo lo que se revela puede ser un ciclopéptido, debido a que la solución de Cl_2/o -tolidina reveló la glicina y no es un ciclopéptido. En la cromatoplasma revelada con ninhidrina 18 (a), se observan diversas manchas en las aplicaciones que se hicieron, excepto la del ciclopéptido, muchas de las manchas reveladas con Cl_2/o -tolidina no aparecen en la cromatoplasma analítica revelada con solución de ninhidrina, lo cual puede indicar la posible presencia de ciclopéptidos y que estos se encuentran predominando en la fase acuosa.

Por lo que se puede llegar a especular: si en la prueba con solución de Cl_2/o -tolidina revela dando la prueba positiva (aparición de manchas azules) y en la

cromatoplaqueta revelada con ninhidrina da como resultado la ausencia de estas manchas, lo que indica prueba negativa, posiblemente se trate de un ciclo péptido. En la tabla 22 se muestra el código que se pudo lograr en este análisis para detectar la posible presencia de ciclo péptidos.

Tabla 22. Código para conocer la posible presencia o ausencia de ciclo péptidos, utilizando el método de los reveladores de ninhidrina y Cl₂/o-tolidina

Solución reveladora	Ninhidrina	Cl ₂ /o-tolidina
Resultado positivo para ciclo péptido	-	+
Resultado negativo para ciclo péptido	+	+

Para conocer si realmente se encuentran estos compuestos en el extracto metanólico, se deben de aislar para analizar y conocer su estructura, por medio de otras pruebas, como podría ser un análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de Masas (MS) y/o Infrarrojo (IR).

4.6 APROVECHAMIENTO DE LOS NUEVOS RESIDUOS

Una vez obtenido el biodiesel y de haber extraído las acetogeninas y/o ciclo péptidos, el residuo que nos queda es el del bagazo de la almendra y cáscara. En una investigación previa, se muestra el análisis proximal de la *A. diversifolia* (Marroquín-Andrade *et al.*, 2011), mostró una importante cantidad de fibra, carbohidratos y proteína (ésta solo en el caso de la almendra, ver tabla 23). Por lo que se le podría realizar un análisis proximal al bagazo de la *A. purpurea* y los estudios correspondientes para conocer su viabilidad en el desarrollo de alimentos para animales y así aprovechar este nuevo residuo, para no generar más basura de estos procesos (producción de biodiesel, extracción de acetogeninas y ciclo péptidos).

Tabla 23. Composición proximal de las semillas de *Annona diversifolia*.

Parámetros	Almendra	Cáscara
Humedad	9.61 ±0.33	7.85±0.26
Ceniza	2.18±0.17	0.86±0.14
Proteína cruda	15.40±0.17	Indetectable
Aceite	27.43±0.18	1.60±0.11
Fibra cruda	62.58±0.25	83.22±0.15
Carbohidratos	25.03±0.23	6.37±0.21

*(Marroquín-Andrade *et al.*, 2011)

4.7 ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA TRANSESTERIFICACIÓN EN MEDIO BÁSICO

Se estudió el mecanismo de la reacción de transesterificación básica empleando como modelo los monoglicérido de los principales ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico y linoleico, (figura 19) presentes en el biodiesel usando el método Semi-empírico PM3 (Kong, 2000).

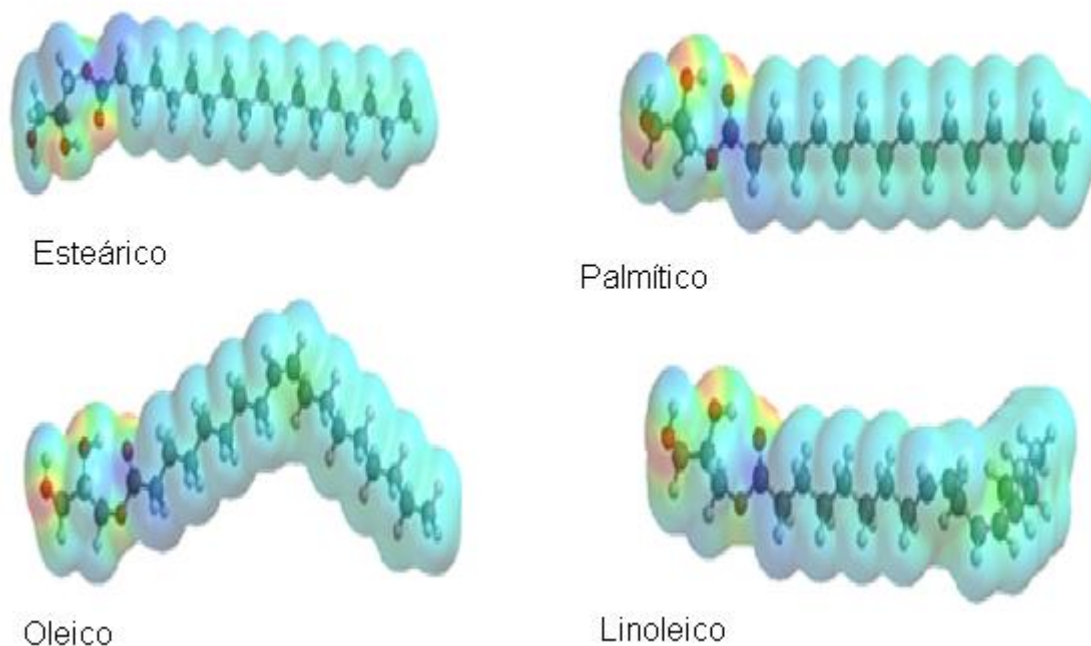
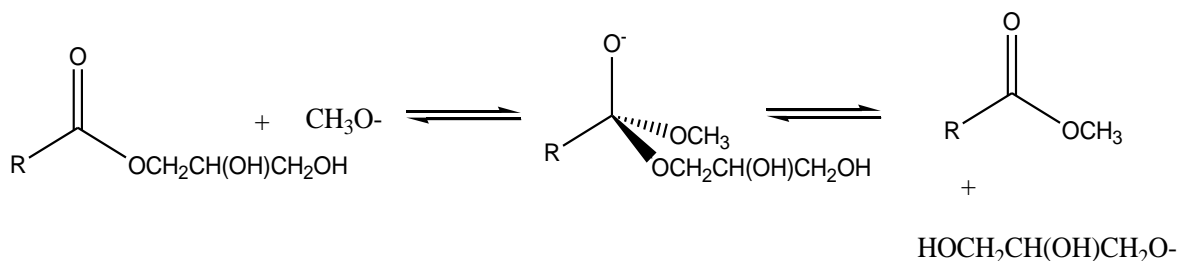


Figura 19. Mapa del potencial electrostático de los monoglicéridos correspondientes a los ácidos grasos más abundantes en el biodiesel.

En la siguiente figura, se presenta la reacción entre el anión metóxido y los monoglicéridos analizados en este trabajo.



R= -CH₃, -C₁₆H₃₃, -C₁₈H₃₇, -C₁₈H₃₅, -C₁₈H₃₃

Figura 20. Esquema de la reacción de transesterificación con metóxido.

Se optimizaron las geometrías de los puntos estacionarios en la superficie de energía potencial de esta reacción: reactivos, estado de transición de la adición del metóxido (TS1) para formar el intermediario tetraédrico y el correspondiente a su descomposición (TS2). La figura 21 muestra las geometrías optimizadas de los puntos estacionarios de la reacción de transesterificación del monoglicérido del ácido palmítico.

Como se observa en la figura 21, la reacción de transesterificación involucra grandes cambios en la distribución electrónica de los átomos, tanto en el proceso de adición para formar el intermediario tetraédrico, como en la descomposición de este último. En la figura 22 se presentan los mapas de potencial electrostático de los principales estados estacionarios de la reacción del monoglicérido del ácido palmítico con el ión metóxido. Las zonas rojas corresponden a una alta densidad electrónica, mientras que las azules indican deficiencia electrónica. En el caso de la estructura de TS1, la zona de alta densidad electrónica recae en el oxígeno del metóxido, y en menor proporción, en el oxígeno del carbonilo del éster, mientras que en el intermediario tetraédrico, la mayor densidad electrónica recae sobre el oxígeno correspondiente al fragmento del éster. Lo anterior indica la forma en que los electrones se mueven durante el proceso de la transesterificación.

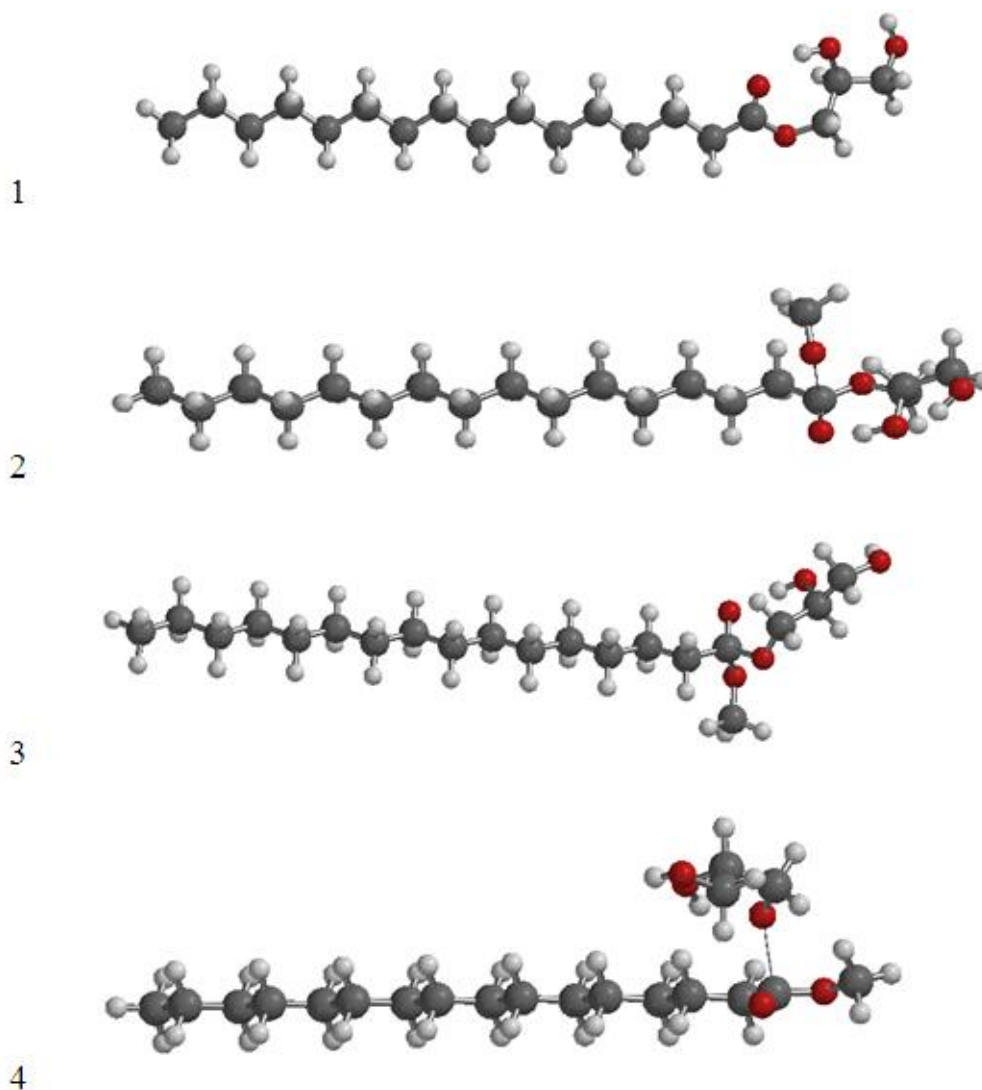


Figura 21. Geometrías optimizadas de los puntos estacionarios de la reacción de transesterificación básica con metanol para obtener palmitato de metilo: (1) monoglicérido del ácido palmítico, (2) TS1, (3) Intermediario tetraédrico, (4) TS2.

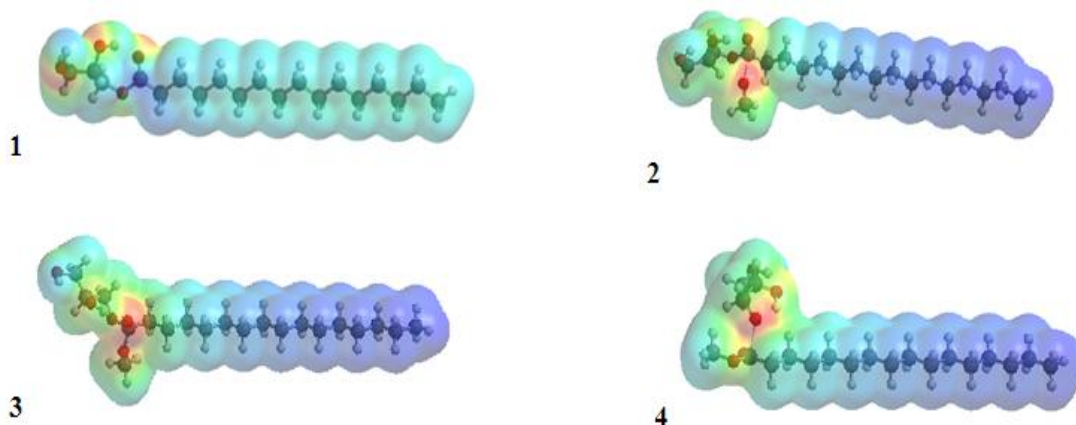


Figura 22. Mapa del potencial electrostático de los puntos estacionarios de la reacción de transesterificación básica con metanol para obtener palmitato de metilo: (1) monoglicérido del ácido palmítico, (2) TS1, (3) Intermediario tetraédrico, (4) TS2.

Es importante mencionar que, si bien los cálculos semi-empíricos realizados en esta parte del trabajo pudieron elucidar aspectos importantes del mecanismo de la transesterificación de los monoglicéridos de los principales ácidos grasos presentes en el biocombustible, queda pendiente el estudio de esta reacción en los triglicéridos correspondientes, utilizando cálculos de mayor nivel como el método que emplea la Teoría de los Funcionales de la Densidad (Becke, 1992).

CONCLUSIONES

La extracción del aceite de la semilla de *Annona purpurea* de la parte de la almendra se considera económicamente viable, por la cantidad de aceite que contiene (33%), tomando en cuenta de que estamos partiendo de un “residuo” que no es aprovechado. En cuanto a la cáscara, el aceite representa un porcentaje menor al 1% con respecto al peso, por lo cual no es factible la extracción del aceite por la baja cantidad que contiene.

El método que reflejó ser más eficiente al extraer mayor cantidad de aceite en las semillas fue el método de soxhlet, utilizando hexano como disolvente que presenta un menor costo y menor toxicidad que otros (como el éter).

El aceite obtenido tanto de la cáscara como de la almendra no es apto para consumo humano, debido a la presencia de acetogeninas. Por lo que su uso en el campo de energéticos es viable, así como en la industria farmacéutica y cosmética por la cantidad de aceites esenciales que tiene.

Las pruebas de calidad tuvieron el objetivo de caracterizar y evaluar el aceite obtenido, para comprobar que estuviera en los intervalos establecidos. Al aceite de almendra de *Annona purpurea* no es necesario realizarle un tratamiento previo lo que ayuda a no aumentar el costo de producción del biodiesel.

El rendimiento obtenido del aceite en la reacción de transesterificación en medio básico para la obtención del biodiesel, fue muy bueno, al igual que la entalpía de combustión por lo que lo podemos considerar muy eficiente comparado con las otras anonas (tabla 16 y gráfica 8 respectivamente). Reduciendo su costo al obtener mayor cantidad y ser más eficiente.

La composición de ésteres metílicos que presenta el biodiesel obtenido, indica que es estable a la oxidación como el aceite de soya y girasol. Y que este se podría utilizar en climas templados, para demostrarlo, se debe de realizar pruebas con motores, para establecer el porcentaje a sustituir del diesel de petróleo, conocer su estabilidad frente a la oxidación y probar el tipo de aditivo que mejor se ajuste para prolongar su estabilidad.

Con los parámetros evaluados de este biodiesel, no se puede tener una caracterización completa de este, por lo que se necesita realizar otras determinaciones para conocer su calidad, y tener un panorama más amplio de los beneficios energéticos y ambientales que puede traer el uso de este nuevo biocombustible en el sector de transporte.

Los desechos procedentes de las semillas de *A. purpurea*, puede emplearse para la extracción de compuestos bioactivos, como es el caso de las acetogeninas y los ciclopéptidos con los que se han trabajado en otros estudios, demostrando actividad biológica importante. Por lo que estos compuestos pueden utilizarse en el ámbito de la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos fármacos o inclusive cosméticos. Por lo que es importante que haya continuidad de estos estudios para definir con precisión la actividad específica de esta especie.

Se deben implementar medidas para que se promueva el cultivo del árbol de *Annona purpurea*, como fuente de alimento, producción de aceite para biodiesel y compuestos con actividad biológica. Y como la producción de esta es escasa no podría contribuir a solucionar la demanda que hay especialmente del sector energético.

Los cálculos semi-empíricos realizados en el presente trabajo permitieron conocer aspectos importantes del mecanismo de la transesterificación de los monoglicéridos de los principales ácidos grasos presentes en el biocombustible.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ajiwe, V. I. E.; Obika, A. E. (2000). "African Pear Seed Oil: Potential Alternative Source to Diesel Oil". *Energy and Fuels*, (14), pp. 112-116.
- Arky. (2007). Preguntas y respuestas más frecuentes sobre biocombustible. Costa Rica. IICA. Pág. 20. Disponible en: <http://books.google.com.mx/books?id=KCOY55tqoQsC&pg=PA1&dq=Preguntas+y+respuestas+m%C3%A1s+frecuentes+sobre+biocombustible.&hl=es&sa=X&ei=hNUTUYPdGNLaqQGM3oHACQ&ved=0CCsQ6AEwAA>
[Último acceso: 7 febrero 2013]
- Atabania, A. E.; Silitonga, A. S.; Badruddina, I. A.; Mahlia, T.M.I.; Masjuki, H.H.; Mekhilefd S. (2012). "A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (16), pp. 2070– 2093.
- Badui, S. D. (1999). *Química de los alimentos*. Edo de México. Pearson Educación. Pág. 256.
- Balat, M. (2011). "Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – A review of current work". *Energy Conversion and Management*, (52), pp.1479–1492.
- Battista, S. M.; Pomilio A. B. (2010) Estudios conformacionales y configuracionales de ciclolinopéptidos en muestras de semillas de *Linum usitatissimum*. XXVIII Congreso Argentino de Química y 4o. taller de Química Medicinal "Bicentenario de Mayo", Lanús, Pcia. de Buenos Aires, 13 al 16 de septiembre de 2010.
- Becke, A. D. (1992). "Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchangeonly gradient correction". *J Chem Phys*, 96 (3), pp. 2155–2160.

- Canosa, R. M. P. (2008). Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. Memoria para optar al grado de Doctora en Química. Profesores Titulares D. Isaac Rodríguez, Pereiro y Dra. Elisa María Rubí Cano, en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela. 2008, pág. 38.
- Cepleanu F.; Ohtani K.; Hamburger M.; Hostettmann k.; Gupta M. P.; Solis P. (1993). "Novel Acetogenins from the Leaves of *Annona purpurea*". *Helvetica Chimica Acta*. (76), pp. 1379–1388.
- Chávez D.; Mata R. (1998). "Purpurediolin and Purpurenin, Two New Cytotoxic Adjacent Bis-tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona purpurea*". *Journal of Natural Products*. 61(5), pp. 580-584.
- Costa, B. P.; Castilho, P. C.; Rosas, M. F.; Ferreira J. (2010). "Characterization of *annona cherimola* Mill. Seed Oil from Madeira Island: a Possible Biodiesel Freedstock". *J Am oil Chem Soc*. (87), pp. 429-436.
- Demirbas A. (2011). "Competitive liquid biofuels from biomass". *Applied Energy*, (88), pp. 17–28.
- Demirbas, F. M.; Mustafa, B.; Havva, B. (2011). "Biowastes-to-biofuels". *Energy Conversion and Management*. (52), pp. 1815–1828.
- Deng, Y. Y.; Blok, K.; van der Leun K. (2012). "Transition to a fully sustainable global energy system". *Energy Strategy Reviews*, (1), pp. 109–121.

- Díaz, R. J. (2004). *Descubre los frutos exóticos*. Madrid. Colección Agricultura. Pág. 43.
- Fang-Rong C.; Jia-Lin W.; Che-Ming T.; Yang-Chang W. (1996). "Antiplatelet Aggregation Constituents of *Annona purpurea*", *Phytomedicine*, (3), Supplement 1, 213.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2008). Volumen 1. Novena edición.
- Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. (1989) *VOGEL'S Textbook of Practical Organic Chemistry*. 5ta edición. Pearson Educación. Págs. 1179 y 1180.
- Ganduglia, F. (2009). *Manual de biocombustibles*. San José Costa Rica: IICA.
- Islas, J.; Manzini, F.; Masera, O. (2007). "A prospective study of bioenergy use in Mexico". *Energy*. (32), pp. 2306–2320.
- Juárez, R. G. H. (2012). Aprovechamiento sustentable de las semillas de guanabana (*Annona muricata*) en la obtención de biodiesel. Tesis para obtener el título de Química en Alimentos. Profesor guía: Benito Reyes Trejo. México, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, carrera de Química Alimentos. 2012, pág. 84 y 90.
- Karavalakis G.; Hilari D.; Givalou L.; Karonis D.; Stournas S. (2011). "Storage stability and ageing effect of biodiesel blends treated with different antioxidants". *Energy*, (36), pp. 369-374.
- Kargbo David M. (2010). "Biodiesel Production from Municipal Sewage Sludges". *Energy Fuels*, (24), pp. 2791–2794.

- Karmakar, A.; Karmakar, S. B.; Mukherjee, S. (2010), "Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production". *Bioresource Technology*. (101), pp. 7201–7210.
- Kelly, L. M. (2000). "Annonaceae". *Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán*. (31), pp. 1-5.
- Kiss, A. A.; Dimian, A. C.; Rothenberg, G. (2008), "Biodiesel by Catalytic Reactive Distillation Powered by Metal Oxides". *Energy & Fuels*. (22), pp. 598–604.
- Kong, J.; White, C.; Krylov, A.; Sherrill, D.; *et al.* (2000), "Q-Chem 2.0: A High-Performance Ab Initio Electronic Structure Program Package". *Journal of Computational Chemistry*. 21(16), pp. 1532–1548.
- Kumar, A.; Sharma S. (2011). "Potential non-edible oil resources as biodiesel feedstock: An Indian perspective". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (15), pp. 1791–1800.
- La Jornada. Periódico miércoles 11 de julio de 2012. Inauguran en Chiapas primera Planta Extractora de Aceite de *Jatropha curcas*. Disponible en:
<http://www.jornada.unam.mx/2012/07/11/politica/018n3pol>
[Último acceso: 16 octubre 2012]
- León, J. (1969). *Fundamentos Botánicos de Los Cultivos Tropicales*. Bogotá: IICA.
- Luna, C. L. M. (2009). Actividad de las Acetogeninas Rolliniastatina-2 y Laherradurina sobre bacterias y el complejo 1 bacteriano. Tesis para obtener el título de grado académico Doctora en Ciencias. Profesor guía: Dra. Alma Rosas Gonzales Esquinca. México, Universidad Nacional

Autónoma de México, Posgrado de Ciencias Biológicas, Instituto de Biología. 2009, pág. 17-21.

- Magara, G. K. T.; Olson, M. R.; Okuda, T.; Walz, K. A.; Schauer, J. J. (2012). "Sensitivity of Diesel Particulate Material Emissions and Composition to Blends of Petroleum Diesel and Biodiesel Fuel". *Aerosol Science and Technology*, (46), pp.1109–1118.
- Manzano, A. F.; Alcayde, A.; Montoya, F.G.; Zapata, S. A.; Gil, C. (2013). "Scientific production of renewable energies worldwide: An overview". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (18), pp. 134–143.
- Marroquín, L.; Cuevas, J.; Guerra, D.; Reyes, L.; Reyes-Chumacero, A.; Reyes-Trejo, B. (2011). "Proximate composition, mineral nutrient and fatty acids of the seed of ilama, *Annona diversifolia* Saff". *Scientific Research and Essays*, 6(14), pp. 3089-3093.
- MILIENIO. Inicia México su era como importador de turbosina. Negocios 22 octubre 2012. Disponible en:
<http://www.milenio.com/cdb/doc/noticias2011/b5717446ffbebd6243d28adfcfcc9865>
[Último acceso: 24 octubre 2012]
- Morita, H.; Takeya, K. (2010). "Bioactive Cyclic Peptides from Higher Plants". *Heterocycles*. (80), No.2, pp.739-764.
- Naik, S. N.; Goud, V. V.; Rout, P. K.; Dalai, A. K. (2010). "Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (14), pp. 578–597.
- Ocampo, S.; Betancur, J.; Ortiz, L.; Ocampo, A. C. (2007), "Estudio cromatográfico comparativo de los ácidos grasos presentes en semilla de *Annona cherimolioides* y *Annona muricata* L". *Vector*, 2, pp. 103 – 112.

- Oguzhan, I. (2012), “Reaction kinetics of dolomite catalyzed transesterification of canola oil and methanol”, *Fuel Processing Technology*, 95, pp. 62–66.
- Pasto, D. J.; Johnson, C. R. (2003). Determinación de estructuras orgánicas. Editorial Reverté. Reimpresión en España. Pág. 27.
- Patiño, R. V. (2002). Historia y dispersión de los frutales nativos del neotrópico. CIAT. Colombia. Pág. 71.
- PEMEX, petróleos mexicanos. PEMEX en cifras, Relación con Inversionistas, Abril 2012. Disponible en:
[http://www.ri.pemex.com/files/content/PEMEX Fact Sheet e 2011D1.pdf](http://www.ri.pemex.com/files/content/PEMEX_Fact_Sheet_e_2011D1.pdf)
[último acceso: 4 noviembre 2012]
- Peralta, M. J. (1998). Estudio fitoquímico biodirigido de la actividad citotóxica de *Annona diversifolia* Saff. (llama). Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Profesor guía: Benito Reyes Trejo. México, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, carrera de Química Farmacéutica Biológica, 1998, 95 pág.
- Reen-Yen K.; Fang-Rong C.; Yang-Chang W. (2002),” Chemical Constituents and Their Pharmacological Activities from Formosan Annonaceous Plants.”, *The Chinese Pharmaceutical Journal*, (54), pp. 155-173.
- Rosas, F. J. A.; Rosas, F. D.; Morillón, G. D. (2011).” Saturation, energy consumption, CO₂ emission and energy efficiency from urban and rural households appliances in Mexico”. *Energy and Buildings*, (43), pp. 10–18.

- Salazar, R.; Soihet, C. (2001). "Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina". Vol. 2. Costa Rica, CATIE. pp. 91-92.
- Sharma, Y.C; Singh, B; Upadhyay, S.N. (2008). "Advancements in development and characterization of biodiesel: A review" *Fuel* (87), pp. 2355-2373.
- SIE. Sistema de Información Energética, Secretaría de Energía Dirección General de Planeación Energética. Balance Nacional de Energía: Consumo final de energía por energético. Disponible en: <http://sie.energia.gob.mx/bdiController.do?action=cuadro&cvecua=IE7C01> [último acceso: 16 noviembre 2012]
- Singh, A.; Olsen, Stig I.; Nigam, P. S. (2011). "A viable technology to generate third-generation biofuel". *Chemical Technology and Biotechnology*, (86), pp. 1349-1353.
- Tapanes, N.; Gomes, A.; Mesquita, C.; Octavio, A.; Antunes, C. (2008). "Transesterification of Jatropha curcas oil glycerides: Theoretical and experimental studies of biodiesel reaction". *Fuel*, (87), pp. 2286-2295.
- Valdéz-Vázquez, I.; Avevedo-Benítez, J. A.; Hernández-Santiago, C. (2010). "Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (14), pp. 2147-2153.
- Villegas, C. W.; Acereto, E. P.; Vargas, Q. M. (2006). *Análisis Ultravioleta-visible. La Teoría Y la Práctica en El Ejercicio Profesional*. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Pág. 16.
- Weininger, S. J.; Stermitz, F. R. (1988). *Química orgánica*. Editorial Reverté, Barcelona. Págs. 223-225.

- Wélé, A.; Mayer, C.; Dermigny, Q.; Zhang, Y.; Blond, A.; Bodo B. (2008). "Sequence and three-dimensional structure of cycloreticulins A and B, new cyclooctapeptides from the seeds of *Annona reticulata*". *Tetrahedron*, (64) 1, pp. 154–162.

7. ANEXO

Figura 23. Cromatografía de gases de los ésteres metílicos presentes en el biodiesel de la almendra de *Annona purpurea*.

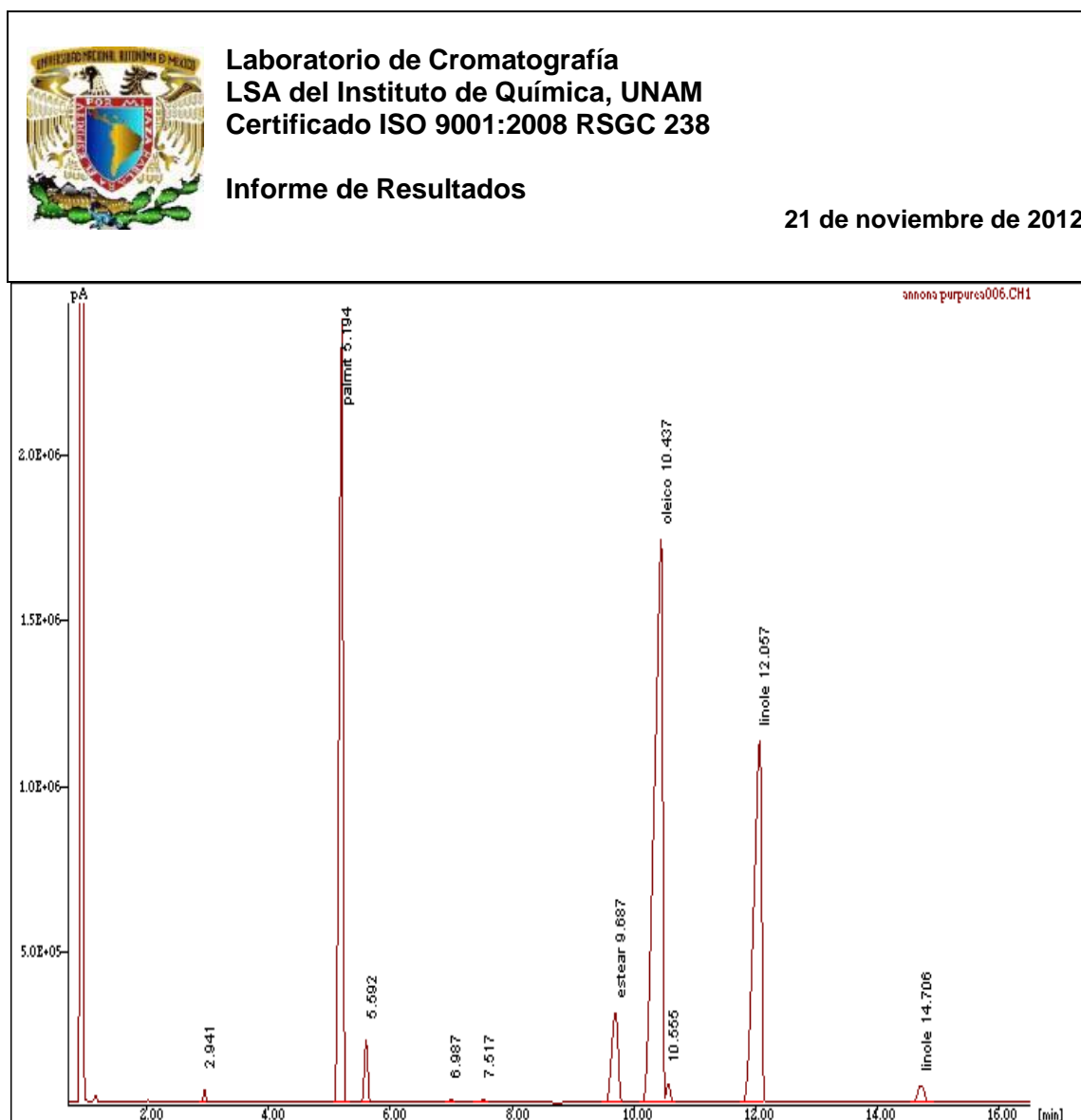


Tabla 24. Resultados de la cromatografía de gases de los esteres metílicos del biodiesel de la almendra de *A. purpurea*.

Nombre	Tiempo de retención (min)	Área (pA*s)	% Área
	2.941	48573	0.151
Palmitato	5.194	7422377	23.028
	5.592	468346	1.453
	6.987	35671	0.111
	7.517	25304	0.079
Estearato	9.687	1626296	5.046
Oleato	10.437	13727013	42.589
	10.555	205140	0.636
Linoleato	12.057	8325838	25.832
Linolenato	14.706	346766	1.076

Condiciones de operación

Operador: CARMEN MARQUEZ

Nombre del sistema: Agilent 6890

Información: 121120-ext-02

Col FAME 30m x.25 mm 0.25 um espesor de película

Horno temperatura inicial 180°C 15 min 10°/min temperatura final 230°C

Flujo hidrógeno 1.8 ml/min

Temperatura detector 275°C e inyector 250°C

Hidrógeno 40 psi split 20

Fecha de inyección: 20-Nov-2012 17:55:26

Fecha: 20-Nov-2012 18:13:18

Tiempo de adquisición: 16.52 [mins]

Método de Control: ÉSTERES FAME2

Modo de Cálculo: % Área