

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Efecto del secado por lecho fluidizado en la estructura
de semillas de *Ricinus communis* y en la extracción de su
aceite como fuente alternativa de biocombustibles”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

I.A. María de Jesús Perea Flores

TESIS DIRIGIDA POR:

Dr. José Jorge Chanona Pérez

Dr. Vicente Garibay Febles



MÉXICO, D.F.

Diciembre, 2011.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F., siendo las 16:00 horas del día 05 del mes de diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de **Alimentos** para examinar la tesis de titulada:

Efecto del secado por lecho fluidizado en la estructura de semillas de *Ricinus communis* y en la extracción de su aceite como fuente alternativa de biocombustibles.

Presentada por el alumno:

 PEREA

Apellido paterno

 FLORES

Apellido materno

 MARIA DE JESÚS

Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	1	2	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. José Jorge Chanona Pérez


Dr. Vicente Garibay Febles


Dra. Gloria Davila Cruz


Dra. Georgina Calderón Domínguez


Dr. Jorge Alberto Mendoza Pérez


Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Manuel Jesús Piñón López





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 5 del mes de Diciembre del año 2011, la que suscribe **María de Jesús Perea Flores** alumno (a) del Programa de **Doctorado en Ciencias en Alimentos** con número de registro **A080128**, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Jose Jorge Chanona Perez y Dr. Vicente Garibay Febles** ceden los derechos del trabajo intitulado: **“Efecto del secado por lecho fluidizado en la estructura de semillas de Ricinus communis y en la extracción de su aceite como fuente alternativa de biocombustibles”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: **peflo ma@hotmail.com; jorge chanona@hotmail.com; vgaribav@imp.mx**; si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



María de Jesús Perea Flores
Nombre y firma alumno (a)

Vo. Bo


Dr. José Jorge Chanona Pérez
Director (a) de Tesis

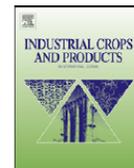

Dr. Vicente Garibay Febles
Director (a) de Tesis



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop



Microscopy techniques and image analysis for evaluation of some chemical and physical properties and morphological features for seeds of the castor oil plant (*Ricinus communis*)

M.J. Perea-Flores^a, J.J. Chanona-Pérez^{a,*}, V. Garibay-Febles^c, G. Calderón-Dominguez^a, E. Terrés-Rojas^c, J.A. Mendoza-Pérez^b, R. Herrera-Bucio^d

^a Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Plan de Ayala y Carpio s/n, Col Santo Tomas, C.P. 11340, México, D.F., Mexico

^b Departamento de Ingeniería en Sistemas Ambientales, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Av. Wilfrido Massieu, Esq. Cda. Miguel Stampa s/n, U.P. Adolfo López Mateos, C.P. 07738, México, D.F., Mexico

^c Laboratorio de Microscopía Electrónica de Ultra Alta Resolución, Instituto Mexicano del Petróleo, Eje Central Lázaro Cárdenas N.152, Col. San Bartolo Atepehuacan, C.P. 07730, México, D.F., Mexico

^d Instituto de Investigaciones Químico-biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Francisco J. Mújica S/N, 58066, Morelia, Michoacán, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 January 2011

Received in revised form 10 March 2011

Accepted 13 March 2011

Available online 6 May 2011

Keywords:

R. communis seeds
Chemical and physical properties
Microstructure
Image analysis

ABSTRACT

Ricinus communis seed is a source of protein and oil with a high potential to use as animal's feedstock and biodiesel production. However, the oil yield and the extraction efficiency depend on the process conditions applied, as well as on the physical, chemical and structural properties of the seed, which have not been fully investigated. Hence, the objective of this study was to evaluate some chemical and physical properties of *R. communis* seed as well as to describe and quantify the macro and microstructure of this raw material by microscopy techniques and image analysis. Chemical analysis confirmed the seeds' high contents of protein ($28.48 \pm 0.25\%$) and fat ($51 \pm 0.31\%$). On the other hand, the values of geometric mean diameter (8.95 ± 0.05 mm), bulk density (538 ± 11 kg/m³), and true density (1458 ± 27 kg/m³), among others, were higher than the ones reported about similar oils seeds. Microstructural studies showed that the endosperm cells presented an ovoid shape, as obtained from the aspect ratio results ($AR = 1.28 \pm 0.17$), and a cell density of 570 ± 10 cell/mm², resulting in a porous structure, while the embryo cells had a cell density of 4903 ± 2 cell/mm², and an AR of 2.41 ± 0.48 , related to a more compact structure (rectangular form) in this part of the seed. Regarding to lipids bodies (lb), they were only visible in the endosperm cells, showing a circular shape ($AR = 1.16 \pm 0.1$), and a mean cell density of 9.57 ± 2.40 lipid bodies/ μm^2 , associated to protein as observed by the mineral presence (K, P, Mg and S) as determined by the energy dispersive X-ray analysis. Microscopy techniques and images analysis were efficient tools for the characterization of macro and microstructure of seeds and the data obtained integrate numerical information that could be useful for thermal and mechanical processing of *R. communis* seed, as well as for the design process equipment.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ricinus communis seed, commonly known as "higuerilla", "ricine" or "mamona", (Ali et al., 2008; Scholz and DaSilva, 2008), is a member of the Euphorbiaceae family and it is native from tropical climates although it has been adapted to a wide range of sub-tropical and temperate climates. The *R. communis* plant has been cultivated since antiquity not only as a garden ornament for its striking foliage and interesting flowers but also because their

seeds were used as a medicinal plant. The annual world production is around one million tons (Kim et al., 2006; Ogunniyi, 2006) and nowadays it is used mainly for the production of non-edible oil (Ogunniyi, 2006; Paul, 2008), as these seeds are poisonous to humans and animals, because they contain ricin, a protein with cytotoxic activity, that inhibits protein synthesis at ribosome levels (Bradberry, 2007; Pita et al., 2004).

R. communis plant is considered as an important source of oil because of their seeds which contain about 35–55% of oil by weight. The oil, also known as "castor oil", enjoys a tremendous annual demand worldwide, which is estimated in about 220,000 tons (Babita et al., 2010). It contains a high concentration (over 85–90%) of ricinoleic acid (12-hydroxy-oleate), which has multiple nonfood

* Corresponding author. Tel.: +55 57296000.

E-mail address: jorge_chanona@hotmail.com (J.J. Chanona-Pérez).

applications in the production of different products such as paints and varnishes, nylon-type synthetic polymers, fungicides, medications, cosmetics, hydraulic fluids and high quality lubricants. As additive, the ricinoleic acid has been found useful to replace sulfur-based lubricity components in petroleum diesel, helping to reduce sulfur emissions, among others applications (Chen et al., 2004; Ogunniyi, 2006).

Due to the rising importance of biodiesel worldwide, the oil from these seeds represents a good alternative for its production, as it will not compete with food crops (Balat, 2011) and it also may become a profitable and sustainable crop in areas not used for food production in all countries with tropical and subtropical climates. Thus to design equipment to improve the existing processing methods, the chemical and physical properties of the seeds have to be known. According with Mohsenin (1970) knowledge of physical properties and seed structure constitutes important and essential data in the design of machines, storage structures, processes and controls.

Different studies have been undertaken to know the morphological characteristics of different raw materials, including oil seeds (Amonsou et al., 2011; Pascual-Alberto et al., 1998; Varela et al., 2008; Young et al., 2004b) with or without processing, showing that the structure (macro or micro) of raw materials is a key parameter to the understanding the effect of processing and the final quality of products. Moreover, the understanding of the microstructure of different of *R. communis* seeds, their organelles and integrating compounds would be helpful to isolate and characterize their lipids and proteins. In particular, the knowledge of the seed microstructure may be important in industrial processing and utilization of non-edible oilseeds, such as food and energetic industries. However, as far as we know, the microstructure of *R. communis* seeds has not been studied with several microscopy techniques at the same time nor the obtained micrographs have been analyzed by image analysis. Thus, when image analysis and microscope techniques are used together, they become an even more powerful tool to understand the structure–property–functionality relationship of biomaterials such as oilseeds (Aguilera and Stanley, 1999; Chanona et al., 2008). Therefore, this study is aimed to analyze *R. communis* seeds by different microscope techniques which include stereo microscopy (SM), light microscopy (LM), confocal laser scanning microscopy (CLSM) and environmental scanning electron microscopy (ESEM) and to apply the image analysis methodology for the quantitative evaluation of the morphology of the seed's elements as obtained from microscopy images, to serve as a frame of reference for future evaluations of *R. communis* seeds when thermal processed, or utilized for oil extraction and isolation of proteins.

2. Materials and methods

2.1. Samples

R. communis "higuerilla" seeds, variety Silvestre Tiripiteo were kindly provided by Promotora Agrícola "La Estancia" (Mich., México). Seeds without fissures or noticeable damage were cleaned and manually selected; after this process the seeds were packed in hermetic bottles and stored at room temperature for further use.

2.2. Chemical analysis

Chemical analyses of *R. communis* seed were carried out according to official standard methodologies (AOAC, 1995). Protein (N x 6.25, method 955.04), crude fat (method 923.03), crude fiber (method 920.86), ash (method 923.03), moisture (7.003 AOAC) and total carbohydrates contents were obtained. All analyses were carried out in triplicates.

2.3. Physical properties

The average unit volume (V_i) of *R. communis* seed was determined by fluid displacement method from irregular shaped particles, following the technique as proposed by Mohsenin (1970). A 500 mL container was filled with edible vegetable oil (190 mL) and a known number of seeds (30) were added. The V_i was determined by applying the following expression:

$$V_i = \frac{\text{oil displacement}}{\text{number of seed}} \quad (1)$$

Bulk and true densities of *R. communis* were evaluated by the methodology described by Mohsenin (1970). Bulk density (ρ_b) was calculated from the ratio of the mass and volume that was filled with the seed; the samples were not compacted in any way. The true density (ρ_t) is defined as the ratio between the mass of the samples and its true volume determined using toluene displacement method.

The porosity (ε) of *R. communis* seeds, defined as the fraction of space in the bulk seed which is not occupied by the seed, was calculated from the following relationship (Mohsenin, 1970):

$$\varepsilon = \left(1 - \frac{\rho_b}{\rho_t}\right) \times 100 \quad (2)$$

where, ε is the porosity in %; ρ_b is the bulk density in kg/m^3 ; and ρ_t is the true density in kg/m^3 .

Seeds' length (L), width (W), and thickness (T , all in mm) were measured by stereo microscopy and image analysis methodology (mentioned in Section 2.5), based on the assumption that *R. communis* seeds is similar to a scalene ellipsoid where $L > W > T$. For this analysis two hundred seeds were randomly selected and for each individual seed, the three dimensions were evaluated.

The geometric mean diameter (D_g) of a seed was calculated by using the following relationship given by Mohsenin (1970), as follows:

$$D_g = (LWT)^{1/3} \quad (3)$$

where, L is the length; W is the width; and T is the thickness in mm.

The surface area (S) was determined by the relationship given by McCabe et al. (1986)

$$S = \pi D_g^2 \quad (4)$$

The sphericity (ϕ) of *R. communis* was calculated by using the following relationship (Mohsenin, 1970) and the different coordinates were calculated from image analysis methodology as described in the image analysis (Section 2.5) (Arnosti et al., 2000):

$$\phi = \frac{(LWT)^{1/3}}{L} = \frac{D_g}{L} \quad (5)$$

where, L is the length; W is the width; and T is the thickness in mm. The higher sphericity value for the seed, the closer is its shape to a sphere.

2.4. Microscopy studies

2.4.1. Stereo microscopy (SM)

A sample of 200 seeds was observed under the Stereomicroscope (Nikon SMZ 1500, Japan) with magnification $\times 0.75$. A digital camera (Nikon Digital Sight DS-2Mv, TV Lens $\times 0.55$, Japan) was attached to the microscope and also to a personal computer. Image acquisition was carried out using an interface (Nikon, DS-U2, Japan); the images were captured using NIS-Elements F 2.30. Images were captured in RGB color and stored in TIFF format at 1600×1200 pixels.

2.4.2. Light microscopy (LM)

For LM, the seed coat was carefully removed from each seed (50 seeds) with a razor blade. Individual seeds were separated into the two cotyledons that form each seed. The two cotyledons were sectioned longitudinally and transversally by using a freezing microtome (Leica, CM1850, Germany) into 10–20 μm thick slices (Ross et al., 2004; Sandoval, 2005). The slices were stained with methyl blue reagent in water at 1%, fast green (FCF) reagent in water at 2% and Sudan IV both in ethanol solution (80%) at 2% were used to highlight cell walls (lignin) and lipid bodies, subsequently the slices were observed under the Light microscope (Nikon, Eclipse 50i, Japan) and a total of 50 fields were acquired for each magnification and stained ($\times 10/0.30$ and $\times 40/0.95$). Image acquisition process was similar to the reported for the above stereo microscopy technique. The images were captured in RGB color and stored in TIFF format at 1280×960 pixels.

2.4.3. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

For CLSM, a samples of 10 seeds were cut with freezing microtome (Leica, CM1850, Germany) into 45 μm thick slices, then each sample was mounted on glass slides and viewed under CLSM (LSM 710, Carl Zeiss, Germany) and magnification $\times 40/1.3$. The laser wavelengths excitation was 405, 488 and 561 nm with 16%, 15% and 15% capacity, respectively. This tool is equipped with a spectral canal used to detect autofluorescence signals which comes from seed components (such as proteins and lipids), in where the measurements of fluorescence intensity were performed using the built software ZEN of the LSM 710. The intensity peak characteristic of fluorescence emission signal was 519 for proteins and 461 nm for lipids (Aguilera and Stanley, 1999; Amonsou et al., 2011). A total of 10 fields were acquired in RGB color and stored in TIFF format at 512×512 pixels.

2.4.4. Environmental scanning electron microscopy (ESEM)

Thirty mature seeds were divided into longitudinal and transversal sections to study the microstructure of endosperm and 10 seeds were used to study the seed coat. They were mounted on aluminum stubs with double-sided carbon adhesive tape and directly observed under a XL-30 Environmental Scanning Electron Microscope (Philips, USA) at 25 kV accelerating voltage. The used ESEM was coupled to a GSE (gaseous secondary electron detector), BSE (backscattered electron detector) and EDX (energy dispersive X-Ray detector) (Stokes, 2008). The GSE and BSE detector were used to investigate the microstructure and the EDX detector (EDAX model New XL30 and an active area of 10 mm^2) was used to carry out the microanalysis of the minerals on the seed's endosperm, also this detector was used to perform X-ray mapping technique, this method consists in using pseudo-colors to represent the bidimensional spatial distribution of the energy emission of the chemical elements of the sample detected by means of EDX detector. A total of 150 images, as obtained from GSE and BSE-ESEM, were acquired in gray scale and stored in TIFF format at 712×484 pixels. For the EDX analysis, five fields of view (100.7 mm^2 each one) were analyzed for 60 s at a 25 kV accelerating voltage and at a count rate of 1000–3000 cps.

2.5. Image analysis

The images obtained from microscopy techniques were used to extract several features by means of image analysis methodology. SM RGB images, from the lateral and upper views, were converted to a gray scale format using the ImageJ 1.43u freeware software (National Institutes Health, Bethesda, MD, USA). Binary images of seeds were obtained by manual segmentation from gray scale images using threshold tool (from 8 ± 1 to 255) of ImageJ 1.43u

software. L , W and T dimensions were estimated in mm from the minor and major lengths by using of a measuring tool.

LM images of the endosperm stained with fast green were converted to gray scale and then to binary images by manual segmentation (threshold from 161 ± 5 to 255) from cropped gray scale images of individual cells. Finally, the parameters of the shape and size of endosperm cells mentioned in Table 1, were obtained from binary images by means of ImageJ 1.43u software.

The following size and shape features were determined from the binary images:

Major length (ML): The longest distance between two points of the object's border.

Area (A): Number of pixels within the boundary.

Perimeter (P): The length of the outside boundary of the selection. Major diameter (MD): It is determined by the distance of two pixels with the largest coordinates at different orientations.

Aspect ratio (AR): This is a relationship between the minimum and maximum diameters. A value 1.0 for equidimensional objects and tends to infinity for extended objects.

$$AR = \frac{\text{Max Diameter}}{\text{Min Diameter}} \quad (6)$$

Roundness (R): This is the ratio of area over the square root of the major diameter. R determines the roundness of objects. A perfectly round object will have a roundness of 1.0, while the straight and elongated objects approach to zero.

$$R = \frac{4 \times A}{\pi(\text{Max Diameter})^2} \quad (7)$$

From images obtained by CLSM, the image analysis was similar to the one described for LM with a threshold from 25 ± 3 to 255 for manual segmentation for lipids bodies. The same parameters extracted from endosperm cells also were determined for lipid bodies.

ESEM images of embryo cells were utilized to obtain the same parameters determined from the endosperm cells and lipid bodies. Image processing procedure was similar to LM and CLSM, but the manual segmentation was from 90 ± 10 to 140 ± 8 in the gray-scale. For LM and ESEM images a total of 1000 cells were analyzed and for CLSM Images 500 lipids bodies were measured.

2.6. Statistical analysis

Descriptive statistical were done for all experiments and for image analysis results a normality test (Kolmogorov–Smirnov) were made to determine the normal distribution of objects using SigmaStat statistical programme version 3.5 (SYSTAT Inc., USA).

3. Results and discussions

3.1. Chemical analysis

R. communis seeds, as expected, showed a large protein and fat contents, presenting chemical composition values (Table 1) in accordance with the ones reported by Okorie et al. (1985) for this seed. The fat content for *R. communis* seed was similar to the ones reported for edible and non-edible oilseeds; such as peanuts, sunflower and *Jatropha curcas* seeds; but it was higher as compared to cartamo and canola seeds. Regarding to the protein content, *R. communis* seed showed similar values to ones reported for *J. curcas*, but smaller than soya seed (Hernández et al., 1977; Karaj and Müller, 2010; López, 1998). Total carbohydrates, ash and crude fiber contents of *R. communis* were different in comparison with the oilseeds aforementioned. These results confirm that *R. communis* seeds can

Table 1
Summary of some chemical and physical properties and morphological features of *R. communis* seeds.

Chemical properties	Seed	Physical properties	Seed	Morphological features	Endosperm cells	Embryo cells	Lipids bodies
% Moisture	5.64 ± 0.08	Bulk density (ρ_b) (kg/m ³)	538 ± 11	A (μm^2)	1013.46 ± 403.72 ^a	269.26 ± 61.37 ^a	93.07 ± 18.44 ^a
% Protein	28.48 ± 0.25	True density (ρ_s) (kg/m ³)	1458 ± 27	P (μm)	141.98 ± 30.21 ^a	71.88 ± 7.99 ^a	42.55 ± 5.59 ^a
% Fat	51.62 ± 0.31	Porosity (ϵ) (%)	63 ± 0.63	MD (μm)	44.01 ± 8.05 ^a	28.20 ± 3.51 ^a	12.63 ± 1.30 ^a
% Total carbohydrates	6.18 ± 0.52	Average unit volume (V _u) (mm ³)	406.67 ± 25.28	AR	1.28 ± 0.17 ^a	2.41 ± 0.48 ^a	1.16 ± 0.10 ^a
% Crude fiber	4.31 ± 0.26	Length (mm)	13.5 ± 0.08 ^a	R	0.79 ± 0.10 ^a	0.43 ± 0.02 ^a	0.87 ± 0.07 ^a
% Ash	3.82 ± 0.42	Width (mm)	8.7 ± 0.04 ^a	Number of cell per mm ² or lipid bodies per cell (μm^2)	570 ± 10	4903 ± 2	9.57 ± 2.40
Elemental chemical composition of cells by EDX analysis (%wt)	20.15 ± 0.86 Mg	Thickness (mm)	6.1 ± 0.04 ^a				
	40.55 ± 1.60 P	Sphericity (ϕ)	0.67 ± 0.02				
	13.25 ± 1.45 S	Geometric mean diameter (D_g) (mm)	8.95 ± 0.05				
	26.04 ± 1.08 K	Surface area (S) (mm ²)	251.54 ± 0.01				
		Thickness of seed coat (μm)	281.97 ± 13.21				

^a Indicate that the samples had a normal distribution ($P > 0.05$). All results were expressed as the mean value ± standard deviation.

be considered as a good source of protein for animal feeds and oil (Karmakar et al., 2010).

3.2. Physical properties

The values of some physical properties measured for *R. communis* seed are summarized in Table 1. Length, width and thickness of seeds were 13.5 ± 0.08 mm, 8.7 ± 0.04 mm and 6.1 ± 0.04 mm, respectively, results that are in agreement with the ones reported by Greenwood et al. (2005). These physical properties and morphological features may be useful for the design of seed cleaning equipment (sieving) and oil extraction processes.

The true density of *R. communis* seed was found to be 1458 ± 27 kg/m³, while the bulk density was 538 ± 11 kg/m³. These values were higher than those for soybean (Deshpande et al., 1993), calabash nutmeg (Omobuwajo et al., 2003), oilbean seed, cocoa bean, maize (Mohsenin, 1970), and other seeds.

The porosity of the *R. communis* seeds was $63 \pm 0.63\%$ with an average unit volume of 406.67 ± 25.28 mm³. These values were higher than those reported for calabash nutmeg (Omobuwajo et al., 2003), hemp (Sacilik et al., 2003), oilbean (Oje and Ugbor, 1991), and African oilbean seeds (Asoegwu et al., 2006). The higher values of porosity could be associated with irregular shapes of seeds (Mohsenin, 1970).

The sphericity was 0.67 ± 0.02 and it is similar to calabash nutmeg seed (Omobuwajo et al., 2003) and lower than hemp seed (Sacilik et al., 2003) and higher than the corresponding values reported for the oil bean seed (Oje and Ugbor, 1991); which indicate that the shape of the seeds makes it difficult to roll on surface and facilitates sliding (Perez et al., 2007; Tunde-Akintunde and Akintunde, 2004). Additionally the thickness of seed coat was around of 281.97 ± 13.21 μm .

The geometric mean diameter and surface area of seeds were 8.95 ± 0.05 mm and 251.54 ± 0.01 mm², respectively. These values indicate that mass or energy transfer rate through the surface of the seed is higher than the rate of other oil seeds (Mohsenin, 1970; Oje and Ugbor, 1991; Sacilik et al., 2003; Tunde-Akintunde and Akintunde, 2004).

The physical properties reported in this work could be useful in the design of equipment useful in the processing of seeds, such as cleaning, oil extraction, pneumatic and conventional transportation, and drying among others.

3.3. Microscopy studies

R. communis seed was studied by several microscopy techniques in order to characterize its microstructure.

3.3.1. Stereo microscopy

Overall structure of *R. communis* seeds observed under stereo microscopy is presented in Fig. 1. The seeds have an ellipsoid form and its average dimensions are showed in Table 1. Its seed coat (testa) is brittle and shining and presents a complex mottled color pattern, with a distinct caruncle at the base of seeds close to the micropyle (Fig. 1a–c). The internal structure shows a copious white endosperm. The embryo is around 6 mm long, consisting of the root–shoot axis and two thin and elongated cotyledons (Greenwood et al., 2005), which are displayed in Fig. 1d and e.

3.3.2. Light microscopy

Microstructure of endosperm cells, epidermis and embryo of *R. communis* seed are shown in Fig. 2. Based on fast green staining technique, used to identified vegetable lignocellulosic compounds (Luna, 1968; Sandoval, 2005), it is possible to see that endosperm

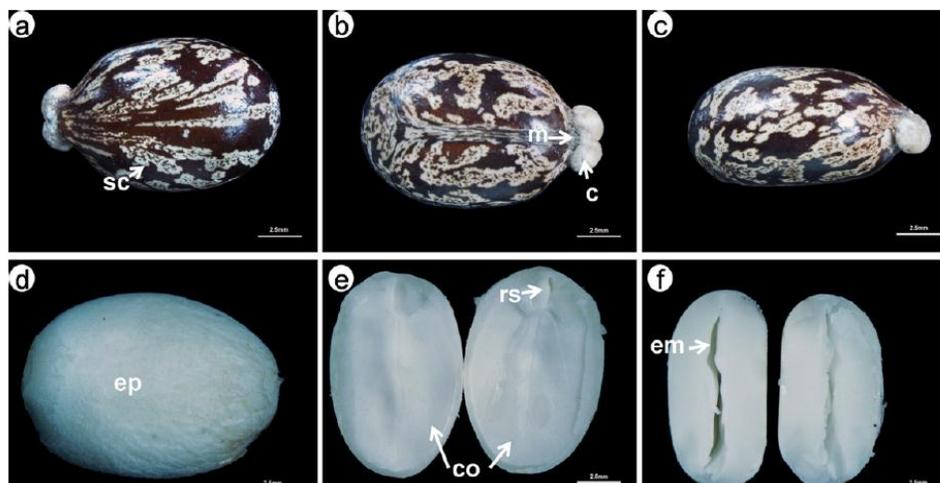


Fig. 1. Stereo microscopy micrographs of *R. communis* seed. Upper and lateral views of intact seed (a, b and c, respectively); *R. communis* seed enclosed within testa (d) and separated into its two cotyledons cut in transversal and longitudinal form (e and f, respectively). Here sc stands for seed coat or testa; c, caruncle; co, cotyledon; rs, root–shoot axis; ep, epidermis; en, endosperm; m, micropyle and em, embryo.

cells showed a nearly isodiametric form, while the epidermal film consisted of uniform and thin film cells (Fig. 2a and b).

Some morphological features of endosperm cells are shown in Table 1, such as the area of the endosperm cells which presented a wide variation, from 609.74 to 1417.18 μm^2 . This variability could be associated to the heterogeneity of cellular size along the endosperm tissue, since the cells can be in different devel-

opmental stages. With respect to this statement, Young et al. (2004a) reported that peanuts endosperm cells diameters varied from 12 μm to 50 μm depending on their maturity, showing the more immature seeds the smaller cell sizes, while the mature seed showed the largest ones. On the other hand, both the perimeter ($141.98 \pm 30.21 \mu\text{m}$) and the major diameter ($44.01 \pm 8.05 \mu\text{m}$) also showed large variations. Regarding to the diameter values of

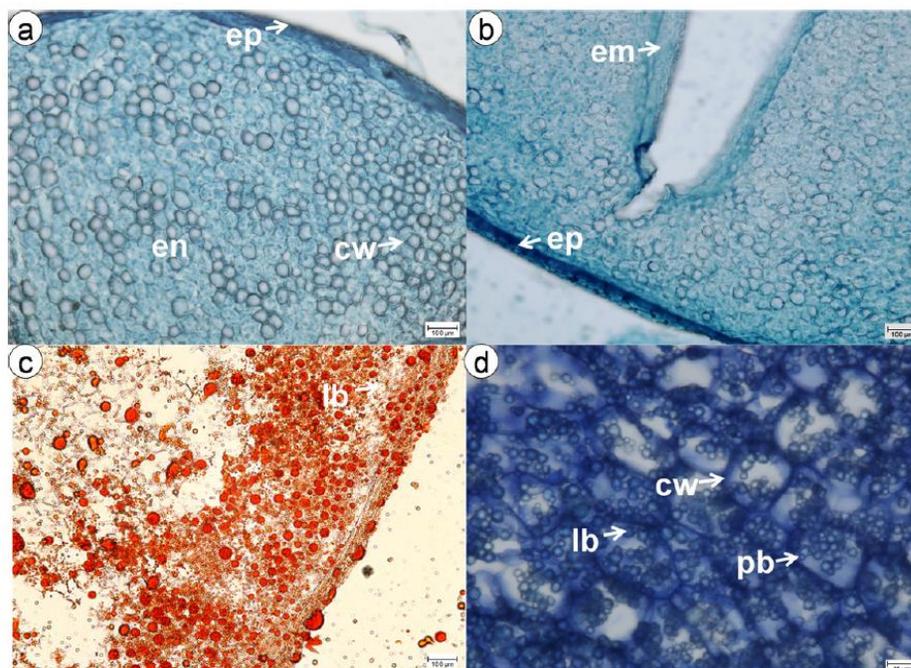


Fig. 2. Light microscopy micrographs of endosperm of *R. communis* seed. Fast green (FCF) stained cell wall and endosperm tissue (a); epidermis and embryo are remarked by FCF (b); the characteristics orange color corresponds to lipid bodies stained with Sudan IV (c); methyl blue staining cell wall, lipid bodies and protein bodies (d). ep, epidermis; en, endosperm; em, embryo; lb, lipid bodies; pb, protein bodies; and cw, cell wall. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

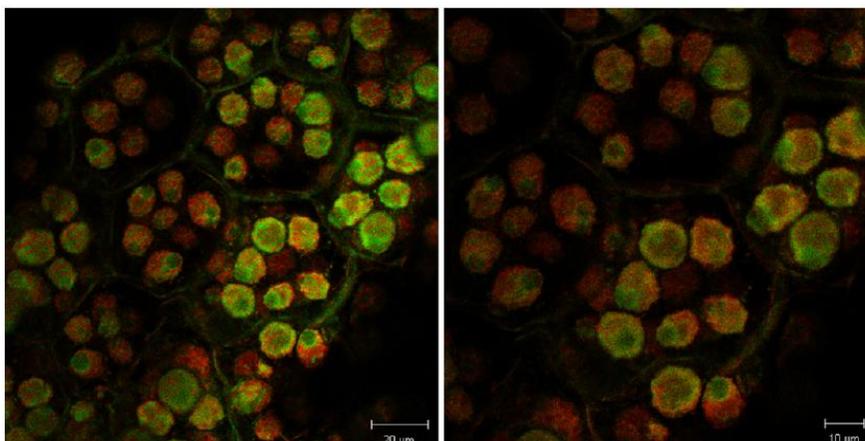


Fig. 3. Confocal laser scanning microscopy micrographs show autofluorescence of endosperm cells of *R. communis* seed. Green color depicts lipid bodies and red protein bodies. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

R. communis endosperm cells they were similar to those reported for mature endosperm cells of peanut (Young et al., 2004a), where the diameter values varied from 25 to 45 µm and for almond seed from 15 to 40 µm range (Young et al., 2004b).

The AR (1.28 ± 0.17) and *R* (0.79 ± 0.10) values of endosperm cells indicated that they, in average, presented an ovoid form (Fig. 2d). Furthermore, the number of cells per mm² (cell density) presented an average value of 570 ± 10 (Table 1). Low values of cell density could be associated to porous materials and higher values of cell size. Also, the values of cell density represent an important data for studies of heat and mass transfer during drying of plant tissues at

microscopic scale (Castro-Giráldez et al., 2011; Campos-Mendiola et al., 2007).

Lipid bodies can be recognized when stained with Sudan IV and methyl blue dyes (Fig. 2c and d). Lipid bodies showed a typical spherical shape similar to those reported for others seeds such as almond (Ellis et al., 2004; Young et al., 2004b), peanut (Young et al., 2004a), soybean, coffee bean (Borém et al., 2008), and marama bean (Amonsou et al., 2011). The microtome cuts of endosperm tissue induce the development of the oil drops due to a coalescence of lipids bodies. Furthermore, the cut produce abundance of lipids bodies and oil drops allowing the diffusion of oil from endosperm to

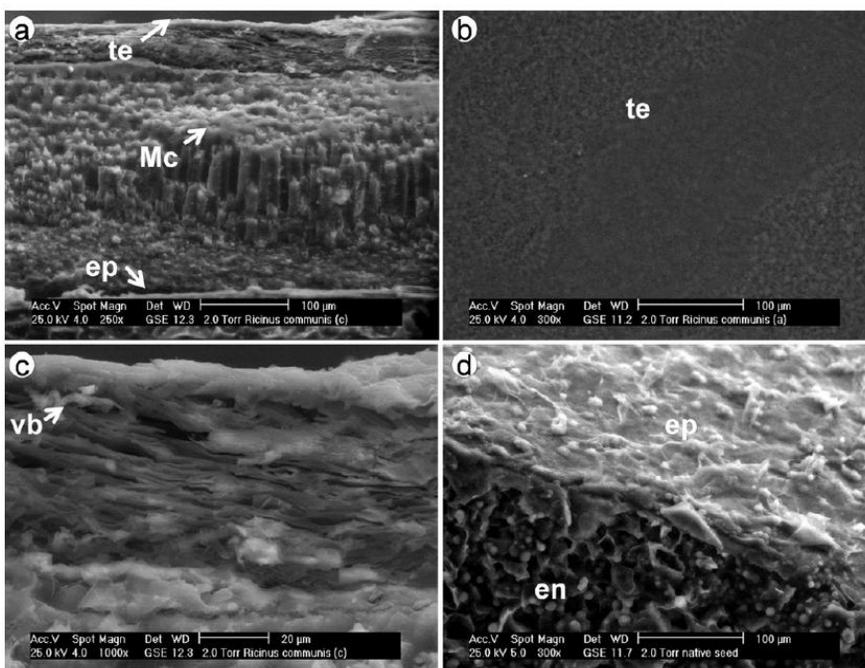


Fig. 4. Environmental scanning electron microscopy micrographs of a seed section of seeds where en stands for endosperm; te, tegument; ep, surface of epidermis; vb, vascular bundle and Mc are Malpighi cells.

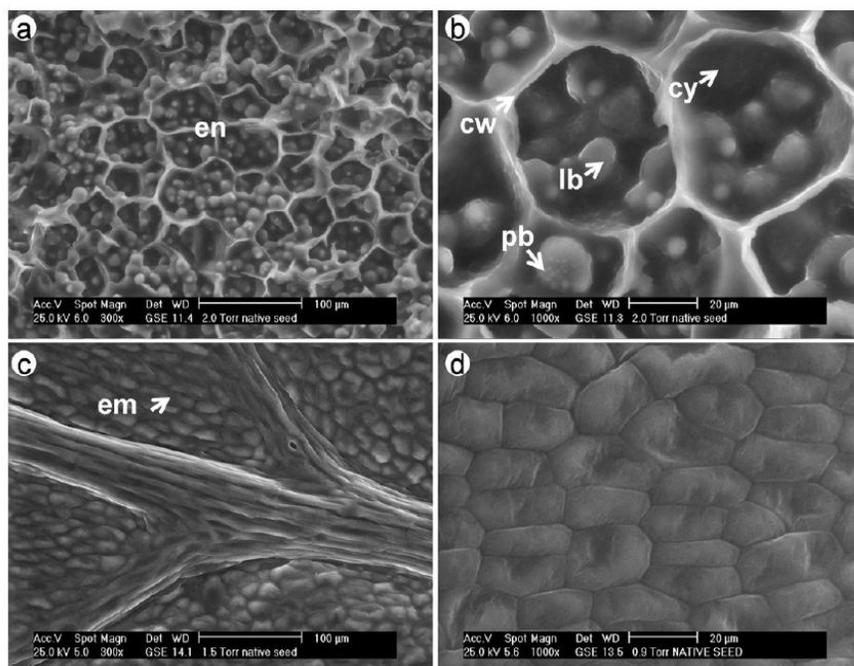


Fig. 5. Environmental scanning electron microscopy micrograph of *R. communis* seed of an endosperm section (a, b) and inner surface of cotyledon (c, d). en, endosperm; cw, cell wall; cy, cytoplasm; lb, lipid bodies; pb, protein bodies; and em, embryo.

epidermis edge (Fig. 2c). For this reason the *R. communis* seeds have been widely used for oil extraction and subsequent biofuel manufacture (McKeon et al., 2000; Ogunniyi, 2006). The methyl blue stain also allows the observation of protein morphology, which showed to be spherical. In these seeds the protein bodies are associated to lipid bodies.

3.3.3. Confocal laser scanning microscopy

CLSM images of endosperm cells showing a green-red autofluorescence and clusters of lipids bodies inside of endosperm cells could be observed (Fig. 3). Proteins associated with lipids body surfaces and cell walls were also observed. The cell wall and cellular membrane are structures composed of lipids, phospholipids, proteins and lignocellulosic compounds that can have autofluorescence when being excited at ultraviolet-green wavelengths (Aguilera and Stanley, 1999). For this reason, the autofluorescence of cell wall and protein bodies (red) associated to lipid bodies (green) was easily noticed (Fig. 3); this property is due to chemical composition of proteins, lipids and lignocellulosic compounds (Aguilera and Stanley, 1999; Amonsou et al., 2011).

Image analysis allowed the measurement of the size and shape of lipids bodies from CLSM images (Table 1). The size of the lipid bodies was evaluated from image features parameters such as the area ($93.07 \pm 18.44 \mu\text{m}^2$), the perimeter ($42.55 \pm 5.59 \mu\text{m}$) and the major diameter ($12.63 \pm 1.30 \mu\text{m}$). The lipids bodies of *R. communis* seeds presented a larger size in comparison with other lipids bodies reported for others oils seeds (Ellis et al., 2004; Young et al., 2004a, 2004b) such as peanuts (1–2 μm of diameter) and almond (diameter up to 3 μm for *Prunus dulcis* and 1–5 μm of diameter for *Prunus amygdalus* L.). The lipid bodies have approximately a circular shape and they showed AR and R values close to 1 (AR = 1.16 ± 0.1 and R = 0.87 ± 0.07). These results confirm the spherical shape of lipids bodies observed in CLSM (Fig. 3) and LM (Fig. 2d) images. This spherical shape for lipids bodies have also been reported in other

seeds such as coffee, almond, *Brassica rapa* L. and peanut (Borém et al., 2008; Ellis et al., 2004; Young et al., 2004a, 2004b; Kuang et al., 2000; Pascual-Alberto et al., 1998), but not quantitatively, and it is well known that the oil reserve organelles such as the lipids bodies present a spherical shape, which has been proved to be a very geometrically stable form to storage fluid substances into the cells. For this reason AR and R could be considered as qualitative indicators of oil resources. However more research in this area is needed.

The largest size and high density of lipids bodies per cell (9.57 ± 2.40) in endosperm cells were observed. CLSM and image analysis were useful to study the composition and morphology of lipids bodies in endosperm cells of seeds.

3.3.4. Environmental scanning electron microscopy

The microstructure of seed coat is displayed in Fig. 4, consisting of a three layers: tegument, Malpighi cells and epidermis (Fig. 4a and b) and from ESEM images the thickness of these layers could be measured. The first one is a layer, which cover the whole seed (Fig. 4c) and it has been related to its protection from external factors, as well as to the regulation exchange between endosperm and environment elements (water, CO₂, O₂, among others). Additionally, it has been linked to the maintenance of the seed vigor when it is exposed to non-favorable conditions during storage (Ferreira et al., 2010). This structure is compounded of vascular bundle and its average thickness was $45.80 \pm 6.04 \mu\text{m}$. The second layer (Fig. 4a), with an average thickness of $225.42 \pm 13.89 \mu\text{m}$, is known as Malpighi's cell (Flores-Vindas, 1999), which supports the seed coat and has been related to water permeability during the maturity and storage processes. Finally, the last layer is the epidermis (Fig. 4d) that is a white thin single cell layer, that covers the surface of the endosperm; and their functions are the protection and regulation of different compounds (Flores-Vindas, 1999), its average thickness was $9.56 \pm 2.89 \mu\text{m}$.

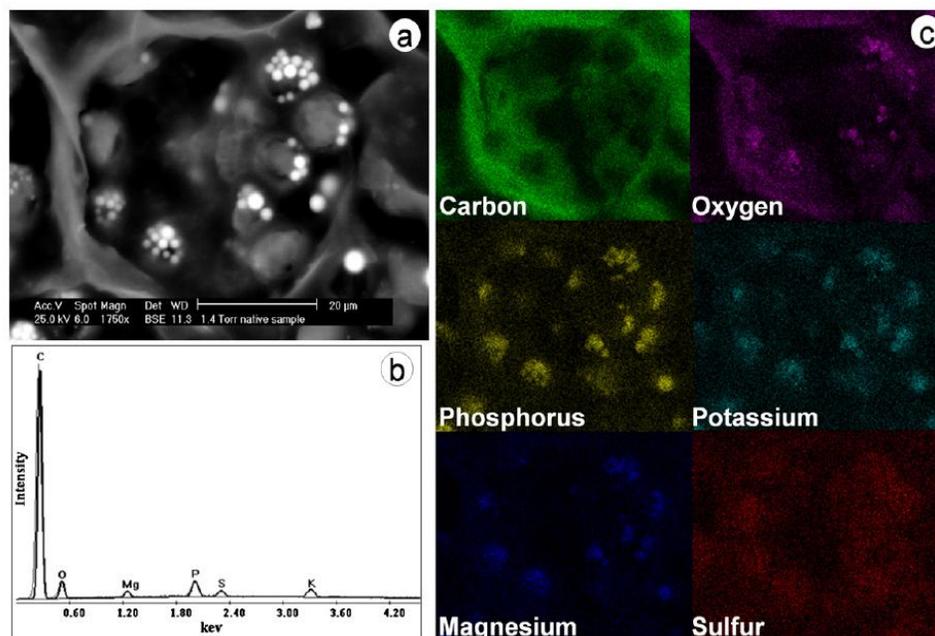


Fig. 6. Environmental scanning electron microscopy micrographs of endosperm cells of *R. communis* seed. (a) BSE-ESEM micrograph of an endosperm, (b) EDX spectrum of endosperm cell, and (c) endosperm cell elemental distribution by X-ray mapping technique from EDX analysis spectrum.

The endosperm and the embryo cells of *R. communis* seed are shown in Fig. 5 where it can be seen that the endosperm is a homogeneous tissue with a complex cytoplasmic network (Fig. 5b). The cells have a nearby isodiametric shape, which also was studied by means of LM. Furthermore ESEM images allowed to observe the subcellular organelles that include protein and lipid bodies (Fig. 5b). Similar results have been described by Borém et al. (2008); Duffus and Slaughter (1985); Esau (1972); Pascual-Alberto et al. (1998); Smith (1979); and Varela et al. (2008). The embryo consisted of a root–shoot axis (Fig. 5c) and two cotyledons (Fig. 1c); all the embryo cells have a thin primary cell wall, presenting a closely packed sheet form (Fig. 5c and d). The values of images features, area ($269.26 \pm 61.37 \mu\text{m}^2$), perimeter ($71.88 \pm 7.99 \mu\text{m}$), major diameter ($28.20 \pm 3.51 \mu\text{m}$) and number of cell per mm^2 (4903 ± 2) obtained for the embryo cells are shown in Table 1. These values were smaller than those obtained for the endosperm cells may be due to that the embryo cells are a tissue in a development stage (Kuang et al., 2000). However, the values obtained for AR (2.41 ± 0.48) for embryo cells were higher than those for endosperm cells, this fact indicates that the shape of embryo cells was similar to a rectangular object with a higher major diameter (Fig. 5d), consequently the cell density was higher than that of the endosperm cells because rectangular objects can better be packaged than spherical cells. The lowest values of R (0.43 ± 0.02) of embryo cells confirmed the non roundness of this kind of cells.

3.3.5. Energy dispersive X-ray (EDX) analysis

EDX analysis and X-ray mapping obtained from *R. communis* seed endosperm cells are presented in Fig. 6. ESEM micrograph (Fig. 6a) of endosperm cell obtained by BSE detector shows the shape of lipid bodies as shining dots; this structures have been observed in others oilseeds, but not in *R. communis* (Amonsou et al., 2011; Ellis et al., 2004; Young et al., 2004a, 2004b) and according with the detector utilized to obtain these images, the elements with major atomic weight correspond to globoid crystals associated

with protein bodies (Stokes, 2008). The results of EDX spectrum are presented in Fig. 6b; this elemental analysis revealed that they contained C, O, K, P, Mg and S, the elemental composition of cells is showed in Table 1. Several mineral reserves found in seeds (Lott et al., 1982; Prego et al., 1998) are contained inside the proteins bodies, generally in electron-dense inclusions called globoid crystals, which was observed by BSE detector of ESEM; and K, P, Mg and S are mineral reserves in castor seed (Lott et al., 1982). In case of castor seed, the elemental chemical composition of the cells obtained by means of EDX spectrum and X-ray mapping can be seen in Fig. 6b and c, where the elemental chemical composition of cells and the globoid crystals associated to protein bodies were observed.

4. Conclusions

Chemical analysis of seeds and elemental composition of endosperm cells confirm the high potential of *R. communis* as a rich source of protein and oil with possible uses as animal feedstock and in the biodiesel production. Physical properties evaluated for seeds could be useful for the design of equipment of separation, cleaning, storage, transportation and processing of seeds. Microstructural characterization of seeds by means of microscopy techniques and images analysis provided relevant qualitative and quantitative information that can be helpful for the study of macro and microstructure of *R. communis* seeds and also for its processing and utilization. The obtained results in this work integrate qualitative and numerical information that could be useful for process engineering and understanding of the properties–structure relationships of *R. communis* seeds.

Acknowledgments

M.J. Perea-Flores wishes to thank CONACyT-México and PIFI-IPN-México for the scholarship provided. This research was financed through the projects 20091151 and 20100771 at the Insti-

tuto Politécnico Nacional (México) and 59730 from CONACYT. The authors also wish to thank the Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) of IPN, and Mexican Petroleum Institute, México.

References

- Aguilera, J.M., Stanley, D.W., 1999. Microstructural principles of food processing and engineering. In: Barbosa-Cánovas, G.V. (Series Ed.), Food Engineering Series, 2nd edition. Aspen Publishers, Inc., Maryland.
- Ali, R.M., Elfeky, S.S., Abbas, H., 2008. Response of salt stressed *Ricinus communis* L. to exogenous application of glycerol and/or aspartic acid. J. Biol. Sci. 8 (1), 171–175.
- Amonsou, E., Taylor, J., Minnaar, A., 2011. Microstructure of protein bodies in maramba bean species. LWT – Food Sci. Technol. 44 (1), 42–47.
- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, 15th edition. AOAC, Washington, DC.
- Arnosti Jr., S., Freire, J.T., Sartori, D.J.M., 2000. Analysis of shrinkage phenomenon in *Brachiaria brizantha* seeds. Drying Technol. 18 (6), 1339–1348.
- Asoegwu, S., Ohanyere, S., Kanu, O., Iwueke, C., 2006. Physical properties of African oil bean seed (*Pentaclethra macrophylla*). Agric. Eng. Int.: CIGRE J. VIII, Manuscript FP 05 006.
- Babita, M., Maheswari, M., Rao, L.M., Shanker, A.K., Rao, D.G., 2010. Osmotic adjustment, drought tolerance and yield in castor (*Ricinus communis* L.) hybrids. Environ. Exp. Bot. 69, 243–249.
- Balat, M., 2011. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production—a review of current work. Energy Conversion Manage. 52 (2), 1479–1492.
- Borém, F.M., Marques, E.R., Alves, E., 2008. Ultrastructural analysis of drying damage in parchment Arabica Coffee endosperm cells. Biosyst. Eng. 99, 62–66.
- Bradberry, S., 2007. Ricin and abrin. Medicine 35 (10), 576–577.
- Campos-Mendiola, R., Hernández-Sánchez, H., Chanona-Pérez, J.J., Alamilla-Beltrán, L., Jiménez-Aparicio, A., Fito, P., Gutiérrez-López, G.F., 2007. Non-isotropic shrinkage and interfaces during convective drying of potato slabs within the frame of the systematic approach to food engineering systems (SAFES) methodology. J. Food Eng. 83, 285–292.
- Castro-Giráldez, M., Fito, P.J., Fito, P., 2011. Nonlinear thermodynamic approach to analyze long time osmotic dehydration of parenchymatic apple tissue. J. Food Eng. 102, 34–42.
- Chanona, P.J.J., Quevedo, R., Jiménez, A.A.R., Gumeta, C.C., Mendoza, P.J.A., Calderón, D.G., Alamilla, B.L., Gutiérrez, L.G.F., 2008. Chapter 16: Image processing methods and fractal analysis for quantitative evaluation of size, shape, structure and microstructure in food materials. In: Gutiérrez-López, G.F., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J., Parada-Arias, E. (Eds.), Food Engineering Integrated Approaches: Food Engineering Series. Springer, pp. 227–285.
- Chen, G.Q., He, X., Liao, L.P., McKeon, T.A., 2004. 2S albumin gene expression in castor plant (*Ricinus communis* L.). J. Am. Oil Chemists' Soc. 81 (9), 867–872.
- Deshpande, S.D., Bal, S., Ojha, T.P., 1993. Physical properties of soybean. J. Agric. Eng. Res. 56 (2), 89–98.
- Duffus, C., Slaughter, C., 1985. Capítulo 2: Formación de la semilla en Las semillas y sus usos. AGT Editor, S.A. Mexico, D.F., pp. 41–67.
- Ellis, P.R., Kendall, C.W.C., Ren, Y., Parker, C., Pacy, J.F., Waldron, K.W., Jenkins, D.J.A., 2004. Role of cell walls in the bioaccessibility of lipids in almond seeds. Am. J. Clin. Nutr. 80, 604–613.
- Esau, K., 1972. Las semillas en Anatomía Vegetal, 2ª. Edición. Ediciones Omega, Barcelona, España, pp. 641–677.
- Ferreira, M.E., Contin, V.M., Yoshimitsu, S.S., 2010. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). Sci. Agric. 67 (4), 399–407.
- Flores-Vindas, E., 1999. La planta: estructura y función, vol. I, II. Libro Universitario Regional, Costa Rica. ISBN, ISBN 9968-801-01-1.
- Greenwood, J.S., Helm, M., Gietl, C., 2005. Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (6), 2238–2243.
- Hernández, M.A., Chávez, A., Bourges, H., 1977. Valor nutritivo de los alimentos mexicanos Tablas de uso práctico. Instituto Nacional de la Nutrición, México, L.12.
- Karaj, S., Müller, J., 2010. Determination of physical, mechanical and chemical properties of seeds and kernels of *Jatropha curcas* L. Ind. Crops Prod. 32 (2), 129–138.
- Karmakar, A., Karmakar, S., Mukherjee, S., 2010. Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. Bioresour. Technol. 101, 7201–7210.
- Kim, S.-K., Hancock, D.K., Wang, L., Cole, K.D., Reddy, P.T., 2006. Methods to characterize ricin for the development of reference materials. J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol. 111, 224–313.
- Kuang, A., Xiao, Y., McClure, G., Musgrave, M.E., 2000. Influence of microgravity on ultrastructure and storage reserves in seeds of *Brassica rapa* L. Ann. Bot. 85, 851–859.
- López, R.G.F., 1998. Botánica: Anatomía, morfofisiología y diversidad. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección General de Difusión Cultural, México, D.F., pp. 13–85, 243–259.
- Lott, J.N.A., Greenwood, J.S., Vollmer, C.M., 1982. Mineral reserves in Castor beans: the dry seed. Plant Physiol. 69, 829–833.
- Luna, L.G., 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the AFIP, 3rd edition. McGraw-Hill Book Company, New York, NY, USA.
- McCabe, W.L., Smith, J.C., Harriot, P., 1986. Unit Operations of Chemical Engineering. McGraw-Hill, New York.
- McKeon, T.A., Chen, G.Q., Lin, J.T., 2000. Biochemical aspects of castor oil biosynthesis. Biochem. Soc. Trans. 28 (6), 972–974.
- Mohsenin, N.N., 1970. Physical Properties of Plant and Animal Materials. Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- Ogunniyi, D.S., 2006. Castor oil: a vital industrial raw material. Bioresour. Technol. 97, 1086–1091.
- Oje, K., Ugbor, E.C., 1991. Some physical properties of oil bean seed. J. Agric. Eng. Res. 50 (4), 305–313.
- Okorie, A.U., Anugwa, F.O.I., Anamelechi, G.C., Nwaiwu, J., 1985. Heat-treated castor oil bean (*Ricinus communis*): a potential livestock protein-supplement in the tropics. Nutr. Rep.-Int. 32 (3), 659–666.
- Omobuwajo, T.O., Omobuwajo, O.R., Sanni, L.A., 2003. Physical properties of calabash nutmeg (*Monodora myristica*) seeds. J. Food Eng. 57, 375–381.
- Pascual-Alberto, M.J., Pérez-Munuera, I., Lluç, M.A., 1998. Estructura del cotiledón de la semilla de almendra (*Prunus amygdalus* L.) cruda, remojada y tostada. Food Sci. Technol. Int. 4, 189–197.
- Paul, E., 2008. Castor oil plant. Alpacas Australia 57, 48–49.
- Perez, E.E., Crapiste, G.H., Carelli, A.A., 2007. Some physical and morphological properties of wild sunflower seeds. Biosyst. Eng. 96 (1), 41–45.
- Pita, R., Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., 2004. Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. Rev. Toxicol. 21, 51–63.
- Prego, I., Maldonado, S., Otegui, M., 1998. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. Ann. Bot. 82, 481–488.
- Ross, M.H., Kaye, G.L., Pawlina, W., 2004. Histología, Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular: Técnica histológica y microscopía, 4ª. Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp. 10–18.
- Sacilik, K., Öztürk, R., Keskin, R., 2003. Some physical properties of Hemp seed. Biosyst. Eng. 86 (2), 191–198.
- Sandoval, Z.E., 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal Cuadernos 38. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., pp. 63–64, 79–81.
- Scholz, V., DaSilva, J.N., 2008. Review prospects and risks of the use of castor oil as fuel. Biomass Bioenergy 32, 95–100.
- Smith, C.G., 1979. Oil seeds in food science and technology a series of monographs. In: Vaughan, J.G. (Ed.), Food Microscopy. Academic Press, London, pp. 35–71.
- Stokes, D.J., 2008. In: Rainforth, M. (Series Ed.), Principles and Practice of Variable Pressure/Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM). Wiley, UK.
- Tunde-Akintunde, T.Y., Akintunde, B.O., 2004. Some physical properties of Sesame seed. Biosyst. Eng. 88 (1), 127–129.
- Varela, P., Aguilera, J.M., Fiszman, S., 2008. Quantification of fracture properties and microstructural features of roasted *Marcona* almonds by image analysis. LWT 41, 10–17.
- Young, C.T., Pattee, H.E., Schadel, W.E., Sanders, T.H., 2004a. Microstructure of peanut (*Arachis hypogaea* L. cv 'NC 7') cotyledons during development. LWT 37, 439–445.
- Young, C.T., Schadel, W.E., Pattee, H.E., Sanders, T.H., 2004b. The microstructure of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A Webb cv. 'Nonpareil') cotyledon. LWT 37, 317–322.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del **Dr. José Jorge Chanona Pérez** y **Dr. Vicente Garibay Febles** en los Laboratorios del Doctorado en Alimentos del Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN) y en el Laboratorio de Microscopia Electrónica de Ultra-Alta Resolución (LAMEUAR) del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP). De la misma forma, algunos de los estudios microestructurales y espectroscópicos fueron realizados el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) del IPN.

Se extiende un reconocimiento por el apoyo para la realización del trabajo al Dr. Vicente Garibay Febles, Jefe del LAMEUAR del IMP y del Dr. Eduardo Terrés Rojas y Dr. Ubaldo Sadott Pacheco Alcalá investigadores del IMP. Al Dr. José Gerardo Cabañas director del CNMN por las facilidades y el apoyo otorgado hacia el trabajo de tesis.

A los integrantes del comité tutorial, doctoras Gloria Dávila y Georgina Calderón y doctores Jorge Alberto Mendoza y Gustavo Fidel Gutiérrez, por sus contribuciones y asesorías para la realización de la tesis y a lo largo de los estudios doctorales.

APOYO FINANCIERO

Este trabajo contó con el apoyo financiero de la **Secretaría de Posgrado e Investigación (SIP)** del Instituto Politécnico Nacional, **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** y **Cátedra Coca Cola-CONACyT** para Jóvenes Investigadores 2011 a través de los siguientes proyectos:

Proyectos SIP-IPN:

Procesamiento de imágenes aplicado al estudio de la estructura a escalas macro, micro y nanométrica de biomateriales con aplicaciones en la ingeniería de alimentos y ambiental. Clave SIP: 20080510. Director de Proyecto: Dr. José Jorge Chanona Pérez.

Estudio fisicoquímico y estructural de materiales biológicos a través de técnicas de espectroscopia, microscopia y análisis de imágenes. Clave SIP: 20091151. Director de Proyecto: Dr. José Jorge Chanona Pérez.

Caracterización y construcción de biomateriales mediante microscopia convencional y de alta resolución con aplicación en alimentos. Clave SIP: 20100771. Director de Proyecto: Dr. José Jorge Chanona Pérez.

Construcción y caracterización de películas biopoliméricas puras y compuestas como sistemas de barrera para la conservación y funcionalización de materiales biológicos. Clave SIP: 20110627. Director de Proyecto: Dr. José Jorge Chanona Pérez.

Otros proyectos:

Proyecto CONACyT aceptado en la convocatoria 2006 con clave 59730 modalidad investigador Joven, vigencia 2007-2009. Análisis microestructural de biomateriales sometidos a procesos térmicos y su relación con sus propiedades de funcionalidad. Director de Proyecto: Dr. José Jorge Chanona Pérez.

Cátedra Coca-Cola-CONACyT para Jóvenes Investigadores 2011: Estructura de Alimentos a escalas macro, micro y nanométricas.

El autor de la tesis también contó con la beca del CONACyT que se otorga a los estudiantes inscritos en los programas del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC); así como también contó con la beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del IPN.

DEDICATORIAS

A dios por darme la vida.

A mi abuelo Ángel Perea Rosales[†] por darme todo lo que se puede dar a un ser querido... gracias, siempre estarás en mi corazón y nunca te olvidare.

A mis padres, Manuela Flores y Evaristo Perea, la gran fortaleza de la familia y mi mayor orgullo. En las buenas y en las malas, quienes me enseñaron que con amor, trabajo, dedicación y perseverancia se puede lograr todo.

A mis hermanos, Roberto, Olaf, Angel Evaristo, Viviana y Cinthia Daniela; quienes me dan todo su apoyo, cariño, comprensión, alegrías y amor para que en momentos malos siempre vea lo bueno, los quiero mucho hermanitos.

A mis grandes amigos Jocelyn, Luis, Javier y Nayeli que siempre estuvieron ahí, y me mostraron el verdadero valor de la amistad.

A mis Directores de tesis, quienes me dieron todo su apoyo y confianza para la realización de este trabajo de investigación. Y que en todo momento estuvieron conmigo.

Al Dr. Eduardo Térres y Dr. Ubaldo Sadott Pacheco del Instituto Mexicano del Petróleo, quienes me abrieron las puertas del conocimiento y fueron mis tutores en todo momento, gracias.

A Ing. Nayeli Vélez Rivera y Dr. Israel Arzate Vázquez por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo, y a mis compañeros de trabajo Dr. Adrián Martínez, Dr. Juan Vicente Méndez, M en C. Luis Moreno y M en C. Claudia Ramos por su apoyo y amistad.

A Leticia Peña por su ejemplo y tenacidad.

A mis grandes amigos, compañeros y doctores del posgrado y laboratorio, que de alguna forma enriquecieron mi vida profesional y vida personal.

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN ASOCIADOS A LA TESIS

Artículos en revistas incluidas en el Journal Citation Reports (JCR)

1. **Perea-Flores, M.J.**, Chanona-Pérez, J.J., Garibay-Febles, V., Calderón-Domínguez, G., Terrés-Rojas, E., Mendoza-Pérez, J.A., Herrera-Bucio, R. (2011). Microscopy techniques and image analysis for evaluation of some chemical and physical properties and morphological features for seeds of the castor oil plant (*Ricinus communis*). *Industrial Crops and Products*. 34 (1): 1057-1065. Factor de Impacto: 2.507.
2. **Perea-Flores, M.J.**, Garibay-Febles, V., Chanona-Pérez, J.J., Calderón-Domínguez, G., Méndez-Méndez, J.V., Palacios-González, E., Gutiérrez-López, G.F. (2011). Mathematical modelling of castor oil seeds (*Ricinus communis*) drying kinetics in fluidized bed at high temperatures. *Industrial Crops and Products*. Manuscript Number: INDCRO-D-11-00650. Enviado para su publicación. Factor de Impacto: 2.507.
3. **Perea-Flores, M.J.**, Domínguez-Fernández, R.N., Terrés-Rojas, E., Pacheco-Alcalá, U.S., Gutiérrez-López, G.F., Garibay-Febles, V., Chanona-Pérez, J.J. (2009). Estudio de la Microestructura de Alimentos mediante las Técnicas Microscópicas. *Acta Microscópica*, Vol. 18, Supp. C. ISSN: 0798-4545.
4. **Perea-Flores, M.J.**, Velez-Rivera, N., Solís-Ceja, A.Y., Terrés-Rojas, E., Calderón-Domínguez, G., Garibay-Febles, V., Chanona-Pérez, J.J. (2011). Several microscopy techniques and image analysis to study the microstructure and microchemical composition of higuierilla seed "*Ricinus communis*": a potential source of biofuels. *Acta Microscópica*, Vol. 20, Supp. B. ISSN: 0798-4545.
5. Mendoza-Madrigal, A.G., **Perea-Flores, M.J.**, Gutiérrez-Martínez, S.M., Palacios-González, E., Terrés-Rojas, E., Garibay-Febles, V., Chanona-Pérez, J.J. (2011). Estudio de la micro y ultraestructura de cuerpos lipídicos de *Ricinus communis* sometidos a extracción mediante microscopía electrónica de barrido y haz de iones focalizados. *Acta Microscópica*, Vol. 20, Supp. B. ISSN: 0798-4545.

Resúmenes en extenso, cortos, ponencias orales y carteles en eventos científicos de la especialidad.

1. P.J.J. Chanona, V.I. Arzate, **F.M. Perea**, C.C. Gumeta, B.A. Vazquez, D.G. Calderón, B. L. Alamilla, P.J. Mendoza and L.G.F. Gutiérrez. *Characterization of Food materials structure during their storage and processing by image analysis methodology*. 1st. International ISEKI Food Conferences (10-13 de Septiembre del 2008, Porto-Portugal) (Cartel).
2. **Perea Flores, M.J.**; Chanona Pérez, J.J.; Cruz-Cruz, L.; Mendoza Pérez, J.J.; Herrera Bucio, R.; Gutiérrez López, G.F. *Secado convectivo de Ricinus communis (Higuerilla)*. VII Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos (6-9 de Septiembre, Bogotá, Colombia, 2010) (Resumen en extenso y Cartel).
3. **Perea-Flores, M. J.**; Dominguez-Fernández, N.; Terrés-Rojas, E.; Pacheco-Alcalá, U. S.; Gutiérrez-López, G. F.; Garibay-Febles, V.; Chanona-Pérez, J. J. *Estudio de la microestructura de alimentos mediante Técnicas microscópicas*. 10th Inter-American Congress of Electron Microscopy (CIASEM 2009) and 1st Congress of the Argentine Society of Microscopy (SAMIC 2009). October 25-28 del 2009. Rosario City – Argentina. (Resumen en extenso y cartel).
4. **María de Jesús, Perea-Flores**; Stephany Montserrat, Gutiérrez-Martínez; Eduardo, Terrés-Rojas; Jorge Alberto, Mendoza-Pérez; Rafael, Herrera-Bucio; Vicente, Garibay-Febles; José Jorge, Chanona-Pérez. *Efecto del tratamiento térmico sobre la estructura de la higuerilla (Ricinus communis) para la extracción de aceite*. XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Acapulco, Guerrero del 22 al 26 de marzo de 2010. (Ponencia oral, cartel y extenso).

5. **Perea-Flores, M.J.;** Vélez-Rivera, N., Terrés-Rojas, E.; Pacheco-Alcalá, U.S.; Mendoza-Pérez, J.A.; Garibay-Febles, V.; Chanona-Pérez, J.J. *LM, ESEM, CLSM, AFM Y análisis de imágenes: herramientas potenciales para la caracterización de biomateriales.* X Congreso Nacional de Microscopía Morelia, Michoacán (23-27 de mayo del 2010). (Resumen en extenso y cartel).
6. **Perea, María J.,** Velez, Nayeli., Terrés, Eduardo., Mendoza, Jorge A., Gutiérrez, Gustavo F., Garibay, Vicente., Chanona, José J. *Evaluation of microstructural changes during convective drying of higuierilla seeds (Ricinus communis) by environmental scanning electron microscopy and image analysis.* 11th. International Symposium on the Properties of Water (ISOPOW 11), Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems. Querétaro, México. (5-9 de Septiembre 2010). (Cartel)
7. **Perea-Flores, M.J.,** Velkez-rivera, N., Arzate-Vazquez, I., Terrés-Rojas, E., Gutierréz-López, G.F., Garibay-Febles, V., Chanona-Pérez, J.J. *Evaluation of microstructural changes of higuierilla (Ricinus communis) during convective drying by means of microscopy techniques.* The 17 IFSM International Microscopy Congress IMC17. Rio de Janeiro, September 19-24, 2010 (Resumen en extenso y cartel).
8. **Perea-Flores, M.J.,** Chanona-Pérez, J.J., Terrés-Rojas, E., Mendoza-Pérez, J.A., Hernández-Hernández, H.M., Gutiérrez-López, G.F., Garibay-Febles, V. *Effect of Fluidized-bed drying on the microstructure of higuierilla seeds (Ricinus communis). An alternative source of protein and biofuel.* 11th International Congress on Engineering and Food. 22 al 26 de Mayo del 2011. Atenas, Grecia. “Food Process Engineering in a Changing World” (Resumen en extenso y cartel).
9. **Perea-Flores, M.J.,** Terrés-Rojas, E., Velez-Rivera, N., Arzate-Vazquez, I., Mendoza-Madrigal, A.G., Garibay-Febles, V., Chanona-Pérez, J.J. *Microstructure characterization of higuierilla seed (Ricinus communis) by microscopy techniques and image analysis.* 6th International CIGR Technical Symposium. Towards a Sustainable

Food Chain. Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management. 10 al 20 de Abril del 2011. Nantes, Francia. (Cartel y extenso).

10. **Perea-Flores, M.J.**, Velez-Rivera, N., Solís-Ceja, A.Y., Terrés-Rojas, E., Calderón-Domínguez, G., Garibay-Febles, V., Chanona-Pérez, J.J. *Several microscopy techniques and image analysis to study the microstructure and microchemical composition of higerilla seed "Ricinus communis": a potential source of biofuels.* XI Congreso Interamericano de Microscopía CIASEM 2011. 25 al 29 de Septiembre del 2011. Mérida, Yucatán. (Resumen en extenso y cartel).
11. Mendoza-Madrigal, A.G., **Perea-Flores, M.J.**, Gutierréz-Martínez, S.M., Palacios-González, E., Terrés-Rojas, E., Garibay-Febles, V., Chanona-Pérez, J.J. *Estudio de la micro y ultraestructura de cuerpos lipídicos de Ricinus communis sometidos a extracción mediante microscopía electrónica de barrido y haz de iones focalizados.* XI Congreso Interamericano de Microscopía CIASEM 2011. 25 al 29 de Septiembre del 2011. Mérida, Yucatán. (Resumen en extenso y cartel).

Capítulos de libros

1. **M.J. Perea-Flores**, J.J. Chanona-Pérez, E. Terrés-Rojas, G. Calderón-Domínguez, V. Garibay-Febles, L. Alamilla-Beltrán, G.F. Gutiérrez-López. (2010). Chapter 8: *Microstructure characterization of milk powders and their relationship with rehydration properties.* In Spray Drying Technology. Edited by Meng Wai Woo, Wan Ramli Wan Daud, Arun S. Mujumdar. Transport Processes Research (TPR) Group National University of Singapore, Singapore. ISBN - 978-981-08-6270-1, Published in Singapor.
2. **Perea-Flores, M.J.**, Mendoza-Madrigal, A.G., Chanona-Pérez, J.J., Alamilla-Beltrán, L., Gutiérrez-López, G.F. (2012). Chapter 22: *Microscopy Techniques and Image Analysis for the Quatitative Evaluation of Food Microstructure.* In Food Processing Handbook, 2ª. Edición. Editado por: James G. Brennan y Alistair S.

Grandison. Editorial Wiley-VCH, Weinheim, Alemania. ISBN – 978-3-527-32468-2. Pp. 667-692.

Premios y distinciones

1. **Primer Lugar** en el concurso de trabajos libres en el área de **Desarrollo Sustentable** del XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Acapulco, Guerrero del 22 al 26 de Marzo del 2010. Con el trabajo titulado *Efecto del tratamiento térmico sobre la estructura de la higuera (Ricinus communis) para la extracción de aceite*. XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Acapulco, Guerrero del 22 al 26 de marzo de 2010.

CONTENIDO GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	25
ÍNDICE DE CUADROS	29
RESUMEN.....	30
ABSTRACT	32
INTRODUCCIÓN	34
1.1. Biocombustibles y su relación con la crisis alimentaría.....	34
1.2. Ricinus communis “higuerilla”	35
1.2.1. Aceite de ricino.....	38
1.3. Extracción de aceites	39
1.4. Fundamentos del secado	41
1.4.1. Periodos de secado.....	41
1.4.2. Mecanismos de transferencia.....	43
1.4.3. Secado de materiales biológicos.	47
1.5. Relación estructura-propiedad-funcionalidad de materiales biológicos.....	50
1.5.1. Propiedades físicas, fisicoquímicas y estructurales	52
1.5.2. Propiedades bioquímicas	53
1.5.3. Estructura de materiales biológicos	54
1.6. Herramientas para el análisis de la microestructura.	56
1.6.1. Microscopía	56
1.6.2. Análisis de imágenes	58
1.6.2.1. Adquisición de la imagen.....	61
1.6.2.2. Pre-procesamiento de la imagen	61
1.6.2.3. Segmentación de la imagen.....	62

1.6.2.4.	Extracción de parámetros	62
1.6.2.5.	Clasificación.....	62
1.7.	Espectroscopía Raman	63
2.	JUSTIFICACIÓN	65
3.	HIPÓTESIS	65
4.	OBJETIVOS	66
4.1.	Objetivo General	66
4.2.	Objetivos Particulares	66
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	67
5.1.	Materiales, Equipo y Software	67
5.2.	Metodología	69
5.2.1.	Acondicionamiento de la materia prima	70
5.2.2.	Capítulo I. Caracterización química, física y microestructural de la semilla <i>R. communis</i> mediante las técnicas de microscopía y el análisis de imágenes.....	70
5.2.2.1.	Caracterización química	70
5.2.2.2.	Caracterización física	72
5.2.2.2.	Caracterización microestructural	75
5.2.3.	Capítulo II. Modelado matemático de las cinéticas de secado por lecho fluidizado a altas temperaturas de las semillas de <i>R. communis</i>	81
5.2.3.1.	Acondicionamiento de la materia prima y determinación de parámetros hidrodinámicos	81
5.2.3.2.	Proceso de secado.....	82
5.2.3.3.	Modelado matemático de las cinéticas de secado.....	85
5.2.3.4.	Estimación del coeficiente de difusividad efectiva (D_{eff}) y de la energía de activación	89
5.2.4.	Capítulo III. Cambios estructurales en la semilla de <i>R. communis</i> debidos al secado por lecho fluidizado.....	92

5.2.4.1. Testa	92
5.2.4.1.1. Acondicionamiento de la muestra	92
5.2.4.1.2. Análisis de la fractura.....	92
5.2.4.1.3. Evaluación de los cambios estructurales	94
5.2.4.2. Endospermo	94
5.2.5. Capítulo IV. Espectroscopía Raman	95
5.2.6. Capítulo V. Extracción del aceite de ricino	96
5.2.6.1. Acondicionamiento de la muestra	96
5.2.6.2. Tiempo de contacto	96
5.2.6.3. Extracción de aceite.....	97
5.2.6.4. Evaluación de los cambios microestructurales	97
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
6.1. Capítulo I. Caracterización química, física y microestructural de la semilla de R. communis mediante las técnicas de microscopía y el análisis de imágenes.	100
6.1.1. Caracterización química.....	100
6.1.2. Caracterización física.....	101
6.1.3. Caracterización microestructural	102
6.2. Capítulo II. Modelado matemático de las cinéticas de secado por lecho fluidizado a altas temperaturas de las semillas de R. communis.....	120
6.2.1. Hidratación.....	120
6.2.2. Cinéticas de secado	120
6.2.3. Análisis de las curvas de velocidad de secado	123
6.2.4. Modelado matemático de las cinéticas de secado	125
6.2.5. Difusividad efectiva (D_{eff}) y energía de activación.....	129
6.3. Capítulo III. Cambios estructurales en la semilla de R. communis debidos al secado por lecho fluidizado.....	136
6.3.1. Testa.....	136
6.3.1.1. Prueba de compresión.....	136
6.3.1.2. Análisis del patrón de fractura.....	138
6.3.2. Evaluación de los cambios estructurales en la testa.....	141
6.3.3. Evaluación de los cambios estructurales en el endospermo.....	145

6.4. Capítulo IV. Espectroscopía Raman	148
6.5. Capítulo V. Extracción del aceite de ricino.....	155
6.5.1. Extracción por el método de soxhlet.....	155
6.5.2. Evaluación de los cambios microestructurales debidos a la extracción.....	159
7. CONCLUSIONES	166
8. BIBLIOGRAFÍA.....	168

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Planta y b) Valva con semillas de <i>Ricinus communis</i>	36
Figura 2. Estructura cuaternaria de la ricina vista de forma tridimensional mediante cristalografía de rayos X. Consta de dos proteínas unidas por un puente de disulfuro. La cadena RTB se muestra en color verde, la RTA de acuerdo a su estructura α -hélice es rosa y β -filamento en amarillo y el espiral en blanco. El sitio de unión por el puente disulfuro es azul (Tomada de Lord y col, 1994; Bradberry, 2007). La cadena RTA es una N-glucosidasa hidrolasa que inhibe la síntesis de proteínas. La cadena RTB es una lectina que ayuda a la unión de la ricina con las células.	37
Figura 3. Esquema que muestra los diferentes mecanismos que suceden durante la extracción solido-liquido del aceite en materiales biológicos.	40
Figura 4. Curva típica de secado para un sólido húmedo en aire caliente a temperatura constante. La curva muestra la variación del contenido de humedad en función del tiempo (Tomada de Foust y col, 1978).....	43
Figura 5. Mecanismos de transporte de humedad (Adaptada de Sablani y Rahman, 2008).	44
Figura 6. Posibles cambios en el tejido celular vegetal inducidos debidos al secado.	51
Figura 7. Imágenes binarias de los fragmentos de la fractura de las muestras de almendras después de la compresión, de izquierda a derecha: 1, 5, 3, 4, 5 y 6 minutos de tostado (Tomada de Varela y col, 2008).....	53
Figura 8. Enfoque microestructural para la ingeniería de los productos alimenticios y su relación estructura-propiedad (Tomada de Aguilera, 2000b).	55
Figura 9. Uso de las diferentes microscopias para el estudio de la influencia del secado de café a 40°C sobre la ultraestructura. (a) Microscopia de luz, en donde puede observarse el aceite en la forma globular dentro de la célula, (b) MEB en donde se observa la integridad de la membrana y los espacios intracelulares vacíos y (c) MET observándose las vesículas intactas (Tomada de Borem y col, 2008).....	58
Figura 10. Pasos del análisis de imágenes de acuerdo con Pedreschi y col, (2004).	61
Figura 11. Espectro Raman de (a) fibras de algodón marrón encontradas en el sospechoso, (b) fibras de algodón encontradas en la victima. (Espectro tomado de Das y Agrawal (2011)) Los espectros Raman cuentan en el eje de las x (intensidad en unidades arbitrarias).....	64
Figura 12. Diagrama de flujo del trabajo experimental	69
Figura 13. Dimensiones axiales características de las semilla de <i>R. communis</i> para determinar la esfericidad (L: longitud mayor, W: ancho o longitud menor y T: altura).	74

Figura 14. Esquema 3D del equipo de secado por lecho fluidizado del Laboratorio de Ingeniería en Alimentos. (1) Válvula reguladora del gas, (2) balanza digital analítica, (3) termobalanza, (4) turbo ventilador, (5) variador de frecuencia o controlador de la velocidad del flujo de aire, (6) manómetro, (7) termoanemómetro, (8) termopar tipo K envuelto en algodón húmedo conectado a un termómetro digital, (9) lecho de semillas *R. communis*, (10) columna de secado. 84

Figura 15. Imágenes de Estereomicroscopia de las semillas de *R. communis*. Vistas superior y lateral (a, b y c, respectivamente), semillas sin testa (d) y separada en cotiledones cortados transversal y longitudinal (e y f, respectivamente). sc, testa; c, carúncula; co, cotiledones; rs, eje del brote de la raíz; ep, epidermis; en, endospermo; m, micrópilo; em, embrión. 103

Figura 16. Imágenes de Microscopia Óptica del endospermo de las semillas de *R. communis*. Pared celular teñidas con verde rápido (FCF) y endospermo (a); la epidermis y el embrión son remarcados por la tinción de verde rápido (b); color naranja característico corresponde a los cuerpos lipídicos teñidos con Sudan IV (c) y toda la célula teñida con azul de metileno para contrastar las estructuras (d). ep, epidermis; en, endospermo; em, embrión; lb, cuerpos lipídicos; pb, cuerpos proteicos; cw, pared celular. 106

Figura 17. Imágenes de Microscopia Confocal de Barrido Laser que muestran la autofluorescencia del endospermo de la semilla de *R. communis*. Verde: cuerpos lipídicos; rojo: cuerpos proteicos. 108

Figura 18. Imágenes de Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental de una sección de la semilla de *R. communis*. en, endospermo; te, tegumento; ep, epidermis; vb, haz vascular; Mc, células de Malpighi. 110

Figura 19. Imágenes de Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental la semilla de *R. communis*. en, endospermo; cw, pared celular; cy, citoplasma; lb, cuerpos lipídicos; pb, cuerpos proteicos; em, embrión. 112

Figura 20. Imágenes de Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental del endospermo de las semillas de *R. communis*. (a) Imagen de la células vista por el detector BSE acoplado al MEBA; (b) Espectro EDS y (c) Técnica de mapeo químico elemental de la composición de la semilla de *R. communis*. 115

Figura 21. Micrografías de MEBA con el detector de electrones retrodispersos (BSD) y EDX del endospermo de las semillas teñidas con Solución de Nitrato de plata y paraformaldehído (1%) a diferentes aumentos de observación, para la identificación de los cuerpos proteicos unidos a la Plata (Ag). Así como también se muestra el espectro del análisis químico elemental en donde se identifica la presencia del Ag y el mapeo de ésta. El espectro es la relación de la energía de rayos X característicos (KeV) y la intensidad del elemento. 117

Figura 22. Cinéticas de secado por lecho fluidizado de las semillas de <i>R. communis</i> a cuatro diferentes temperaturas de aire de secado (80, 90, 100 y 100°C), con un lecho L/D= 0.5 correspondiente a 250g durante el tiempo necesario para que cese la pérdida de humedad.	122
Figura 23. Velocidad de secado de las semillas <i>R. communis</i> sometidas a secado por lecho fluidizado a las cuatro temperaturas (80-110°C).....	124
Figura 24. Cinéticas de secado de las semillas de <i>R. communis</i> secadas por lecho fluidizado, ajustadas por el modelo de aproximación de la difusión en función del tiempo de secado.	127
Figura 25. Regresión lineal del ln de la humedad adimensional en función del tiempo de secado a diferentes temperaturas para las semillas de <i>R. communis</i>	130
Figura 26. Relación tipo Arrhenius entre el logaritmo de las difusividad efectiva (D_{eff}) y el inverso de la temperatura absoluta.....	133
Figura 27. Prueba de compresión. Fuerza (N) contra distancia (mm), de la comparación de las semillas de <i>R. communis</i> nativa (sin tratamiento) con las secadas por lecho fluidizado a diferentes condiciones (80-110°C).	137
Figura 28. (A) Imágenes binarias de los fragmentos de las muestras después de la fractura por compresión. (B) Numero de fragmentos respecto al tratamiento térmico de las semillas de <i>R. communis</i> . (C) Distribución del tamaño de fragmentos después de fracturar las semillas secadas a diferentes condiciones y la nativa (calculado por el análisis de imágenes).	140
Figura 29. Imagen de Estéreo microscopia de las semillas de <i>R. communis</i> sometidas a secado por lecho fluidizado a diferentes temperaturas.....	141
Figura 30. Galería de micrografías de MEBA, que muestran los diferentes tipos de fracturas microscópicas en la testa de las semillas de <i>R. communis</i> sometidas a secado por lecho fluidizado a cuatro temperaturas (80, 90, 100 y 110°C) comparadas con las semillas sin tratamiento. Aumentos de de 300X y 1000X.	144
Figura 31. Galería de micrografías de MEBA del efecto del tratamiento térmico sobre la testa y endospermo de las semillas de <i>R. communis</i> a una amplificación de 300X.....	146
Figura 32. Espectro Raman del endospermo de la semilla <i>R. communis</i> nativa.	149
Figura 33. Espectros Raman del endospermo de la semilla de <i>R. communis</i> sometida a secado por lecho fluidizado (a) 80°C y (b) 90°C.	150
Figura 34. Espectros Raman del endospermo de la semilla de <i>R. communis</i> sometida a secado por lecho fluidizado (a) 100°C y (b) 110°C.	150
Figura 35. Espectros Raman del endospermo de la semilla <i>R. communis</i> nativa y comparada con las sometidas a secado por lecho fluidizado a 80, 90, 100 y 110°C.	151

Figura 36. Mapeos Raman de la distribución de los componentes principales (lípidos y proteínas) de la semillas de *R. communis* nativa. Para el caso de las proteínas, se muestra la distribución de las amidas. 152

Figura 37. % de aceite extraído de la semilla nativa y a diferentes tiempos de reflujo. 155

Figura 38. Imágenes de MEBA del efecto del tiempo de remoción de los lípidos sobre la microestructura del endospermo. 157

Figura 39. % de aceite extraído de la semilla nativa y tratada a diferentes temperaturas de secado. 158

Figura 40. Efecto del secado por lecho fluidizado sobre la microestructura de la semilla 162

Figura 41. Graficas de los parámetros texturales (segundo momento angular, diferencia de momento inverso, entropía y textura fractal) extraídos de las imágenes de MEBA de los diferentes tratamientos térmicos o condiciones de secado (80-110°C) y nativo..... 164

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Algunos trabajos importantes acerca del secado de materiales biológicos.	48
Cuadro 2. Comparación de microscopios (Adaptada de Aguilera y Stanley, 1999).....	57
Cuadro 3. Aplicaciones de la técnica de análisis de imágenes para la evaluación cuantitativa de diversos parámetros de materiales biológicos, imágenes tomadas con cámara con dispositivo de carga acoplada (Tomado de Du y Sun, 2004).	60
Cuadro 4. Caracterización fisicoquímica de las semillas de <i>R. communis</i> y sus procedimientos analíticos usados para su análisis	70
Cuadro 5. Intervalos de los tamaños y pesos de las semillas utilizadas para la prueba de compresión.	92
Cuadro 6. Resumen de algunas propiedades químicas y físicas, y características morfológicas de las semillas de <i>R. communis</i>	118
Cuadro 7. Resultados estadísticos obtenidos a partir de los parámetros estimados para la semillas de <i>R. communis</i>	128
Cuadro 8. Valores de difusión efectiva de diversos materiales biológicos a diferentes condiciones de secado	131
Cuadro 9. Parámetros de las fracturas extraídos a partir de las imágenes binarias y aplicando el análisis de imágenes.	139
Cuadro 10. Valores de los parámetros de textura extraídos de las imágenes de la torta residual de las semillas de <i>R. communis</i> obtenías con el MEBA.	165

Resumen

Los objetivos de este trabajo fueron realizar: (i) una caracterización química, física y microestructural de la semilla, (ii) modelar matemáticamente las cinéticas de secado por lecho fluidizado, (iii) evaluar los cambios estructurales en la testa y endospermo de la semilla debido al tratamiento térmico, (iv) evaluar el efecto que tiene el secado por lecho fluidizado de la semilla sobre los rendimientos de extracción del aceite y su efecto en la microestructura final de la torta y (v) caracterización química y el efecto del secado en el endospermo de la semilla mediante espectroscopía Raman.

Para la caracterización química, física y microestructural de la semilla se emplearon técnicas fisicoquímicas y de microscopía, así como análisis de imágenes para obtener parámetros cuantitativos de la macro y microestructura y propiedades físicas y química de las semillas. Los resultados más relevantes de esta parte del estudio fueron confirmar el alto contenido de aceite (51.6 % bh) y proteínas (28.5 % bh) en el endospermo de las semillas. El microanálisis químico mostró que las células del endospermo contienen minerales como Mg, P, S, K que están asociados a las proteínas y lípidos. Se evidenció un alto número cuerpos lipídicos por célula del endospermo (9.6 por célula); células del endospermo con un diámetro mayor promedio de 44.01 μm , células del embrión con 28.2 μm y cuerpos lipídicos de 12.5 μm . Este estudio fue importante para comparar los cambios microestructurales ocurridos cuando las semillas son secadas por lecho fluidizado a diferentes temperaturas (80, 90, 100 y 110 °C) y a una velocidad de aire de secado de 7 m/s. A partir de los datos de pérdida de humedad, se obtuvieron cinéticas de secado que sugieren que las semillas se deshidratan en el periodo de velocidad decreciente y que la estructura controla la difusión del vapor de agua. Las cinéticas de secado se modelaron matemáticamente, el modelo llamado aproximación de la difusión fue el que mejor ajuste proporciono. Se obtuvieron coeficientes de difusividad efectiva (D_{eff}) en un intervalo de 8.21×10^{-10} a 2.61×10^{-9} m^2/s para las temperaturas ensayadas y una energía de activación (41.41 kJ/mol), estos parámetros pueden ser utilizados en el diseño y simulación de equipo de secado. Los estudios microestructurales incluyeron observaciones de los cambios ocurridos en el endospermo y la testa debido al secado; esto fue asociado a las pruebas de

compresión, donde se obtuvo una máxima fuerza para la fractura de la testa de alrededor de 67.5 N para la semilla nativa y 62 N para las semillas tratadas térmicamente. Asimismo, se cuantificó el patrón de fractura de los fragmentos generados y el efecto que tiene el secado sobre ellas; estos datos son útiles para procesos de descascarado de semillas. Se evidenció el efecto del secado por lecho fluidizado sobre las células del endospermo, el cual mostro que a mayor temperatura de secado mayor destrucción de las estructuras celulares. Los cambios estructurales inducidos en el endospermo mejoraron los rendimientos de extracción del aceite de las semillas tratadas térmicamente (61.23 % a 80 °C, 62.30 % a 90 °C, 63.92 % a 100 °C y 64.27 % a 110 °C) en comparación con las semillas sin tratamiento (53.16 %), esto fue asociado a un mayor daño estructural de las células del endospermo. Los estudios microestructurales permitieron observar una disminución de los cuerpos lipídicos en la torta residual a mayor temperatura de secado y después de ocho horas de extracción. La espectroscopía Raman realizada sugiere que las condiciones de 80 y 110°C los lípidos contenidos en las semillas sufrieron los mayores cambios conformacionales tanto en su estructura como en su composición. El efecto global que tiene el secado por lecho fluidizado de las semillas de *R. communis* sobre la estructura, y en la extracción del aceite pudo describirse exitosamente de forma cualitativa y cuantitativa a partir de las técnicas de microscopia, técnicas de espectroscopía y análisis de imágenes. La contribución más relevante de esta investigación fue que se generó conocimiento básico y aplicado, que podrían ser de utilidad en el futuro para un aprovechamiento integral de la semilla de *R. communis* con aplicaciones en la industria alimentaria y energética.

Abstract

The objectives of this study were: (i) chemical, physical and microstructural characterization of the seed, (ii) mathematically modeling of fluidized drying bed kinetics, (iii) evaluate the structural changes in the seed coat and endosperm of the seed due to heat treatments, (iv) evaluate the effects of the fluidized drying bed on the seed and the extraction yields of oil and its effects on the final microstructure of the residual cake and (v) chemical characterization and the endosperm seed effects of drying using raman spectroscopy.

In order to obtain physical and chemical quantitative parameters of the macro and microstructure of the seed were used image analysis, physicochemical and microscopy techniques. The most important results were the confirmation of the high lipids content (51.6% wb) and protein (28.5% wb) in the endosperm. The chemical microanalysis showed that the endosperm cells contain minerals such as Mg, P, S, K that are associated to proteins and lipids. Also it was found that there are a high number of lipids bodies in the endosperm per cell (9.6 lb per cell); endosperm cells with average diameter of 44.01 μm , cells of the embryo of 28.2 μm and lipid bodies of 12.5 μm diameter. This study was important to compare the microstructural changes that occurred when the seeds are dried out by fluidized bed at different temperatures (80, 90, 100 and 110 ° C) and drying air velocity of 7 m / s. With the help of the moisture loss data was possible to obtained drying kinetics which suggest that the seeds were dehydrated in decreasing rate period and that the structure controls the diffusion of water vapor. The drying kinetics were modeled mathematically and it was found that the diffusion approximation model provide the best fit. The coefficients of effective diffusivity were obtained (D_{eff}) in the range of 8.21×10^{-10} - 2.61×10^{-9} $\text{m}^2 \text{ a} / \text{s}$ for the temperatures tested and an activation energy of (41.41 kJ / mol), these parameters can be used in the design and simulation of drying equipment. The microstructural studies included observations of the changes in the endosperm and testa due to drying, and this was associated to the compression tests, where it was found that the maximum force to fracture the head is about 67.5 N for the native seeds and 62 N for heat-treated seeds. Also it was quantified the fracture pattern of fragments generated and the

effect of drying process on them, these data are useful for seed hulling process. The results showed the effects of the fluidized bed drying on the endosperm cells, which allows concluding that at higher drying temperature, increased the destruction of cellular structures. The structural changes induced in the endosperm improved the extraction yields of oil from the seeds treated thermally (61.23% at 80 ° C, 62.30% at 90 ° C, 63.92% at 100 ° C and 64.27% at 110 ° C) compared with the untreated seeds (53.16%), this was associated with increased of the structural damage of the cells of the endosperm. Microstructural studies allowed observing a decrease of lipid bodies in the residual cake dry out at higher temperatures and after eight hours of extraction. Raman spectroscopy suggests that to conditions of 80 and 110 ° C the lipid content in the seeds were the main conformational changes in structure and composition. The overall effect that has the fluidized bed drying over the seeds structure, and extraction content of oil was successfully described qualitatively and quantitatively with the used techniques of microscopy, spectroscopy and image analysis. The most relevant contribution of this research was that it was generated basic and applied knowledge, which could be useful in the future for a better utilization of the seed of *R. communis* with applications in food and energy industry.

1. Introducción

1.1. Biocombustibles y su relación con la crisis alimentaria

Desde algunos años el mundo atraviesa una crisis alimentaria por el aumento de los precios de los alimentos básicos como el maíz, arroz, trigo, entre otros, debido a que gran parte de las tierras destinadas a la producción de estos alimentos, así como su cosecha se ha destinado a la producción de biocombustibles, como el bioetanol y biodiesel; esto ha sido promovido por el creciente consumo del petróleo y agotamiento de las reservas petrolíferas. El impacto ambiental que tiene el consumir los combustibles fósiles ha generado el desarrollo de energías renovables, como una nueva alternativa. (Ortiz y Fernández, 2004; Falasca y Ulberich, 2005; Espinosa y col, 2008). Normalmente el bioetanol es un alcohol hecho a partir de azúcar, almidón y productos que los contienen, como es el caso de algunos granos o de la caña de azúcar, a través de un proceso de fermentación y destilación, el biodiesel es producido a partir de diversos aceites vegetales y grasas animales; los cuales son convertidos químicamente a esteres, ambos son usados como una fuente de poder para carros, tractores y aeroplanos. Los grandes productores son Brasil (etanol y biodiesel), Estados Unidos (etanol), Alemania (biodiesel), y Austria (biodiesel), entre otros países (Ma y Hanna, 1999; Umar y col, 2008).

El biodiesel posee diversas virtudes entre las cuales se pueden incluir las siguientes (Ma y Hanna, 1999; Umar y col, 2008):

- El biodiesel tiene un valor calorífico de más de 90% que el diesel de petróleo y ofrece un poder energético comparable.
- Posee una alta viscosidad, tiene un gran poder lubricante por lo que reduce el desgaste de la bomba del inyector y el motor.
- No es tóxico, no contiene compuestos aromáticos y casi ningún azufre.
- Es biodegradable e incrementa su degradabilidad cuando este se somete a elevados esfuerzos de corte (mezclado), y cualquier derramamiento de combustible no contamina el ambiente.

- Las emisiones de CO₂ emitidas cuando combustionan es igual a la cantidad consumida por la planta durante el periodo de crecimiento.
- Reduce las condiciones de invernadero, resultado de la emisión de CO₂ al ser usado como combustible, siendo este igual al consumido por las plantas durante el periodo de crecimiento.
- El calor del motor se disipa mejor al utilizar el biodiesel, en comparación con el diesel comercial.
- No requiere modificación del sistema carburante y del motor antes de usar.
- El material base es renovable.

Sin embargo, la producción del biodiesel compite con la industria alimentaría por que la materia prima usada consiste en aceites comestibles, por tanto es necesario la búsqueda de nuevas alternativas, tal es el caso de aceites vegetales no comestibles (Umar y col, 2008) o a partir de los desechos agroindustriales. En México, diversas investigaciones se realizan con el objetivo de buscar nuevas alternativas para la producción de biocombustibles, tal es el caso de la obtención de grasa de cocina que desechan restaurantes, o de los aceites de semillas no comestibles provenientes de plantas como son *Jatropha curcas* e higuierilla (Notimex, 2007; Bringas, 2008; Notimex, 2008; Crespo, 2009).

1.2. *Ricinus communis* “higuerilla”

Ricinus communis L. (Euphorbiaceae) comúnmente llamado semilla de castor, planta del aceite de ricino, ricino, higuerilla, mamona, entre otros usados (Ali y col, 2008; Scholz y Da Silva, 2008), es un arbusto perennifolio (Figura 1.a.) de la familia euforbiácea, de crecimiento rápido. El ricino es una planta herbácea que llega a medir hasta 8-10 m de altura, habita de forma silvestre y es considerada como maleza que crece en las cunetas de las carreteras, bordes de arroyos, jardines, tierras de labor, etc. El fruto es una cápsula dehiscente de tres valvas, ovoide, de 1-2 cm de diámetro, con la superficie cubierta por espinas color rojo antes de la maduración. Contiene 3 semillas elipsoides grandes y brillantes, de color pardo rojizo, con manchas tal y como se muestra en la Figura 1.b. Esta

oleaginosa es cultivada desde la antigüedad para el aprovechamiento de sus semillas y utilizada como planta medicinal durante mucho tiempo, actualmente es usada de forma ornamental y para la producción de aceites industriales en varios países del mundo, tanto de Europa, Asia y África, especialmente Brasil y la India (San Miguel, 2005). Es abundante en la mayoría de los climas del mundo, disponible a un bajo costo y posee una gran tolerancia al ambiente; la producción anual es en exceso de un millón de toneladas (Kim y col, 2006; Ogunniyi, 2006).

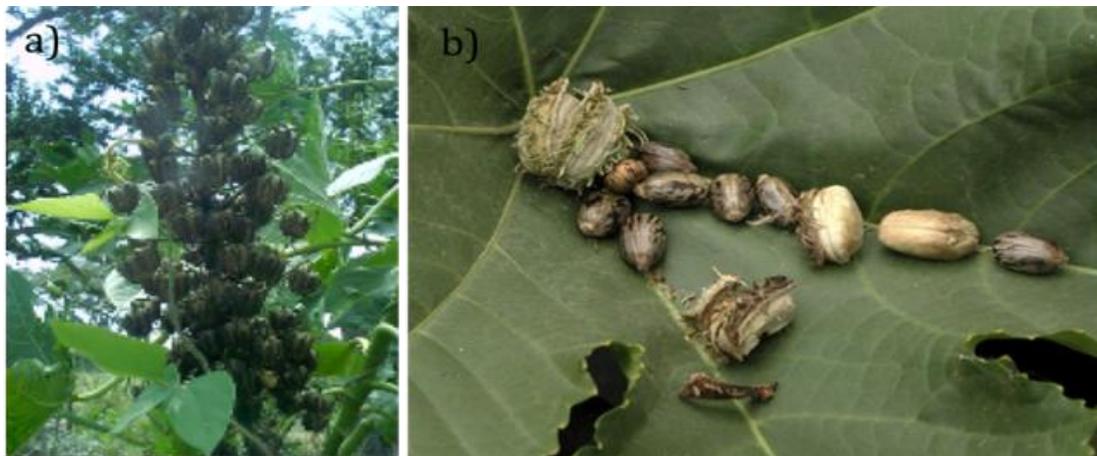


Figura 1. a) Planta y b) Valva con semillas de *Ricinus communis*.

Sin embargo, la ingestión de las semillas produce intoxicaciones graves, incluso puede ser mortal (0.18 g/Kg de masa), a causa de la toxialbumina llamada ricina que contiene la semilla. La ricina es una glicoproteína globular derivada de las semillas, obtenida fácilmente a partir de la semilla entera o de la torta después de la extracción de aceite. Esta representa más del 5% del total de proteína presente en las semillas de higuierilla (Lord y col, 1994; Scholz y Da Silva, 2008).

La proteína toxica ricina (Figura 2) está compuesta por una cadena A (o RTA) que confiere la toxicidad celular debido a que inhibe la síntesis de proteínas al inactivar los ribosomas (Bradberry, 2007; Kim y col, 2006; Sujatha y col, 2008) y una cadena B (o RTB) que tiene propiedades de lectinas que va a permitir fijarse a glicolípidos y glicoproteínas presentes en la membrana celular (Pita y col, 2004) unidas por un enlace de disulfuro, su peso molecular

es de aproximadamente 65kDa. Existen tres rutas de exposición a la ricina, las cuales son por ingestión, inhalación e inyección (Kim y col, 2006). La toxina puede ser inactivada por calentamiento de 10 minutos a 80°C, por una desintoxicación de las semillas de castor implicando una fermentación, así como también mediante la neutralización de los constituyentes de la toxina por taninos (Ogunniyi, 2006).

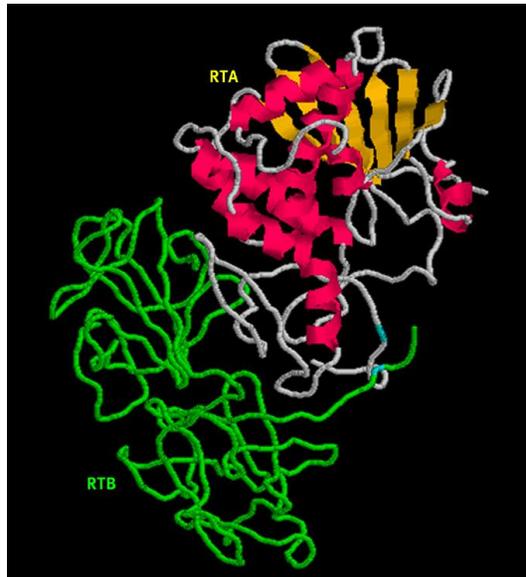


Figura 2. Estructura cuaternaria de la ricina vista de forma tridimensional mediante cristalografía de rayos X. Consta de dos proteínas unidas por un puente de disulfuro. La cadena RTB se muestra en color verde, la RTA de acuerdo a su estructura α -hélice es rosa y β -filamento en amarillo y el espiral en blanco. El sitio de unión por el puente disulfuro es azul (Tomada de Lord y col, 1994; Bradberry, 2007). La cadena RTA es una N-glucosidasa hidrolasa que inhibe la síntesis de proteínas. La cadena RTB es una lectina que ayuda a la unión de la ricina con las células.

La pulpa remanente después de remover el aceite, es la mayor fuente de ricina, puede ser utilizada como fertilizante orgánico aunque no es apto para el alimento del ganado debido a la presencia de esta; sin embargo, se ha reportado que en algunas zonas se lleva a cabo un tratamiento térmico del prensado, con la finalidad de destruir la ricina y poder utilizarlo en la alimentación de ganado (Pita y col, 2004; Ogunniyi, 2006).

La ricina puede ser fácilmente aislada en abundancia a partir de la pulpa, por lo que es mencionada como un agente terrorista biológico por su alta toxicidad (Kim y col, 2006).

Las hojas han sido utilizadas para el tratamiento de dolor reumático y como un antibacterial y anti-inflamatorio; la hoja, la raíz y el aceite de esta planta han sido usados como laxante y en el tratamiento de inflamación y desordenes del hígado. Los productos naturales obtenidos de esta especie incluye aceites, alcaloides y varios fenólicos (Ali y col, 2008).

1.2.1. Aceite de ricino

El aceite de ricino, de castor o higuierilla es uno de los productos más importantes de la semilla, estas pueden contener de 46 a 55% de aceite en peso (Ogunniyi, 2006). Es único en su composición, debido a que aproximadamente del 80-90% es ácido ricinoleico, 3-6% es ácido oleico y 1-5% ácidos grasos saturados (McKeon y col, 2000); el contenido de ácido ricinoleico en el aceite es el causante de que no pueda ser usado como aceite comestible, debido a su acción purgante, ya que afecta los componentes lipídicos de la mucosa del intestino delgado produciendo un aumento violento del peristaltismo por la hidrólisis de los glicéridos (Pita y col, 2004; Tierney y col, 2005) otra razón es por su versatilidad e importancia en la industria (Scholz y da Silva., 2008). En la industria química es usado como material base para la obtención de diversos productos: en la elaboración de pinturas, plásticos, tintes para fibras, aditivos para sedas, resinas, en la industria farmacéutica, en la industria cosmética, aceites lubricantes, producción de combustibles y en una variedad amplia de otros productos (McKeon y col, 2000; Ogunniyi, 2006).

En la producción de biocombustibles el uso de aceite de ricino es una nueva alternativa, por lo que la demanda de este producto alrededor del mundo se ha incrementado, pese a los usos mencionados anteriormente, su alto poder calorífico, bajo contenido de residuos de fósforo y carbón permite ser convertido a biodiesel, además de que este aceite vegetal es amigable con el ambiente (Biodegradable, no tóxico), el almacenamiento puede ser por largos periodos sin que haya degradación, aunado a que no se congela y que es soluble en alcohol y que por tanto no requiere energía térmica para la conversión del aceite a biodiesel, no deja secuelas en suelos, requiere de inversiones bajas y existe una comercialización segura.

Sin embargo, una desventaja podría ser su alta viscosidad a temperaturas de 50°C debida a la presencia de un OH en el ácido ricinoleico, pero por otro lado esto añade estabilidad adicional al aceite y sus derivados. Esta propiedad puede causar problemas en la extracción tanto en frío como caliente; ya que un alto contenido de agua propicia problemas de corrosión, filtración y de crecimiento de algas. También es caracterizado por su extraordinaria oxidación y baja estabilidad al calor (Ogunniyi, 2006; Scholz y Da Silva, 2008); por lo que es importante el estudio de la estructura de la semilla así como de los procesos previos al proceso de extracción de aceite de ricino. Lo mencionado anteriormente es importante ya que de acuerdo a la revisión de Scholz y Da Silva, (2008), semillas con un contenido promedio de aceite del 47% y una producción estimada de 90% da un promedio de producción de aceite de 460Kg/ha y un máximo de 2000Kg/ha (1200Kg de semillas pueden producir de 500-550L de aceite). Por lo tanto, se puede decir que el *Ricinus communis* está entre las plantas con la producción más alta del aceite.

1.3. Extracción de aceites

Industrialmente la extracción de aceites a partir de semillas oleaginosas es realizado de manera común, primero el prensado mecánico y posteriormente se realiza una extracción con un disolvente llamada también extracción sólido-liquido o lixiviación (Kartika y col, 2006). La extracción sólido-liquido ha sido un campo importante en la investigación en la ingeniería y procesamiento de los alimentos en recientes años (Crossley y Aguilera, 2001). Siendo principalmente el medio para la extracción de aceites vegetales de materiales oleaginosos (Carrín y Crapiste, 2008). Es un proceso de separación que consta de la transferencia de solutos de una matriz sólida hacia un disolvente. Es una operación utilizada extensivamente para la recuperación de importantes compuestos alimentarios como son: la sucrosa de la caña o remolacha, lípidos de oleaginosas, proteínas de la torta de oleaginosas, fotoquímicos de plantas, e hidrocoloides funcionales de algas, entre otros. Comúnmente son usados como disolventes en la extracción el agua, etanol, hexano, dióxido de carbono, pero la tendencia esta hacia el uso de compuestos químicos naturales (Aguilera, 2003b).

La extracción sólido-líquido (Figura 3) de aceites mediante disolventes como es el hexano ha sido utilizada en la extracción de aceite de soya (Ikhuoria y col, 2008), aceite de girasol (Gallegos y col, 2007) y aceite de las semillas de limón (Anwar y col, 2008) entre muchos más. El principio de la extracción es poner en contacto la matriz sólida porosa (semillas o granos) con un disolvente puro o un disolvente/mezcla de aceites, para ser transferido hacia un medio fluido, esta extracción es más lenta que en el sistema mecánico. Aunque el principio de la extracción por disolvente es relativamente simple, esta implica un mecanismo complejo, especialmente por los materiales que producen aceite, a causa de la estructura celular de los cuerpos vegetales por lo tanto, es difícil explicar todo el fenómeno que toma lugar durante la extracción con el disolvente con una simple teoría (Carrín y Crapiste, 2008).

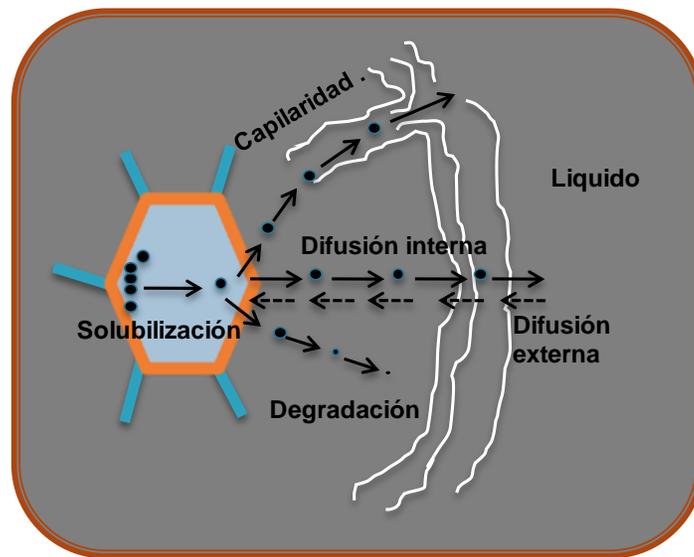


Figura 3. Esquema que muestra los diferentes mecanismos que suceden durante la extracción sólido-líquido del aceite en materiales biológicos.

También se ha reportado la extracción de aceite de cacahuete mediante la extracción enzimática acuosa como un proceso eco-amistoso alternativo (Sharma y col, 2002), aceite de la semilla de rosa mosqueta extraído a partir del dióxido de carbono supercrítico (Del Valle y col, 2004), la extracción de aceite de germen de mandioca (Popoola y Yangomodou, 2006), aceite de frijón africano (Ikhuoria y col, 2008) y aceite de semillas de arroz, entre otros.

El aceite de ricino es extraído mediante un prensado mecánico seguido de una extracción con n-hexano y/o éter de petróleo (Ogunniyi, 2006), en donde el prensado puede hacerse en frío produciendo 30-36% de aceite, mientras que el prensado caliente (>70°C) produce cerca de 38-40% de aceite; El restante de aceite se extra con disolventes, si el proceso es realizado bien, únicamente del 1-2% de aceite se tendrá en la torta que queda al realizar el prensado (Kartika y col, 2006; Scholz y Da Silva, 2008). Sin embargo, es importante considerar que la eficiencia y rendimiento de la extracción de aceite estará dada por las condiciones de extracción, la naturaleza del material, la preparación de la muestra, la selección del disolvente o tipo de extracción a realizar; por lo que es importante el estudio de cada una de las variables.

1.4. Fundamentos del secado

La deshidratación o secado es una de las operaciones unitarias más antiguas e importantes empleadas por el humano para la preservación, producción, purificación de alimentos o materiales biológicos, también es importante en la química y procesamiento de los alimentos (Ramos y col, 2004; Sacilik, 2007). El secado es un proceso simultáneo de transferencia de calor, masa y momentum (Aguilera y Stanley, 1999; Koç y col, 2008) durante el cual la mayor parte del agua de los materiales a secar, es removida por evaporación o sublimación hasta un cierto nivel al aplicárseles calor bajo condiciones controladas (Foust y col, 1978; Krokida y col, 2003).

1.4.1. Periodos de secado

Al secar un sólido húmedo mediante un gas con temperatura y humedad fijas, aparece siempre un patrón general de comportamiento como se puede observar en la Figura 4. Inmediatamente después del contacto entre la muestra y el aire de secado, la temperatura del sólido se ajusta hasta que alcanza un estado estable. La temperatura del sólido y la proporción de secado pueden aumentar o disminuir hasta alcanzar la condición de estado estable. (Periodo de ajuste A-B). En el estado estable, una medida de la temperatura

mostrará que la temperatura de la superficie húmeda del sólido es la temperatura de bulbo húmedo del aire de secado. Una vez que la temperatura superficial del sólido alcanza la temperatura de bulbo húmedo del aire, se encuentra que la proporción de secado permanece constante. Este es el llamado periodo de secado a velocidad constante (Periodo B-C). El periodo termina cuando el sólido alcanza el contenido crítico de humedad (C), donde el contenido de humedad del sólido es apenas adecuado para suministrar humedad a la superficie completa.

Después de que el sólido alcanza el contenido crítico de humedad, la temperatura de la superficie del sólido aumenta y la velocidad de secado disminuye rápidamente. Este periodo de velocidad decreciente se divide en dos subperiodos, el de secado de superficie insaturada y el controlado por el movimiento interno de humedad. En el primer subperiodo, la superficie está cada vez más y más desprovista de líquido, en virtud de la proporción de movimiento del líquido hacia la superficie, el cual es más lento que la proporción de transferencia de masa desde la superficie hacia el aire, hacia el punto D, no hay un área en la superficie del sólido que esté húmeda, este periodo es llamado primer periodo de velocidad decreciente. Más allá del punto D, la humedad a eliminar es la interna del sólido, el flujo de humedad dentro del sólido comienza a gobernar la velocidad de secado y se presenta el subperiodo de velocidad de secado controlado por el movimiento interno de la humedad, hasta que la velocidad de secado se aproxima a cero, cuando la humedad del producto se aproxima a la humedad de equilibrio. El contenido de humedad en equilibrio se alcanza cuando la presión de vapor sobre el sólido iguala a la presión de vapor parcial del aire de secado. Este, es el llamado segundo periodo de velocidad decreciente.

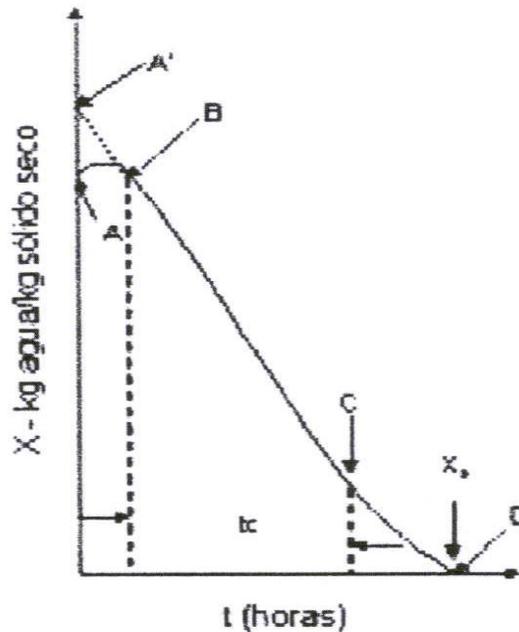


Figura 4. Curva típica de secado para un sólido húmedo en aire caliente a temperatura constante. La curva muestra la variación del contenido de humedad en función del tiempo (Tomada de Foust y col, 1978).

1.4.2. Mecanismos de transferencia

Es importante tener en cuenta que el mecanismo del movimiento del líquido y consecuentemente la velocidad de este movimiento varía notablemente con la estructura del sólido (Foust y col, 1978). La remoción de la humedad de los materiales biológicos llevarse a cabo mediante diferentes mecanismos como los mostrados en la Figura 5, estos mecanismos pueden resumirse como transporte líquido-agua y agua-vapor. Los mecanismos de transporte líquido-agua son el flujo capilar, difusión superficial y difusión líquida; mientras que el mecanismo de transporte agua-vapor consiste en la difusión Knudsen, difusión mutua, difusión Stefan, el flujo Poiseuille y la condensación-evaporación. En el secado de materiales biológicos la difusión es el mecanismo que describe mejor la migración de la humedad (Sablani y Rahman., 2008).

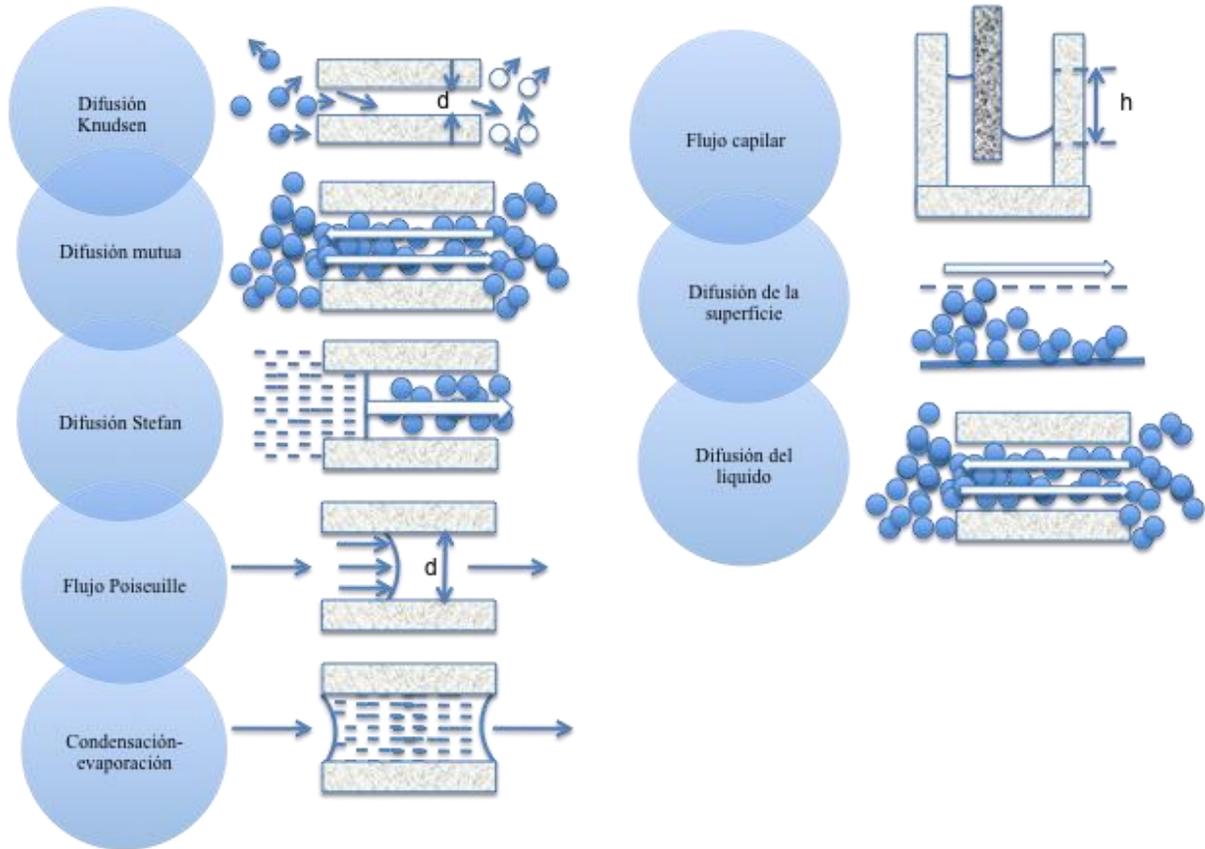


Figura 5. Mecanismos de transporte de humedad (Adaptada de Sablani y Rahman, 2008).

Sin embargo, estos mecanismos dependen de la naturaleza del material. Los sólidos cristalinos, granulares y porosos mantienen la humedad en los intersticios entre partículas o en los poros superficiales, el mecanismo del movimiento de la humedad es controlada principalmente por las fuerzas de capilaridad, tensión superficial y gravitacional existentes dentro del sólido. En este tipo de materiales, el periodo de velocidad constante continua hasta contenidos bajos de humedad, mientras que el periodo de velocidad decreciente se aproxima generalmente a una línea recta conforme el contenido de humedad disminuye (control del sólido y difusión Fickiana). Los materiales que presentan estas características son inorgánicos, tal es el caso de los hidratos de carbono, rocas, sulfatos, entre otras. Para estas sustancias la humedad en equilibrio esta generalmente muy próxima a 0. Un claro ejemplo en el área de los alimentos de predominación de este mecanismo (fuerzas capilares) es la penetración del líquido dentro de los polvos alimenticios durante la deshidratación (Foust y col, 1978; Aguilera, 2003a; Aguilera, 2005).

En el caso de sólidos orgánicos no porosos, de estructura fibrosa, amorfa o coloidal, como es el caso de algunos materiales biológicos, el movimiento del líquido se hace principalmente en función de su difusión a través del sólido. Estos materiales retienen la humedad como parte integral de la estructura o atrapada dentro de las fibras o en el interior de los poros o de los vasos, por lo que las velocidades de difusión son lentas en comparación con el flujo mediante gravedad y capilaridad. En los sólidos orgánicos no porosos en el cual la difusión controla el movimiento del líquido se presentan periodos cortos de velocidad constante, o se secan sin que existan periodos en forma medible, finalizando en valores altos de contenidos críticos de humedad. En el caso de los periodos de velocidad decreciente, el primer periodo es muy reducido y la mayor parte de los procesos de secado están controlados por la difusión del líquido, lo cual puede indicar que la velocidad de secado se controla por la velocidad de difusión del líquido a través del sólido. Sin embargo, el secado completo tiene lugar en el segundo periodo de velocidad decreciente, cuando el contenido de humedad en equilibrio es alto generalmente indica que hay una cantidad sustancial de agua retenida tan íntimamente dentro de la estructura del sólido, que su estructura se ve afectada cuando se le es retirada (Foust y col, 1978; Aguilera, 2003a).

En el caso en donde el mecanismo predominante es la difusión molecular, la velocidad de movimiento de la humedad se expresa mediante el modelo matemático de la difusión Fickiana. La primera ley de Fick (Ecuación 1) afirma que dentro de un medio continuo y bajo la presencia de un gradiente de concentración, la migración neta de moléculas de soluto debido al movimiento de una región de alta concentración a una de menor concentración es al azar, por lo que la fuerza motriz para este tipo de difusión es el gradiente de concentración (Foust y col, 1978; Aguilera, 2005). Sin embargo, la primera Ley de Fick solo es aplicable solo para estado estacionario y en consecuencia al periodo de velocidad constante. Por otro lado en materiales en donde el secado se lleva en el periodo de velocidad decreciente el proceso se lleva a cabo en estado no estacionario y por consiguiente la segunda Ley de Fick puede ser aplicada para describir la transferencia de masa durante este periodo de secado.

$$\begin{aligned} \text{a)} \quad J &= -D \left(\frac{dC}{dz} \right) && 1^{\text{a}}. \text{ Ley de Fick} \\ \text{b)} \quad \frac{dC}{dt} &= D \frac{d^2C}{dx^2} && 2^{\text{a}}. \text{ Ley de Fick} \end{aligned}$$

Dónde: J es flux molar de transferencia de masa, D es la difusión molecular, c la concentración molar, t el tiempo y “x” y “z” las distancias de difusión.

La 2a. ley de Fick conocida también como ecuación de difusión, es una ecuación diferencial cuya integración nos expresa la concentración molar difundida en función del espacio o distancia y el tiempo. Consecuentemente, la remoción de humedad de acuerdo a la segunda Ley de Fick, es directamente proporcional al coeficiente de difusividad y al tiempo de secado e inversamente proporcional al cuadrado de la longitud característica del material bajo estudio (Aguilera y Stanley, 1999).

Los ingenieros en alimentos por largo tiempo han utilizado extensamente la solución de la ecuación de la 2ª ley de Fick para geometrías regulares (placas infinitas y cilindros, esferas, etc.) y para el cálculo del coeficiente de difusión efectiva (D_{eff}), sin embargo, para materiales de origen biológico el mecanismo de difusión no es del todo adecuado para describir apropiadamente el secado de estos, porque la D_{eff} varía con la temperatura, el contenido de humedad crítica y la geometría de los materiales, dado que el agua es parte integral de estos, las geometrías a lo largo del secado cambian (Geankoplis, 1999). Aunado a que existen otros factores que impiden el buen modelamiento del fenómeno de secado, como son los siguientes: la complejidad estructural que presentan los materiales biológicos y la falta de entendimiento del papel de la estructura en los mecanismos de transferencia de masa y calor. Por ello, se han hecho algunas correcciones para compensar los efectos microestructurales y la complejidad de los fenómenos de transferencia de masa, en el modelamiento del secado (Foust y col, 1978; Aguilera y Stanley, 1999; Aguilera, 2005).

Por ejemplo, Zogzas y col, (1994) utilizaron un modelo matemático para predecir las propiedades de los materiales con el contenido de humedad, dichas propiedades fueron incorporadas al modelo, estas fueron la densidad, encogimiento y porosidad, observándose resultados satisfactorios para explicar el secado de vegetales y la influencia de la variación de las condiciones de secado.

Existen varios ejemplos más en donde se han observado mejores resultados en las curvas de secado al utilizar coeficientes de difusión que varían con el contenido de humedad y propiedades como el encogimiento durante el proceso de secado. La estructura de los materiales biológicos no juega un rol decisivo únicamente en el valor absoluto de la difusividad de la humedad sino también el contenido de la humedad y la temperatura sobre las propiedad de transporte (Aguilera, 2005).

Es por tanto importante tener en cuenta que el comportamiento de las curvas del secado y entendimiento del fenómeno están relacionados con las condiciones de secado (temperatura, humedad y velocidad), el tamaño de la muestra (Chua y col, 2000; Krokida y col, 2003) y su estructura (Foust y col, 1978).

1.4.3. Secado de materiales biológicos.

Diversos investigadores han estudiado y aplicado el secado a diferentes materiales biológicos con el objetivo de mejorar la calidad de los productos, para la preservación, aceleración de algún cambio, mantenimiento de su calidad, el estudio de los efectos de las variables de secado, para el modelamiento, simulación, optimización del proceso y efectos de la macro y micro estructura. Aplicación de diferentes métodos de secado, entre algunos de los más importantes podemos verlos en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Algunos trabajos importantes acerca del secado de materiales biológicos.

Autor	Material	Descripción
Tosi y col., 1999.	Soya	Efecto de secado por lecho fluidizado sobre la concentración de fosfatos en el aceite.
Soponronnarit y col., 2001.	Soya	Secado de las semillas mediante lecho fluidizado.
Cnossen y col., 2003.	Arroz	Efecto del atemperado sobre el fisuramiento.
Krokida y col., 2003.	Papa, zanahoria, cebolla, maíz, tomate	Efecto de las condiciones de secado y las propiedades de los materiales sobre las cinéticas de secado.
Ramos y col., 2004.	Uvas	Modelo matemático del fenómeno de transferencia de masa y calor considerando los cambios a nivel macroscópico y microscópico durante el secado solar .
Stenberg., 2005.	Linaza	Estudio de las cinéticas de secado.
Lacerda y col., 2005.	Soya	Estudio de la transferencia de masa y calor entre el aire de secado y las semillas.
Akpan y col., 2006.	Higuerilla	Secado en estufa.
Aquerreta y col., 2007.	Arroz	Efecto de altas temperaturas de secado con atemperado sobre la calidad.
Gely y Santalla., 2007.	Quinoa	Modelamiento de la difusión de la humedad.
Kerdpiboon y col., 2007.	Zanahoria y papa	Estudio de los cambios físicos durante el secado, incluidos los microestructurales.
Hernández y col., 2008.	Café	Modelamiento de la transferencia de masa y calor durante el secado.

El proceso de secado de productos de baja humedad como lo son los granos y semillas han sido descritos en muchos trabajos como un secado difusivo. De acuerdo a los estudios que se han realizado, es importante el estudio de las condiciones de los diferentes tipos de secado, para mayor eficiencia y entendimiento del fenómeno. Uno de los importantes es el secado por lecho fluidizado, la cual es una operación mediante la cual los sólidos generalmente de tamaño pequeño, son llevados a un estado semejante a un fluido a través

del contacto con gas o líquido. Una de las aplicaciones importantes de esta operación ha sido el secado de estos productos de baja humedad, debido a las altas velocidades de transferencia de masa y calor (Sánchez y col, 2003; Santiago y col, 2007) a la utilización de altas temperaturas (80 a 200°C), altas velocidades de aire (>2.3 m/s) (Siebenmorgen y col, 2006), aunado a tratamientos homogéneos del producto por la distribución uniforme de la humedad (Chen y Wu, 2000), al control preciso de la temperatura y a la conservación de la calidad del producto (Tosi y col, 1999).

El secado por lecho fluidizado ha sido aplicado sobre todo al secado de: soya (Florin y Bartsch, 1983; Tosi y col, 1999; Lacerda y col, 2005), arroz (Chen y Wu, 2000; Cnossen y col, 2003; Madambay Yables, 2005; Nishiyama y col, 2006; Siebenmorgen y col, 2006; Aquerreta y col, 2007; Soponronnarit y col, 2008), semillas de linaza (Stenberg y col, 2005), semillas de cuphea (Cermak y col, 2005), quinoa (Gely y Santalla, 2007), membrillo (Koç y col, 2008), semillas de uva (Roberts y col, 2008), entre otros.

En los últimos años, se ha introducido en el procesamiento de semillas oleaginosas (Florin y Bartsch, 1983), siendo esta más aplicada al secado de semillas de soya y lino, sin embargo, el secado de oleaginosas es un campo que aún no está totalmente investigado, dado que el secado en semillas es un importante paso el almacenamiento y procesamiento (Barrozo y col, 2005).

Su importancia reside en que las semillas al someterlas al secado bajo condiciones no controladas pueden favorecer el deterioro y crecimiento de microorganismos sino son procesadas inmediatamente después de que hayan llegado a la madurez fisiológica. Un ejemplo son las semillas de maíz, los cuales toman de uno a dos meses para ser secadas en el campo partiendo de una humedad de 35% hasta 13%, siendo esta la principal razón por la que se ha recurrido al secado bajo condiciones controladas; la soya cual tarda de dos a tres semanas para secar de un 50% hasta un 13%. Otro claro ejemplo es la cosecha del arroz, la cual se hace con una humedad del 20 - 24% y subsecuentemente se realiza el secado (Teichert, 2008). Por lo tanto, el secado de semillas es un proceso importante que debe de ser estudiado con toda profundidad y entendimiento.

Los productos biológicos son sensibles a la acción del calor y la temperatura, que pueden, cuando son excesivos producir daños importantes en las propiedades del material. Algunos atributos funcionales y de calidad pueden ser seriamente comprometidos por las agresiones térmicas, entre las cuales podemos citar a los niveles de rajaduras, la integridad de los tejidos, la acidez, los niveles de proteínas, el poder germinativo y la apariencia entre otros (Groff, 2002). Estos cambios son debido a que la humedad es retenida como parte integral de la estructura, por lo que cuando se le retira se muestra afectada esta se ve afectada seriamente (Foust y col, 1978; Koç y col, 2008).

1.5. Relación estructura-propiedad-funcionalidad de materiales biológicos.

En épocas pasadas, la investigación y desarrollo del secado y conocimiento de las propiedades de los materiales biológicos se ha incrementado, pero aun esta limitada por la ingeniería mecánica y fenómenos de transferencia de masa y calor. Sin embargo, el secado es un proceso en el que al bajar el contenido de humedad y de los diferentes procesos que envuelve esta tecnología para la preservación, procesamiento, almacenamiento, comercialización y consumo (Aguilera, 2000b; Shafiur, 2005); se pueden afectar las propiedades físicas, fisicoquímicas, cinéticas, nutricionales, químicas y organolépticas que están a su vez están asociadas con la estructura del material (Foust y col, 1978; DiScala y Crapiste, 2008; Koç y col, 2008), tal y como se muestra en la Figura 6. El secado depende de la naturaleza del material y de las condiciones de secado, la temperatura del aire, humedad relativa, velocidad del aire y el tamaño del material. El secado constante ha sido estudiado extensivamente, más no sus cambios microestructurales (Krokida y col, 2003), además, los aspectos de calidad de los productos han sido estudiados independientemente de la ingeniería de la operación de secado (Chua y col, 2000). En un sentido práctico, la eficiencia de un proceso y las características finales de un producto guardan una fuerte dependencia de la composición y estructura del material antes de ser sometido a una modificación o proceso (Aguilera, 2000a).

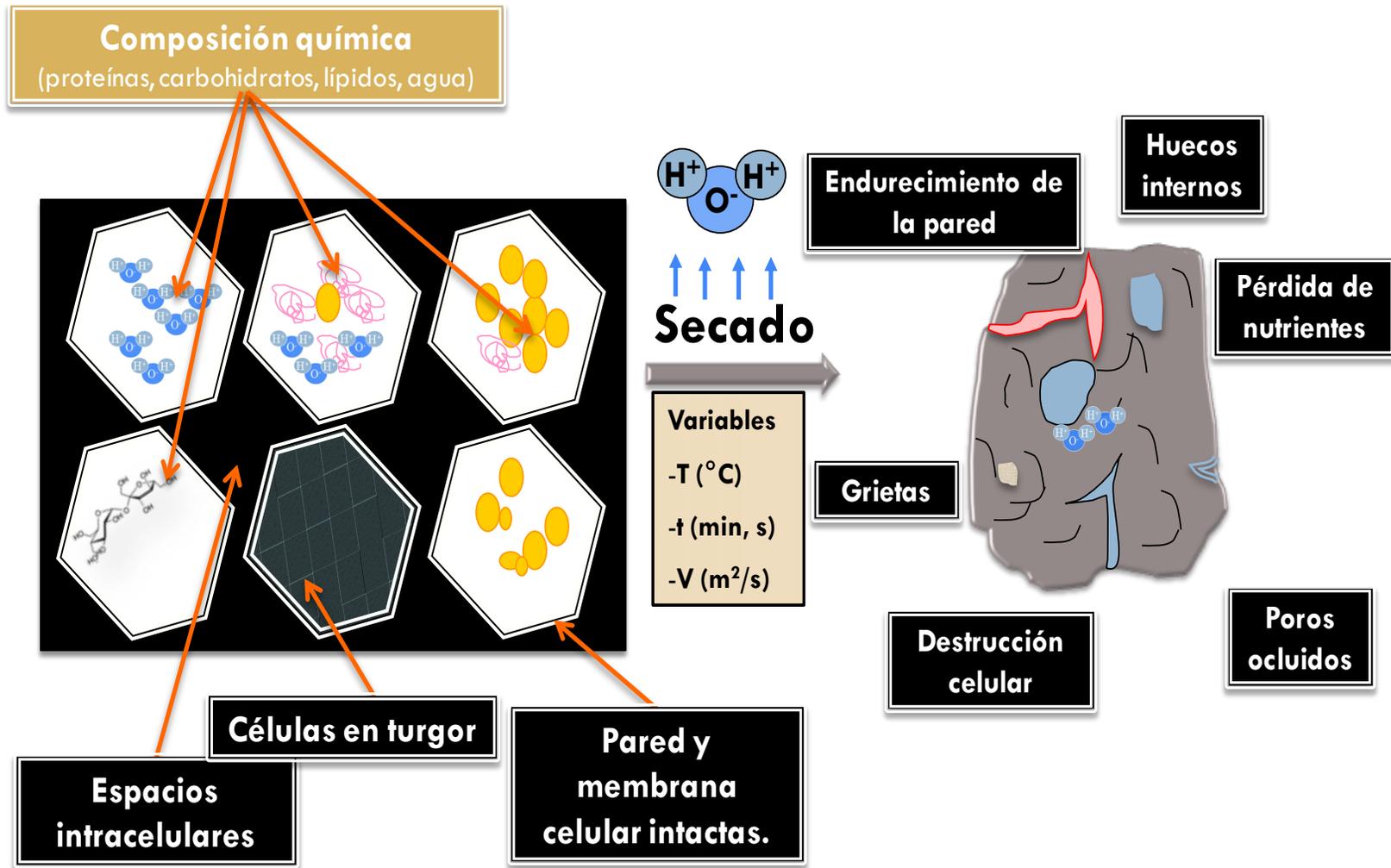


Figura 6. Posibles cambios en el tejido celular vegetal inducidos debidos al secado.

1.5.1. Propiedades físicas, fisicoquímicas y estructurales

La calidad de los materiales biológicos secos se ve afectada por los cambios físicos, estas propiedades proveen una cuantificación descriptiva de los alimentos, resultado de la migración o pérdida del agua de las regiones interiores hacia la superficie y al aire de alrededor (Sablani y Rahman, 2008). El volumen, área, tamaño, forma, color, apariencia, porosidad, encogimiento, capacidad de rehidratación, textura, así como también la destrucción del sistema celular y los cambios estructurales, entre otras, son propiedades físicas (Kerdpi boon y col, 2007) que han sido objeto de estudio en diversas investigaciones acerca de la caracterización de los cambios en las propiedades fisicoquímicas durante el secado.

- Color

El color es un atributo muy importante de los productos alimenticios y es sujeto a cambios apreciables durante el procesamiento (Chua y col, 2000). Diversos investigadores (Dincer, 1996; Shivhare y col, 2000; DiScala y Crapiste, 2008; Luangmalawat y col, 2008) han reportado la influencia del secado sobre la medición del color como una medición de calidad de materiales biológicos. Sin embargo, estos cambios externos o aparentes son primordialmente causados por los cambios internos (Kerdpi boon y col, 2007) y a los cambios debido a las reacciones químicas y bioquímicas (Perera, 2005) de los materiales secados.

- Resquebrajamiento, agrietamiento y fisuramiento.

Las capas superficiales tienden a secarse más rápidamente que las interiores, si la velocidad de secado es muy alta, puede ocasionar diferencias en el contenido de la humedad y presentar fenómenos como es el resquebrajamiento o fisuramiento (Foust y col, 1978; Chou y col, 1997; Zhang y col, 2004). Tal es el caso del arroz, en el cual el resquebrajamiento es un criterio importante para la calidad, un alto resquebrajamiento y fisuramiento denota un daño aparente en la superficie del grano, este es un índice cuantitativo de daño (Chen y Wu, 2000; Zhang y col, 2004; Shimizu y col, 2007; Soponronnarit y col, 2008). Otro caso es

presentado en la investigación de Varela y col, (2007), los cuales cuantificaron y caracterizaron el patrón de fractura (Figura 7) en la almendra al ser sometida a un tostado bajo diferentes condiciones, encontrando que existe una relación entre la fractura y las condiciones de tostado debida a un daño térmico en el parénquima interno. Tosi y col, (1999) estudiaron el cambio al secar soya bajo ciertos parámetros, logrando minimizar el agrietamiento, resquebrajamiento y descortezamiento, estos daños fueron asociados al contenido de humedad.

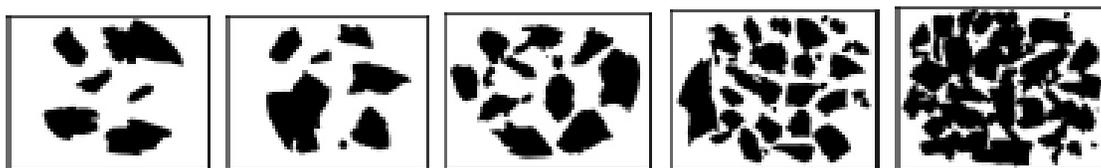


Figura 7. Imágenes binarias de los fragmentos de la fractura de las muestras de almendras después de la compresión, de izquierda a derecha: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 minutos de tostado (Tomada de Varela y col, 2008).

1.5.2. Propiedades bioquímicas

Propiedades como lo es el sabor, estabilidad química, actividad del agua, olor y sabor, así como también los aspectos microbiológicos y la retención de nutrientes son propiedades consideradas como atributos de calidad de materiales biológicos.

El secado debe de preservar varios criterios de calidad como son los factores nutricionales que suelen ocurrir simultáneamente con los cambio o modificaciones estructurales y fisicoquímicas (Dincer, 1996). Dichos factores son irreversibles y siempre hay un riesgo de que la calidad decline debido al secado, puesto que los productos alimenticios son sistemas multicomponentes que están compuestos de biomoléculas tal como las proteínas, carbohidratos, lípidos, entre otros. La pérdida de los nutrientes está en función de la temperatura, contenido de humedad, la duración del proceso y de la descomposición del alimento (Anaya y col, 2003).

Por ejemplo, Aguilera, (2003a) y Tosi y col, (1999), mencionan que la temperatura de secado afecta la degradación de las proteínas inactivando enzimas. Anaya y col, (2003) reportaron que un secado a altas temperaturas de semillas de fríjol causa la formación de

una corteza en la superficie restringiendo la migración del agua y por tanto afectando la actividad de la enzima lipoxigenasa y modificando el peso molecular de las proteínas. Otros casos son la biodisponibilidad de carotenoides de tejido celular sujeto a diferentes tratamientos causando la destrucción celular y el someter a triturado el tejido de zanahoria para abrir la estructura celular y hacer más disponibles los micronutrientes, entre otros. En la mayoría de los casos, tenemos que tener en cuenta como la estructura de los materiales biológicos, tanto la impartida por la naturaleza como la transformada al ser sometida por diferentes procesos afecta la disponibilidad o contenido de nutrientes (Aguilera, 2005).

1.5.3. Estructura de materiales biológicos

La estructura en materiales biológicos es el arreglo espacial de los elementos estructurales y sus interacciones, el estudio de estas estructuras ayudan a la cuantificación de los cambios de los alimentos durante el secado y pueden también mejorar el entendimiento del mecanismo y cambios en los factores de calidad, es decir cambios en la textura de los alimentos (Ramos y col, 2004). Estos cambios o fenómenos son por pérdida de la estructura celular, encogimiento y colapso (Aguilera y Stanley, 1999.).

Encogimiento, colapso celular

Uno de los más importantes cambios que sufren los alimentos durante el secado es la reducción del volumen (encogimiento), debido a que la pérdida de agua y el calentamiento causan tensiones en la estructura celular, propiciando la contracción de la matriz viscoelástica dentro del espacio previamente ocupado por el agua removida; llevando a un cambio en la forma, dimensiones y estructura celular, las cuales afectan la calidad (Aguilera, 2005; Prothon y col, 2003; Al-Muhtaseb y col, 2004; Ramos y col, 2005). Pese a la enorme importancia en la calidad de los alimentos, el encogimiento de los alimentos ha sido a menudo estudiado por mediciones directas ordinarias o inferidas de los cambios en los parámetros relacionados como es la densidad y porosidad. El problema es que los cambios en las dimensiones estructurales durante el secado son no isotrópicos. Con el

avance del análisis de imágenes los datos más precisos para el encogimiento pueden ser obtenidos (Aguilera y col, 2003).

Los estudios microestructurales podrían ayudar a la cuantificación de los cambios de calidad de los alimentos (propiedades fisicoquímicas, nutricionales y estructurales) durante el secado y podrían ayudar al entendimiento de los mecanismos sucedidos durante el procesamiento térmico (Ramos y col, 2005). Por lo tanto, el concepto de relación estructura-propiedad implica una conexión entre una estructura y la forma en que un producto se comporta; en otras palabras es el conocimiento de la estructura de los materiales biológicos lo que permite entender cómo y porqué se construye, así como la manera en que esta construcción realiza sus funciones y de manera recíproca, como una determinada calidad del material puede ser completamente comprendido por la forma en que se construye (Aguilera, 2000a). La Figura 8, muestra el esquema del enfoque de la microestructura como sus aplicaciones en el procesamiento de los materiales biológicos (Aguilera, 2000b).

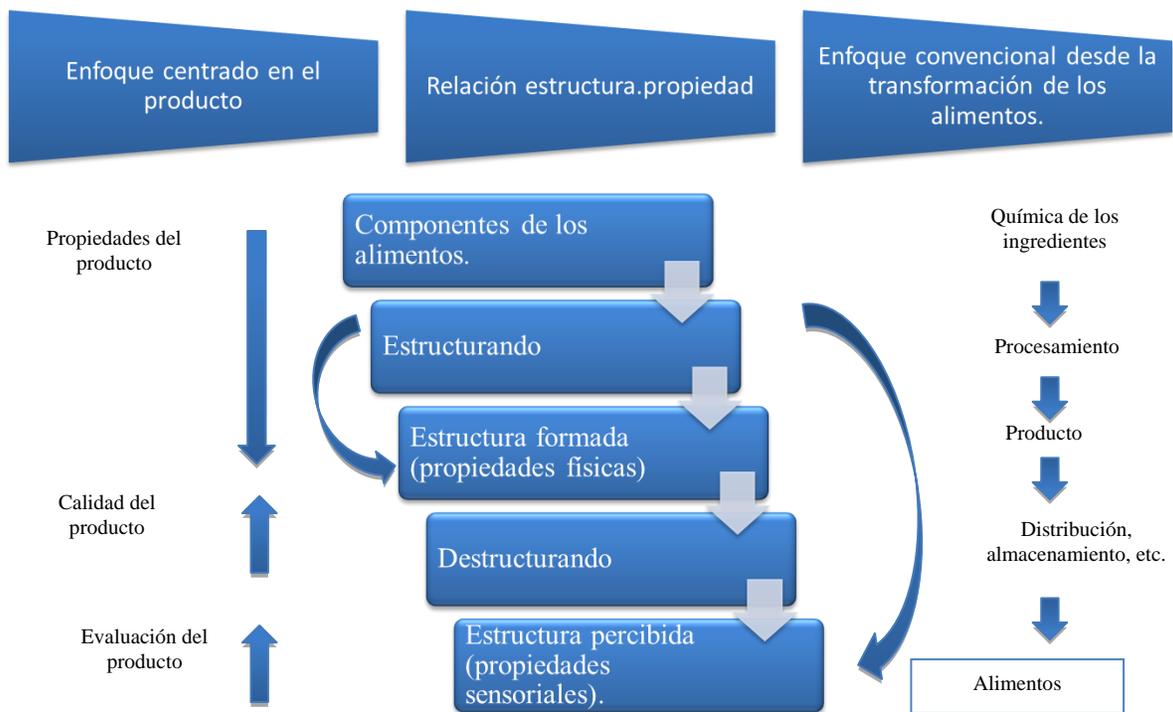


Figura 8. Enfoque microestructural para la ingeniería de los productos alimenticios y su relación estructura-propiedad (Tomada de Aguilera, 2000b).

1.6. Herramientas para el análisis de la microestructura.

El estudio de la microestructura de los alimentos es un requisito para el entendimiento de las propiedades de los materiales alimenticios, por lo que es importante conocer las metodologías que están disponibles para la evaluación o análisis de estas (Aguilera y Stanley, 1999). Dichas técnicas ahora son usadas rutinariamente por científicos en alimentos para caracterizar la microestructura, proveyendo información cualitativa y cuantitativa acerca de su estado.

1.6.1. Microscopía

Actualmente, existe un gran énfasis en aplicar la microscopía para el estudio de productos biológicos secos; para lo cual existen diversas técnicas para el estudio de las microestructuras de los alimentos y especialmente si se complementa con el análisis de imágenes (Ramos y col, 2004). Las técnicas de microscopía más comunes son la microscopía de luz, la microscopía electrónica, recientemente el microscopio láser confocal y los microscopios de fuerza atómica (Parada y Aguilera, 2007).

a) Microscopía de luz

Esta tiene limitada la magnificación, pero debido a la larga distancia focal permite la observación de piezas de gran tamaño, diferente de otros métodos en donde solamente es posible visualizar una pequeña región de una muestra. Las técnicas preparativas son rápidas y no originan muchas alteraciones de la muestra. La información obtenida del microscopio es entonces conveniente para la cuantificación usando el software para el análisis de imágenes (Ramos y col, 2004).

b) Microscopia Electrónica

Dentro de la microscopía electrónica existen dos importantes sistemas que proporcionan datos morfológicos y analíticos de los sistemas biológicos: la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) (Ross y col, 2004) tal y como se muestra en el Cuadro 2. Dentro de los microscopios electrónicos de barrido podemos encontrar el Microscopio electrónico de barrido ambiental o de bajo vacío

(MEBA), el cual a comparación del convencional en donde las muestras requieren de un alto vacío, que estén secas y por lo general que sean conductivas; el MEBA no requiere de que la muestra sea totalmente seca y conductiva, permitiendo variar el medio ambiente de la cámara a través de una serie de presiones, temperaturas y composición de gas. Este elimina la limitación de alta vacío en el ambiente de la muestra del microscopio convencional, permitiendo la observación en su estado natural, o a diferentes humedades (Aguilera, 2003a; Ma y Rudolph, 2006). Mientras que la MET permite la observación de muestras en cortes ultrafinos, sin embargo es necesario que las muestras sean tratadas para su observación con el microscopio, el objeto de estudio puede ser aumentado hasta un millón de veces (<http://www.biologia.edu.ar/microscopia/meb.htm>).

Cuadro 2. Comparación de microscopios (Adaptada de Aguilera y Stanley, 1999).

	Microscopia de luz	MET	MEBA	MEB	MFA
Uso general	Estructura de la superficie y de secciones	Secciones finas internas	Estructura superficial	Estructura superficial	Topografía y fases de las superficies.
Resolución (nm)	200-500	0.2-0.7Å	3-6	3-6	F
Magnificación (x)	10-1,500	200-30,000,000	20-100,000	20-100,000	Atómicas
Campo de profundidad 500x (mm)	2	800	1000	1000	
Iluminación	Luz visible	Electrones de alta velocidad	Electrones de alta velocidad	Electrones de alta velocidad	Sin iluminación de luz.
Muestra preparación grosor ambiente espacio disponible	Fácil Delgada Versátil Pequeño	Difícil Muy delgada Vacío Pequeño (3mm)	Fácil Reflexión Bajo vacío Regular o medio (1 cm)	Fácil Reflexión Vacío Regular o medio (1 cm)	Fácil dependiendo la naturaleza del material. Las muestras son pequeñas y delgadas.

Algunas de las investigaciones realizadas en el área de alimentos como en Alamilla y col, (2005) emplearon el MEB para describir los cambios morfológicos de las partículas de maltodextrina a lo largo del secado por aspersión; por otra parte Ma y Rudolph, (2006) utilizaron el MEBA para estudiar el cambio dimensional (área, pared celular) y el transporte de la humedad durante el secado o proceso de humectabilidad de rodajas de piña mediante el análisis de las imágenes. Por otra parte, Aguilera y col, (1986) en la cual caracteriza la semilla oleaginosa Guindilla mediante el uso del MEB. Borém y col, (2008) analizó el daño de la ultraestructura (Figura 9) de semillas de café al ser sometidas a un tratamiento térmico mediante la microscopía electrónica de barrido y la microscopía electrónica de transmisión, siendo que el secado de estas semillas uno de los pasos más importante en el procesamiento.

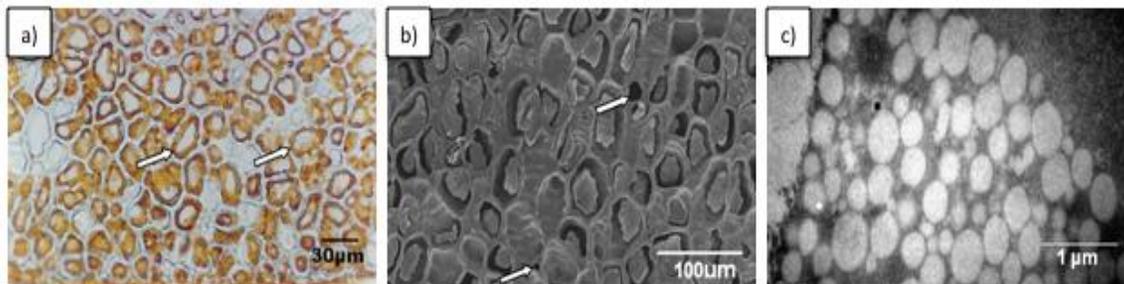


Figura 9. Uso de las diferentes microscopias para el estudio de la influencia del secado de café a 40°C sobre la ultraestructura. (a) Microscopía de luz, en donde puede observarse el aceite en la forma globular dentro de la célula, (b) MEB en donde se observa la integridad de la membrana y los espacios intracelulares vacíos y (c) MET observándose las vesículas intactas (Tomada de Borem y col, 2008).

1.6.2. Análisis de imágenes

Recientemente, el empleo de los sistemas de visión por computadora y las técnicas de análisis de imágenes han tenido un gran desarrollo, dado que han sido aplicados para la evaluación y caracterización cuantitativa de la morfología (tamaño, forma, color y propiedades de textura), estructura y microestructura (encogimiento, colapso celular) de los alimentos y materiales biológicos a partir de imágenes (Aguilera y Stanley, 1999; Du y Sun, 2004; Kerdpiboon y col, 2007; Mendoza y col, 2007; Chanona y col, 2008). El análisis de imágenes juega un rol cada vez más importante en la evaluación de la calidad de los alimentos por la precisión y consistencia, eliminando la subjetividad manual del inspector.

Sin embargo, a menudo la técnica de análisis de imágenes se combina con sistemas mecánicos e instrumentales como las técnicas microscópicas, que pueden reemplazar a menudo el esfuerzo de la manipulación humana en el funcionamiento del proceso (Du y Sun, 2004; Rodrigues y Fernandes, 2007).

En el área de los alimentos recientemente se ha empleado el análisis de imágenes al ser una técnica no destructiva permitiendo la evaluación de varios productos alimenticios (Du y Sun, 2004). Mediante la técnica de análisis de imágenes se ha medido el color ($L^*a^*b^*$) en papas fritas para evaluarlas y clasificarlas (Pedreschi y col, 2004; Pedreschi y col, 2006; Mendoza y col, 2007), el color de filetes de salmón para evaluar su calidad con el objetivo de reemplazar la labor manual durante el procesamiento del pescado (Misimi y col, 2007), la textura de papas fritas comerciales para su caracterización y clasificación (Mendoza y col, 2007), la rugosidad de la superficie del chocolate (Quevedo y col, 2005), así como los cambios en el color de la superficie de este durante su almacenamiento (Briones y Aguilera, 2005), cuantificado el patrón de fractura y daño térmico a la microestructura de almendras (Varela y col, 2008), determinación de la senescencia de plátano (Quevedo y col, 2008), al análisis de la textura de pan para su caracterización de su apariencia (Gonzales y Butler, 2007), se ha evaluado los cambios en la morfología de partículas secadas por aspersion bajo diferentes condiciones (Alamilla y col, 2005); así como también ha sido aplicado a la evaluación del encogimiento, color y textura de cortes circulares de manzana al ser sometidos a una deshidratación (Fernández y col, 2005) y a la deshidratación osmótica de melón (Rodrigues y Fernandes, 2007). Du y Sun, (2004) por su parte, realizaron una revisión de los recientes desarrollos y aplicaciones de las técnicas de análisis de imágenes en la evaluación de la calidad de los alimentos, mencionan a detalle las etapas del análisis de imágenes, así como se hace mención de los diversos trabajos en donde se ha empleado esta herramienta para la evaluación de la calidad de varios materiales biológicos, sobre todo en los alimentos, en base a sus características físicas. De la revisión del estado del arte se extrajo un cuadro donde se muestran algunas de las aplicaciones que ha tenido esta herramienta (Cuadro 3).

Cuadro 3. Aplicaciones de la técnica de análisis de imágenes para la evaluación cuantitativa de diversos parámetros de materiales biológicos, imágenes tomadas con cámara con dispositivo de carga acoplada (Tomado de Du y Sun, 2004).

Categoría	Materiales biológicos	Aplicaciones	Referencias
Pescadería	Pescado	Clasificación del pescado.	Zion y col., 1999.
Frutas	Manzana	Segmentación de los defectos.	Leemans y col., 1999.
	Naranja	Localización y caracterización del cáliz del tronco.	Ruiz y col., 1996.
	Cerezas	Análisis de la forma.	Beyer y col., 2002.
Granos	Arroz	Clasificación de la calidad.	Wan y col., 2002.
	Trigo	Clasificación.	Utku y Koksel., 1998.
Carne	Res	Características de textura como indicadores de ternura.	Li y col., 1999.
	Cerdo	Evaluación del color.	Lu y col., 2000.
Vegetales	Espárragos	Inspección de los defectos	Rigney y col., 1992.
Otros	Queso	Evaluación de las propiedades funcionales.	Wang y Sun., 2001.
	Tallarines	Influencia del daño de brotes sobre la apariencia.	Hatcher y Symons., 2000.
	Pizza	Evaluación de la calidad.	Sun y Brosnan., 2003a., 2003b.
	Salchichas	Estimación de las propiedades sensoriales.	Loannoun y col., 2002.

Sin embargo, dicha técnica no ha sido aplicada totalmente al estudio de la microestructura de semillas al ser sometidas a diferentes procesos. Usualmente, la técnica de análisis de imágenes consiste en 5 etapas (Pedreschi y col, 2004; Du y Sun, 2004) las cuales se muestran en la Figura 10. En las aplicaciones en la ingeniería de los alimentos, alguna o todas de estas etapas han sido usadas para la extracción de información de las imágenes capturadas con diferentes sistemas de captura. La información extraída es usada para trasladar la complejidad de los sistemas biológicos y alimenticios en datos numéricos para

después ser analizados para mejorar el entendimiento de las relaciones estructura-función de los sistemas complejos, tales como los alimentos y materiales biológicos.



Figura 10. Pasos del análisis de imágenes de acuerdo con Pedreschi y col, (2004).

1.6.2.1. Adquisición de la imagen

Se refiere a la captura de la imagen digital y almacenamiento en la computadora. Cuando la imagen es adquirida, es importante considerar el efecto de la intensidad de la iluminación y la orientación relativa del espécimen (Pedreschi y col, 2004), ya que la calidad de la imagen se verá afectada. Una alta calidad de la imagen puede ayudar a reducir el tiempo y complejidad de las subsecuentes etapas del análisis de imágenes. Diversos sensores han sido utilizados para la captura de estas imágenes, las cámaras con dispositivo de carga acoplada (CCD por sus siglas en inglés) son los sensores que más se emplean para evaluación de la calidad, clasificación, detección de características físicas y estimación de las propiedades de los materiales biológicos y alimenticios. Atributos externos como el tamaño, forma, color, textura y defectos externos con algunas características que pueden ser evaluadas (Du y Sun, 2004).

1.6.2.2. Pre-procesamiento de la imagen

Las imágenes digitales pueden ser preprocesadas para mejorar su calidad antes de que sean analizadas. Usando filtros digitales, el ruido de la imagen puede ser removido y el contraste

aumentado, importantes para su futuro procesamiento y así crear una imagen mejor a la original. Existen dos tipos de propuestas para el pre-procesamiento de imágenes para la evaluación de la calidad: el pre-procesamiento por píxel en el área de los alimentos y materiales biológicos, la transformación más común en los espacios de color es de $L^*a^*b^*$ y RGB y el pre-procesamiento local; esta propuesta se utiliza para mejorar los bordes o límites de las formas que se encuentran contenidas en la imagen. Ambas propuestas se basan en el cambio de los valores de los píxeles que conforman la imagen (Du y Sun, 2004; Pedreschi y col, 2004).

1.6.2.3. Segmentación de la imagen

Consiste en identificar regiones de la imagen con el propósito de separar aquellas regiones de interés del fondo (Pedreschi y col, 2004). Para la evaluación de la calidad de los alimentos se desarrollaron 4 diferentes propuestas para realizar la segmentación de la imagen pero solo dos son las más utilizadas: segmentación basada en el umbral y en regiones (Du y Sun, 2004).

1.6.2.4. Extracción de parámetros

La segmentación detecta regiones de interés dentro de la imagen o de las características estructurales del objeto. Subsecuentemente, la extracción de las características es principalmente concentrada alrededor de la medición de las propiedades geométricas (perímetro, factores de forma, descriptores de Fourier, entre otros) y las características de color e intensidad de las regiones (valor medio, gradiente, entre otros). Las características se pueden clasificar en cuatro clases: tamaño, forma, color y textura (Du y Sun, 2004).

1.6.2.5. Clasificación

Las características extraídas de cada región son analizadas y asignadas a una clase definida, el cual representa todos los tipos posibles de regiones esperados en una imagen. La

clasificación es diseñada siguiendo un entrenamiento supervisado y una clasificación simple puede ser implementada por la comparación de las características medidas con los valores del umbral. Es posible usar más técnicas de clasificación sofisticadas como son las redes neuronales o la lógica difusa (Du y Sun, 2004; Pedreschi y col, 2004).

1.7. Espectroscopía Raman

La técnica de dispersión Raman es una técnica no destructiva, con especificidad molecular y un método cuantitativo para la detección remota o para el censado de analitos. Se basa en la vibracional molecular que deriva de un proceso de dispersión de luz inelástica. Con la espectroscopía Raman, un láser de fotones es dispersada por una molécula de la muestra y pierde (o gana) energía durante el proceso. La cantidad de energía que es pérdida o ganada, es observada como un cambio en la energía del fotón irradiado, esta pérdida de energía es característica de un vínculo partículas de la molécula. Raman es una técnica única, ya que produce una huella espectral precisa y única de una molécula o una estructura molecular individual (Figura 11). La espectroscopía Raman está compuesta con una fuente de luz, un monocromador, el portamuestra y el detector. Los factores que afectan el análisis del espectro Raman pueden incluir una elevada relación señal-ruido, la estabilidad del instrumento y una resolución suficiente. El desarrollo efectivo del espectrómetro Raman usando para la excitación los laser NIR (por sus siglas en inglés “near infrared”) o el rojo, resuelve el problema de evitar la fluorescencia que afecta las señales Raman. Por otro lado, el desarrollo de detectores de alta sensibilidad en conjunción con el acoplamiento de fibras ópticas y microscopios mejorando la capacidad de análisis. Dos tecnologías mayores son usadas para coleccionar el espectro Raman, la espectroscopía dispersiva Raman y la espectroscopía Raman por transformada de Fourier, con diferencias en su fuente de láser y en la forma por la cual la dispersión Raman es detectada y analizada. Ambas técnicas tienen ventajas únicas y el método que mejor se adapte a la muestras es el que se prefiere. Recientemente, la técnica de dispersión Raman ha sido utilizada para el análisis de los alimentos, en estudios arqueológicos, hasta la nanotecnología. Unos de los mayores ventajas que tienes esta técnica reside en el hecho de que la muestra no requiere tanta

preparación como para otras técnicas (microscopía), es una herramienta rápida y no destructiva que puede ser implementada para el análisis on-line en la industria (Das y Agrawal, 2011; Zachhuber y col, 2011; Socrates, 2005).

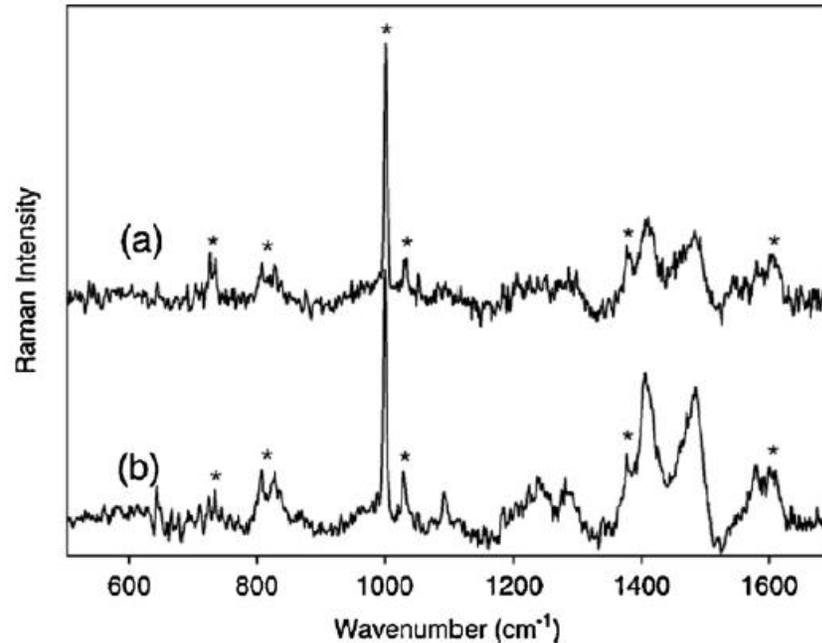


Figura 11. Espectro Raman de (a) fibras de algodón marrón encontradas en el sospechoso, (b) fibras de algodón encontradas en la víctima. (Espectro tomado de Das y Agrawal (2011)) Los espectros Raman cuentan en el eje de las x (intensidad en unidades arbitrarias)

2. Justificación

Dada la importancia económica y las ventajas de la semilla de *R. communis* como una alternativa para la producción de biocombustibles de manera sustentable, así como a la falta de información acerca de los efectos que tiene el secado por lecho fluidizado de las semillas en su estructura y en la facilidad de extracción de su aceite con disolventes orgánicos. Resulta de interés científico y tecnológico el estudio y la evaluación de los cambios estructurales a escala macro y micrométrica que ocurren durante el secado de las semillas y la extracción de su aceite empleando técnicas de microscopía y el análisis de imágenes para el entendimiento de los cambios provocados por dichos tratamientos y con ello proponer estrategias de procesamiento para beneficiar la extracción del aceite de las semillas de *R. communis* y en consecuencia en la producción de biodiesel.

3. Hipótesis

Si se comprenden y controlan los cambios estructurales ocurridos en el secado y extracción del aceite de las semillas de *R. communis*, entonces sería posible facilitar su descascarado y los rendimientos de extracción de su aceite y en consecuencia su explotación para la producción de biocombustibles.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Realizar un estudio del secado por lecho fluidizado de semillas de *Ricinus communis* y conocer su efecto sobre su macro y microestructura, en su composición química, en el descascarado de la semilla y en la extracción de su aceite.

4.2. Objetivos Particulares

- Evaluar la estructura de semilla de *R. communis* mediante microscopia fotónica, microscopia electrónica y el análisis de imágenes para caracterizar la morfología y microestructura de las semillas. Así mismo, caracterizar su composición mediante espectroscopía Raman.
- Someter a secado por lecho fluidizado las semillas de *R. communis*, y evaluar el efecto de altas temperaturas sobre las cinéticas de secado. Así como también, modelar matemáticamente las cinéticas de secado y evaluar los coeficientes difusivos y la energía de activación para la remoción del agua de las semillas.
- Evaluar cualitativamente el efecto del secado por lecho fluidizado sobre las macro y microestructura de las semillas *R. communis*, mediante las técnicas de microscopia (Estéreo microscopia y Microscopia electrónica de barrido ambiental).
- Realizar la extracción del aceite de las semillas *R. communis* secadas a altas temperaturas mediante lecho fluidizado y evaluar el rendimiento de aceite extraído así como el efecto en la microestructura.

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales, Equipo y Software

Materiales

- Materia prima: semillas de *R. communis* “higuerilla” variedad Silvestre Tiripiteo, provenientes de la Promotora Agrícola “La Estancia” en el Municipio de Paracuaró, Michoacán. Las semillas que no presentaron fisuras visuales daño alguno, fueron seleccionadas manualmente y limpiadas de materia extraña; después de dicho procesos se almacenaron en recipientes de PET a temperatura ambiente hasta su uso.

- Reactivos:
 - Agua destilada para la elaboración de las diferentes soluciones utilizadas durante la experimentación.
 - Para realizar las tinciones histológicas se utilizaron los colorantes azul de metileno en agua al 1%, verde rápido en agua al 2% y Sudan IV en solución en etanol (80%) al 2%.
 - Para realizar los cortes histológicos se utilizó el medio de embeber “Tissue freezing médium” (Leica, Alemania).
 - Para realizar la extracción del aceite se utilizó hexano grado reactivo.
 - Aceite comestible para determinar algunas propiedades físicas de las semillas.

Equipos

- Secador de lecho fluidizado de laboratorio, diseñado y construido en el Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos.
- Termobalanza (MB300, Brainweigh, USA).
- Balanza Analítica (Adam equipment, PGW 124 4502i, USA, precisión ± 0.01 g).

- Termoanemómetro digital (TSI Inc. 8330-M, USA, precisión de ± 0.1 m/s).
- Termómetro digital (Dakota Instruments Inc, 103 1604, USA, precisión de ± 0.1 °C).
- Sistema Soxhlet para extracción de aceite.
- Estéreo microscopio (Nikon SMZ 1500, Japón).
- Microscopio Óptico (Nikon, Eclipse 50i. Japón).
- Cámara digital (Nikon Digital Sight DS-2Mv, TV Lens $\times 0.55$, Japón) con interface (Nikon, DSU2, Japón).
- Microscopio Confocal de Barrido Laser (LSM 710, Carl Zeiss, Alemania).
- Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (XL-30, Philips, USA).
- Criostato o micrótopo de congelación (Leica, CM1850, Alemania).
- Manómetro
- Texturometro Universal (5565, Instron, USA)
- Cámara digital 7.1 Megapíxeles modelo Stylus 710 (Olympus, China).
- Micro-Raman Confocal (LabRam HR800, Horiba Jobin-Yvon).
- Rotavapor Büchi R-205 (Suiza).
- Platina de calentamiento modelo PE94 (Linkam Scientific Instruments Ltd, UK).
- Estufa Eléctrica Hamilton Beach.

Software

- ImageJ v. 1.43u (National Institutes Health, Bethesda MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).
- SigmaStat v. 3.5 (Systat Software Inc., 2004, USA).
- SigmaPlot v. 11.0 (Systat Software Inc. USA).
- NIS-Elements F 2.30

5.2. Metodología

La metodología desarrollada en la investigación, se presenta en el diagrama de flujo de la Figura 12.

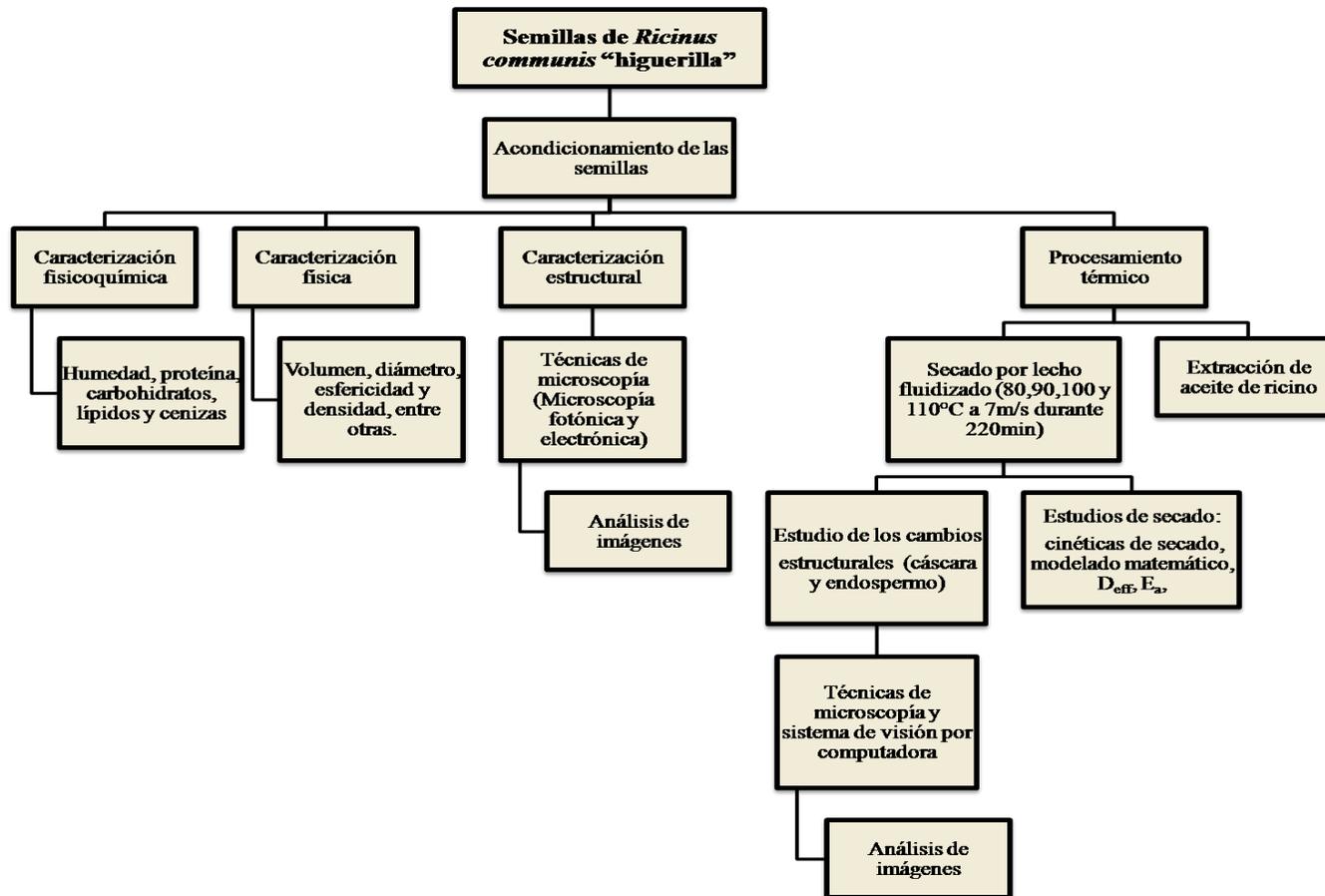


Figura 12. Diagrama de flujo del trabajo experimental

5.2.1. Acondicionamiento de la materia prima.

Las semillas de *R. communis* fueron provistas por la empresa *Promotora Agrícola La Estancia* (PROMAGRILE) del estado de Michoacán. Se realizó un acondicionamiento el cual consistió en la eliminación de la tierra u otros materiales ajenos a la semilla, así como aquellas que presentaron fisuras o daño en la superficie. Finalmente se almacenaron a temperatura ambiente en un contenedor.

5.2.2. Capítulo I. Caracterización química, física y microestructural de la semilla *R. communis* mediante las técnicas de microscopía y el análisis de imágenes.

5.2.2.1. Caracterización química

Se caracterizaron las semillas de *R. communis*, mediante un análisis fisicoquímico mostrados en el cuadro 4 (Onyeike y col, 2002). Los análisis se realizarán por triplicado.

Cuadro 4. Caracterización fisicoquímica de las semillas de *R. communis* y sus procedimientos analíticos usados para su análisis

Propiedades fisicoquímicas	Método	
Humedad	7.003-AOAC	Termobalanza (% de humedad)
Cenizas	923.03 AOAC	$\% \text{ Cenizas} = \frac{A}{B} \times 100$ A= peso de cenizas en grs. B= peso de muestra en grs.
Proteína cruda	955.04-AOAC (Kjeldahl)	% Proteina cruda = % N x 6.25
Grasa cruda	920.39-AOAC (Soxhlet)	$\% \text{ grasa cruda} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100$ m=peso de la muestra

		m_1 =tara del matraz solo m_2 =peso de matraz con grasa
Fibra cruda	920.86- AOAC	$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{(P_s - P_p) - (P_c - P_{cp})}{M}$ P_s = masa en g del residuo seco P_p = masa en g del papel filtro P_c = masa en g de cenizas papel P_{cp} = masa en g de las cenizas
Carbohidratos	$\% \text{ carbohidratos} = [100 - (\text{proteína} + \text{cenizas} + \text{grasa cruda} + \text{fibra cruda} + \text{humedad})]$	

Determinación de humedad (7.003-AOAC)

La determinación de la humedad de cada muestra se realiza mediante la determinación en termobalanza. Se toman aproximadamente 6 semillas con testa que son aproximadamente 2 g, se muelen en un mortero y se coloca en una charola de aluminio previamente puesta a peso constante y se determina la humedad en la termobalanza.

Determinación de Cenizas (923.03, AOAC, 1995).

La determinación de la cantidad de cenizas de las semillas de *R. communis* se realiza para determinar el contenido de minerales o residuos inorgánicos. Se toma una muestra de 3 gramos, se tritura hasta conseguir un tamaño de partícula pequeño, posteriormente se coloca en un crisol de porcelana previamente pesado. El crisol con la muestra es colocado en la mufla por un tiempo de 12-18 h., para incinerar la muestra, a una temperatura de 550-600°C. Transcurrido el tiempo, el crisol se retira de la mufla y deja enfriar en el desecador y se pesa de nuevo. Se realiza pesadas sucesivas hasta que el peso sea constante.

Determinación de proteína cruda (955.04-AOAC,1995).

Se determina mediante el método de Kjeldhal, el cual determina el nitrógeno total contenido en la muestra, posteriormente para convertir ese nitrógeno en proteína se multiplica por un factor de 6.25 para cereales, granos y derivados de soya. Se basa en la digestión de la materia orgánica con H₂SO₄, formándose sulfato de amonio que en exceso

con NaOH libera amoníaco destilándolo en ácido bórico, formándose borato de amonio que finalmente es valorado con HCl.

Determinación de grasa cruda (método de Soxhlet, 920.39)

La grasa cruda es el peso del residuo que se obtiene después de exponer una muestra previamente deshidratada con un solvente orgánico (en este caso hexano) no polar por cierto tiempo. Una cantidad previamente homogenizada y seca se coloca en el dedal y a su vez en el portacartuchos, en el matraz de extracción se adiciona el solvente y se deja de 6 a 8 horas a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/seg. Posteriormente el solvente se elimina por evaporación en el rotavapor.

Determinación de fibra cruda (920.86-AOAC)

Es un método basado en digestión ácida y alcalina, donde se obtiene el residuo que es la fibra cruda más sales que con la calcinación posterior se determina la fibra cruda. Tomar 2 g de muestra desengrasada, colocar en un vaso de 600 mL, agregar 1g de asbesto y 200mL de H₂SO₄ al 1.25% hervir durante 30 min con agitación y reflujo. Posteriormente se filtra y el residuo se lava hasta que el pH del agua de lavado sea la del agua. Se transfiere el residuo a un vaso y se agrega 200mL de NaOH al 1.25% hirviendo durante 30 min, luego se filtra y se lava con agua hasta que el pH del agua de lavado sea la del agua; finalmente el residuo se transfiere a un crisol y se seca a 130 °C durante 2h y se calcina a 600 °C durante 30 min; enfriar y determinar la masa que es fibra cruda.

Finalmente, el contenido de carbohidratos se calcula por diferencia de los demás componentes ya determinados.

5.2.2.2. Caracterización física

Volumen medio unitario (Vi) (Mohsenin, 1970).

Se determinó por el método de desplazamiento de un fluido para partículas de forma irregular. En una probeta graduada de 500 mL fue llenada de aceite vegetal comestible (190

mL), y se adiciona un número conocido de semillas (30); el volumen desplazado es registrado. El V_i fue determinado aplicando la siguiente expresión:

$$V_i = \frac{\text{volumen de aceite desplazado}}{\text{número de semillas}}$$

Densidad a granel (ρ_b). (Mohsenin, 1970)

La ρ_b fue calculada a partir de la razón de la masa y volumen que ocupan las semillas. En una probeta de 500mL se colocaron las semillas de higuera hasta un volumen conocido, este material se pesa (m) y se procede a dividir la masa entre el volumen ocupado (V):

$$\rho_b = \frac{m}{V}$$

Densidad verdadera (ρ_t). (Mohsenin, 1970)

La densidad verdadera es definida como la relación entre la masa de la muestra y su volumen real determinado mediante el método de desplazamiento por Tolueno.

Porosidad (ε). (Mohsenin, 1970)

La porosidad es definida como la fracción de espacio en el cual las semillas no ocupan, es calculada a partir de la siguiente relación:

$$\varepsilon = \left(1 - \frac{\rho_b}{\rho_t}\right) \times 100$$

En donde, ε es la porosidad en %; ρ_b es la densidad a granel en kg/m^3 ; y ρ_t es la densidad verdadera en kg/m^3 .

Medidas de las dimensiones axiales de las semillas (Arnosti y col, 2000)

Para determinar las dimensiones axiales de las semillas de *R. communis* fue necesario seleccionar 200 semillas, a las cuales se les midió el L (longitud del grano), W (ancho del grano), T (altura del grano) en mm mediante Esteromicroscopia y la metodología del

análisis de imágenes, dichas mediciones están basadas en que la forma de las semillas de *R. communis* son similares a un elipsoide escaleno en donde $L > W > T$.

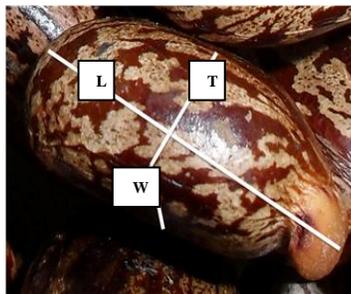


Figura 13. Dimensiones axiales características de las semilla de *R. communis* para determinar la esfericidad (L: longitud mayor, W: ancho o longitud menor y T: altura).

Diámetro medio geométrico (D_g)

El diámetro medio geométrico fue calculado mediante la relación descrita por Mohsenin (1970):

$$D_g = (LWT)^{1/3}$$

Donde, L es la longitud del grano; W es el ancho del grano y T es la altura del grano.

Área superficial (S)

El área superficial es determinada por la relación dada por McCabe y col., (1986):

$$S = \pi D_g^2$$

Esfericidad (φ)

La esfericidad se calculó a partir de la relación dada por Mohsenin (1970) y de las diferentes coordenadas obtenidas a partir de la metodología del análisis de imágenes descrito posteriormente (Arnosti y col., 2000):

$$\varphi = \frac{(LWT)^{1/3}}{L} = \frac{D_g}{L}$$

Donde, L es la longitud; W es el ancho y T es la altura en mm. Altos valores de esfericidad para las semillas, más parecido a una forma de esfera.

5.2.2.2. Caracterización microestructural

5.2.2.2.1. Técnicas de microscopia

En la presente investigación, se utilizaron cuatro diferentes técnicas de microscopia (Estereomicroscopia, Microscopia Óptica, Microscopia Confocal de Barrido Laser y Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental) con el fin de que el conocimiento de la microestructura de la semillas de *R. communis* es importante para el procesamiento industrial y la utilización de su aceite y proteína en la industria de los alimentos y energética (Ogunniyi, 2006).

Estéreomicroscopia

200 semillas de *R. communis* fueron observadas por el Estéreomicroscopio (Nikon SMZ 1500, Japón) con una magnificación de 0.75x. La adquisición de las imágenes se realizaron a través de una cámara digital (Nikon DS-2Mv, TV Lens x0.55, Japón) acoplada al microscopio y a una computadora personal, y con una interface (Nikon, DS-U2, Japón). Las imágenes fueron capturadas con el programas NIS-Elements F 2.30, con tamaño de 1600 X 1200 pixeles en RGB y almacenadas en formato TIFF para su posterior utilización en el análisis de imágenes.

Microscopia Óptica

Para el caso del microscopio óptico de procedió a tomar 50 semillas de *R. communis*, la testa fue removida y el endospermo fue seccionado longitudinal y transversalmente mediante el Criostato (Leica, CM1850, Alemania) con espesores de 10-20 μm (Ross y col, 2004; Sandoval, 2005). Posteriormente, los cortes fueron teñidos con azul de metileno al 1% para contrastar los cortes, Verde rápido (FCF) al 2% y Sudan IV al 2% en etanol (80%) para teñir la pared celular y los cuerpos lipidicos, respectivamente (Sandoval, 2005; Borem y col, 2008); subsecuentemente se observaron en el Microscopio Óptico (Nikon,

Eclipse 50i, Japon) a $\times 10/0.30$ y $\times 20/0.95$. Se adquirieron un total de 50 campos de observación, el proceso similar al utilizado por el Estereomicroscopio. Las imágenes fueron capturadas en color RGB y almacenadas en formato TIFF con tamaño 1280x960 pixeles.

Microscopia Confocal de Barrido Laser (MCBL)

Para el caso de la Microscopia Confocal de Barrido Laser, se tomaron 10 semillas al azar de las cuales se realizaron cortes del endospermo con grosor de $45\mu\text{m}$ con el Criostato (Leica, CM1850, Alemania). Los cortes fueron montados en un portaobjetos y vistas por el MCBL (LSM 710, Carl Zeiss, Alemania) a un objetivo de $\times 40/1.3$. Las muestras fueron excitadas con los láseres 405, 488 y 561nm con un 16%, 15% y 15% de capacidad del láser, respectivamente. El equipo cuenta con un modo de trabajo llamado canales espectrales o modo lambda usado para detectar las señales de autofluorescencia de los componentes de las semillas de *R. communis* (tales como son las proteínas y lípidos), en donde la intensidad de fluorescencia es detectada por el software ZEN del LSM 710. Los picos característicos de la señal de emisión de fluorescencia fueron 519 nm para el caso de las proteínas y 461 nm para los lípidos (Aguilera y Stanley, 1999; Amonsou y col., 2010). Se capturaron alrededor de 10 campos en color RGB y almacenadas en formato TIFF a 512×512 pixeles. Con el fin de reducir el ruido de la imagen fueron escaneadas con una velocidad de 4 y promediadas.

Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental (MEBA)

Se seleccionaron al azar 30 semillas de *R. communis*, las cuales fueron divididas en secciones de 2.5mm de grosor longitudinal y transversal, para estudiar el endospermo y el embrión; mientras que para la testa se seleccionaron 10 semillas (Pascual y col, 1998; Varela y col, 2008; Ellis y col, 2004). Los cortes fueron montados en los portamuestras de aluminio con cinta de carbono y observados mediante el MEBA (XL-30 Philips, USA) con una aceleración de voltaje de 25 kV. El MEBA tiene acoplado el detector de electrones secundarios gaseosos (GSE) y detector de electrones retrodispersados (BSE), los cuales fueron utilizados para la observación de la microestructura de la semilla de *R. communis*. A

su vez se determinó la composición química elemental y distribución de minerales de reserva (Lott y col, 1980; Lott y col, 1982; Lott y col, 1995) en el endospermo del tejido de la semilla mediante el análisis del detector de rayos X característicos por energía dispersa (Energy dispersive X-ray spectroscopy, EDAX modelo New XL30 y una área de activación de 10mm²), el cual está acoplado al MEBA, dicha técnica permite analizar regiones de la célula con mayor sensibilidad y obtener simultáneamente los elementos de interés en el estudio, permitiendo así realizar un análisis químico cualitativo de la región de observación (Lott y col, 1982; Lott y col, 1995) y un mapeo químico elemental (Stokes, 2008). Este método consiste en utilizar pseudo-color para representar la distribución espacial bidimensional de la emisión de energía de los elementos químicos de la muestra que es detectado por el detector EDX.

Para los análisis, se capturaron un total de 150 imágenes obtenidas a partir de GSE y BSE-MEBA, en escala de grises y almacenadas en formato TIFF con un tamaño de 712 x 484 píxeles. Para el análisis por EDX, se tomaron cinco campos de observación (100.7 mm² cada uno) con un tiempo de retención de 60 s a una aceleración de voltaje de 25 kV y una tasa de conteo 1000-3000 cps.

5.2.2.2.2. Análisis de Imágenes

A partir de las imágenes obtenidas por las técnicas de microscopía son utilizadas para obtener parámetros de tamaño y forma haciendo uso de las metodologías del análisis de imágenes (Du y Sun, 2004; Ramos y col, 2004; Kerdpi boon y col, 2007; Mendoza y col, 2007; Quevedo y col, 2008).

La metodología realizada es la siguiente:

- a) Estéreo microscopía. A partir de las imágenes en RGB obtenidas por esteromicroscopio de la vista superior y lateral de las semillas de *R. communis* son convertidas a formato de escala de grises usando el software de análisis de imágenes llamado ImageJ 1.43u (National Institutes Health, Bethesda, MD, USA). Posteriormente, las imágenes se cambiaron a formato binario realizando una segmentación manual seleccionando un nivel de grises (de 8 ± 1 a 255) que permitió

la separar la semilla del fondo. Las imágenes binarizadas fueron utilizadas para estimar el tamaño de la semilla de *R. communis* (L, W y T) de la semilla y la esfericidad (mencionada en la caracterización física), mediante el plugin *measure*.

- b) Microscopía Óptica. Las imágenes adquiridas a 10X de las muestras teñidas con verde rápido fueron utilizadas para medir parámetros de forma y tamaño de las células del endospermo. Las imágenes fueron convertidas del formato RGB a escala de grises, posteriormente se realizó una segmentación de la imagen seleccionando un nivel de grises (de 161 ± 5 a 255) que permitió separar la células del fondo de la imagen. Finalmente, los parámetros se determinaron por la herramienta *Analyze particles* del Software Image J 1.43u.

Los siguientes parámetros de forma y tamaño fueron determinados a partir de las imágenes binarias:

- Longitud mayor (ML): distancia más larga entre dos puntos de la frontera del objeto.
- Área (A): Número total de píxeles que caen dentro del contorno del elemento analizado, multiplicado por el área de un píxel. Se realizó el cambio de píxeles a μm^2 .
- Perímetro (P): La longitud total de los límites de un cuerpo. Calculado a partir de sus proyecciones horizontales y verticales.
- Diámetro mayor o Diámetro de Feret (DM): Es determinado por la distancia de dos píxeles con las coordenadas más largas a orientaciones diferentes. Este parámetro puede utilizarse para describir el encogimiento global de un objeto.
- Circularidad (C): Es definido como 4π multiplicado por el área y dividido entre el perímetro al cuadrado. Un círculo perfecto tiene un valor de factor de forma de 1.0 y una línea tiene un valor de 0.

$$\text{Circularidad} = 4\pi \frac{\text{Area}}{\text{Perimetro}^2}$$

- Razón de aspecto (AR): Es la relación entre el diámetro máximo y mínimo. Valores de 1.0 es para objetos equidimensionales y cuando tiende a infinito es para objetos extendidos.

$$\text{AR} = \frac{\text{diametro máximo}}{\text{diametro menor}}$$

- Redondez (R): Es la relación de cuatro veces el área sobre la raíz cuadrada del diámetro mayor. R determina la redondez de los objetos, un objeto perfectamente redonda tendrá una redondez de 1.0, mientras que los objetos rectos y alargados tenderán a cero.

$$R = \frac{4 \times \text{Área}}{\pi (\text{Diametro máximo}^{1/2})}$$

- Número de células por mm². Se contó el número de células por unidad de área.
- c) Microscopia Confocal de Barrido Laser. La metodología que se llevó a cabo es igual a las imágenes obtenidas por Microscopia Óptica, pero el nivel de grises utilizado para la segmentación manual realizada para separar los cuerpos lipídicos del fondo fue de 25±3 a 255. Las imágenes obtenidas, fueron utilizadas para caracterizar la estructura de los cuerpos lipídicos mediante la obtención de parámetros de forma y tamaño, descritos anteriormente para las células.
- d) Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental. Las imágenes de MEBA de las células embrionarias fueron utilizadas para obtener los mismos parámetros para las células del endospermo y los cuerpos lipídicos. La metodología seguida es igual a la de Microscopia óptica y Microscopia confocal de barrido laser, sin embargo la

segmentación manual realizada para convertir a niveles de grises fue de 90 ± 10 a 140 ± 8 . Las imágenes utilizadas fueron tomadas a 1000x.

Para el análisis de MO y MEBA, se analizaron un total de 1000 células y para MCBL un total de 500 cuerpos lipídicos.

5.2.2.2.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadísticos descriptivos para todos los experimentos y para los resultados del análisis de imágenes, se realizó un prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) para determinas la distribución normal de objetos usando el programa de estadística SigmaStat v. 3.5 (SYSTAT Software Inc., USA).

5.2.3. Capítulo II. Modelado matemático de las cinéticas de secado por lecho fluidizado a altas temperaturas de las semillas de *R. communis*.

5.2.3.1. Acondicionamiento de la materia prima y determinación de parámetros hidrodinámicos

Velocidad mínima de fluidización (Umf) (Kunii y Levenspiel, 1991).

La velocidad mínima de fluidización se determina de manera experimental, se tomó un lecho de relación L/D de 0.5, correspondiente a 250g de semillas hidratadas y sin hidratar. Dicha cantidad de semillas de higuierilla se pone en el lecho y se carga en el secador, posteriormente se incrementa la velocidad del gas sin calentar y se mide la caída de presión mediante un manómetro lleno de agua destilada.

La medición se realiza cada vez que se aumenta 2.5 m/s la velocidad del gas, iniciando en 2.5m/s. Las lecturas del manómetro están indicadas en centímetros de columna de agua, posteriormente se convierten en Pascales, según la ecuación:

$$\Delta P_L = h\rho g$$

En donde, h es la diferencia de altura en la columna de agua en m, ρ es la densidad del agua dada en Kg/m³ y g la gravedad en m/s².

Para determinar la velocidad de mínima de fluidización, se graficó la velocidad de superficial (U_o) vs la caída de presión (Pa); en donde la Umf se localiza en el punto en donde la caída de presión permanece constante con respecto a la velocidad del aire (Santiago, 1999).

Acondicionamiento de las semillas de higuierilla

Las semillas de *R. communis* variedad Silvestre Tiripiteo fueron hidratadas con agua destilada durante 24 h a temperatura ambiente hasta alcanzar una humedad de 16±0.3% b.h., dicha humedad fue escogida en base a dos razones; primero la humedad mínima para

la germinación (Ferreira y col, 2009; Mendes y col, 2009), y a que es similar a la humedad de las semillas cuando son cosechadas (Gely y Giner, 2007; Correa y col, 2006; Markowski y col, 2010; Ruiz y col, 2008). La humedad se determinó de acuerdo con el método 26-95.01 (AACC, 2003).

5.2.3.2. Proceso de secado

Después de atemperar las semillas de *R. communis*, se someten a secado por lecho fluidizado. Los experimentos de secado fueron realizados en un secador por lecho fluidizado esquematizado en la Figura 14, del Laboratorio de Ingeniería en Alimentos del Departamento de Graduados. La columna de secado es un cilindro de acrílico (10 cm de diámetro externo, 9.6 cm de diámetro interno y 43 cm de altura). Las semillas fueron sometidas a secado bajo cuatro temperaturas de aire de secado de 80, 90, 100 y 110°C. La temperatura del aire de secado fue mantenida en la entrada de la columna de secado en un rango de $\pm 2^\circ\text{C}$, regulando la velocidad de 7.0 ± 0.2 m/s, con la unidad de control de flujo de aire (Micromaster Vector Inverter, MMV1102, Siemens, USA). La temperatura de bulbo seco y la velocidad del aire fueron monitoreadas durante todo el tiempo de secado con el termotanómetro (TSI Inc. 8330-M, USA, precisión de ± 0.1 m/s). La temperatura de bulbo húmedo se midió con un termopar tipo K envuelto en algodón húmedo con agua destilada conectado a un termómetro digital (Dakota Instruments Inc, 1604, USA, precisión de ± 0.1 °C). A partir de la tabla psicrométrica, se determinó la humedad relativa del aire de secado, haciendo uso de las temperaturas de bulbo húmedo y de bulbo seco. La humedad relativa del aire fue de 1.4%, 1.2%, 0.6% y 0.4% para 80, 90, 100 y 110°C, respectivamente.

La velocidad del aire de secado (7.0 ± 0.2 m/s) para todas las condiciones de secado, fue utilizada de acuerdo a Gazor y Mohsenimanesh (2010), ya que una buena fluidización es obtenida cuando el lecho del material a secar muestra una mezcla perfecta. Este comportamiento es producido cuando la caída de presión medida en el lecho del material dentro del cilindro casi no tiene fluctuaciones conforme la velocidad del aire aumenta.

Para el caso de esta investigación, la temperatura es la principal variable que de acuerdo a diversos reportes afecta las cinéticas de secado, mientras que tanto la humedad relativa y la velocidad del aire de secado no son consideradas variables importantes para el secado de

materiales biológicos (Kashaninejad y col, 2007; Zielinska y Markowski, 2007; Gazor y Mohsenimanesh, 2010). Las temperaturas del aire de secado seleccionadas (80-110°C) fueron escogidas de acuerdo a que esas temperaturas están relacionadas con la desnaturalización de las proteínas, ya que como se sabe las semillas de *R. communis* contiene principalmente la proteína Ricina, que es altamente tóxica para los humanos (Pita y col, 2004; Bradberry, 2007). Adicionalmente, se sabe que el aplicar altas temperaturas podría ser útil para la utilización de las proteínas de *R. communis* en la industria alimentaria y para la mejora de la extracción de aceite de ricino empleado en la síntesis de biodiesel (Ogunniyi, 2006, Scholz y DaSilva, 2008). Para realizar el secado, se utilizó lotes de 250 ± 1 g de semillas, pesado con una balanza analítica digital (Adam equipment, PGW 4502i, EUA, precisión de ± 0.01 g) con una cama de lecho L/D de 0.5 (Santiago, 1999; Anaya, 2003). Durante los experimentos de secado, se registró la pérdida de peso del lote mediante la balanza electrónica a diferentes intervalos de tiempo (cada 2.5, 5, 10 y 20 min) hasta que la pérdida de peso se mantuvo constante (220 min).

Las cinéticas de secado se calculan a partir de la masa inicial, el contenido de humedad inicial y final, la pérdida de peso y el contenido de sólidos secos de las semillas. Para efectos de esta investigación, la pérdida de peso durante el secado se reporta en términos de la humedad adimensional (MR por sus siglas en inglés “Moisture ratio”) y en función del tiempo de secado. Después de cada experimento, el contenido de humedad final se determinó mediante el método de la termobalanza, y para el caso de la humedad en equilibrio fue determinado usando el método dinámico (Kashaninejad y col, 2007), en donde para todas las condiciones de secado, las muestras fueron mantenidas en el secador hasta que la pérdida de humedad cedió. Los valores de la humedad en equilibrio (M_e) obtenidos fueron 1.55 ± 0.26 , 0.17 ± 0.09 , 0.08 ± 0.01 y 0.06 ± 0.03 % b.s. (g de agua/g de solidos secos X 100) de 80, 90, 100 y 110 ° C, respectivamente. Los valores de la humedad en equilibrio se utilizaron para calcular el MR y para el modelado matemático de las cinéticas de secado. Los experimentos se repitieron tres veces y para terminaos de esta investigación, las cinéticas de secado se informan como el promedio de la repeticiones.

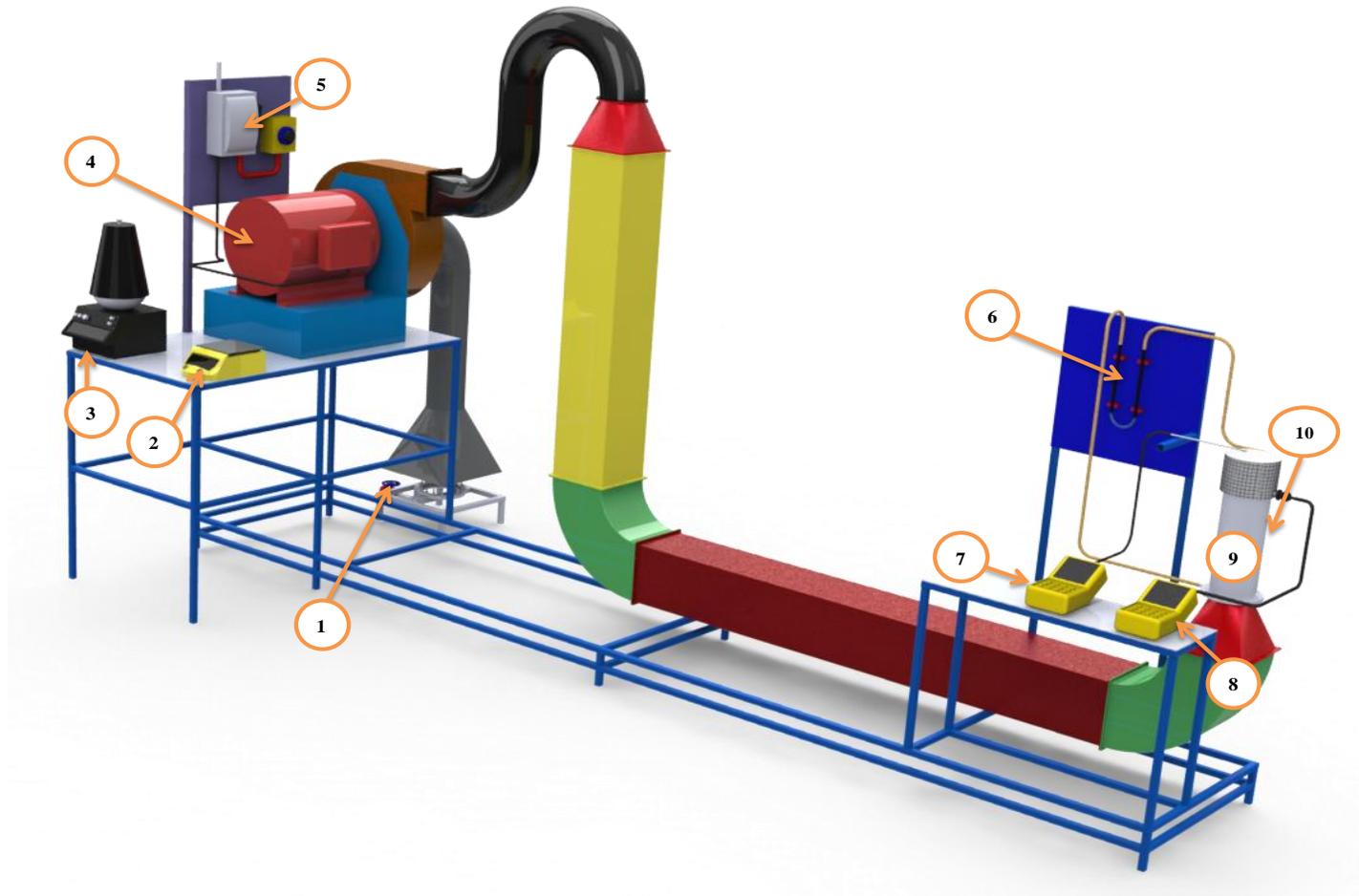


Figura 14. Esquema 3D del equipo de secado por lecho fluidizado del Laboratorio de Ingeniería en Alimentos. (1) Válvula reguladora del gas, (2) balanza digital analítica, (3) termobalanza, (4) turbo ventilador, (5) variador de frecuencia o controlador de la velocidad del flujo de aire, (6) manómetro, (7) termoanemómetro, (8) termopar tipo K envuelto en algodón húmedo conectado a un termómetro digital, (9) lecho de semillas *R. communis*, (10) columna de secado.

5.2.3.3. Modelado matemático de las cinéticas de secado

El modelado matemático ha sido ampliamente y efectivamente utilizado para el análisis de las cinéticas de secado de productos agrícolas. Es importante para el diseño y operación de secadores a condiciones ópticas de secado, así como permite predecir la temperatura, el tiempo y la humedad de las muestras que se estén secando. Como consecuencia, la validación de estos modelos dependen del buen ajuste del modelo de secado utilizado.

Para este trabajo, los datos experimentales de las cinéticas de secado de cada una de las cuatro temperaturas estudiadas fueron modelados con seis modelos matemáticos que serán descritos posteriormente. Para estos modelos, la humedad adimensional (MR) de las semillas de *R. communis* durante el secado por lecho fluidizado fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_0 - M_e}$$

En donde, M_0 es el contenido de humedad inicial; M_e es el contenido de humedad en el equilibrio y M_t que es el contenido de humedad a los diferentes tiempos (Sacilik, 2007; Doymaz, 2011).

Posteriormente, se calculó la velocidad del secado (DR por sus siglas en inglés “drying rate”) de las semillas de *R. communis* usando la ecuación siguiente y expresada como g (agua) g^{-1} (sólidos secos) min^{-1} .

$$DR = \frac{M_{t_1} - M_{t_2}}{t_2 - t_1}$$

En donde, t_1 y t_2 son tiempos de secado en min a diferentes tiempos durante el secado por lecho fluidizado; M_{t_1} y M_{t_2} es el contenido de humedad (b.h.) de las semillas de *R. communis* a los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente. Las curvas de la velocidad de secado, se utilizaron para evaluar qué tipo de mecanismo se lleva a cabo durante el secado de las semillas (Doymaz, 2008; Rafiee y col, 2009).

Los modelos matemáticos utilizados para ajustar las cinéticas de secado de diversos productos agrícolas y alimentarios, se dividen en tres categorías: teóricos, semi-teóricos y empíricos. Los modelos semi-teóricos (semi-theoretical thin layer models) son generalmente derivados de la simplificación de la solución general de las series de la ley de Fick, estos han sido usados ampliamente para el modelado de las cinéticas de secado de productos similares a las semillas estudiadas en esta investigación. Es por tanto, que en este trabajo se utilizaran estos modelos para el modelado matemático de las cinéticas de secado de las semillas de *R. communis*. Se seleccionaron seis modelos matemáticos, los cuales son frecuentemente utilizados en el secado de productos agrícolas similares (Doymaz, 2005; Sacilik y col, 2006; Demir y col, 2007; Ceylan y col, 2007; Kashaninejad y col, 2007; Sacilik, 2007; Zielinska y Markowski, 2007; Doymaz, 2008; Rafiee y col, 2009; Sirisomboon y Kitchaiya, 2009; Vega y col, 2010; Shen y col, 2011; Doymaz, 2011). Para el caso del modelado, con los datos experimentales de la humedad adimensional (MR) de cada condición de secado (80-110°C) fueron ajustados a los seis modelos, que a continuación son descritos.

✓ Modelo de Lewis o Exponencial

El modelo de Lewis es el modelo más simple utilizado para ajustar los datos experimentales de las cinéticas de secado, describe la transferencia de humedad de los alimentos, biomateriales y materiales o productos agrícolas. El modelo de Lewis ve de manera análoga que el flujo de calor desde el cuerpo sumergido en un fluido frío. Este modelo asume que la resistencia interna es despreciable, lo que significa que no hay resistencia en el movimiento o desplazamiento de la humedad del interior del material hacia la superficie del material (Doymaz, 2005; Kashaninejad y col, 2007). La velocidad de secado es proporcional a la diferencia de contenido de humedad entre el material de secado y el contenido de humedad de equilibrio en la condición del aire de secado. Este modelo puede ser escrito como:

$$MR = \frac{M - M_e}{M_0 - M_e} = \exp(-kt)$$

En donde, k es la constante del modelo y t es el tiempo.

✓ Modelo de Henderson y Pabis

El modelo de Henderson y Pabis es el primer término de una solución general de las series de la segunda ley de Fick. Este modelo también es conocido como modelo exponencial bi-paramétrico (Iguazú y col, 2003). La pendiente de este modelo, el coeficiente k, está relacionada con la difusividad efectiva de la humedad cuando el proceso de secado se lleva a cabo sólo en el período decreciente y el control del proceso es por la difusión del líquido (Doymaz, 2005; Gazor y Mohsenimanesh, 2010).

$$MR = \frac{M - M_e}{M_0 - M_e} = a \exp(-kt)$$

Donde a y k son constantes del modelo y t es el tiempo.

✓ Modelo de Page

El modelo de Page es una modificación empírica del modelo de Lewis, que corrige algunas deficiencias. Este modelo sugiere la utilización de dos constantes empíricas, las cuales han demostrado buenos ajustes para describir el secado de diversos productos agrícolas, como la soja, judías verdes, maíz y nueces de pistacho (Iguaz y col, 2003; Doymaz, 2005; Rafiee y col, 2009; Kashaninejad y col, 2007). El modelo está dado por:

$$MR = \frac{M - M_e}{M_0 - M_e} = \exp(-kt^N)$$

Donde k y N son constantes del modelo

✓ Modelo exponencial de dos términos

Este modelo es una parte de la serie infinita de exponenciales negativos derivados de la solución general de la ecuación de difusión. Esta solución se aplica independientemente de la geometría de las partículas y las condiciones del ambiente, pero asume que la difusividad es constante (Iguaz y col, 2003; Rafiee y col, 2009; Shen y col, 2011).

$$MR = \frac{M - M_e}{M_0 - M_e} = a_1 \exp(-k_1 t) + a_2 \exp(-k_2 t)$$

Donde a_1 , a_2 , k_1 , k_2 son las constantes del modelo

✓ Modelo logarítmico

Este modelo es una modificación del modelo de Henderson y Pabis con una constante empírica adicional (c). Este modelo ha sido utilizado con éxito para el ajuste de las cinéticas de secado en diferentes condiciones de operación, tal es el caso de semillas de *Jatropha curcas* L., granos, aceitunas verdes y semilla de calabaza (Demir y col, 2007; Sacilik, 2007; Sirisomboon y Kitchaiya, 2009).

$$MR = \frac{M - M_e}{M_0 - M_e} = a \exp(-kt) + c$$

✓ Modelo de aproximación de la difusión o modelo de difusión

Conocido indistintamente como el modelo de aproximación de difusión o modelo de difusión, es una modificación del modelo exponencial de dos términos. Para algunos materiales como la oliva (Akgun y Doymaz, 2005) y soja (Rafiee y col, 2009), el modelo tiende a subestimar en las últimas etapas, mientras que el modelo tiende a tener un buen ajuste en las etapas iniciales para diversas condiciones de secado.

$$MR = \frac{M - M_e}{M_0 - M_e} = a \exp(-kt) + (1 - a) \exp(-kbt)$$

Las constantes de la velocidad de secado y los coeficientes de todos los modelos fueron estimados utilizando el análisis de regresión no lineal de mínimos cuadrados, realizado mediante el algoritmo Marguardt-Levenberg. El propósito del ajuste es encontrar el modelo adecuado para describir la cinéticas de secado de las semillas de *R. communis*. El análisis de regresión no lineal se realizó mediante el software SigmaPlot v. 11.0 (Systat Software Inc. USA), y la validación estadística de los modelos se evaluó y comparo mediante el coeficiente de determinación R^2 ; el cual es el principal criterio de selección usado para seleccionar el mejor modelo, pero adicionalmente se determinaron otros parámetros estadísticos como criterios de selección, tal es el caso de los valores de chi-cuadrada (χ^2),

porcentaje relativo de la desviación media (E_{MD}) y el error de la raíz cuadrada de la media (E_{RMS}). Para mejores ajustes, los valores de R^2 deben de ser altos y lo de (χ^2 , E_{MD} y E_{RMS} deben de ser bajos (Demir y col, 2004; Erenturk y col, 2004; Kashaninejad y col, 2007; Sacilik, 2007; Gazor y Mohsenimanesh, 2010; Doymaz, 2011). Los parámetros fueron calculados usando las siguientes expresiones:

$$E_{MD} = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|M_{R,ex,i} - M_{R,pre,i}|}{M_{R,ex,i}}$$
$$E_{RMS} = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (M_{R,ex,i} - M_{R,pre,i})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$
$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (M_{R,ex,i} - M_{R,pre,i})^2}{N - z}$$

En donde, $M_{R,exp,i}$ es el i -ésimo coeficiente experimental de la humedad adimensional; $M_{R,pre,i}$ es el i -ésimo es la humedad adimensional predicha; N es el número de observaciones, y z es el número de constantes.

5.2.3.4. Estimación del coeficiente de difusividad efectiva (D_{eff}) y de la energía de activación

La difusividad efectiva de las semillas ha sido estudiada utilizando el modelo matemático de la difusión de la ecuación de la segunda ley de Fick. La solución a esta ecuación fue desarrollada por Crank (1975), la cual puede ser utilizada para diversos materiales con forma regular, como rectangulares, cilíndricos y esféricos. Es por tanto, que la Ecuación (-) puede ser aplicada a las semillas de *R. communis*, debido a que muestran una forma esférica equivalente y que se supone que la migración de la humedad es por difusión, y que el encogimiento es despreciable y los coeficientes de difusión constantes (Crank 1975; Sacilik, 2007, Ruiz y col, 2008; Hii y col, 2009; Vega y col, 2010; Gazor y Mohsenimanesh, 2010; Shen y col, 2011).

$$MR = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left[-n^2 \frac{\pi^2 D_{\text{eff}} t}{r^2} \right]$$

En donde, MR es la humedad adimensional, D_{eff} es la difusividad efectiva de la humedad (m^2/s), r es el radio equivalente (m) y t es el tiempo (s).

El valor de r para las semillas fue estimada asumiendo un radio equivalente a una esfera, el cual es calculado a partir del volumen unitario promedio (V_i) de acuerdo con lo reportado por Markowski y col, (2010).

$$r = \sqrt[3]{\frac{3V_i}{4\pi}}$$

Para largos tiempo de secado, la ecuación para estimar el coeficiente de difusividad puede ser simplificada para conservar únicamente el primer término, por lo que puede ser descrita en forma logarítmica, como se muestra en la ecuación siguiente. La difusión efectiva fue calculada a partir de la pendiente de la línea recta que se obtiene al graficar los datos experimentales del secado en términos de $\ln(MR)$ versus (con respecto) el tiempo de secado (Treybal, 1988; Geankoplis, 1999; Kashaninejad y col, 2007; Doymaz, 2011).

$$\ln MR = \ln \frac{6}{\pi^2} - \left(\frac{\pi}{r} \right)^2 D_{\text{eff}} t$$

Posteriormente, para evaluar la influencia de la temperatura del aire de secado sobre la difusividad efectiva, se determinó la energía de activación (Vega y col, 2005; Honorato y col, 2005; Calzetta y col, 2004) mediante la ecuación de Arrhenius (Calzetta y col, 2004; Doymaz, 2005; Kashaninejad y col, 2007; Ruiz y col, 2008; Doymaz, 2011) como se muestra en la siguiente ecuación (-):

$$D_{\text{eff}} = D_0 \exp \left(-\frac{E_a}{RT} \right)$$

En donde, D_{eff} es el coeficiente de difusividad efectiva (m^2/s), D_0 es la constante de difusividad equivalente a la difusividad a altas temperaturas infinitamente o también llamado como coeficiente de Arrhenius (m^2/s), E_a es la energía de activación (kJ/mol), R es

la constante universal de los gases (8.314 J/molK), y T es la temperatura absoluta (K). La energía de activación (E_a) y la constante (D_0) son determinadas a partir de la gráfica de $\ln(D_{\text{eff}})$ versus $1/T$ después de la linearización por la ecuación de D_{eff} .

5.2.4. Capítulo III. Cambios estructurales en la semilla de *R. communis* debidos al secado por lecho fluidizado.

Con la finalidad, de estudiar el efecto del secado por lecho fluidizado sobre la estructura de la semillas de *R. communis*, se evaluó en primera instancia, la testa (cascara) y posteriormente el endospermo.

5.2.4.1. Testa

5.2.4.1.1. Acondicionamiento de la muestra

Las muestras de las semillas de *R. communis* secas a las cuatro diferentes temperaturas (80, 90, 100 y 110°C) y sin tratamiento fueron almacenadas en bolsas de polipropileno hasta su análisis.

5.2.4.1.2. Análisis de la fractura

Para realizar el análisis de la fractura, se procedió a aplicar el método descrito por Varela y col, (2008) y Varela y col, (2008b) para cuantificar el patrón de factura y el daño microestructural debido al secado a través del análisis de imágenes y el sistema de visión por computadora.

- *Prueba de compresión*

Las semillas de *R. communis* nativas y secas se seleccionaron por tamaño y peso para asegurar una mínima variación entre lotes, se basó en el tamaño reportado por Perea y col, (2011). Por cada condición se evaluó un total de 30 semillas, el promedio de sus dimensiones y su peso se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Intervalos de los tamaños y pesos de las semillas utilizadas para la prueba de compresión.

Condición de secado	Largo (mm)	Ancho (mm)	Espesor (mm)	Peso (g)
Nativa	0.560-0.617	0.350-0.382	0.259-0.283	0.36-0.52
80°C	0.548-0.588	0.340-0.360	0.241-0.260	0.28-0.46
90°C	0.527-0.588	0.318-0.345	0.224-0.252	0.30-0.49
100°C	0.528-0.578	0.319-0.344	0.228-0.250	0.32-0.48
110°C	0.517-0.578	0.327-0.353	0.223-0.247	0.32-0.44

Posteriormente para realizar las pruebas de compresión, las semillas fueron puestas en el Texturometro Universal (5565, Instron, USA) con una celda cilíndrica plana de un diámetro de 2.5cm con un peso de 148.58g. Las condiciones de las pruebas para las cinco muestras fueron con una velocidad de 1 mm/s y una distancia de compresión de 2.5mm. La distancia de compresión fue del 50% para evitar sobrecargar el equipo y evitar interferencia generada por el endospermo (se realizaron pruebas preliminares de compresión, y el 50 % se escogió en orden de fracturar toda la muestra en piezas pero evitando la sobrecarga del texturometro universal). Se realizaron seis repeticiones por cada condición (seis semillas de cada uno de los cinco lotes de 30 semillas), y se graficaron las curvas de Fuerza (N) contra distancia. Los trozos debidos a la fractura fueron puestos en cajas petri, para su posterior análisis.

- *Cuantificación del patrón de fractura mediante el análisis de imágenes*

Después de la fractura de la testa de las semillas de *R. communis*, las piezas fueron colocadas con cuidado en una caja petri y observadas en el Sistema de Visión por Computadora a través de una cámara digital (Stylus 710, Olympus, China) conectada por una interface a la computadora, las muestras fueron puestas en una superficie blanca e iluminadas uniformemente por una lámpara fluorescente. Las imágenes fueron tomadas en formato *.jpg y almacenadas en color RGB. Posteriormente con el programa ImageJ 1.43u, primero se cambiaron a formato binario con una segmentaron manual, seleccionando un nivel de gris (de 153 a 255) que permitió separar las piezas del fondo. Las imágenes binarizadas fueron utilizadas para estimar parámetros de forma y tamaño descrito en el apartado de análisis de imágenes en el Tema I. Por otro lado, también se determinó el % de fracturas y la distribución de fragmentos en intervalos de tamaños, para describir el efecto del secado por lecho fluidizado sobre la testa. Finalmente se realizó un análisis estadístico para determinar si había diferencia significativas entre los parámetro de tamaño y forma de las cinco condiciones de trabajo.

5.2.4.1.3. Evaluación de los cambios estructurales

Para observar con más detalle en daño estructural en la cascara, se procedió a observarla mediante microscopia fotónica y microscopia electrónica.

- *Estéreomicroscopia*

Las semillas de *R. communis* nativas y secas mediante lecho fluidizado fueron observadas por el Estéreomicroscopio (Nikon SMZ 1500, Japón). La adquisición de las imágenes se realizaron a través de una cámara digital (Nikon DS-2Mv, TV Lens x0.55, Japón) acoplada al microscopio y a una computadora personal, y con una interface (Nikon, DS-U2, Japón). Las imágenes fueron capturadas con el programas NIS-Elements F 2.30, con tamaño de 1600 X 1200 pixeles en RGB y almacenadas en formato TIFF para su posterior análisis.

- *Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental*

Las semillas nativas y secas por lecho fluidizado fueron montadas en los portaobjetos de aluminio con cinta de carbono, y observadas con mediante el MEBA (XL-30 Philips, USA) con una aceleración de voltaje de 25 kV. Se tomaron 5 áreas de cada semilla (10 semillas por tratamiento), capturándose un total de 50 imágenes, las cuales fueron almacenadas en formato TIFF con un tamaño de 712 x 484 pixeles.

5.2.4.2. Endospermo

Con el fin de evaluar el efecto del secado por lecho fluidizado a cuatro temperaturas (80-110°C) sobre la microestructura del endospermo, se aplicó la microscopía electrónica de barrido ambiental y el análisis de textura de imágenes.

- *Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental*

Para la evaluación de los cambios microestructurales sufridos en las semillas de *R. communis* se procedió de la misma forma que la metodología descrita para la caracterización microestructural para el endospermo. Para este caso, se tomaron al azar 10 semillas, y de estas se tomaron dos áreas a una misma magnificación (300x), lo que da un

total de 20 imágenes por tratamiento a una aceleración de voltaje de 25 kV. Las imágenes fueron capturadas en formato TIFF con un tamaño de 712 x 484 píxeles.

5.2.5. Capítulo IV. Espectroscopía Raman

Con el objetivo de corroborar la composición de la semilla de *R. communis* y evaluar el efecto del secado por lecho fluidizado sobre su composición (proteínas y lípidos), se realizó un análisis con la Espectroscopía Raman, la cual es una prueba no destructiva. Los espectros Raman fueron obtenidos usando el Micro-Raman confocal (LabRam HR800, Horiba Jobin-Yvon). Las muestras fueron excitadas con el láser He-Ne a 632.81nm con un poder de laser de 86.3 MW. El espectrómetro de dispersión está equipado con una rejilla de 600 líneas/mm, y una resolución espectral de 1 cm^{-1} . El detector fue un detector CCD enfriado por peltier. El láser fue enfocado manualmente sobre la muestra con el objetivo de 50x del microscopio, el software fue usado para recolectar los espectros Raman de 248 a 4020 cm^{-1} con una acumulación de entre 20x5 escaneos.

Para realizar el análisis, a las semillas *R. communis* se les quito la testa y posteriormente se realizaron cortes longitudinales en el endospermo con un grosor de 2 mm. En los cuales se enfocaron un total de 6 áreas por muestra (condición de secado y nativa), reportándose el promedio de seis espectros. Finalmente, se identificaron los grupos funcionales de los principales componentes de la semilla (lípidos y proteínas). Una vez identificados, se observó la distribución de los componentes en escala micrométrica, utilizando el modo de mapeo Raman en los intervalos de los grupos funcionales más importantes de los componentes como son los lípidos y las proteínas.

5.2.6. Capítulo V. Extracción del aceite de ricino

Con la finalidad de evaluar el efecto del secado sobre la extracción, se procedió a realizar la extracción del aceite mediante soxhlet y se describió la microestructura antes y después de la extracción mediante microscopia electrónica de barrido ambiental. Ya que es sabido que el tratamiento térmico facilita la extracción del aceite, por lo que es importante estudiar las variables que puedan facilitar la extracción.

5.2.6.1. Acondicionamiento de la muestra

Las semillas de *R. communis* nativas y las que fueron secadas por lecho fluidizado a las cuatro temperaturas (80-110°C), se les determinó la humedad inicial mediante el método 7.003 (AOAC). Posteriormente se descascaron, y el endospermo fue sometido a una reducción de tamaño (Gutiérrez, 2011), en donde el promedio de partícula fue de 14.5 ± 8.8 mm², con el objetivo de iniciar con un tamaño de muestra homogéneo.

5.2.6.2. Tiempo de contacto

Como se sabe, el tiempo de exposición (tiempo de contacto entre el disolvente y el soluto) es una de las variables más importantes a considerarse cuando se hace la extracción.

Para realizar la extracción del aceite, se pesaron 5 g de muestra (molida) de semillas *R. communis* sin ningún tratamiento, y se colocaron en el cartucho que previamente estaba a peso constante. Se determinó el tiempo de contacto ideal para obtener rendimientos altos; se realizó la extracción continua a 4, 6, 8, 12, 18 y 14 h. Posteriormente, el cartucho con la muestra se evaporó por 12 h a temperatura ambiente para eliminar el exceso de hexano, para después colocarlos a peso constante y pesar los cartuchos. Las pruebas se realizaron por triplicado. A través de la fórmula siguiente se obtuvo el rendimiento y la eficacia del proceso:

$$\% \text{ aceite extraído} = \frac{\text{g aceite extraído}}{\text{g de semilla}}$$

5.2.6.3. Extracción de aceite

Ya que se ha establecido el tiempo de contacto (8 h), se procedió a realizar la extracción del aceite de las muestras de cada uno de los tratamientos térmicos (80, 90, 100 y 110°C). Se tomaron 5g de muestra previamente homogenizada y descascarada, y se colocó en el cartucho; más 150 mL de hexano. Posteriormente se puso a reflujo durante 8 h (Akpan y col., 2006; Ogunniyi, 2006), y se determinó el % de aceite extraído. Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.2.6.4. Evaluación de los cambios microestructurales

Para describir los cambios microestructurales que sufre el endospermo al ser extraído el aceite, se hizo uso de la microscopía electrónica de barrido ambiental. Primero se observó las muestras de las semillas nativas y secadas por lecho fluidizado previamente descascaradas y homogenizadas en el tamaño. Posteriormente, después de la extracción se observaron también, para describir el efecto de la extracción del aceite. El procedimiento a seguir fue colocar un poco de muestra en los portaobjetos de aluminio con cinta de carbono y observarlas mediante el MEBA (XL-30 Philips, USA) con una aceleración de voltaje de 25 kV. Se tomaron 20 imágenes por muestra, capturándose un total de 100 imágenes, las cuales fueron almacenadas en formato TIFF con un tamaño de 712 x 484 píxeles. Posteriormente, al igual que las imágenes del endospermo, se le aplicó el análisis de textura de imágenes (Arzate y col, 2011) para describir cualitativamente los cambios sufridos por la extracción del aceite y el efecto del tratamiento térmico (secado) previamente realizado. Es importante tener en cuenta que en el MEBA, el brillo y contraste son las variables más importantes que deben ser controladas para la adquisición de la imagen; por lo que para poder aplicar el análisis de textura de imágenes los parámetros fueron mantenidos constantes o en su defecto muy similares para todas las muestras al momento de la adquisición de las imágenes.

- *Análisis de textura de imágenes*

El análisis de textura de imágenes fue aplicado para caracterizar cuantitativamente los cambios microestructurales de la torta residual de la semillas de *R. communis* después de la extracción del aceite. De acuerdo con Du y Sun (2004), la textura de una imagen es una característica representada por el arreglo espacial de los niveles de grises de los píxeles de la imagen. En esta investigación, se seleccionaron tres parámetros texturales para cuantificar los cambios microestructurales los cuales fueron: homogeneidad, entropía y textura fractal.

Las imágenes de MEBA que en el formato de adquisición ya están en escala de grises, se le aplico el algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises (GLCM por sus siglas en inglés, “Gray Level Co-Occurrence Matrix”) y el de Modificado de Conteo de Cajas Diferencial (SDBC por sus siglas en inglés, “Shifting Differential Box Counting”), para obtener los parámetros desde las imágenes en escala de grises (Arzate y col, 2011; Haralick y col, 1973; Wen y col, 2003). La obtención de estos parámetros a partir de las imágenes fue realizada por el programa Image J 1.43u.

- *Algoritmo de Matriz de Co-Ocurrencia en Escala de Grises*

La GLCM es un algoritmo estadístico de segundo orden que compara dos píxeles vecinos a un determinado tiempo y compila la frecuencia a la cual diferentes niveles de grises pueden ser encontrados dentro de un área restringida (Gosselin y col, 2008). Tres variables son consideradas en este algoritmo: el número de niveles de grises (0 a 255), la distancia entre los píxeles (d) y el ángulo de desplazamiento (θ) (Haralick y col, 1973). La textura de las imágenes fue analizada a través del estudio de la dependencia espacial de los valores de los píxeles representada por una matriz de co-ocurrencia $P_{d,\theta}$ con entrada en $P_{d,\theta}(i, j)$ siendo la frecuencia relativa o distancia para dos píxeles (d) en la dirección (θ) teniendo valores i y j , respectivamente. De acuerdo con Haralick y col. (1973), con el algoritmo GLCM es posible calcular catorce parámetros texturales. Pero para este caso de estudio, solo se consideraron útiles tres: homogeneidad, entropía y la dimensión fractal.

- **Segundo momento angular.** Mide la uniformidad textural de la imagen y es un parámetro opuesto a la entropía.
- **Diferencia de momento inverso.** Es una medida similar a la energía; la cual también representa la homogeneidad local de la imagen.
- **Entropía.** Mide el desorden o aleatoriedad de las imágenes y puede ser usado para caracterizar la textura de la imagen y es un indicativo de la complejidad dentro de una imagen, por tanto, imágenes complejas tendrán altos valores de entropía (Haralick y col, 1973; Mendoza y col, 2007).

Estos parámetros fueron obtenidos a partir del plug-in GLCM Texture disponible en el programa Image J. v.1.43.

- *Algoritmo Modificado de Conteo Diferencial de Cajas*

La dimensión fractal de textura o textura fractal fue determinada usando el algoritmo Modificado de Conteo Diferencial de Cajas. Este algoritmo se basa en un gráfico de superficie de intensidad, el cual es generado a partir de imágenes en escala de grises 2D, graficando las coordenadas de los píxeles (x, y) y su respectivo nivel de gris en el eje z (Quevedo y col, 2008; Weng y col, 2003). La dimensión fractal fue estimada usando el programa Image J con el plug-in SDBC. Este parámetro es una medida directamente relacionada con el grado de rugosidad de la superficie. Para imágenes en escala de grises 2D, valores entre 2 y 3 de dimensión fractal pueden ser obtenidos, por lo tanto, el valor de dimensión fractal para una superficie rugosa es mayor que para una superficie lisa (Chanona y col, 2004; Quevedo y col, 2009). Este parámetro fue estimado para todas las imágenes en escala de grises obtenidas del MEBA.

Resultados y discusión

6.1. Capítulo I. Caracterización química, física y microestructural de la semilla de *R. communis* mediante las técnicas de microscopía y el análisis de imágenes.

6.1.1. Caracterización química

La principal composición de las semillas de *R. communis* son los lípidos y las proteínas (51.6% y 28.48%, respectivamente), clasificándose así dentro de las oleaginosas, su composición química puede ser observada en la Tabla 1. Aunque es una semilla no comestible, el contenido de proteína es superior al promedio reportado para otros granos y semillas comestibles como es el trigo (*Triticum aestivum* L.) (10.6%), maíz (*Zea mays* L.) (11%) y arroz (*Oryza sativa* L.) (7.4%) (Hernández y col., 1977); pero comparable con el contenido de proteína de *Jatropha curcas* (25-28%) (López, 2008), sin embargo menor que el de soya (*Glycine max* L.) (40.4%). Anteriormente, el contenido de proteínas de las oleaginosas eran un subproducto de la obtención de aceites vegetales, pero hoy en día resulta evidente que tiene una gran importancia para la formulación de piensos para la alimentación de ganado, así como muchas de estas proteínas tienen un gran valor económico (Smith, 1979).

En el caso de los lípidos, su contenido es comparable con los reportados para semillas oleaginosas comestibles, como el cacahuete (*Arachis hypogaea*) (47%) o girasol (*Helianthus annuus*) (51%); así como con el contenido de lípidos promedio de *Jatropha curcas* (40-60%) la cual es una semilla oleaginosa no comestible (Hernández y col, 1977; López, 1998; Karaj y Müller, 2010), pero mayor al contenido promedio de oleaginosas como el cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) (35%) y la canola (*Brassica napus*) (40-44%).

Los resultados obtenidos del análisis proximal en el laboratorio en cuanto a contenido de proteína y lípidos son similares a los reportados por Okorie y col, (1985). Sin embargo, pequeñas variaciones en los otros componentes podrían deberse a las diferentes variedades de higuierilla que existen alrededor del mundo. Estos resultados confirman que la semilla de *R. communis* puede ser considerada como una buena fuente de proteína para la alimentación de ganado y de aceite, para la industria energética (Karmakar y col, 2010).

6.1.2. Caracterización física

Los valores de las propiedades físicas determinadas para las semillas de *R. communis* se pueden observar en la Tabla 1. Estos valores permiten caracterizar a las semillas de *R. communis* variedad Silvestre Tiripiteo, dichos parámetros no han sido reportados aun en la literatura. Las mediciones de las dimensiones axiales (largo, ancho y alto) de las semillas fue de 13.5 ± 0.08 mm, 8.7 ± 0.04 mm y 6.1 ± 0.04 mm, respectivamente, los resultados están de acuerdo por lo reportado por Greenwood y col, (2005). Las determinaciones de estas mediciones pueden ser útiles para el diseño de equipo de limpieza (tamizado) de las semillas y el proceso de extracción.

La densidad verdadera de las semillas de *R. communis* fue de 1458 ± 27 kg/m³, mientras que la densidad a granel fue de 538 ± 11 kg/m³. Estos valores son altos de acuerdo a otros reportes para semilla y granos (soja, calabaza, cocoa, maíz, entre otros) (Deshpande y col, 1993; Omobuwajo y col, 2003; Mohsenin, 1970). La densidad de las semillas juega un papel importante para el secado y almacenamiento, en el diseño de silos, para la clasificación y limpieza, para la evaluación de la madurez, para la calidad de las semillas, entre otras más (Mohsenin, 1970).

La porosidad de la semilla de *R. communis* fue de $63 \pm 0.63\%$ con un volumen unitario promedio de 406.67 ± 25.28 mm³. Estos valores son altos, en comparación con los reportes para otras semillas como lo son la de calabaza (Omobuwajo y col, 2003), hemp (Sacilik y col, 2003), frijol (Oje y Ugbor, 1991), y frijol oleaginoso africano (Asoegwu y col, 2006). De acuerdo con Mohsenin (1970), altos valores de porosidad puede ser asociado a formas irregulares de semillas. Esta propiedad, es importante para el diseño de equipo para el almacenamiento de semillas. La esfericidad fue de 0.67 ± 0.02 , lo cual indica que la forma de las semillas hace que sea difícil el rodar sobre la superficie y facilita el deslizamiento (Perez y col, 2007; Tunde-Akintunde y Akintunde, 2004). Adicionalmente el ancho de la testa fue de alrededor de 281.97 ± 13.21 μm. El diámetro medio geométrico y el área superficial de las semillas fueron 8.95 ± 0.05 mm y 251.54 ± 0.01 mm², respectivamente. Se sabe que el conocimiento del área superficial de los materiales biológicos, es importante para la manipulación y el procesamiento de los productos, por lo que estos valores podrían indicar que la velocidad de transferencia de masa y energía a través de la superficie de las

semillas es alta en comparación de otras semillas oleaginosas (Mohsenin, 1970; Oje y Ugbor, 1991; Sacilik y col, 2003; Tunde-Akintunde y Akintunde, 2004).

La determinación de estas propiedades físicas son consideradas como parámetros útiles y esenciales para facilitar el diseño de equipo para el manejo, cosecha, procesamiento, almacenamiento, extracción de aceite, transportación y secado de las semillas. Se sabe que varios tipos de equipos de limpieza, clasificación y separación están diseñados en base a las propiedades físicas de los granos o semillas (Mohsenin, 1970; Sacilik y col., 2003), es por tanto que este tipo de propiedades son importantes para el secado. De acuerdo con las características físicas que presentan las semillas *R. communis*, podemos clasificarlas dentro de las partículas tipo D de acuerdo con Geldart (Kunii y Levenspiel, 1991). En este tipo de clasificación corresponde a partículas de 1-20 mm; eruptivas, grandes y densas, tienen una fluidización difícil, en lechos profundos su comportamiento es errático dando lugar a grandes explosiones de burbujas o erupciones si la distribución del gas es muy irregular, más sin embargo para lechos bajos fluidizan bien. Algunos ejemplos son granos de café, trigo, cebada, arroz, maíz, soya, sorgo, triticale, entre otros. Por lo tanto, es importante conocer la partícula y sus características, ya que de esto depende su comportamiento en el secador por lecho fluidizado (Kunii y Levenspiel, 1991; Santiago, 1999).

6.1.3. Caracterización microestructural

Las semillas de *R. communis* ha sido estudiada por las diversas técnicas de microscopía (fotónica y electrónica) en orden de caracterizar su microestructura.

Estéreomicroscopio

La estructura general de las semillas de *R. communis* observadas por estéreomicroscopio es presentada en la Figura 15. Las semillas tienen una forma elipsoide característica y las dimensiones promedio son mostradas en el Cuadro 6. La testa es frágil y brillante y presenta un patrón de color moteado complejo; con una carúncula esponjosa y en la base se halla el micrópilo (Figura 15a-c). La estructura interna muestra un endospermo esponjoso y abundante. El embrión es de alrededor de 6 mm de largo, formado por el eje del brote de raíz y dos cotiledones delgados y alargados (Grenwood y col. 2005), estas estructuras internas son típicas (Figura 15d-e).

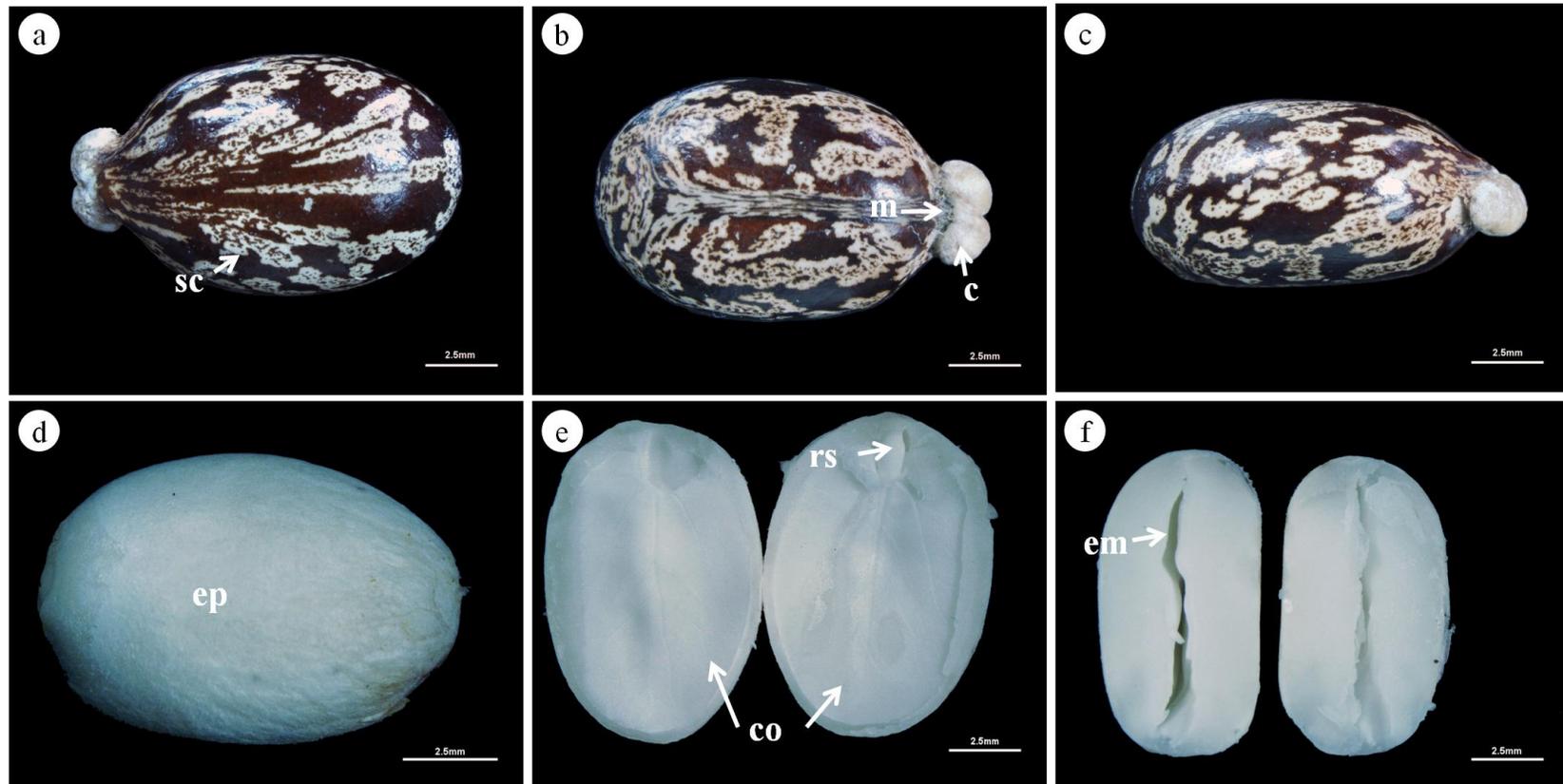


Figura 15. Imágenes de Estereomicroscopia de las semillas de *R. communis*. Vistas superior y lateral (a, b y c, respectivamente), semillas sin testa (d) y separada en cotiledones cortados transversal y longitudinal (e y f, respectivamente). sc, testa; c, carúncula; co, cotiledones; rs, eje del brote de la raíz; ep, epidermis; en, endospermo; m, micrópilo; em, embrión.

Microscopia Óptica

La microestructura de las células del endospermo, epidermis y embrión de las semillas de *R. communis* son mostradas en la Figura 16., dichas imágenes muestran cortes histológicos con tinciones específicas de la composición de la semilla (Autio y Salmenkallio-Marttila, 2001). Basado en la técnica de tinción con verde rápido (FCF) (Figure 16 a-b), colorante catiónico que tiñe compuestos lignocelulósicos de los tejidos vegetales (Luna, 1968; Sandoval, 2005), es posible observar que las células del endospermo muestran una forma isodiamétrica, y que la epidermis consiste en una delgada película uniforme de células. Este contraste en las células, permitió aplicar el análisis de imágenes y obtener algunos parámetros morfológicos de las células del endospermo, los cuales son mostrados en la Cuadro 6.

El área de las células del endospermo presentaron una variación amplia, de 609.74-1417.18 μm^2 . Esta variabilidad podría estar asociada con la heterogeneidad del tamaño células a lo largo del tejido del endospermo, ya que las células pueden estar en diferentes estados de desarrollo, esto se ha reportado (Young y col, 2004a), que el diámetro de las células del endospermo del cacahuete varía de 12 a 50 μm dependiendo de su madurez, mostrando pequeños tamaños de células para semillas inmaduras, mientras que grandes tamaños de células para semillas maduras. Para el caso del perímetro ($141.98 \pm 30.21 \mu\text{m}$) y el diámetro mayor ($44.01 \pm 8.05 \mu\text{m}$) mostraron grandes variaciones. Los valores del diámetro de las células del endospermo de las semillas de *R. communis* fueron similares a las reportadas para células del endospermo de cacahuates maduros (Young y col, 2004a) donde los rangos de valores del diámetro son de 25 a 45 μm y para semillas de almendra de 15 a 40 μm (Young y col, 2004b). Los valores de los parámetros de AR (1.28 ± 0.17) y R (0.79 ± 0.10) de las células del endospermo de la semilla de *R. communis* indican que las células tienen forma ovoide (Figura 16d). El número de células por mm^2 (densidad celular) presentó un valor promedio de 570 ± 10 (Cuadro 6), los valores bajos de densidad celular podrían estar asociados con la porosidad del material y a altos valores de tamaño celular. Este valor de densidad celular representa un dato importante para estudios de transferencia de masa y

calor durante el secado de tejidos vegetales a escala microscópica (Castro-Giráldez y col, 2011; Campos-Mendiola y col, 2007).

Los cuerpos lipídicos pueden ser identificados cuando son tenidos con Sudan IV (Figura 16c), los cuerpos lipídicos mostraron una forma esférica típica similar a otros reportes de semillas como almendra (Young y col., 2004b; Ellis y col., 2004), cacahuete (Young y col, 2004a), soya, café (Borém y col, 2008), marama (Amonsou y col, 2011). Los cortes del endospermo realizados por el micrótomo indujeron el desarrollo de gotas de lípidos debido a la coalescencia de los cuerpos lipídicos. Además, el corte produce la abundancia de los cuerpos lipídicos y que estos difundan desde el endospermo hacia la orilla de la epidermis (Figura 16c), es por lo tanto que las semillas de *R. communis* pueden ser usadas ampliamente para extraer aceite y subsecuentemente para la producción de biodiesel (McKeon y col, 2000; Ogunniyi, 2006). La Figura 16d muestra las células del endospermo teñidas con azul de metileno, el cual se utiliza para contrastar las diferentes estructuras y composición del tejido. Permitted observar la morfología de las proteínas, las cuales mostraron una forma esférica; en estas semillas los cuerpos proteicos están asociados a los cuerpos lipídicos.

La microscopía óptica permite caracterizar las diferentes estructuras celulares de las semillas de *R. communis*, proveyendo información relevante para el estudio de éste biomaterial, sin embargo la composición de estas estructuras celulares es importante para el entendimiento del arreglo estructural

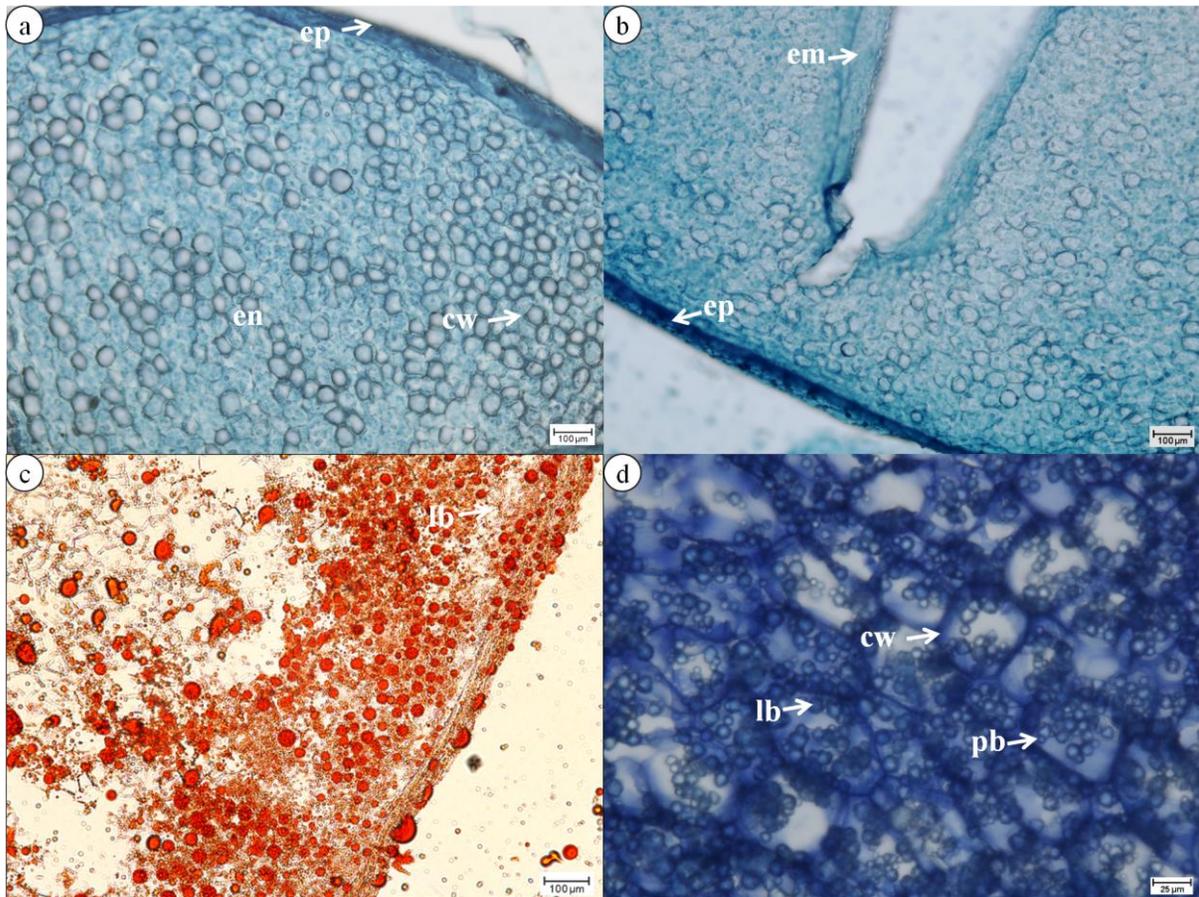


Figura 16. Imágenes de Microscopía Óptica del endospermo de las semillas de *R. communis*. Pared celular teñidas con verde rápido (FCF) y endospermo (a); la epidermis y el embrión son remarcados por la tinción de verde rápido (b); color naranja característico corresponde a los cuerpos lipídicos teñidos con Sudan IV (c) y toda la célula teñida con azul de metileno para contrastar las estructuras (d). ep, epidermis; en, endospermo; em, embrión; lb, cuerpos lipídicos; pb, cuerpos proteicos; cw, pared celular.

Microscopia Confocal de Barrido Laser (MCBL)

La MCBL permite la identificación de un número ilimitado de componentes (proteínas, lípidos, carbohidratos, entre otros) a través del uso de la fluorescencia, lo que permite realizar una caracterización microestructural de diversos biomateriales (Amos y White, 2003). Las imágenes de MCBL (Figura 17) de las células del endospermo mostraron una autofluorescencia verde-roja y clúster de cuerpos lipídicos en las células del endospermo. También se observó que las proteínas están asociadas a los cuerpos lipídicos en estructuras llamadas oleosinas (Murphy y col, 2001; Purkrtova y col, 2008), las cuales son

relativamente proteínas de bajo peso molecular (aproximadamente de 16-24 kDa) que se acumulan en la superficie de los cuerpos lipídicos en semillas tolerantes a la desecación. Este tipo de estructuras son caracterizadas por un dominio central hidrófobo de 70 residuos que están flanqueados con más dominios polares con terminación N y C. Los numerosos casos de oleosinas y su gran abundancia en las semillas oleaginosas (<10-20% de proteína total de la semilla) ha llevado a sugerir que pueden estar implicados en la formación de los cuerpos lipídicos de la membrana del retículo endoplasmático durante el desarrollo de la semilla y/o movilización de los cuerpos lipídicos después de la germinación de la semilla.

En los tejidos vegetales, existen varios componentes, tales como aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas, ácidos nucleicos, alcaloides, esteroides, flavonoides, lípidos, fosfolípidos, compuestos lignocelulosicos y otros metabolitos que pueden llegar a presentar autofluorescencia cuando son excitados con láser ultravioleta-verde (Aguilera y Stanley, 1999). Por esta razón, la autofluorescencia de la pared celular (verde) y proteínas (red) asociadas a los cuerpos lipídicos (verde) fue observada (Figura 17); esta propiedad es debida a la composición química de proteínas, lípidos y compuestos lignocelulosicos (Aguilera y Stanley, 1999; Amonsou y col, 2011).

El análisis de imágenes permitió obtener parámetros de forma y tamaño de los cuerpos lipídicos a partir de las imágenes de MCBL (Cuadro 6). El tamaño de los cuerpos lipídicos fue evaluada a partir de los parámetros obtenidos de las imágenes tales como, el área ($93.07 \pm 18.44 \mu\text{m}^2$), perímetro ($42.55 \pm 5.59 \mu\text{m}$) y el diámetro mayor ($12.63 \pm 1.30 \mu\text{m}$). Los cuerpos lipídicos de las semillas de *R. communis* presentaron una gran tamaño en comparación con otros cuerpos lipídicos de otras semillas oleaginosas (Ellis y col, 2004; Young y col, 2004a; Young y col, 2004b) tal como lo es el cacahuete (1-2 μm de diámetro) y la almendra (1-5 μm de diámetro). Los cuerpos lipídicos mostraron aproximadamente una forma circular de acuerdo a los parámetros de AR y R cercanos a 1 (AR= 1.16 ± 0.1 y R= 0.87 ± 0.07); estos resultados confirmaron la forma esférica de los cuerpos lipídicos observadas por MCBL (Figura 17) y Microscopía óptica (Figura 16d). La forma esférica de los cuerpos lipídicos ha sido reportada para otras semillas como es en el café, almendras, *Brassica rapa* L, y cacahuete (Bórem y col, 2008; Ellis y col, 2004; Young y col, 2004a; Young y col, 2004b; Kuang y col, 2000; Pascual-Alberto y col, 1998). Es sabido que los

organelos de reserva de aceite, tal como los cuerpos lipídicos presentes en forma esférica, ya que esta forma es una forma geométrica estable para el almacenamiento de las sustancias fluidas dentro de las células. De acuerdo con Murphy y col, (2001) y Purkrtova y col, (2008) las proteínas estructurales rodean a los lípidos dándole la forma redonda de los cuerpos lipídicos en las semillas oleaginosas. Por esta razón, los parámetros de AR y R podrían ser considerados como indicadores cualitativos y cuantitativos de fuentes de aceite, sin embargo más investigaciones en esta área son necesarias. Los grandes tamaños y la alta densidad de los cuerpos lipídicos por célula (9.57 ± 2.40) en las células del endospermo pudo determinarse al aplicarle el análisis de imágenes. La MCBL y el análisis de imágenes fueron utilizados para estudiar la composición y morfología de los cuerpos lipídicos en las células del endospermo de las semillas de *R. communis*.

La técnica de MCBL es una novedosa herramienta que podría ayudar a caracterizar la composición de diversos materiales biológicos. (Amonsou y col, 2011) y que con la ayuda del análisis de imágenes realizar una caracterización cuantitativa.

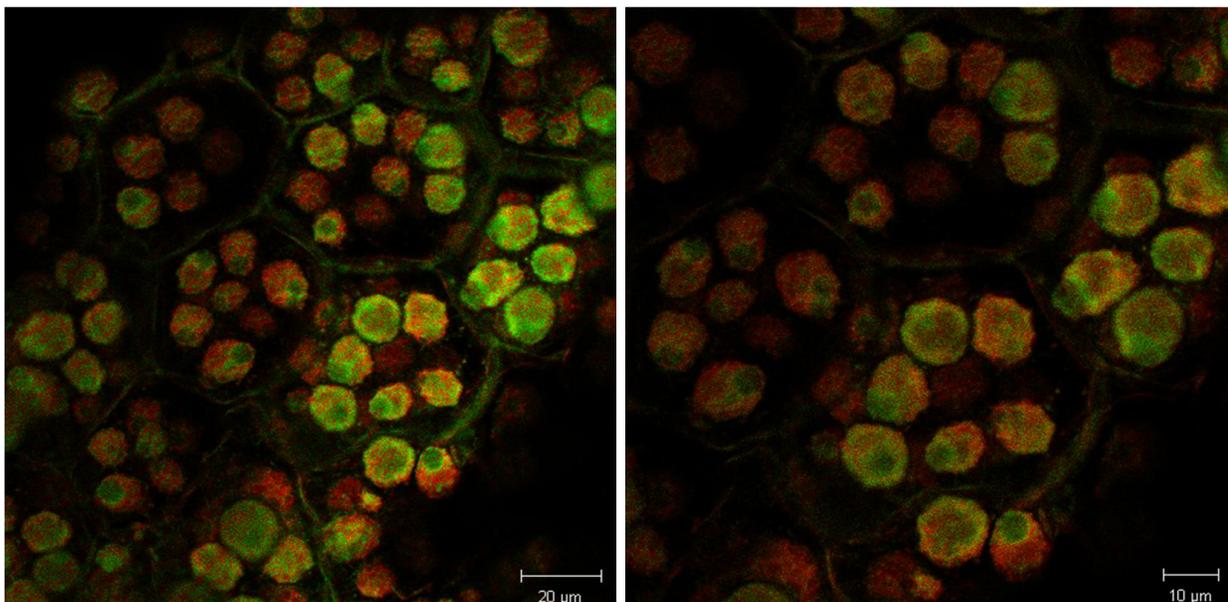


Figura 17. Imágenes de Microscopia Confocal de Barrido Laser que muestran la autofluorescencia del endospermo de la semilla de *R. communis*. Verde: cuerpos lipídicos; rojo: cuerpos proteicos.

Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental

La microestructura de las semillas consta de varias partes mostradas en la Figura 18. La primera estructura es la testa que mide alrededor de $281.97 \pm 13.21 \mu\text{m}$., que consta de tres diferentes capas: el tegumento, las células de Malpighi y la epidermis (Figura 18a). El tegumento (Figura 18b-c) es una capa gruesa de células que envuelve a toda la semilla protegiéndola de factores externos (golpes, evita rupturas), se encarga de regular el intercambio de elementos entre el ambiente y el endospermo (agua, CO_2 , O_2 , entre otros). Adicionalmente esta estructura es importante porque mantiene el vigor cuando las semillas quedan expuestas a condiciones no favorables durante la pre-cosecha y el almacenamiento (Ferreira y col, 2010). Esta estructura está compuesta por haces vasculares (Figura 18c), el grosor del tegumento es de $45.80 \pm 6.04 \mu\text{m}$.

La segunda capa (Figura 18a) es conocida como células de Malpighi (células con arreglo en empalizado que miden $225.42 \pm 13.89 \mu\text{m}$ de grosor), las cuales dan soporte a la testa y a su vez han sido relacionadas con la permeabilidad del agua durante el proceso de maduración y almacenamiento (Flores-Vindas, 1999). Finalmente la tercera capa es la epidermis (Figura 18a-d), formada por una sola capa de células (mide alrededor de $9.56 \pm 2.89 \mu\text{m}$) que cubre toda la superficie del endospermo, es delgada y generalmente blanquecina; las funciones son de protección y regulación de diferentes componentes (humedad, minerales, entre otros) (Flores-Vindas, 1999).

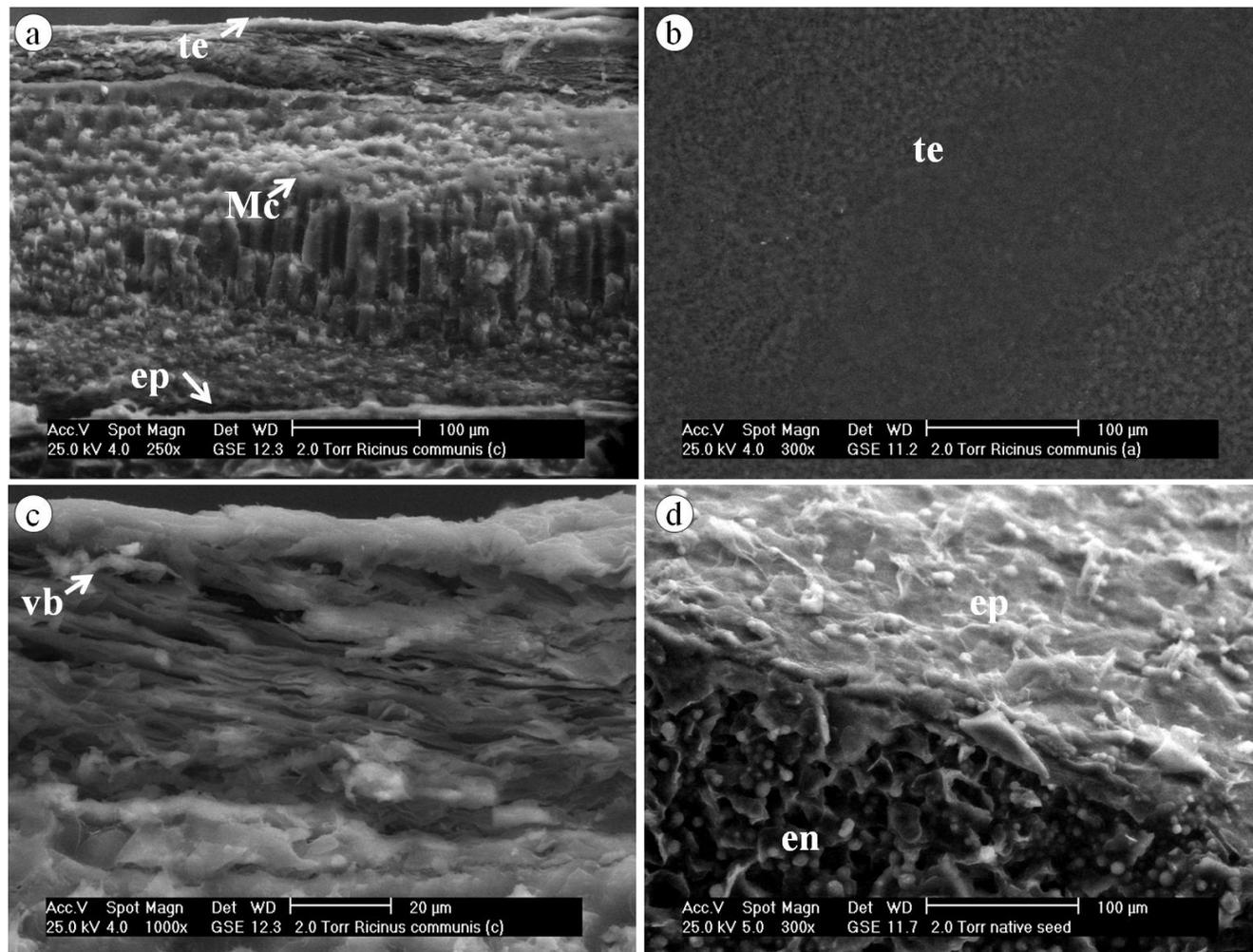


Figura 18. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental de una sección de la semilla de *R. communis*. en, endospermo; te, tegumento; ep, epidermis; vb, haz vascular; Mc, células de Malpighi.

El endospermo y las células embrionarias de las semillas de *R. communis* son mostradas en la Figura 19. El endospermo es un tejido homogéneo que presenta una red citoplasmática compleja (Figura 19b), su principal función es de reserva energética para la germinación y vigor del grano (Lott y col, 1982). Las células tienen una forma isodiamétrica, ésta también ha sido observada mediante Microscopia óptica y descritas por el análisis de imágenes (Cuadro 6). Las imágenes de MEBA mostraron los organelos subcelulares que incluyen los cuerpos proteicos y lipídicos dentro de las células, las cuales están limitadas por la pared celular. (Figura 19b). Resultados similares han sido descritos por Bórem y col. (2008), Duffus y Slaughter (1985), Esau (1972), Pascual y col. (1998), Smith (1979) y Varela y col. (2008).

El embrión (Figura 19c-d) consiste en una estructura de células primarias aplanadas con un eje del brote de la raíz (Figura 19c) y dos cotiledones (Figura 15c); el eje del brote de la raíz está encargado del transporte de los nutrientes para el crecimiento de las células. Las células del embrión son una pared delgada de células primarias, que presentan un alto empaquetamiento (Figura 19d). Al aplicar el análisis de imágenes, se obtuvieron parámetros de tamaño y forma de las células del embrión (Cuadro 6), como es el área ($269.26 \pm 61.37 \mu\text{m}^2$), perímetro ($71.88 \pm 7.99 \mu\text{m}$), diámetro mayor ($28.20 \pm 3.51 \mu\text{m}$) y el número de células por mm^2 (4903 ± 2). Estos valores fueron pequeños en comparación con los obtenidos para las células del endospermo, debido a que las células del embrión es un tejido en estado de desarrollo (Kuang y col, 2000). Sin embargo, los valores obtenidos de AR (2.41 ± 0.48) para las células del embrión fueron altos en comparación para las células del endospermo, este hecho indica que la forma de las células del embrión son similares a objetos rectangulares con un diámetro mayor (alargadas) (Figura 19d), por consecuencia la densidad celular es mayor que las células del endospermo, porque los objetos rectangulares pueden tener un mejor empaquetamiento en comparación con los objetos esféricos. La R (0.43 ± 0.02) fue menor que el de las células del endospermo, lo cual confirma que este tipo de células no son redondas, sino alargadas.

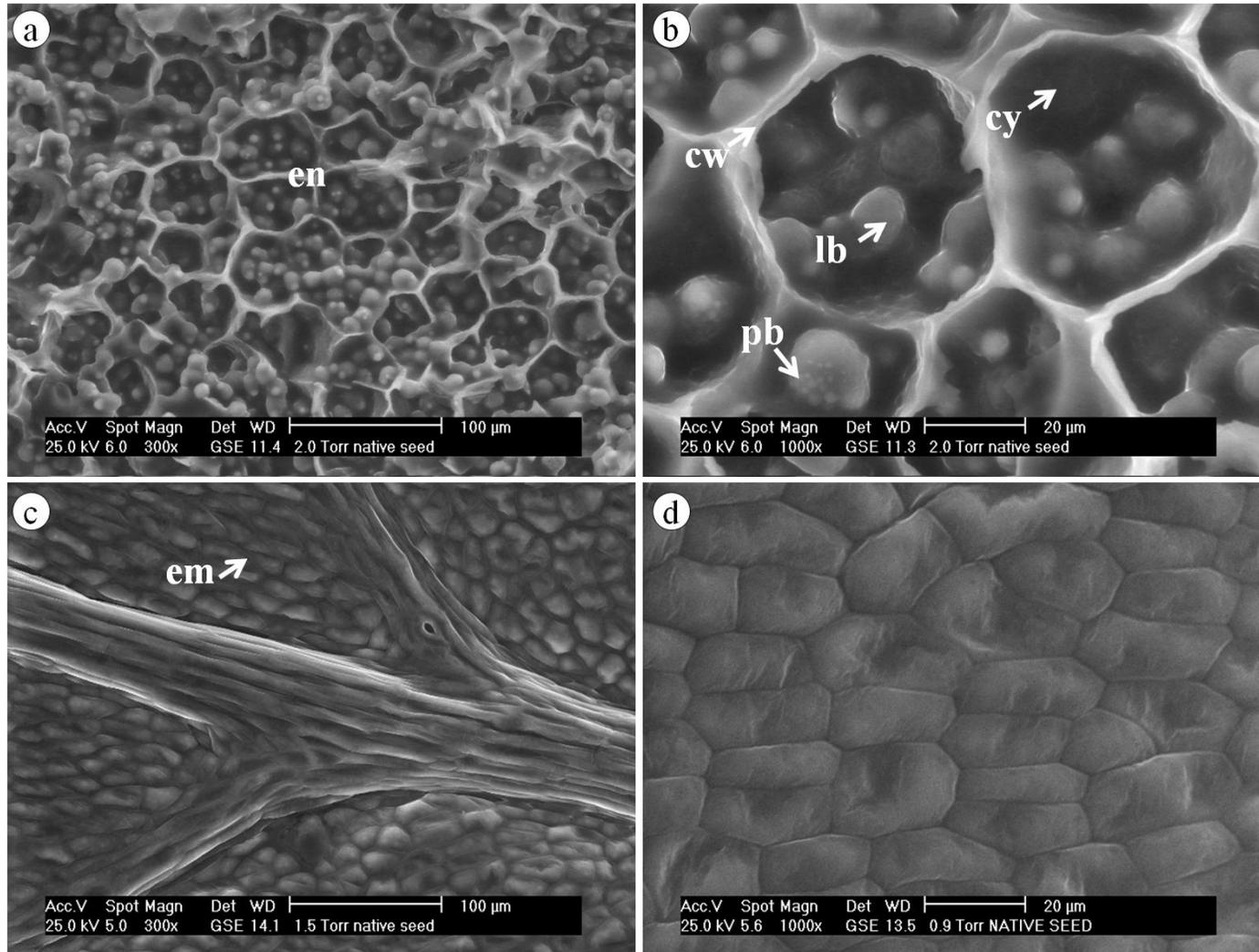


Figura 19. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental la semilla de *R. communis*. en, endospermo; cw, pared celular; cy, citoplasma; lb, cuerpos lipídicos; pb, cuerpos proteicos; em, embrión.

Rayos X característicos por energía dispersa (EDX)

Actualmente, el MEBA tiene integrado una serie de detectores que permiten realizar una caracterización más completa (cualitativa y cuantitativa) del material. Esto es, el detector de electrones secundarios gaseosos (GSE por sus siglas en ingles “gaseous secondary electrons”) permite la formación de imágenes en cuanto a forma, generando imágenes en las cuales es posible observar morfología y microestructura. Sin embargo el detector de electrones retrodispersos (BSE por sus siglas en ingles “back-scattered electrons”) permite la formación de imágenes en relación al número atómico (mayor intensidad cuan mayor es el numero atómico) (Stokes, 2008), y más aún el detector EDS o EDX (por sus siglas en ingles “energy dispersive of characteristics X-ray”) (Lott, 1982) permite realizar el análisis químico elemental y a su vez el mapeo químico elemental o composicional.

El análisis EDX y el mapeo químico elemental obtenido de las células del endospermo de la semilla de *R. communis* es presentado en la Figura 20. La imagen de MEBA (Figura 20a) de las células del endospermo obtenida con el detector BSE muestra la forma de los cuerpos lipídicos, resaltando como puntos brillantes los minerales asociados a las proteínas; estas estructuras han sido observadas en otras oleaginosas, pero no en las semillas de *R. communis* (Amonsou y col, 2011; Ellis y col, 2004; Young y col, 2004a, 2004b). De acuerdo con el detector utilizado para obtener estas imágenes, los elementos con mayor numero atómico corresponde a los cristales globoides (minerales de reserva) asociados a los cuerpos proteicos (Stokes, 2008). Los resultados del espectro EDX son presentados en la Figura 20b; este análisis químico elemental revelo que contiene C, O, K, P, Mg y S, la composición química elemental de las células es mostrada en el Cuadro 2. Los minerales de reserva (Mg, P, S y K) encontrados en las semillas (Lott y col, 1982; Lott y Spitzer, 1980; Prego y col, 1998) están asociados a los cuerpos proteicos, por lo general incluidas en una densidad electrónica llamada cristales globoides, la cual fue observada por el detector BSE del MEBA; y K, P, Mg y S son minerales de reserva de las semillas de *R. communis* (Lott y col, 1982). Para las semillas de *R. communis*, la composición química elemental de las células obtenidas mediante el espectro EDX y el mapeo puede observarse en la Figura 20c-

d, donde la composición química elemental de las células y de los cristales globoides está asociada los cuerpos proteínicas.

La Figura 20a, muestra la imagen en donde se puede apreciar la micrografía de MEBA resaltando las proteínas (estructuras con mayor intensidad) y a su vez se presenta el mapeo químico elemental, muchos de los minerales de reserva se encuentran contenidos en los cuerpos proteicos, generalmente en una densidad electrónica llamada cristales globoides o vacuolas. Las vacuolas sirven como un depositario de proteínas de reserva, estas contienen regiones globoides de transparencia electrónica en el cual el Ácido Fítico (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexacisfosfato) es secuestrado. Los cationes más comunes encontrados en los cristales globoides ricos en fitatos son Mg y K. Uno de los minerales encontrados en el endospermo de la semilla de higuera estudiada es el fósforo (P), almacenado en las semillas como fitatos, una sal del ácido fitico; éste ha sido considerado como compuestos no nutricionales (CNN) por que forman complejos insolubles con los minerales, se une a los carbohidratos y proteínas reduciendo así la disponibilidad. Sin embargo, recientes estudios han mostrado el papel positivo de los fitatos como un antioxidante, es importante considerar que los fitatos tienen un papel nutritivo significativo y un conocimiento completo de su localización e interacción con las proteínas de semillas como son la soya ha sido reportado previamente (Krishnan, 2008), almendras (Ellis, 2004), maíz (Lott y Spitzer, 1980) e higuera (Lott y col, 1982).

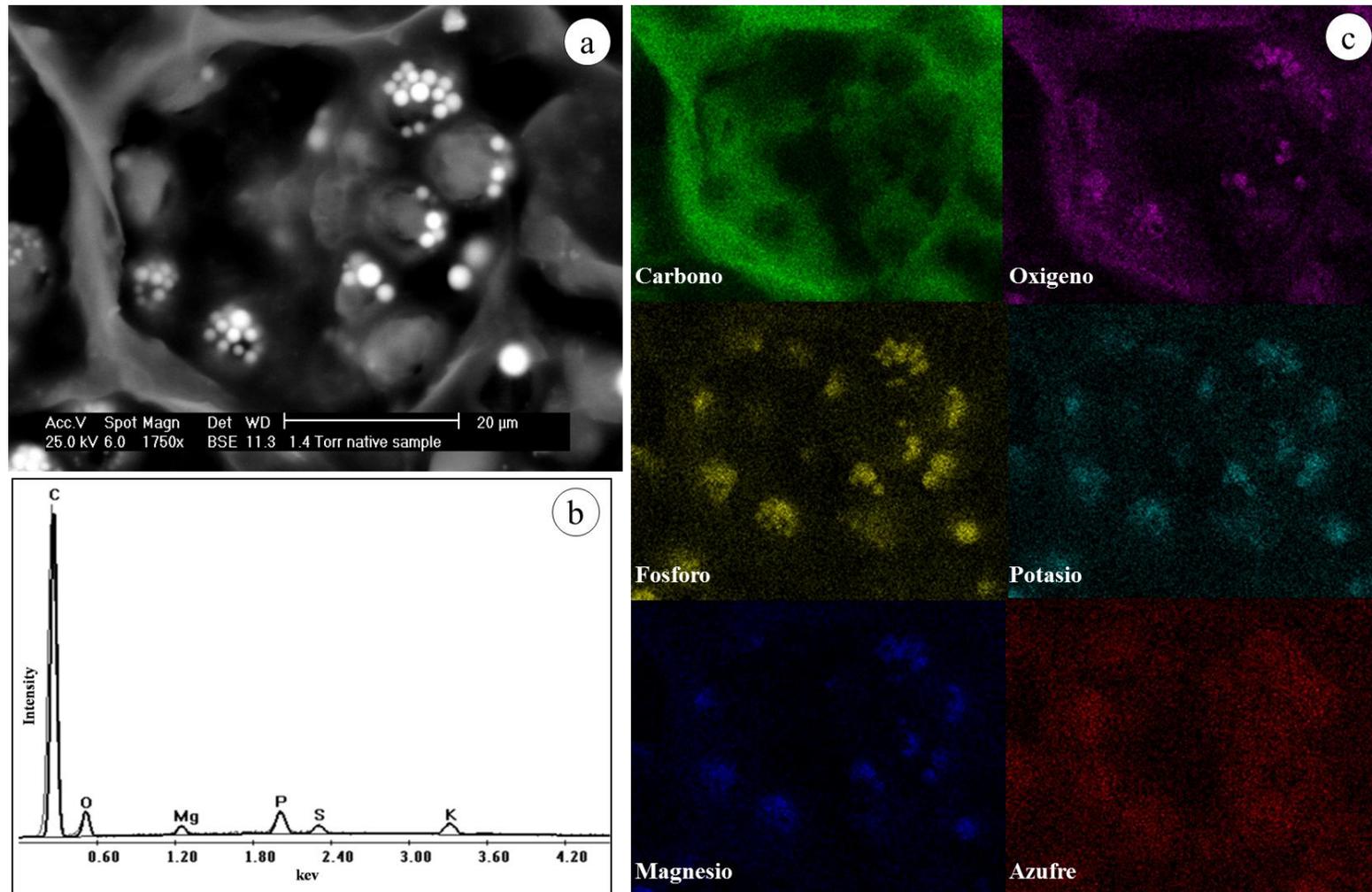


Figura 20. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental del endospermo de las semillas de *R. communis*. (a) Imagen de la células vista por el detector BSE acoplado al MEBA; (b) Espectro EDS y (c) Técnica de mapeo químico elemental de la composición de la semilla de *R. communis*.

Sin embargo, la información acerca de los cuerpos proteicos no era clara, por lo que se procedió a implementar una conjugación de métodos analíticos con las técnicas de microscopia (Figura 20). Se realizó una tinción con Nitrato de Plata (Grana y col, 1996), la cual se une selectivamente a las proteínas de bajo peso molecular evidenciándolas al realizar las micrografías mediante MEBA con el detector de electrones retrodispersos (BSE) que proporciona la formación de imágenes en base al peso atómico de los elementos. Así en la Figura 21 se puede observar los cristales globoides con una mayor intensidad, el análisis químico elemental y la distribución de los elementos en el endospermo.

Por tanto, la Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental proporcionó un método convencional para evaluar la distribución de los diferentes componentes que se encuentran en el tejido de la semilla de higuera, tal es el caso de los cuerpos proteicos, cuerpos lipídicos, y a su vez los minerales de reserva.

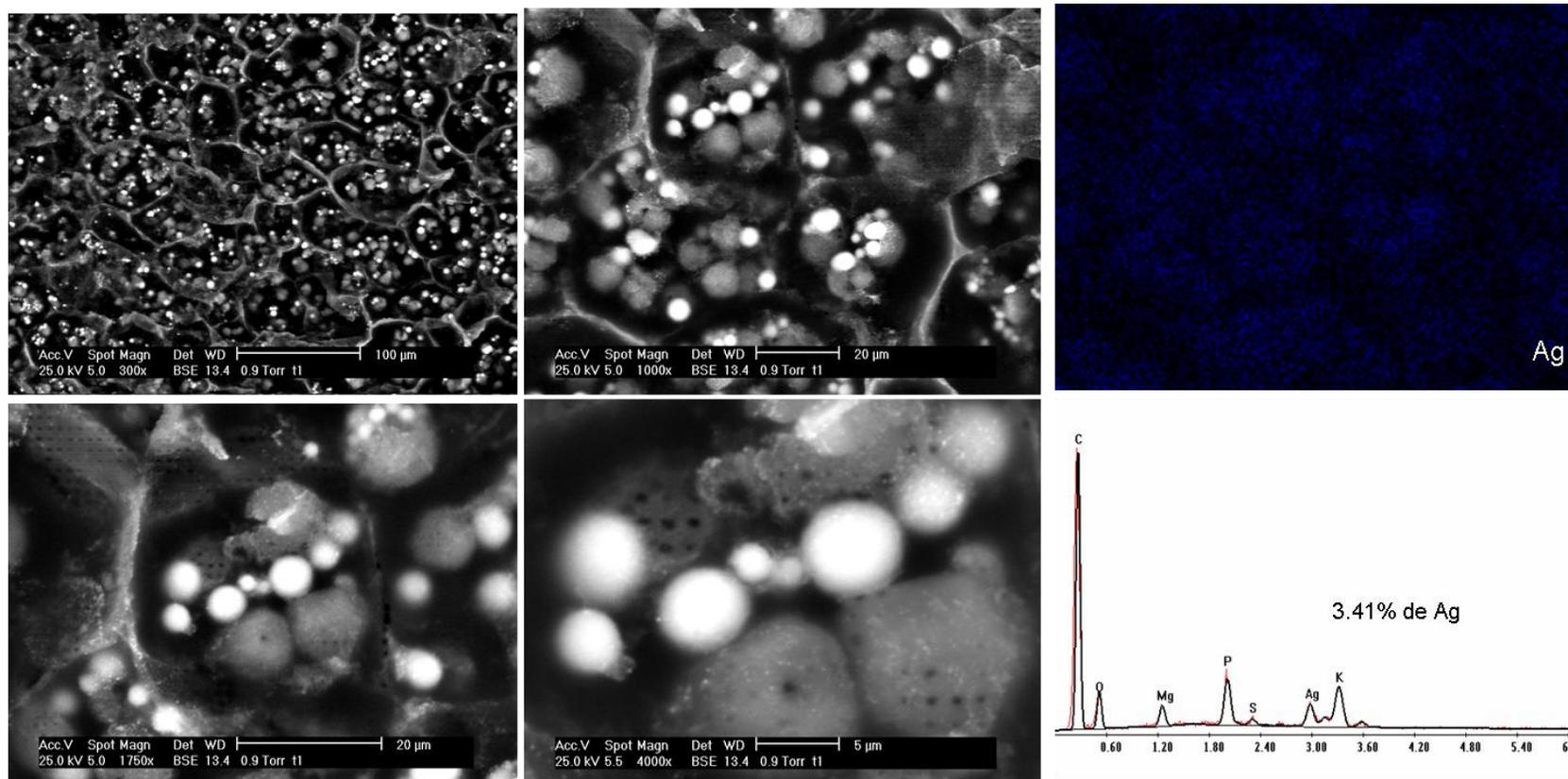


Figura 21. Micrografías de MEBA con el detector de electrones retrodispersos (BSD) y EDX del endospermo de las semillas teñidas con Solución de Nitrato de plata y paraformaldehído (1%) a diferentes aumentos de observación, para la identificación de los cuerpos proteicos unidos a la Plata (Ag). Así como también se muestra el espectro del análisis químico elemental en donde se identifica la presencia del Ag y el mapeo de ésta. El espectro es la relación de la energía de rayos X característicos (KeV) y la intensidad del elemento.

Cuadro 6. Resumen de algunas propiedades químicas y físicas, y características morfológicas de las semillas de *R. communis*.

Propiedades químicas	Semilla	Propiedades físicas	Semilla	Características morfológicas	Células del endospermo	Células del embrión	Cuerpos lipídicos
% Humedad	5.64±0.08	Densidad a granel (ρ_b) (kg/m ³)	538±11	Área (A) (μm^2)	1013.46±403.72*	269.26±61.37*	93.07±18.44*
% Proteína	28.48±0.25	Densidad verdadera (ρ_t) (kg/m ³)	1458±27	Perímetro (P) (μm)	141.98±30.21*	71.88±7.99*	42.55±5.59*
% Grasa	51.62±0.31	Porosidad (ϵ) (%)	63±0.63	MD (Diámetro mayor) (μm)	44.01±8.05*	28.20±3.51*	12.63±1.30*
% Carbohidratos totales	6.18±0.52	Volumen unitario promedio (V_i) (mm ³)	406.67±25.28	AR (Relación de aspecto)	1.28±0.17*	2.41±0.48*	1.16±0.10*
% Fibra cruda	4.31±0.26	Largo (mm)	13.5±0.08*	R (Redondez)	0.79±0.10*	0.43±0.02*	0.87±0.07*
% Cenizas	3.82±0.42	Ancho (mm)	8.7±0.04*	Numero por células por mm ² o cuerpos lipídicos por célula (μm^2)	570±10	4903±2	9.57±2.40
Composición química elemental de las células por el análisis EDX (% Wt).	20.15±0.86 Mg 40.55±1.60 P 13.25±1.45 S 26.04±1.08 K	Grosor (mm)	6.1±0.04*				
		Esfericidad (ϕ)	0.67±0.02				
		Diámetro Geométrico medio (D_g) (mm)	8.95±0.05				
		Área superficial (S) mm ²	251.54±0.01				
		Ancho de la testa (μm)	281.97±13.21				

* Las muestras presentaron una distribución normal ($P>0.05$). Todos los resultados están expresados como el valor promedio \pm desviación estándar.

El análisis químico de las semillas y la composición elemental de las células del endospermo confirman el alto potencial de *R. communis* como una fuente rica de proteína y aceite con posibles usos como alimento de ganado y producción de biodiesel. Las propiedades físicas evaluadas podrían ser útiles para el diseño de equipo de separación, de limpieza, almacenamiento, transportación y procesamiento de las semillas. La caracterización microestructural de las semillas mediante las técnicas de microscopía y el análisis de imágenes proporcionó información cualitativa y cuantitativa que puede ser útil para el estudio de la macro y microestructura de las semillas de *R. communis*, así como también para su procesamiento y utilización. Los resultados obtenidos en este trabajo integran información cualitativa y numérica que podría ser útil para la ingeniería de procesos y para el entendimiento de la relación estructura-propiedad de las semillas de *R. communis*.

6.2. Capítulo II. Modelado matemático de las cinéticas de secado por lecho fluidizado a altas temperaturas de las semillas de *R. communis*.

6.2.1. Hidratación

Las semillas de higuierilla variedad silvestre tiripiteo no tienen una humedad homogénea, por ello se realizó un estudio que involucró un tiempo de hidratación de 24 hrs. La semilla fue dividida en tres secciones (pericarpio, cotiledones y endospermo) y en cada sección mostró diferentes humedades (Duffus y Slaughter, 1985; López, 1998). La homogeneidad de la humedad de la semilla a lo largo de la hidratación está influenciada por las diferentes partes de la semilla. La humedad final de todas las partes de la semilla es cercana a 16% después de las 24 h de rehidratación, tanto para el pericarpio (16.2%), endospermo (15.7%) y el cotiledón (15.4%). A partir de este comportamiento, el pericarpio actúa como una membrana selectiva evitando una rehidratación rápida, asimismo conforme pasa el tiempo el agua va difundiendo a través de la semillas homogenizando la humedad (Esau, 1972). Se realizaron muestreos cada 6h para evaluar la microestructura mediante MEBA, observándose hinchamiento en el endospermo el cual se encontró intacto mostrando la forma típica hexagonal de las células vegetales (forma celular no dañada); así como al término de la hidratación (24h) los cuerpos proteicos y lipídicos no fueron observados por el exceso de agua en el sistema. La humedad final fue de 16%, dicha humedad y condiciones (ambientales) de hidratación no son las óptimas para propiciar la germinación de las semillas (Ferreira y col, 2009).

6.2.2. Cinéticas de secado

Los cambios en la humedad adimensional (MR) experimental en función del tiempo de secado de las semillas de *R. communis* a las diferentes temperaturas de aire de secado (80, 90, 100 y 110°C) son presentados en la Figura 22. El tiempo de secado necesario para reducir la humedad, desde el contenido de humedad inicial de $19.05 \pm 0.55\%$ b.s. a la humedad final fue de 180, 120, 90 y 50 min a las temperaturas del aire de secado de 80, 90, 100 y 110°C, respectivamente. El contenido de humedad final alcanzado para cada tiempo fueron de 1.75 ± 0.31 , 0.69 ± 0.15 , 0.53 ± 0.10 y $0.40 \pm 0.16\%$ bs., respectivamente. La relación de la humedad se redujo de forma exponencial con el tiempo de secado, este

comportamiento es típico de los materiales biológicos (Iguaz y col, 2003; Calzetta y col, 2004; Doymaz, 2005; Sacilik, 2007; Zielinska y Markowski, 2007; Ruiz y col, 2008; Hii y col, 2009; Markowski y col, 2010; Gazor y Mohsenimanesh, 2010; Shen y col, 2011); así como también se observó el efecto de la temperatura del aire de secado sobre la pérdida de humedad (Chua y col, 2000; Shivhare y col, 2000; Abalone y col, 2006; Ruiz y col, 2008; Barrozo y col, 2006; Kerdpiboon y col, 2007).

La cinética de secado mostro que el secado de las semillas de *R. communis* ocurre principalmente en el periodo de velocidad decreciente, la cual sugiere que la superficie del material ya no está saturada con agua y que la velocidad de secado está controlado por el fenómeno de difusión interna de acuerdo con el proceso de control de transferencia de masa (Kashaminejad y col, 2007; Doymaz, 2011). Por lo tanto, el mecanismo predominante en la migración del contenido de humedad por el secado podría ser la difusión molecular; al igual que en el caso de las semillas, granos, hortalizas (Iguaz y col, 2003; Vega y col, 2010; Gely y Santalla, 2007; Zielinska y Markowski, 2007; Gazor y Mohsenimanesh, 2010). El efecto de la temperatura del aire de secado en la pérdida de humedad es típico de varios materiales biológicos (Chanona y col, 2003; Doymaz, 2005; Correa y col, 2006; Sacilik y col, 2006; Kerdpiboon y col, 2007; Arabhosseini y col, 2009).

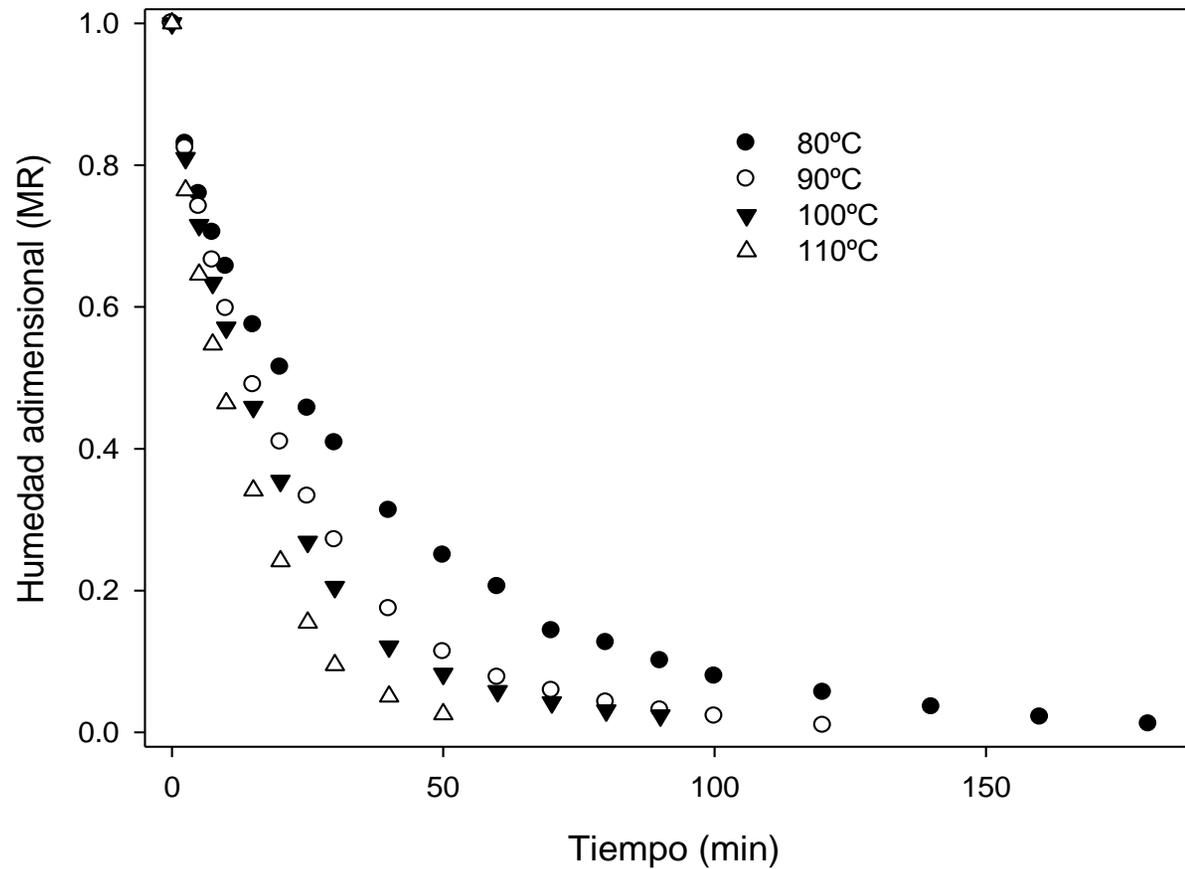


Figura 22. Cinéticas de secado por lecho fluidizado de las semillas de *R. communis* a cuatro diferentes temperaturas de aire de secado (80, 90, 100 y 110°C), con un lecho L/D= 0.5 correspondiente a 250g durante el tiempo necesario para que cese la pérdida de humedad.

6.2.3. Análisis de las curvas de velocidad de secado

La cantidad de agua removida del material en función del tiempo es representada como la velocidad de secado o flux (DR por sus siglas en inglés “Drying Rate”) puede observarse en la Figura 23, durante el secado por lecho fluidizado a 80, 90, 100 y 110°C. Es característico, que el DR decrezca continuamente en relación con el tiempo de secado, debido a que la cantidad de agua disponible va disminuyendo. En las curvas, no aparecen periodos de velocidad constante, por lo que el secado se produce por completo en el periodo de velocidad decreciente. Este comportamiento confirma que el mecanismo de transferencia de masa más probable por la cual se lleva la conducción de la eliminación de la humedad para el caso de la semillas de *R. communis* fue la difusión del agua.

En la Figura 23, se puede observar que cuando la temperatura del aire de secado aumenta, el parámetro DR aumenta también, este hecho corrobora que la temperatura del aire de secado es el factor más importante que afecta el DR. Resultados similares acerca del comportamiento del periodo de velocidad decreciente y de las curvas DR han sido reportados en diversos estudios de secado de materiales biológicos (Doymaz, 2005; Niamnuy y Davahstin, 2005; Babalis y col, 2006; Sacilik, 2007, Arabhosseini y col, 2009; Hashemi y col, 2009; Gazor y Mohsenimanesh, 2010; Markowski y col, 2010). Los resultados obtenidos en las cinéticas de secado y en las curvas de DR podrían ser útiles para el diseño y escalamiento de equipos de secado.

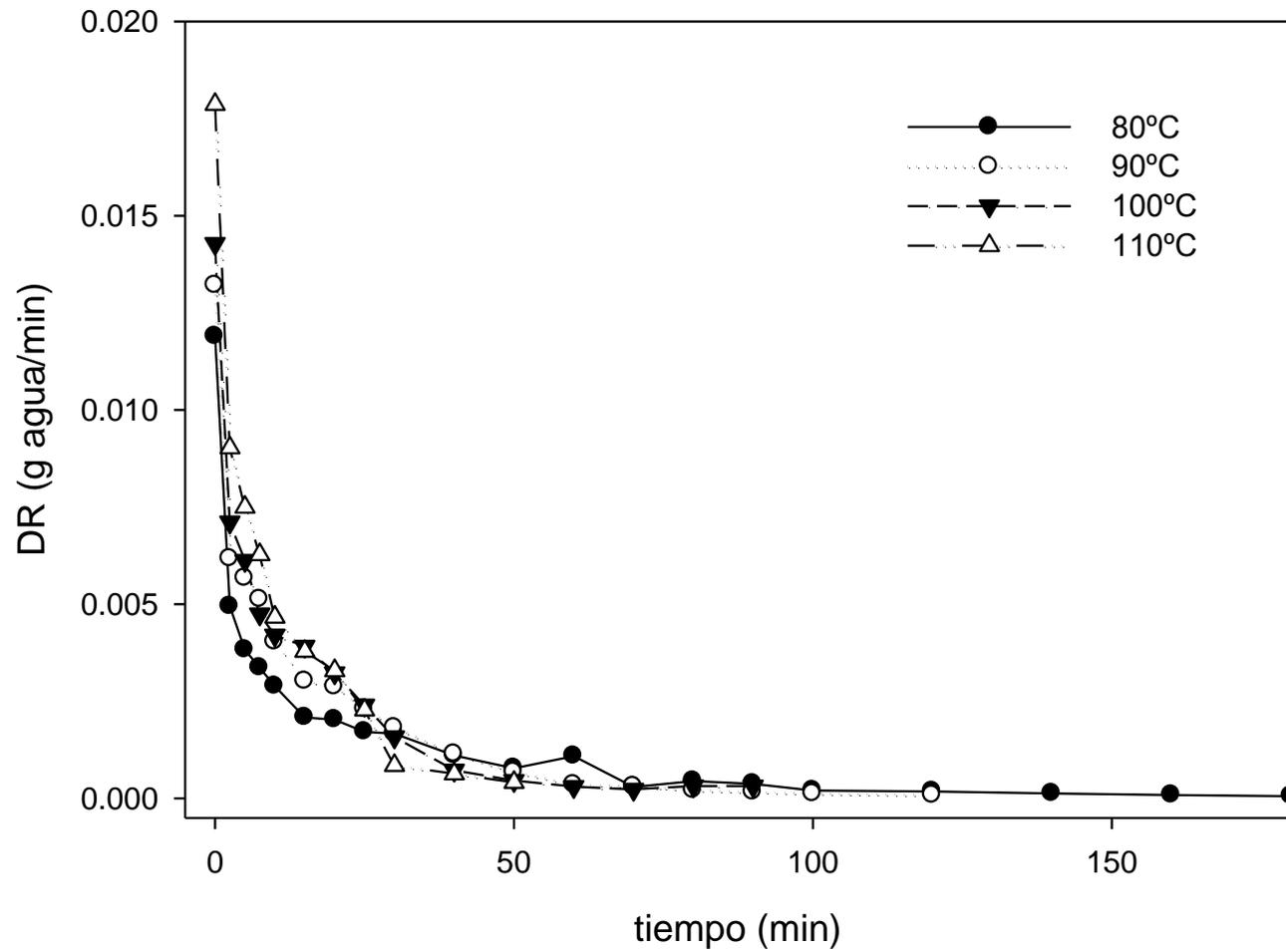


Figura 23. Velocidad de secado de las semillas *R. communis* sometidas a secado por lecho fluidizado a las cuatro temperaturas (80-110°C).

6.2.4. Modelado matemático de las cinéticas de secado

El análisis de los datos de las cinéticas de secado de la humedad adimensional (MR) son esenciales para describir el secado de las semillas de *R. communis* (Figura 22). En el Cuadro 7, detalla los resultados del análisis estadístico de los seis modelos utilizados para ajustar las cinéticas de secado. Los valores de R^2 , E_{MD} , E_{RMS} y χ^2 varían entre 0.9738-0.9998, 3.3481-25.6329, 0.0053-0.0458 and 0.0000-0.0025 respectivamente. Los valores de R^2 fueron superiores a 0.97 para todos los modelos, dicho criterio es aceptable para los seis modelos estudiados. En general se observó que los modelos exponencial de dos términos y de aproximación de la difusión presentaron altos valores de R^2 que otros modelos probados para el ajuste de las cinéticas de secado de las semillas de *R. communis* (Cuadro 7). Por su parte, el modelo de Lewis presentó los valores de R^2 más bajos. E_{MD} (%) es un parámetro que indica la desviación entre los datos experimentales y los predichos por el modelo matemático aplicado, los valores inferiores al 10% se recomiendan para seleccionar los modelos de buen ajuste. Para los modelos de exponencial de dos términos y de aproximación de la difusión mostraron valores más bajos de E_{MD} comparados con otros modelos para las cuatro temperaturas de aire de secado.

El modelo de Lewis es un caso especial del modelo de Henderson y Pabis, pero ambos modelos tienden a sobreestimar en las primeras etapas del secado y a subestimar en las últimas etapas del secado para las temperaturas (Akgun y Doymaz, 2005); sin embargo, ambos modelos mostraron un menor ajuste a los datos de secado experimentales en comparación con el modelo exponencial de dos términos y aproximación de la difusión. El análisis de los valores de E_{RMS} mostró que tanto el modelo exponencial de dos términos como el de aproximación de la difusión dieron un mejor ajuste a los valores experimentales (Cuadro 7). Además, el modelo exponencial de dos términos y el de aproximación de la difusión proveyeron bajos valores de χ^2 , en comparación con los demás modelos, cuando los valores de χ^2 se tienden a cero, se dice que la predicción es la más cercana a la experimental (Roberts y col, 2008), lo cual indica un mejor ajuste a las cinéticas de secado. Por lo tanto, de acuerdo con los resultados de los modelos de exponencial de dos términos y del de aproximación de la difusión mostraron las mejores predicciones; por consiguiente

estos proporcionaron una descripción satisfactoria del secado de las semillas de *R. communis*. Hallazgos similares han sido reportados por Rafiee y col, (2009) para soja, Arabohosseini y col, (2009) para estragón, Demir y col, (2007) para aceitunas verdes; y Waewsak y col, (2006) para chile, hojas de limón, entre otras. En base a los resultados obtenidos, podemos decir que el modelo de aproximación de la difusión representa mejor el comportamiento del secado por lecho fluidizado a altas temperaturas, además de su simplicidad en comparación con el modelo exponencial de dos términos, que también dio un buen ajuste.

En la Figura 24, se muestran los datos de la humedad adimensional (MR) ajustados por el modelo de aproximación de la difusión de las cuatro temperaturas del aire de secado. Se puede observar a partir de esta figura, que hay un buen ajuste entre los datos de MR experimentales y los predichos por el modelo. El modelo de aproximación de la difusión también ha sido reportado por otros autores como un modelo adecuado para ajustarse a las cinéticas de secado, como Doymaz, (2011) para okra, Gazor y Mohsenimanesh, (2010) para semillas de canola, Cihan y col, (2007) para arroz y Sacilik y col, (2006) para ciruela.

En general, se puede concluir que existe una relación directa entre los coeficientes k y la temperatura de aire de secado; este comportamiento se puede observar en el Cuadro 6. Los valores de los coeficientes k están relacionados con la difusividad efectiva de la humedad cuando el proceso de secado se lleva a cabo solo en el periodo de velocidad decreciente (Doymaz, 2005). Por esta razón, los coeficientes k podrían estar asociados con la facilidad de remoción de la humedad de las semillas. Este comportamiento es similar a las tendencias observadas en las curvas de MR y DR de las semillas de *R. communis*.

Los modelos empíricos elegidos en esta investigación resultaron ser adecuados para describir el comportamiento del secado en el rango de temperaturas estudiadas. Por lo tanto, el conocimiento de las cinéticas de secado y su modelado son importantes para el diseño, simulación y optimización del proceso de secado. Diversos autores (Guiné y col, 2006; Kashaninejed y col, 2007; Vega y col, 2010) refieren que la información obtenida de los modelos de secado pueden ser aplicados para calcular las condiciones óptimas de secado (por ejemplo temperatura y tiempo) para alcanzar un contenido de agua en las semillas de *R. communis* para su posterior procesamiento.

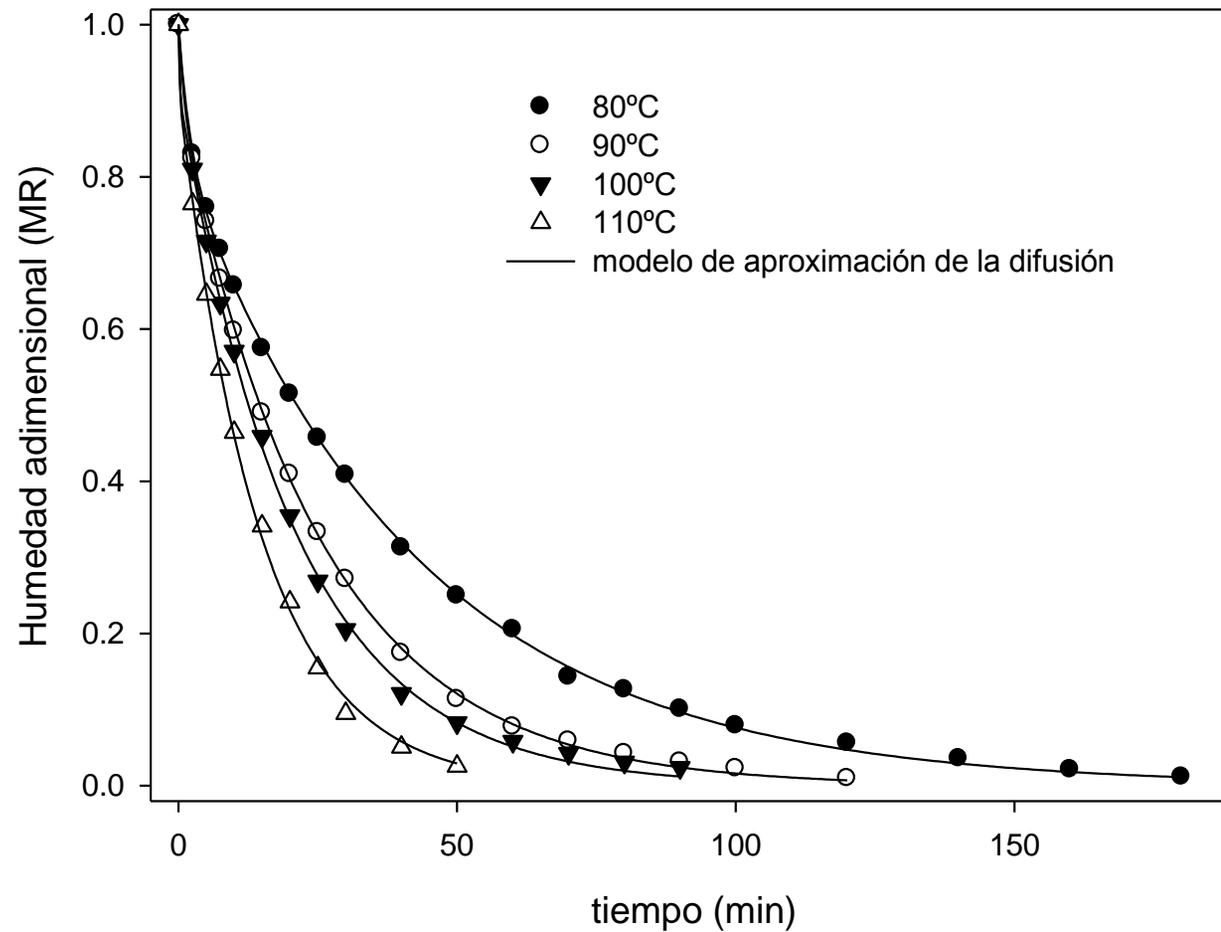


Figura 24. Cinéticas de secado de las semillas de *R. communis* secadas por lecho fluidizado, ajustadas por el modelo de aproximación de la difusión en función del tiempo de secado.

Cuadro 7. Resultados estadísticos obtenidos a partir de los parámetros estimados para la semillas de *R. communis*.

Temperatura (°C)	Modelo	Constantes	R²	E_{MD} (%)	E_{RMS}	χ²
80	Henderson and Pabis	$a: 0.8992, k: 0.0266$	0.9908	12.6234	0.0287	0.0009
	Lewis	$k: 0.0312$	0.9738	25.6329	0.0485	0.0025
	Page	$k: 0.0721, n: 0.7595$	0.9974	14.4892	0.0153	0.0003
	Exponencial de dos términos	$a_1: 0.1682, k_1: 0.4664, a_2: 0.8310, k_2: 0.0239$	0.9997	3.9529	0.0053	0.0000
	Logarítmica	$a: 0.8822, k: 0.0291, c: 0.0278$	0.9923	17.6272	0.0264	0.0008
	Aproximación de la difusión	$a: 0.1690, k: 0.4688, b: 0.0510$	0.9997	3.9587	0.0053	0.0004
90	Henderson and Pabis	$a: 0.9443, k: 0.0428$	0.9966	12.1519	0.0183	0.0004
	Lewis	$k: 0.0465$	0.9922	19.7799	0.0275	0.0008
	Page	$k: 0.0725, n: 0.8550$	0.9987	7.2220	0.0112	0.0001
	Exponencial de dos términos	$a_1: 0.1001, k_1: 0.9004, a_2: 0.8999, k_2: 0.0401$	0.9998	6.8313	0.0046	0.0000
	Logarítmica	$a: 0.9349, k: 0.0450, c: 0.0157$	0.9971	9.9080	0.0168	0.0003
	Aproximación de la difusión	$a: 0.1001, k: 0.9006, b: 0.0446$	0.9998	6.8313	0.0046	0.0003
100	Henderson and Pabis	$a: 0.9531, k: 0.0508$	0.9965	13.1769	0.0185	0.0004
	Lewis	$k: 0.0543$	0.9933	18.0093	0.0255	0.0007
	Page	$k: 0.0787, n: 0.8724$	0.9982	6.1346	0.0133	0.0002
	Exponencial de dos términos	$a_1: 0.0862, k_1: 8.9122, a_2: 0.9138, k_2: 0.0480$	0.9993	9.8219	0.0083	0.0001
	Logarítmica	$a: 0.9408, k: 0.0538, c: 0.0195$	0.9972	3.6025	0.0164	0.0003
	Aproximación de la difusión	$a: 0.0862, k: 5.4035, b: 0.0089$	0.9993	9.8219	0.0083	0.0001
110	Henderson and Pabis	$a: 0.9627, k: 0.0735$	0.9959	3.3481	0.0196	0.0005
	Lewis	$k: 0.0772$	0.9935	3.4122	0.0245	0.0007
	Page	$k: 0.1016, n: 0.8937$	0.9973	10.5378	0.0159	0.0002
	Exponencial de dos términos	$a_1: 0.0854, k_1: 17.5236, a_2: 0.9146, k_2: 0.0688$	0.9990	6.2176	0.0095	0.0001
	Logarítmica	$a: 0.9583, k: 0.0748, c: 0.0064$	0.9959	5.8410	0.0195	0.0004
	Aproximación de la difusión	$a: 0.0854, k: 6.2299, b: 0.0110$	0.9990	6.2176	0.0095	0.0001

6.2.5. Difusividad efectiva (D_{eff}) y energía de activación

Como se ha descrito en apartados anteriores, el secado de las semillas de *R. communis* se producen en el periodo decreciente y la transferencia de la humedad durante el secado es controlada por la difusión interna (Roberts y col, 2008; Doymaz, 2011). Además, es conocido que la difusividad efectiva de diferentes biomateriales varía de acuerdo con su estructura, la temperatura y el contenido de humedad. Se ha aceptado que las características de los productos secados en el periodo de velocidad decreciente podría ser explicado por la ecuación de la difusión de Fick (Kashaninejad y col, 2007; Robert y col, 2008; Doymaz, 2011), la cual también puede ser usada para describir el secado en coordenadas esféricas (Sacilik y col, 2006). Por lo tanto, en esta investigación la pendiente derivada de la regresión lineal del $\ln(MR)$ contra el tiempo de secado se presenta en la Figura 25. Generalmente, la difusividad efectiva es usada como consecuencia de la información limitada sobre el mecanismo de la transferencia de humedad durante el secado, y la complejidad del proceso (Kashaninejad y col, 2007).

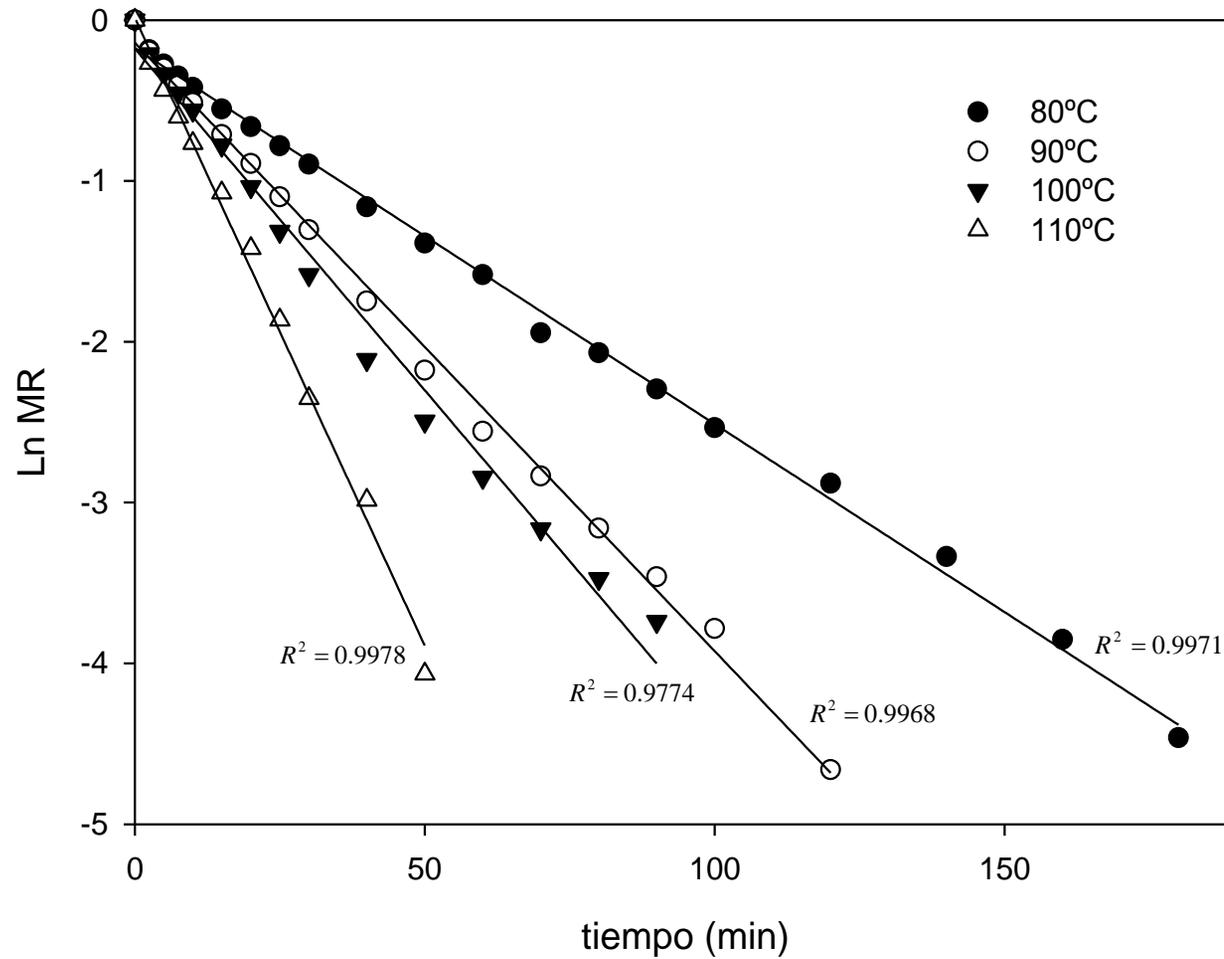


Figura 25. Regresión lineal del ln de la humedad adimensional en función del tiempo de secado a diferentes temperaturas para las semillas de *R. communis*.

Se puede observar en el Cuadro 8, el efecto de la difusividad efectiva durante el secado de las semilla de *R. communis*, donde este coeficiente vario de 8.21×10^{-10} a 2.61×10^{-9} m²/s en el rango de temperaturas de 80 a 110°C. Estos valores de D_{eff} están dentro del rango general de 10^{-9} to 10^{-11} m²/s, según lo informado por varios materiales biológicos (Madamba y col, 1996; Doulia y col, 2000; Doymaz, 2005; Sablani y Rahman, 2008). Sin embargo, debido a las altas temperaturas y la velocidad de aire utilizado en esta investigación, los valores de D_{eff} encontrados, fueron ligeramente mayores que los D_{eff} reportados para otros materiales y condiciones de secado (Cuadro 8); por ejemplo el pistache, semillas de calabaza, trigo, judías verdes, cebada, granos de amaranto y las habas.

Cuadro 8. Valores de difusión efectiva de diversos materiales biológicos a diferentes condiciones de secado

Material	Difusividad efectiva (m ² /s)	Condiciones de secado	Referencias
Semilla de <i>Ricinus communis</i>	8.21×10^{-10}	Secado por lecho fluidizado (7 m/s, 80-110 °C)	Presente trabajo
80 °C	1.32×10^{-9}		
90 °C	1.64×10^{-9}		
100 °C	2.61×10^{-9}		
110 °C			
Pistache	1.37×10^{-10} - 9.29×10^{-10}	Secado convectivo (0.5-1.5 m/s, 25-70 °C)	Kashamiinejad y col, 2007
Semilla de calabaza	8.53×10^{-11} - 1.8×10^{-10}	Secado convectivo (0.8 m/s, 40-60 °C)	Sacilik, 2007
Residuos de oliva	2.03×10^{-9} - 1.71×10^{-9}	Secado convectivo (2 m/s, 50-90 °C)	Vega y col, 2010
Sorgo	1.91×10^{-8} - 7.20×10^{-9}	Horno con flujo natural de aire por convección (0.01 m/s, 30-70 °C)	Shen y col, 2011
Ejotes	2.64×10^{-9} - 5.71×10^{-9}	Secado por gabinete (1 m/s, 50-70 °C)	Doymaz, 2005
Cebada	1.40×10^{-11} - 3.79×10^{-11}	Secado por lecho (30 m/s, 33-56 °C)	Markowski y col, 2010
Granos de amaranto	0.65×10^{-9} - 2.15×10^{-9}	Secado convectivo en cama (3 m/s, 40-70 °C)	Calzetta y col, 2004
Habas	1.27×10^{-9} - 6.48×10^{-9}	Lecho fluidizado con asistencia de calentamiento dieléctrico (3.5-5 m/s, 35-65 °C)	Hashemi y col, 2009

En diversos estudios de secado de materiales biológicos se ha observado el efecto de la temperatura sobre la difusividad efectiva para sistemas heterogéneos (Calzetta y col, 2004; Doymaz, 2005; Gelly y Santalla, 2007; Kashamiinejad y col, 2007; Sacilik, 2007; Ruiz y col, 2008; Vega y col, 2010; Shen y col, 2011; Markowski y col, 2010; (Sablani y Rahman, 2008; Doulia, y col. 2000, Santiago, 1999; Ruiz y col, 2008). Esta dependencia ha sido descrita usando la relación tipo Arrhenius para obtener la energía de activación (E_a) a partir de datos experimentales de la difusividad efectiva. La E_a es la barrera de energía que hay que superar para poder activar la difusión de la humedad y su constante de difusividad equivalente a la temperatura alta infinitamente (D_0). Por lo tanto, para este trabajo el logaritmo de la D_{eff} en función de la inversa de la temperatura absoluta (T) es graficada en la Figura 26.

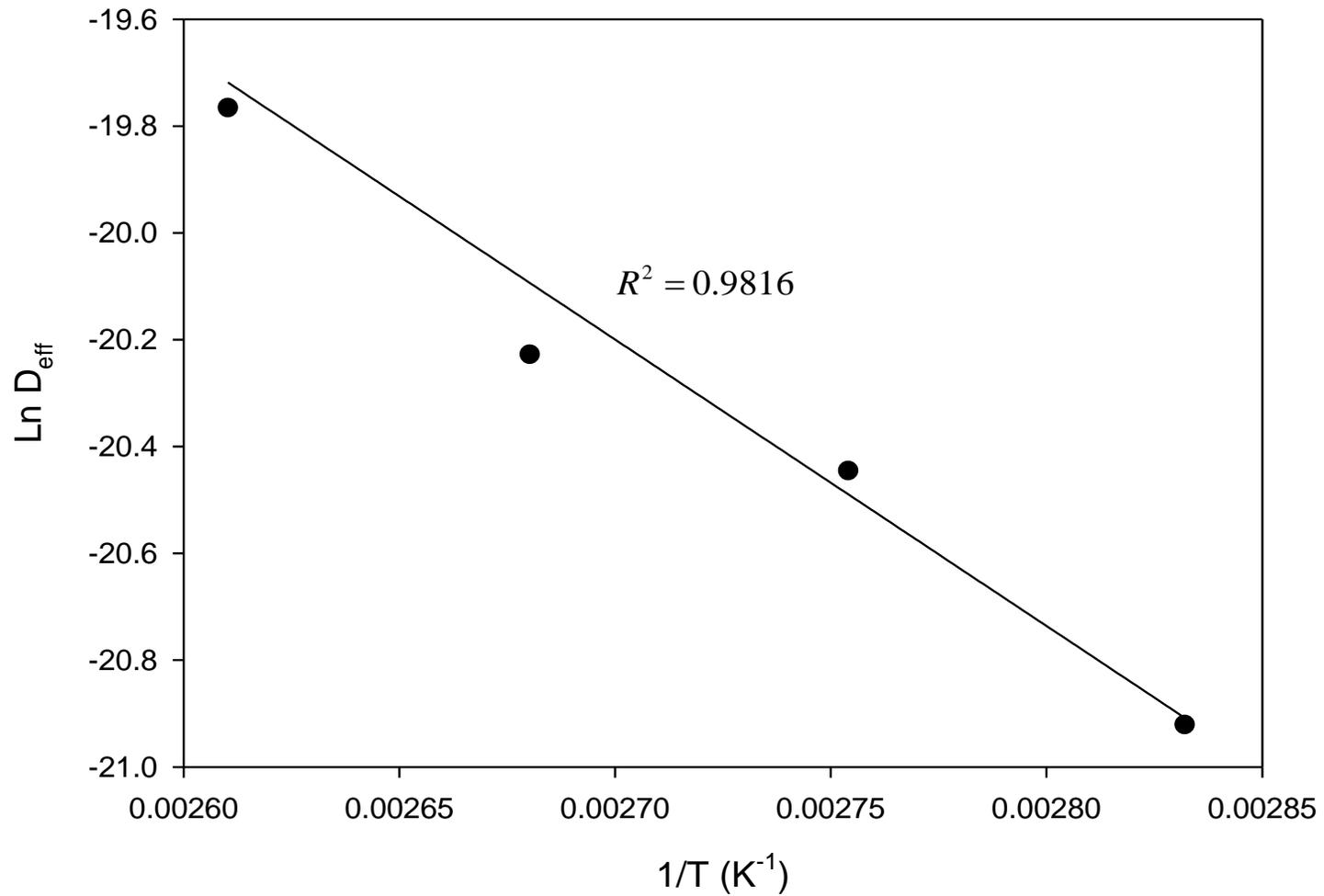


Figura 26. Relación tipo Arrhenius entre el logaritmo de las difusividad efectiva (D_{eff}) y el inverso de la temperatura absoluta.

Los resultados muestran una relación lineal entre $(\ln D_{\text{eff}})$ y $(1/T)$ o una relación de tipo Arrhenius con un R^2 de 0.9816. La constante de difusividad (D_0) y la energía de activación (E_a) calculada a partir de la regresión lineal fueron de $1.12 \times 10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ y 41.41 kJ/mol , respectivamente. Se ha reportado la E_a (entre 18.6 y 31.2 kJ/mol) para granos de maíz (Ruiz y col, 2008), granos de amaranto ($E_a = 23$ a 37.5 kJ/mol), trigo (43.9 kJ/mol) (Calzetta y col, 2004), quinoa ($E_a = 37.98 \text{ kJ/mol}$) (Gely y Santalla, 2007), entre otros biomateriales. Valores altos de E_a están asociados en materiales donde el agua está ligada con mayor fuerza a la estructura del material o la estructura del material dificulta el transporte de humedad a través de sólido (Honorato y col, 2005; Ruiz y col, 2008).

La siguiente ecuación muestra el efecto de la temperatura sobre la D_{eff} de las semilla de *R. communis*, y es útil para el diseño y escalamiento de equipos en el rango de temperaturas estudiadas.

$$D_{\text{eff}} = 1.12 \times 10^{-3} \exp\left(-\frac{4980.7}{T}\right)$$

El valor de E_a encontrado para las semillas de *R. communis* fueron de acuerdo con los datos reportados por diversos autores, de 18.6 a 31.2 kJ/mol para maíz (Ruiz y col, 2008), 23 a 37.5 kJ/mol para granos de amaranto, 43.9 kJ/mol para sorgo (Calzetta y col, 2004), 37.98 kJ/mol para quinua (Gely y Santalla, 2007), 30.79 kJ/mol para pistache (Kashaninejad y col, 2007), 33.15 kJ/mol para semillas de calabaza (Sacilik, 2007), 44.92 kJ/mol para cacao (Hii y col, 2009), de 30.45 a 40.14 kJ/mol para semillas de uva (Roberts y col, 2008), 35.43 kJ/mol para judías verdes (Doymaz, 2005).

Altos valores de E_a están asociados con materiales en donde el agua está unida con más fuerza a la estructura y por consecuencia su eliminación es impulsada por la estructura del material. En el caso de las semillas de *R. communis*, el valor de la E_a encontrado, es más grande que otros informes, posiblemente porque la semilla tiene un recubrimiento duro (testa) y de grandes dimensiones (radio equivalente a una esfera de aproximadamente de 0.46 cm).

El secado por lecho fluidizado de las semilla de *R. communis* se lleva a cabo en el periodo de velocidad decreciente, este hecho indica que la transferencia de la humedad durante el secado es controlado principalmente por la difusión interna. El modelo de aproximación de la difusión mostró el mejor ajuste para la cinética de secado en comparación con los otros modelos empíricos probados en esta investigación. El efecto de la temperatura del aire de secado en un rango de 80-110°C a 7m/s fue caracterizado para estas semillas. El DR y el D_{eff} incrementan con la temperatura del aire de secado y consecuentemente decrece con el tiempo de secado. Los valores de D_{eff} varían en un rango de 8.21×10^{-10} m²/s a 2.61×10^{-9} m²/s. La dependencia de la temperatura del aire de secado y los coeficientes de difusividad efectiva son descritos por la ecuación tipo Arrhenius. La energía de activación para la difusión de la humedad para este material fue de 41.41 kJ/mol. Este estudio provee información del secado de la semilla de *R. communis* mediante lecho fluidizado a altas temperaturas. La información encontrada es esta investigación puede ser utilizada en el diseño, simulación del equipo de secado, y su explotación de la semilla como fuente de biodiesel y proteína para la industria de los alimentos y energética.

6.3. Capítulo III. Cambios estructurales en la semilla de R. communis debidos al secado por lecho fluidizado

6.3.1. Testa

6.3.1.1. Prueba de compresión

La Figura 27 muestra las curvas de fuerza contra la distancia durante la compresión de las semillas. Se puede observar que en la primera parte de las curvas, la fuerza incrementa casi linealmente con el desplazamiento de la muestra, en donde la muestra experimenta una mayor deformación pero no ocurre una ruptura estructural. De acuerdo con Varela y col, (2008a) esta región es característica del comportamiento elástico de los sólidos y está en función de la rigidez (o pendiente de la curva), la forma y el material de estudio. El secado por lecho fluidizado causó una disminución en la rigidez de la testa (menores pendientes apreciadas visualmente en el gráfico). En general, para las cinco condiciones, se observó una súbita disminución en el valor de la fuerza, la cual marca la primera ruptura estructural a unos 67.5 N para la muestra nativa y en alrededor de los 62 N para las demás condiciones.

En función de la fragilidad de la testa, la fractura inicial se propaga hasta que es inhibida por la presencia de rompimientos generalizados en la testa, hacia el final de los gráficos de fuerza se aprecia un patrón que puede ser asociado a la deformación de la semilla. Para las cuatro condiciones de secado, se observa que la testa es más frágil, ya que claramente se observa en la Figura 27 en las curvas de fuerza, en donde hay caídas repentinas conforme incrementa la deformación; lo que refleja es la propagación de las fracturas a través del material.

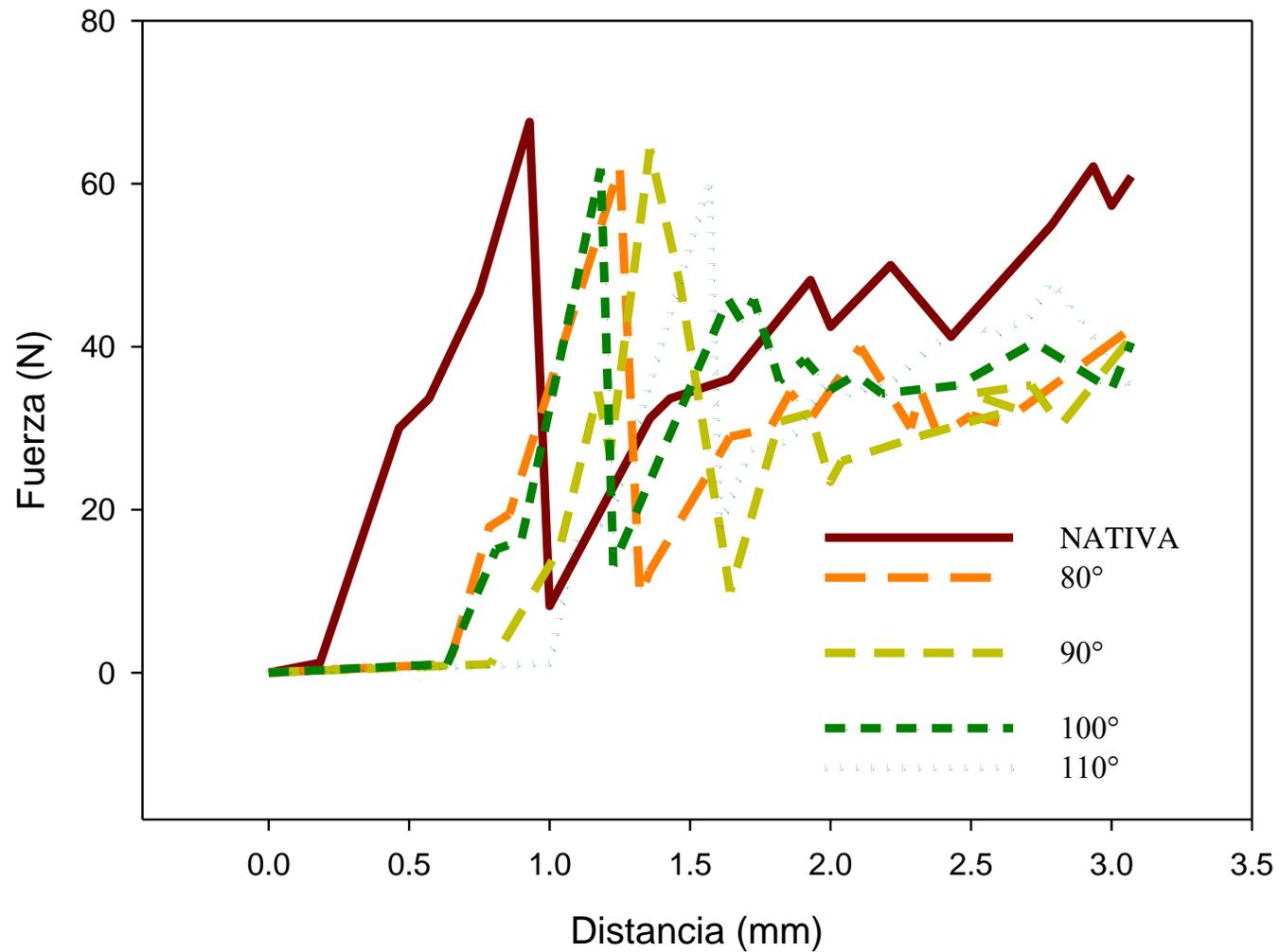


Figura 27. Prueba de compresión. Fuerza (N) contra distancia (mm), de la comparación de las semillas de *R. communis* nativa (sin tratamiento) con las secadas por lecho fluidizado a diferentes condiciones (80-110°C).

6.3.1.2. Análisis del patrón de fractura

De acuerdo con Varela y col (2008a y 2008b), el mecanismo de fractura depende no solo de los parámetros de compresión utilizados, sino también de la forma, tamaño y estructura de la muestra, así como de su composición y arreglo microestructural.

En la presente investigación, se cuantifico este fenómeno con la ayuda del análisis de imágenes. Las imágenes de los fragmentos producidos por la compresión se observan en la Figura 28A. Después de la segmentación y binarización de las imágenes, los objetos de interés (fragmentos) fueron identificados y sus características individuales fueron medidas, estas son mostradas en el Cuadro 9. La Figura 28B y 28C, muestra el número y la distribución del tamaño de los fragmentos, respectivamente. Se observa que conforme se incrementa la temperatura de secado, los fragmentos de las fracturas se incrementan en número y son más pequeñas, porque la fragilidad de las muestras incrementa debido al proceso térmico en comparación para la muestra nativa (mayores tamaños de fracturas). La explicación de este comportamiento podría reforzarse de estudios microestructurales realizados en la testa que son explicados en la siguiente sección.

De acuerdo al Cuadro 9, el número de fragmentos, el área y el diámetro mayor para 80 y 110°C no presentaron diferencias significativas. Este comportamiento puede ser debido a que durante el tratamiento a 80°C, la difusión de la humedad es lenta en comparación con la de 110°C en donde es más rápida, esto se puede observar en la cinéticas de secado y en la velocidad del secado (Figura 22 y 23), esto podría estar asociado al mecanismo de secado y por ende a efectos térmicos similares para las dos condiciones; influenciando el mecanismo el mecanismo de fractura de la testa de la semilla de *R. communis*, en comparación con las demás condiciones. El perímetro de las fracturas no presentó diferencias significativas entre ellas, solo 110°C que es diferente de todas las demás. Con respecto a los parámetros de forma (razón de aspecto y redondez) no presentaron diferencias significativas entre las condiciones.

El procedimiento realizado para cuantificar las características de la fractura de la testa de la semilla de *R. communis* propuesto en esta investigación es útil para el descascarado y aprovechamiento de la semilla.

Cuadro 9. Parámetros de las fracturas extraídos a partir de las imágenes binarias y aplicando el análisis de imágenes.

Muestra	Numero de fragmentos	Área (mm ²)	Perímetro (mm)	Diámetro mayor (mm)	Razón de aspecto (*)	Redondez
Nativa	15±4.35	20.12±15.69	19.61±8.77 ^a	7.08±3.09 ^a	2.16±0.84 ^a	0.52±0.17 ^a
80 ^o C	19±4.94 ^a	12.71±11.58 ^b	16.47±8.36 ^a	5.93±3.11 ^b	2.17±0.86 ^a	0.53±0.18 ^a
90 ^o C	15±3.66	17.11±13.78 ^a	18.23±8.18 ^a	6.55±2.99 ^a	2.20±0.98 ^a	0.53±0.18 ^a
100 ^o C	16±1.90	15.91±13.60 ^a	17.5±8.36 ^a	6.21±3.10 ^a	1.96±0.76 ^a	0.57±0.18 ^a
110 ^o C	21±5.07 ^a	12.33±12.12 ^b	15.33±8.74	5.58±3.38 ^b	2.08±0.92 ^a	0.57±0.21 ^a

Letras idénticas no presentan diferencia significativa con P<0.05. * Adimensional.

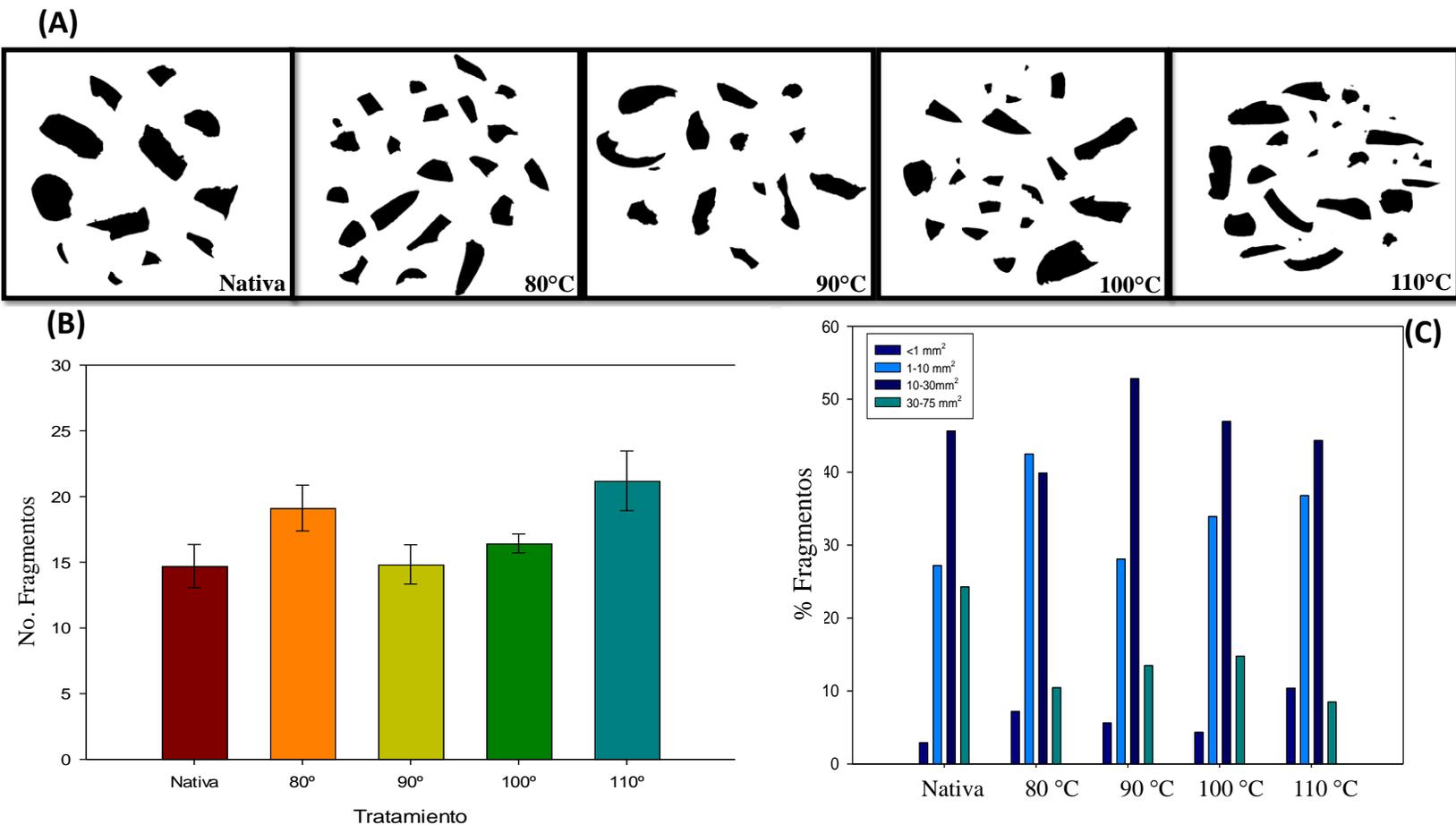


Figura 28. (A) Imágenes binarias de los fragmentos de las muestras después de la fractura por compresión. (B) Numero de fragmentos respecto al tratamiento térmico de las semillas de *R. communis*. (C) Distribución del tamaño de fragmentos después de fracturar las semillas secadas a diferentes condiciones y la nativa (calculado por el análisis de imágenes).

6.3.2. Evaluación de los cambios estructurales en la testa

Como parte de la evaluación de los cambios microestructurales en la testa, la observación de las semillas mediante estéreomicroscopia mostro el efecto del secado por lecho fluidizado (Figura 29). Puede observarse un cambio de color debido a la temperatura, pero también se puede observar más áreas dañadas debidas en primera instancia a la fricción en el lecho cuando se están secando las semillas, y en segunda al efecto de la temperatura sobre la testa de la semilla. Este daño podría beneficiar a que el descascarado sea más sencillo para el caso de semillas similares, tal y como se observó en el análisis de compresión y de la cuantificación de las fracturas (Figura 28 y Cuadro 9).

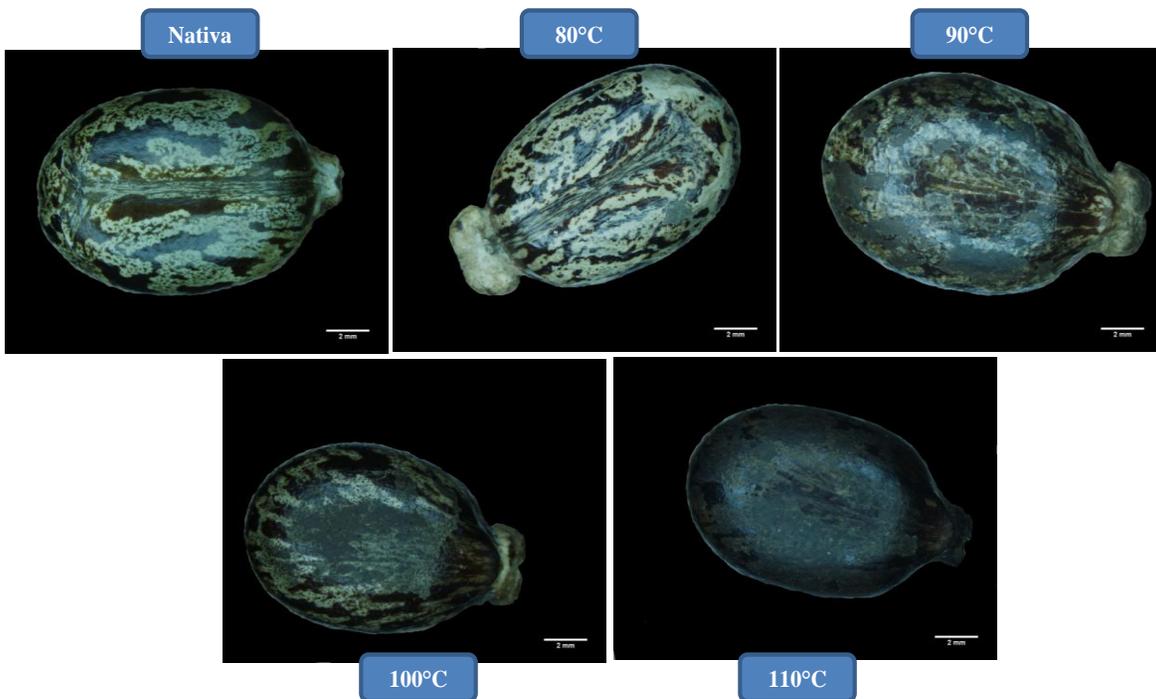


Figura 29. Imagen de Estéreomicroscopia de las semillas de *R. communis* sometidas a secado por lecho fluidizado a diferentes temperaturas.

Posteriormente, mediante el MEBA se obtuvieron imágenes de la microestructura de la testa de las semillas y el efecto debido al tratamiento térmico. En la Figura 30 muestra la galerías de imágenes de las diferentes fracturas microscópicas en la testa de las semillas de *R. communis* sometidas a secado por lecho fluidizado (a 80, 90, 100 y 110°C) en comparación con las muestras sin tratamiento; a una amplificación de 300X y su correspondiente a 1000X para una observación con más detalle. El testa superficial de las semillas sin tratamiento, se observan dos zonas con diferente arreglo estructural de células, la zona (a) es una capa de células hexagonales isodiamétricas que corresponde a las manchas rojizas de la semilla, mientras que en la zona (b) se ven células irregulares que corresponden a las zonas claras de la semilla. Es posible que estas diferencias estructurales generen zonas más sensibles para fractura debido al arreglo de las células y que también pudiera estar asociada a la forma en la cual el agua es eliminada del material, de ahí la importancia de la descripción, que al igual en comparación con las imágenes de la Figura 29, se observa el efecto de la temperatura de secado.

Las modificaciones estructurales de la testa de la semillas de *R. communis* debido al secado por lecho fluidizado a 80°C son más severas en comparación con las de 90 y 100°C. En la testa secada a las diferentes temperaturas 80, 90 y 100°C; exhibe diferentes capas de la testa tal y como se muestra en la Figura 18, para 80°C, se observa el tejido de soporte (células de Malpighi), las muestras secadas a 90 y 100°C son más superficiales. Sin embargo en la testa tratada a 110°C, no se observó el mismo comportamiento (Figura 30), sino una serie de fisuras, tal vez debido a que la temperatura de secado es alta y se encuentra por encima de la temperatura de ebullición del agua, generando un gradiente de temperaturas del medio y del sólido, repercutiendo en una serie de cambios en la testa por la difusión del agua del interior del endospermo hacia el exterior, esto se ve reflejado en las cinéticas de secado (Figura 24) y el D_{eff} . Así mismo, los resultados obtenidos en el apartado de la prueba de compresión y en el análisis de la fractura, sugieren que estas diferencias en el daño microestructural de 80 y 110°C podría estar asociado al mecanismo de fractura de la testa reflejado en la Figura 28 y Cuadro 9. En el caso de 80 °C el daño es más profundo y severo debido a la lenta velocidad de secado y la fracción en comparación con las otras temperaturas estudiadas, mientras que a 110 °C se observan microfracturas profundas y un

menor daño superficial, en ambos casos estos cambios microestructurales inducen que el número de fragmentos sea similar, no así el patrón de fractura ni la distribución de tamaños de los fragmentos obtenidos a cada condición de secado.

Diversos autores han reportado que las modificaciones sufridas en la testa se deben a cambios microestructurales en el endospermo (Varela y col, 2008a), y que dichos cambios están influenciados por las condiciones de secado utilizados. Los cambios microestructurales generados en la testa son útiles para la mejora y optimización del descascarado de la semilla de *R. communis*.

Aumentos de observación

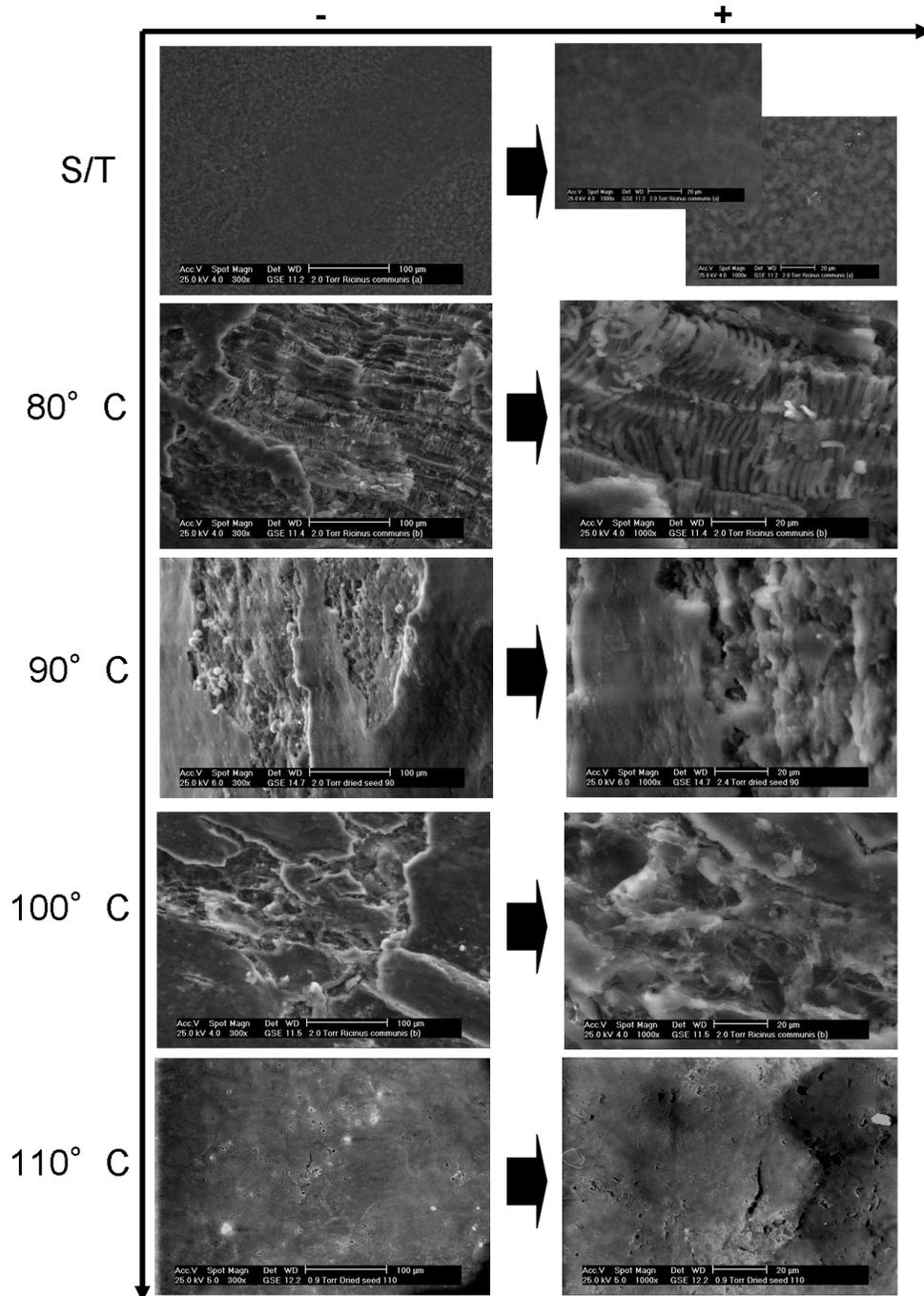


Figura 30. Galería de micrografías de MEBA, que muestran los diferentes tipos de fracturas microscópicas en la testa de las semillas de *R. communis* sometidas a secado por lecho fluidizado a cuatro temperaturas (80, 90, 100 y 110°C) comparadas con las semillas sin tratamiento. Aumentos de de 300X y 1000X.

6.3.3. Evaluación de los cambios estructurales en el endospermo

En la Figura 31 se muestra la galería de imágenes del efecto del secado por lecho fluidizado (80, 90, 100 y 110°C) en cortes transversales de la testa y el endospermo. La testa de las semillas sin ningún tratamiento se observan intacto mostrando las diferentes estructuras (tegumento, células en empalizadas, epidermis) de 80 a 100°C, el tegumento sufre daños perdiendo su estructura al sufrir cierto encogimiento y desprendimiento del tejido grueso o células de Malpighi, en tanto que a 100°C se observa el desprendimiento de pericarpio del endospermo. En el endospermo sin tratamiento se observa la forma de las células, la lámina media, así como los espacios intersticiales vacíos y los cuerpos lipídicos y proteicos; subsecuentemente conforme se aplica el tratamiento térmico a una mayor temperatura se observa cierto daño, tal es el caso de 90 y 100°C en donde se aprecia la pérdida de la estructura celular mostrando ruptura de la pared celular, un cierto aglomeramiento de los cuerpos lipídicos por el calentamiento. Uno de los fenómenos observado por Varela y col, (2008) es que con la pérdida del material celular dentro de los espacios intracelulares, el tamaño y la forma de los cuerpos proteicos también cambian, probablemente como resultado de su desnaturalización; este fenómeno es observado en el endospermo de la semilla de *R. communis* para los tratamientos de 90, 100 y 110°C (Figura 31). Finalmente, el endospermo tratado a 110°C muestra una pérdida total de la estructura celular, observando una fusión del material celular, y libramiento de los demás componentes como son los cuerpos proteicos, esto es debido a que la ruptura de la pared celular es causada principalmente por la presión interna generada por el vapor de agua que sale de la célula (Varela y col, 2008a; Borem y col, 2008).

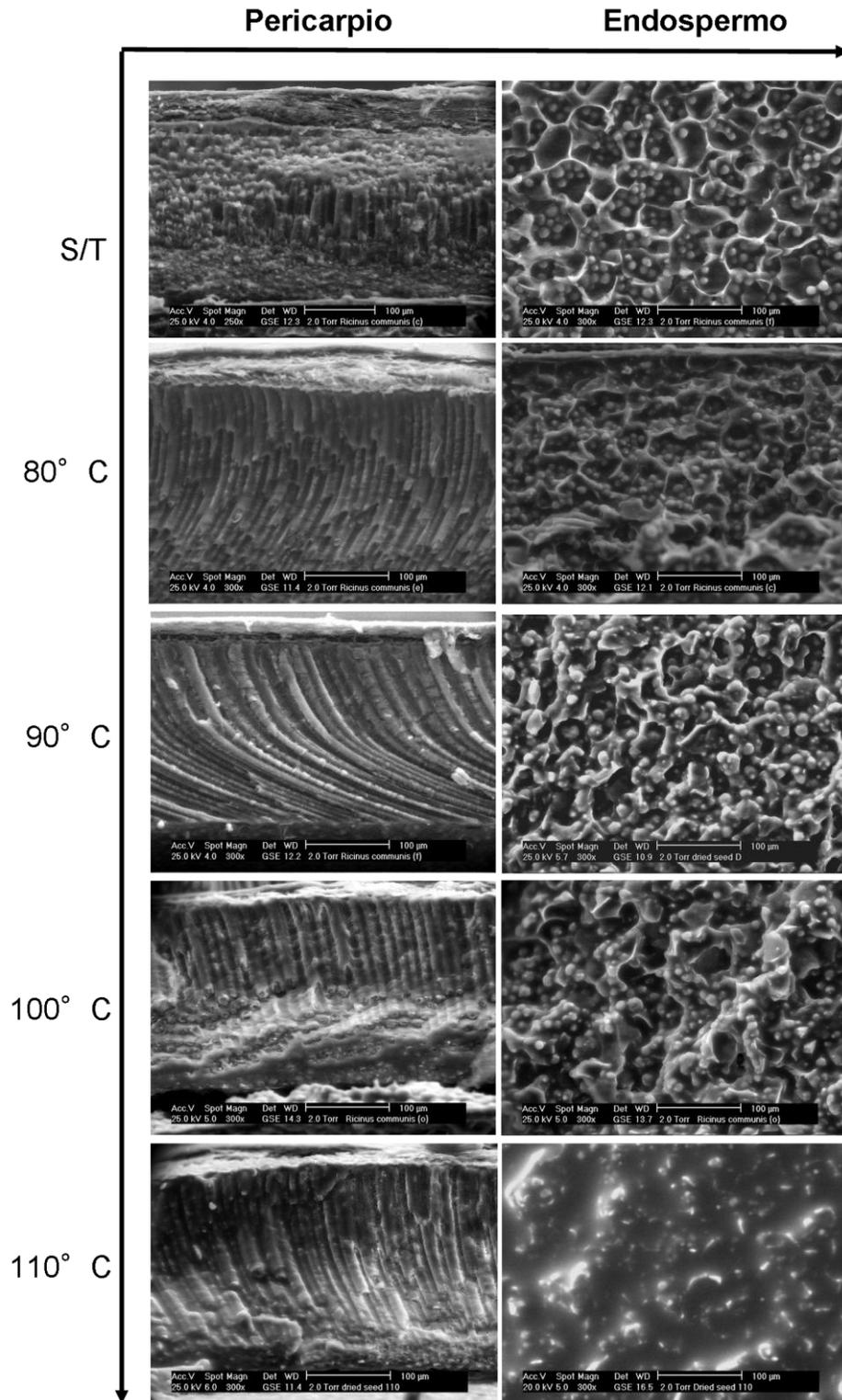


Figura 31. Galería de microfotografías de MEBA del efecto del tratamiento térmico sobre la testa y endospermo de las semillas de *R. communis* a una amplificación de 300X

Los cambios inducidos debido al secado por lecho fluidizado sobre la semilla de *R. communis* pudieron ser caracterizados cualitativamente y cuantitativamente a través de las técnicas de microscopía y el análisis de imágenes. Para el caso de la testa, es evidente que a mayor temperatura los fragmentos aumentan y el tamaño de ellos disminuye debidos a que el secado volvió más frágil la testa. Este mecanismo de fractura de la testa está asociado a los cambios microestructurales observados por MEBA en la testa. Estos datos son útiles para procesos de descascarado de semillas. Así mismo, se describió cualitativamente el efecto del secado por lecho fluidizado sobre la microestructura del el endospermo con el microscopio electrónico de barrido ambiental. Se evidencio el efecto del secado por lecho fluidizado sobre el endospermo, el cual mostro que a mayor temperatura de secado mayor destrucción del mismo. Los cambios estructurales inducidos en el endospermo podrían beneficiar para mejora de los rendimientos y eficiencias en la extracción de aceite de ricino.

6.4. Capítulo IV. Espectroscopía Raman

Como se sabe, las semillas de *R. communis* contienen alrededor de 35% de proteína, que generalmente los espectros de todas las proteínas exhiben las bandas características debido a los grupos amida característicos (la posición de las bandas de la amida I, II y III son afectadas por la disposición estructural de las proteínas), CO-NR´.

De acuerdo con Socrates (2001), menciona que en los estudios de Raman tienden a hacer uso de las bandas de la amida I y III, debido a que la amida II es generalmente inactiva o en su caso débil en Raman. La banda de la amida I ocurre cerca de 1655cm^{-1} , tal y como se observa en el espectro Raman de la semilla nativa (Figura 32) y la posición precisa de esta banda depende de la naturaleza del enlace de hidrógeno entre los grupos CO y N-H, que a su vez dependerá de la disposición molecular de la proteína responsable de la banda. En el caso de la banda que se muestra en la Figura 32, se podría elucidar que se trata de proteínas con estructura α -hélice ($1655\text{-}1645\text{cm}^{-1}$). La banda de la amida III fue de $\sim 1300\text{cm}^{-1}$, que de acuerdo a la literatura (Socrates, 2001) estas amidas III corresponden a proteínas con estructura α -hélice. En 1545 cm^{-1} corresponde a la banda de la Amida II (forma α , deformación vibracional NH). Para el caso de vibraciones de estiramiento de C-C ocurren en la región $1000\text{-}945\text{ cm}^{-1}$, la cual puede ser observada en la Figura 32. Las proteínas contienen también puentes disulfuro en orden de mantener una conformación, la cual ocurre $\sim 490\text{cm}^{-1}$ (Ver Figura 29). Para la banda encontrada en $1550\text{-}1540\text{cm}^{-1}$, corresponde a la banda de la amida II para la forma α y vibraciones de NH. Los lípidos son sustancias insolubles encontradas en los tejidos biológicos. Los cuales consisten en moléculas compuestas por una cabeza polar y colas hidrofóbicas, las cuales usualmente son una larga cadena de grupos de hidrocarburos. Para el caso de los lípidos, se observaron bandas correspondientes a 1747cm^{-1} (C=O, estiramiento de RC=OOR), 1260cm^{-1} (C-H, flexión en el doble enlace *cis* en R-HC=CH-R), 1442cm^{-1} (C-H, tijera de $-\text{CH}_2$). En la parte más alta del espectro (Figura 32), las bandas alrededor de $2850\text{-}2940\text{cm}^{-1}$ son características de vibraciones de estiramiento de C-H simétrico y asimétrico, de los grupos de CH_2 y CH_3 , respectivamente (Shönemann y Edwards, 2011; Brambilla y col, 2011; Yang y col, 2005; Eduardo da Silva y col, 2008). Los picos caracterizados de acuerdo a la composición química descrita anteriormente también fueron observados en las demás condiciones de secado (Figura 33, 34 y 35).

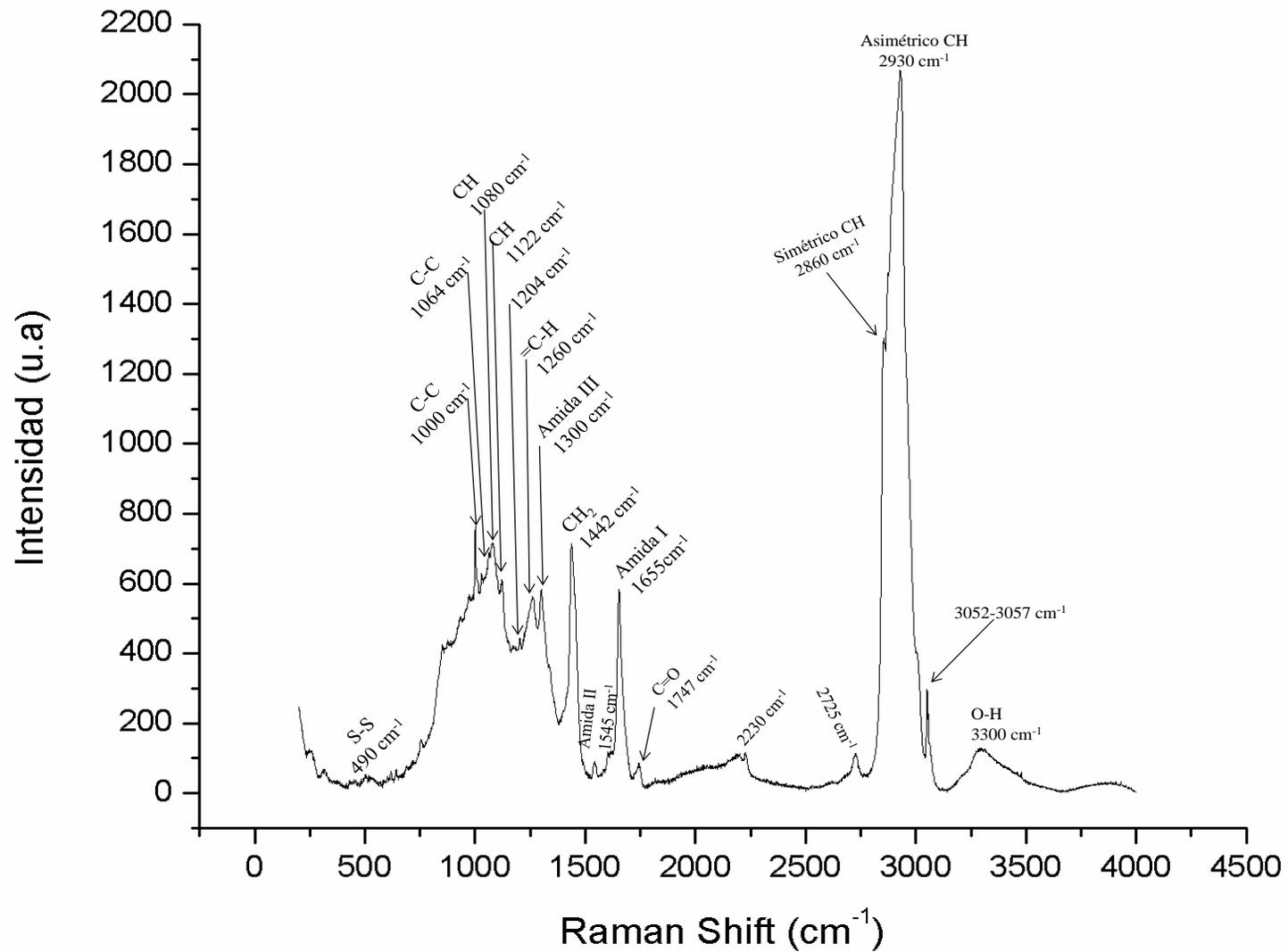


Figura 32. Espectro Raman del endospermo de la semilla *R. communis* nativa.

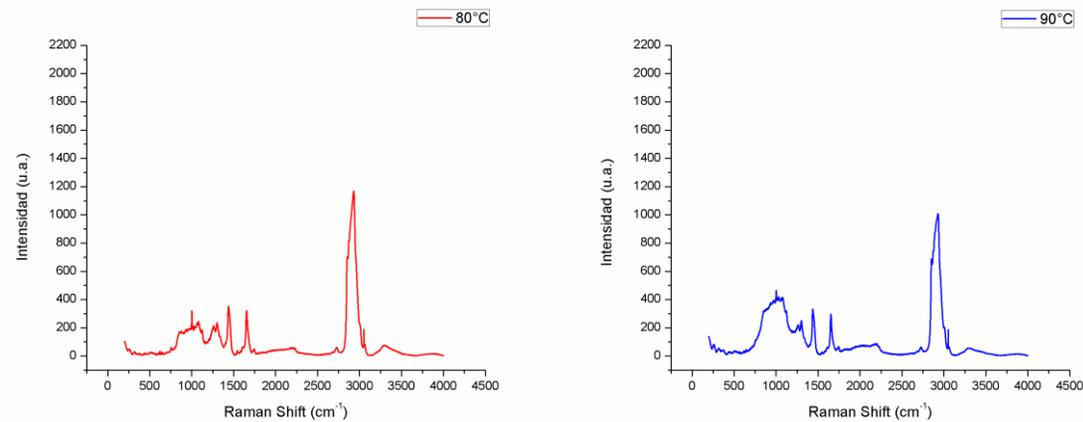


Figura 33. Espectros Raman del endospermo de la semilla de *R. communis* sometida a secado por lecho fluidizado (a) 80°C y (b) 90°C.

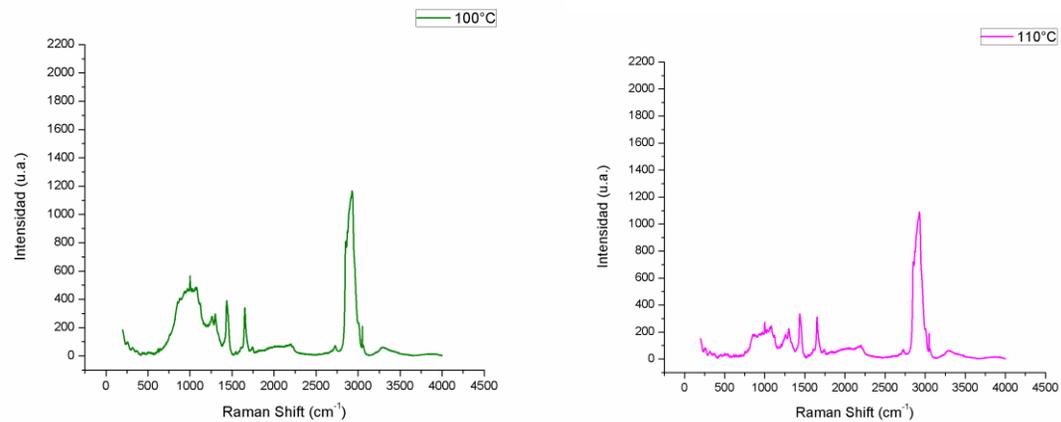


Figura 34. Espectros Raman del endospermo de la semilla de *R. communis* sometida a secado por lecho fluidizado (a) 100°C y (b) 110°C.

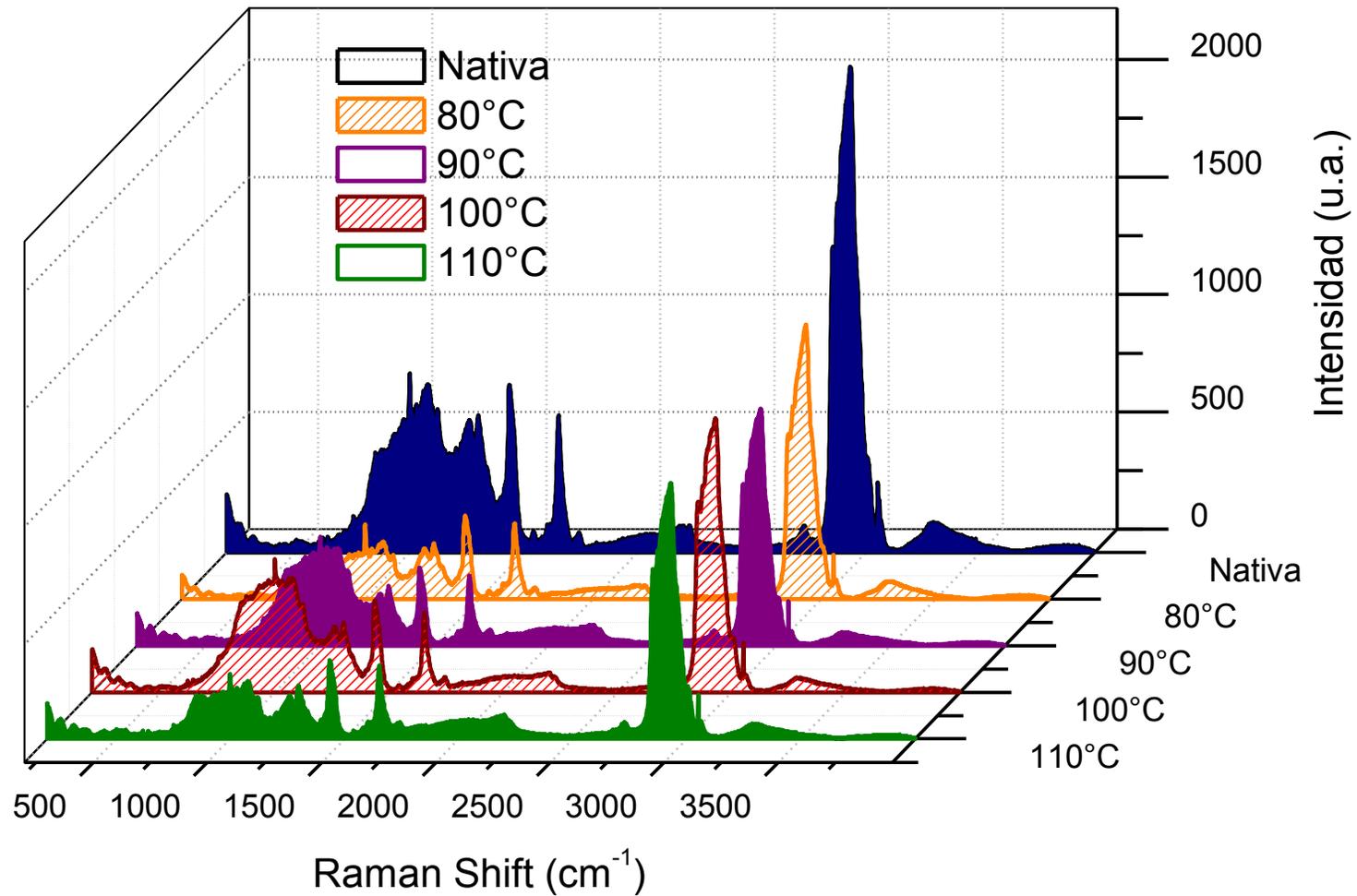


Figura 35. Espectros Raman del endospermo de la semilla *R. communis* nativa y comparada con las sometidas a secado por lecho fluidizado a 80, 90, 100 y 110°C.

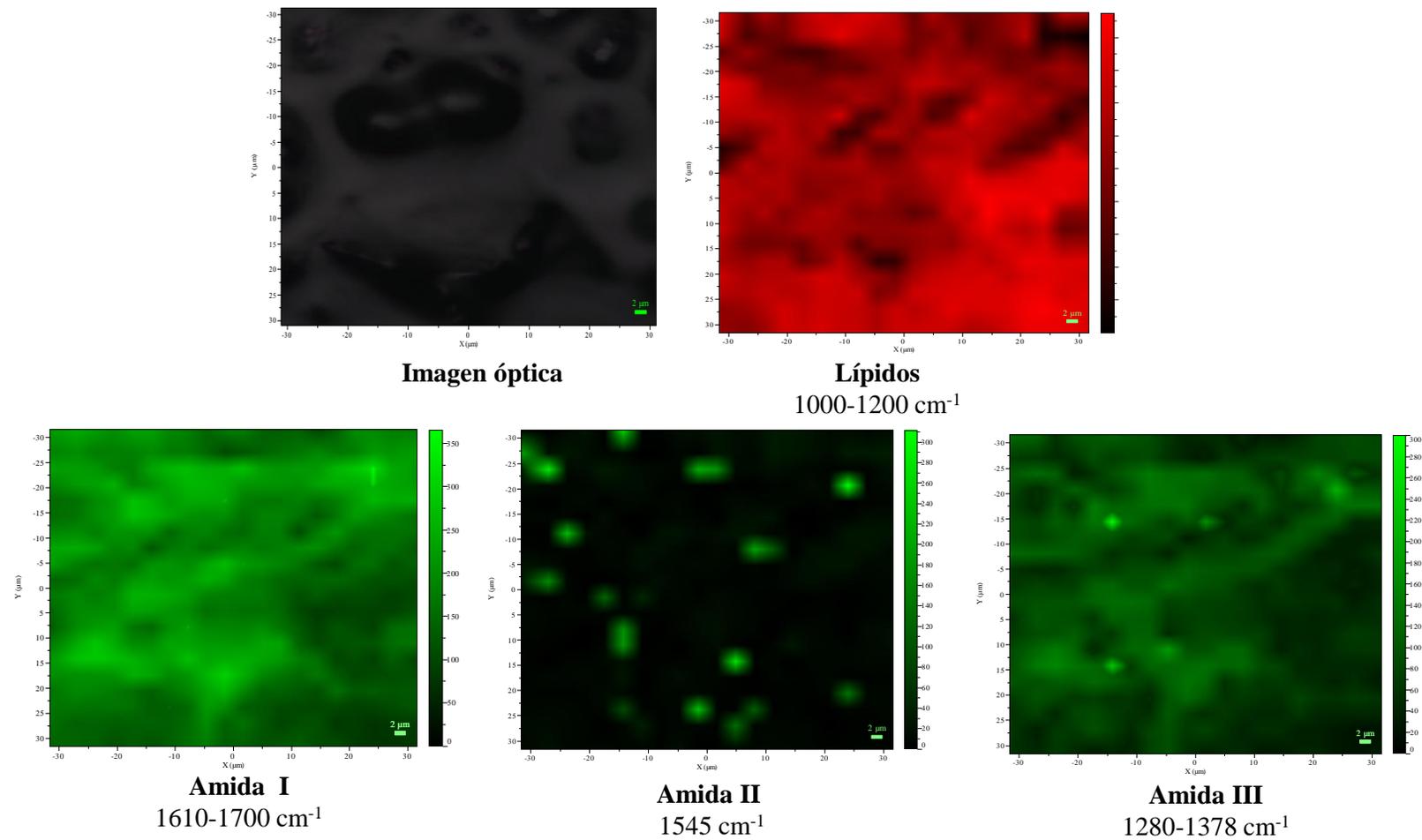


Figura 36. Mapeos Raman de la distribución de los componentes principales (lípidos y proteínas) de la semillas de *R. communis* nativa. Para el caso de las proteínas, se muestra la distribución de las amidas.

En la Figura 35, se observan todos los espectros Raman del endospermo de las cinco condiciones. De acuerdo al análisis previo realizado para identificar los grupos funcionales de los principales componentes (lípidos y proteínas), en los espectros de las demás condiciones siguen apareciendo las bandas de los grupos funcionales de los principales componentes. En el caso de las bandas correspondientes a los lípidos ($800-1200\text{ cm}^{-1}$) las bandas características siguen apareciendo, pero es notorio que para 80 y 110°C en este intervalo correspondientes a los lípidos disminuye la intensidad, esto puede estar asociado a una reconfiguración de la estructura del endospermo y que a ella está asociada la disminución de estas bandas características de los lípidos, así como también a una degradación de estos compuestos. Sin embargo, para el caso de las proteínas ($1300-1655\text{ cm}^{-1}$), las bandas aunque sufrieron una disminución para todas las condiciones de secado ($80-110^\circ\text{C}$), esta disminución no es tan notoria, esto puede estar asociado al tratamiento térmico no está dañando totalmente a la proteína. Este comportamiento de los espectros Raman, sobre todo para el caso de 80°C y 110°C ; podría estar asociado a la forma en que difunde el agua cuando las semillas de *R. communis* son sometidas a secado por lecho fluidizado.

Finalmente, en la Figura 36 se puede observar los mapeos de Raman de la distribución de los componentes principales como lo son las proteínas y los lípidos para las semillas en estado nativo. Para el caso de las proteínas, se descompuso el espectro en las bandas correspondientes a la Amida I ($1610-1700\text{cm}^{-1}$), Amida II (1545cm^{-1}) y Amida III ($1280-1378\text{cm}^{-1}$); y para el caso de los lípidos se monitoreo la distribución en la región de $1000-1200\text{cm}^{-1}$ (Socrates, 2005).

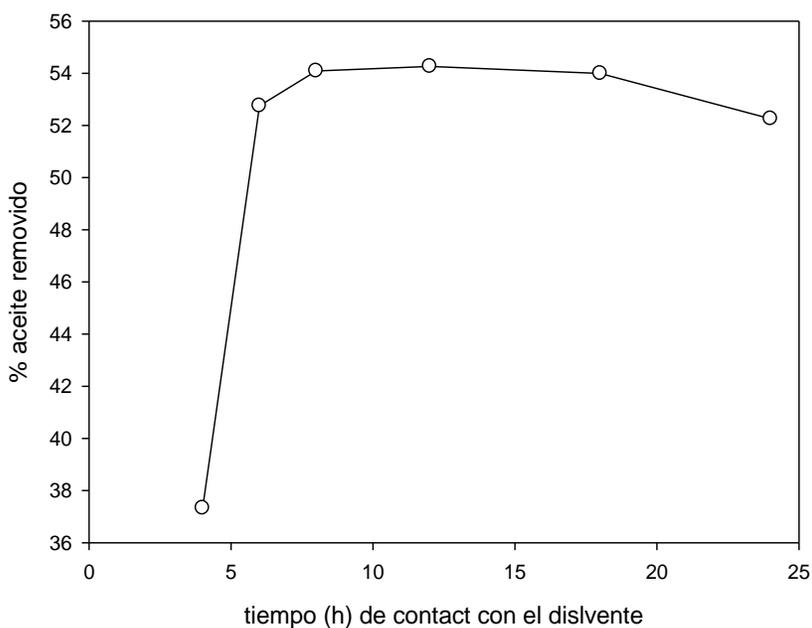
La espectroscopía Raman es una técnica que permite evaluar las vibraciones molecular que permitió identificar los grupos funcionales de los compuestos característicos de la semillas de *R. communis*, la cual en su mayor composición tiene lípidos y proteínas. La distribución de estos compuestos a escala micrométrica fue estudiada usando las imágenes de mapeo de Raman en los intervalos $1280-1700\text{cm}^{-1}$ para el caso de las proteínas y para los lípidos en la región $1000-1200\text{cm}^{-1}$. La variación de los espectros Raman, en el caso de la reducción de los picos característicos, podría estar asociado a los efectos térmicos debidos al secado por lecho fluidizado, no se observó una oxidación drástica debido a la alta estabilidad del aceite

de ricino y a su alta viscosidad. El uso de esta técnica no destructiva para el estudio de los efectos térmicos sobre la composición podría implementarse como una técnica rápida, confiable y que a su vez aplicando métodos numéricos de análisis a los espectros permitirá tener información cuantitativa relevante para el procesamiento de la semilla.

6.5. Capítulo V. Extracción del aceite de ricino

6.5.1. Extracción por el método de soxhlet

Para establecer las condiciones de extracción adecuadas se tomó como referencia la extracción por el método de soxhlet y se evaluó el % de remoción de aceite a diferentes tiempos de reflujo. La Figura 37 muestra los resultados del % de extracción obtenido a diferentes tiempos para semilla nativa o sin tratamiento térmico, se observó un mayor % de remoción a 12 h de tratamiento en comparación con tiempos más cortos de proceso. Para casos prácticos, dado que entre 8 y 12 horas de extracción son similares, el efecto del secado por lecho fluidizado sobre el % de remoción se decidió utilizar 8 h de extracción para el resto de los estudios.



Tiempo (h)	% de remoción
4	37.33
6	52.75
8	54.09
12	54.26
18	53.99
24	52.25

Figura 37. % de aceite extraído de la semilla nativa y a diferentes tiempos de reflujo.

Para visualizar el efecto del tiempo de extracción con el % de remoción, estos resultados se asociaron con los cambios microestructurales ocurridos en la semilla; en la Figura 38, se puede observar imágenes de MEBA del endospermo nativo y de la torta residual después de cada tiempo de extracción. Se aprecia que tanto a todos los tiempos de extracción la

estructura organizada en pequeños compartimentos del endospermo tiende a disgregarse y exponiendo más claramente los cuerpos lipídicos contenidos en las células, esto se hace más notorio después de 8 h de extracción, donde se aprecia fragmentos de las lamelas medias y pequeñas estructuras esféricas que posiblemente se pueden asociar a la presencia de proteínas estructurales como las oleosinas (Murphy y col, 2001) que son evidentes debido a que la mayoría de los lípidos (en promedio 54%) ya fue removido por el proceso de extracción (8, 12 y 18 h de tratamiento). En el caso de las 24 h de extracción la microestructura se observa severamente dañada e incluso los cuerpos proteicos remanentes se aprecian en menor número y solo pequeños fragmentos irregulares de la pared celular y lamela media puede ser observadas; sin embargo, el % de extracción del aceite fue menor que para 8, 12 y 18 h, esto puede estar asociado a una saturación del disolvente o a un fenómeno de re-adsorción del aceite por el largo tiempo de contacto y cambios conformacionales en las proteínas y en la estructura de la semilla.

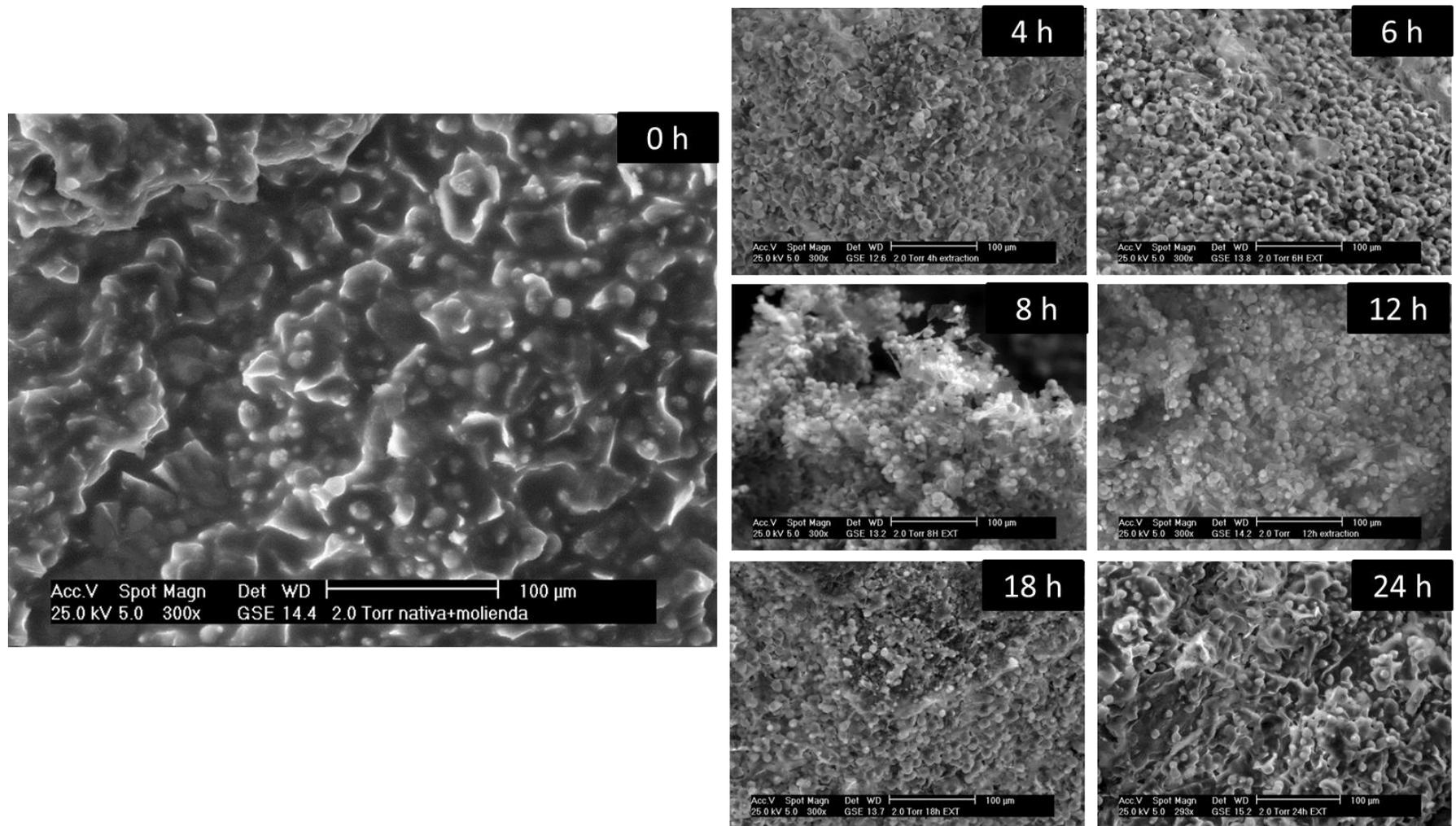


Figura 38. Imágenes de MEBA del efecto del tiempo de remoción de los lípidos sobre la microestructura del endospermo.

La Figura 39 muestra los resultados obtenidos para evaluar el efecto del secado sobre la extracción de aceite, se observó que % de extracción de aceite se incrementa con la temperatura de secado en relación a las semillas sin tratamiento, el mayor % de extracción se obtuvo a 110 °C. Este comportamiento podría estar asociado a los cambios microestructurales observados en las imágenes de MEBA (Figuras 30 y 31) donde el mayor daño en las células del endospermo está asociado a un mayor % de extracción de aceite. Por otro lado, menores % de extracción de aceite correspondieron a las semillas secadas a 80° C, esto puede asociarse procesos de encogimiento lento, compactación del material y un menor daño en las paredes celulares de las células del endospermo comparado con los tratamientos a 100 y 110 °C, como se puede observar en las imágenes microscopía (Figura 30 y 31). Esto se puede confirmar en la Figura 37 donde se observa la microestructura final de la torta residual después del proceso de extracción a las diferentes condiciones de secado.

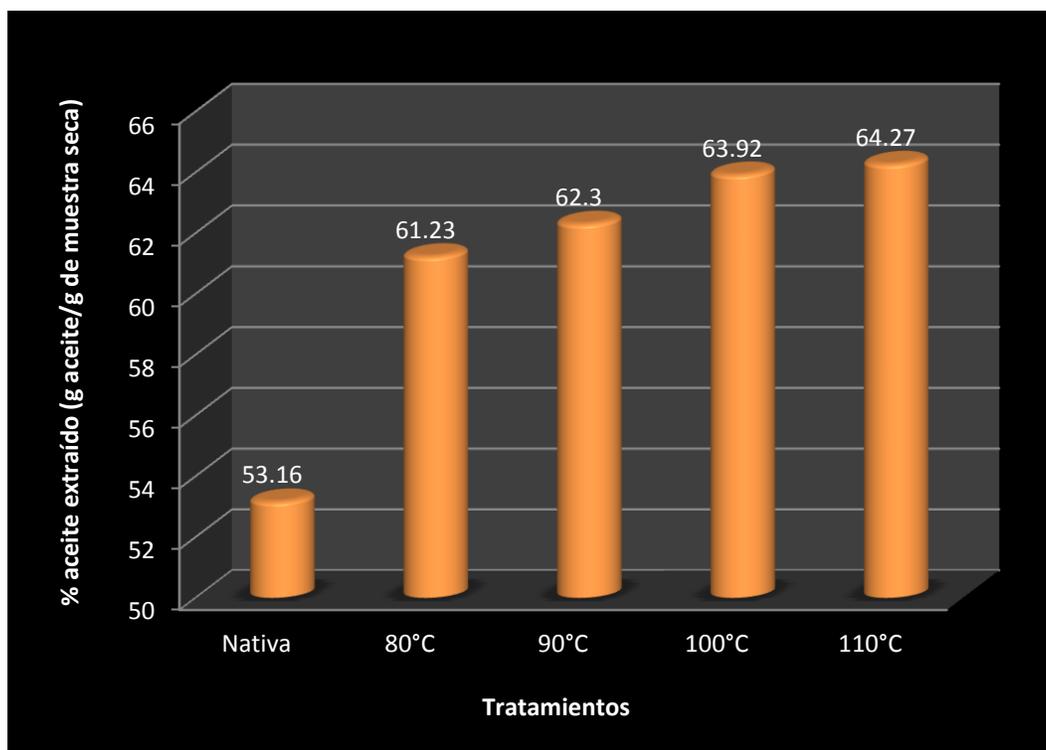
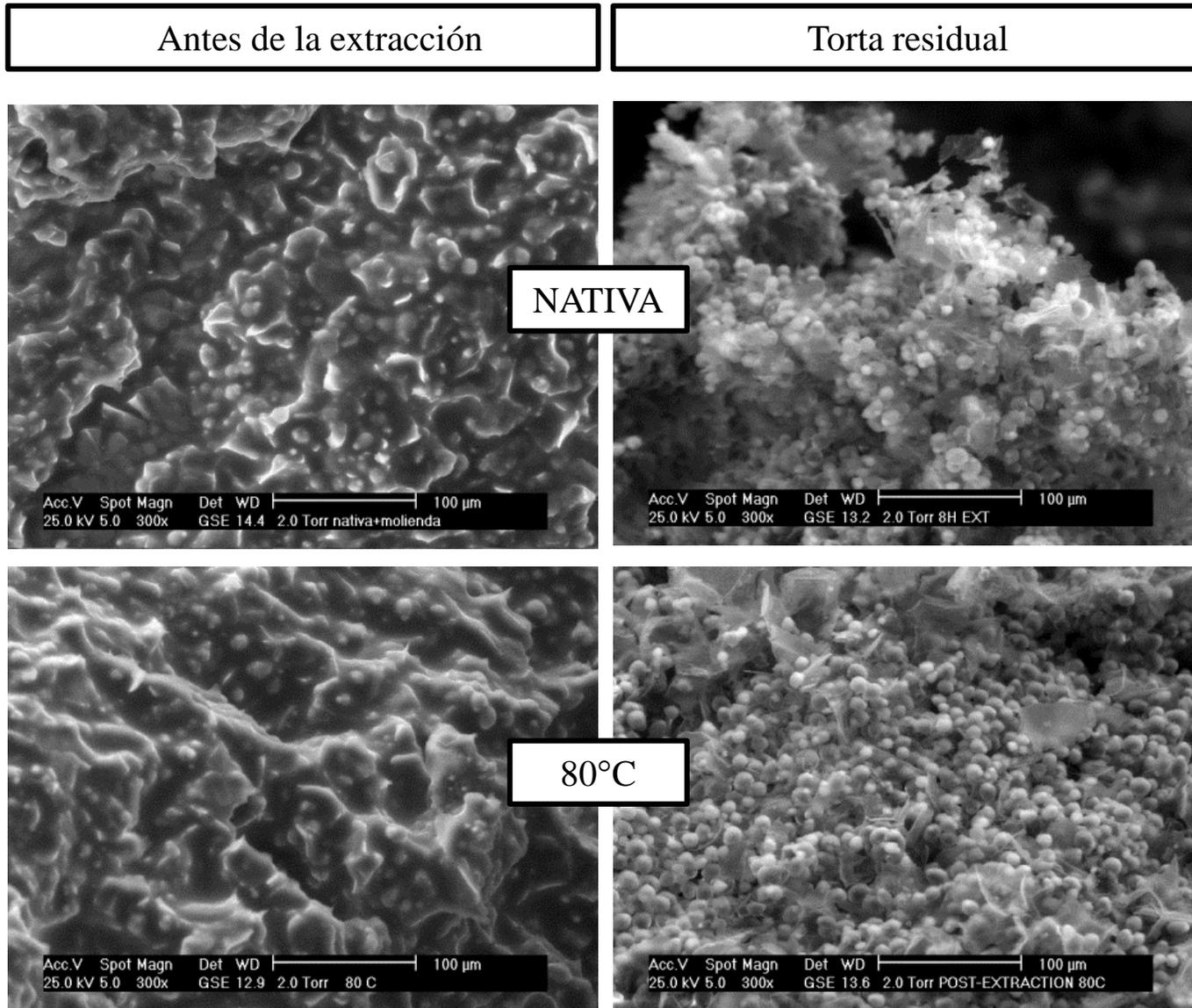
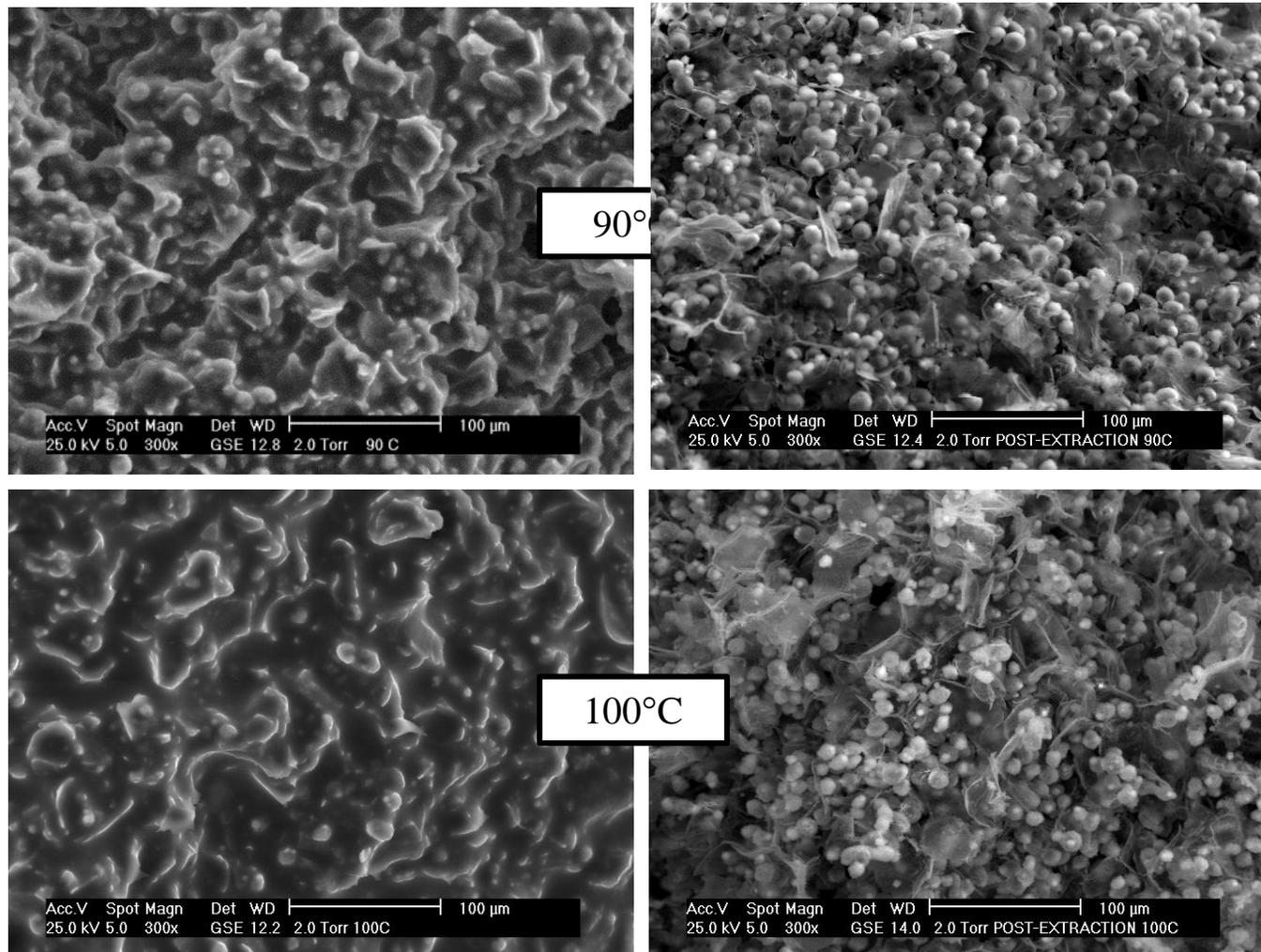


Figura 39. % de aceite extraído de la semilla nativa y tratada a diferentes temperaturas de secado.

6.5.2. Evaluación de los cambios microestructurales debidos a la extracción

Para asociar los porcentajes de extracción con los cambios microestructurales en el endospermo de las semillas de *R. communis*, tanto las semillas secadas a diferentes temperaturas como las tortas residuales después de 8 h extracción fueron observadas en MEBA (Figura 40); se aprecia como el incremento en la temperatura de secado daña considerablemente la microestructura del endospermo de las semillas, el efecto a 100 y 110°C; lo cual también corresponde a un mayor daño apreciado en las imágenes de las tortas residuales donde es más notable la escasez de cuerpos lipídicos en las células y el tamaño menor de la oleosinas. Para las demás condiciones, las oleosinas se observan de tamaño regular, y en las células se aprecia una gran cantidad de cuerpos lipídicos. Este comportamiento está relacionado con el % de remoción de aceite mostrada en la Figura 37, por lo tanto se comprueba la hipótesis inicial en la que se mencionó que el secado puede beneficiar la extracción del aceite dado los daños ocasionados a la microestructura del endospermo de las semillas. También es importante tener en cuenta que para el caso de 110°C, el análisis realizado en los espectros Raman (Figura 35) se observó que para el caso de los lípidos, hay una disminución en los espectros y que esto podría estar asociado a cambios conformacionales tanto en la estructura de la semilla como en los componentes y que esto a su vez asociado a la extracción del aceite.





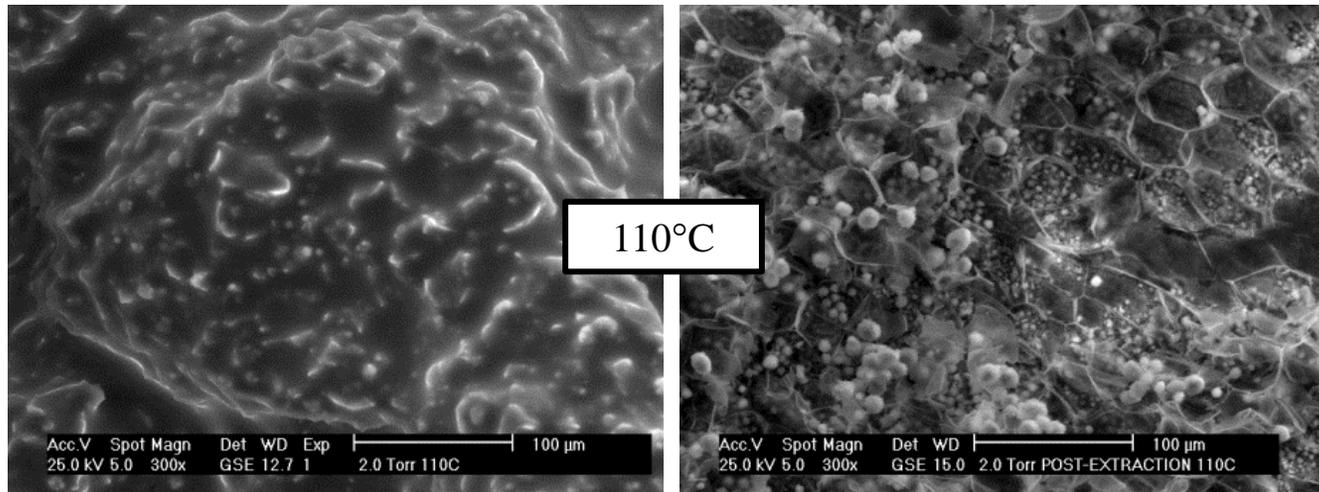


Figura 40. Efecto del secado por lecho fluidizado sobre la microestructura de la semilla

A partir de las imágenes obtenidas por MEBA (Figura 40), se realizó una caracterización cuantitativa de la microestructura de la torta residual después de la extracción por soxhlet durante 8 h para el caso de la nativa y de los cuatro tratamientos térmicos. Los valores obtenidos se observan en el Cuadro 8, y las tendencias se muestran en la Figura 41. Como se esperaba, los parámetros texturales permitieron cuantificar la microestructura de las imágenes de las tortas residuales de cada condición de secado, para el caso de 100 y 110°C se observa similitud entre los cuatro parámetros de textura; para el caso de Entropía (6.8108-6.8361) y textura fractal (2.4276-2.4290) altos valores fueron encontrados en comparación con la nativa (entropía: 6.1246 y textura fractal: 2.3856). En cambio, para el caso de los parámetros de segundo momento angular (0.0019) y diferencia de momento inverso (0.02063-0.2046) para 100 y 110°C fueron los más bajos. De acuerdo con Fernández y col, (2005) y Mendoza y col, (2007) bajos valores del segundo momento angular y de la diferencia de momento inverso indican una distribución irregular y heterogeneidad local de los píxeles de la imagen, respectivamente. Esta tendencia puede estar asociada a que para el caso de la torta residual de las condiciones o tratamientos de 80-90°C muestran una mayor homogeneidad y distribución regular debido a que la microestructura no ha sido afectada completamente debido a la extracción de aceite; se puede observar en la Figura 40 que en esas condiciones aún hay gran presencia de oleosinas intactas que no fueron removidas por el disolvente.

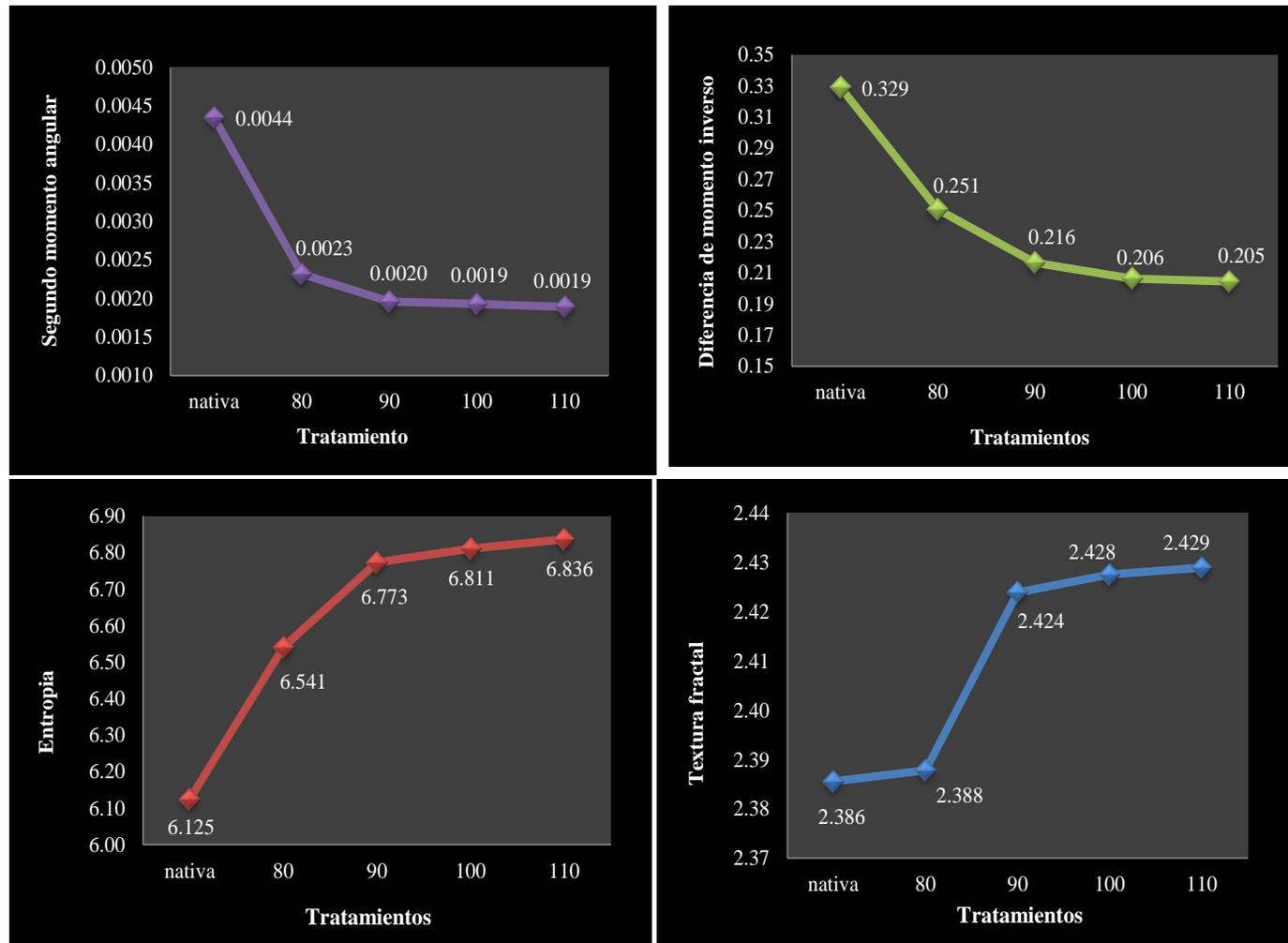


Figura 41. Graficas de los parámetros texturales (segundo momento angular, diferencia de momento inverso, entropía y textura fractal) extraídos de las imágenes de MEBA de los diferentes tratamientos térmicos o condiciones de secado (80-110°C) y nativo.

Por otro lado, las tendencias opuestas de los parámetros de entropía y dimensional fractal fueron observadas en la Figura 41, en donde para la torta residual de los tratamientos de 100-110°C tanto la complejidad como la rugosidad van aumentando. Este comportamiento puede deberse a que a estas condiciones de secado se extrae el mayor % de aceite (63-64%) y que por tanto gran parte de las estructuras en donde se almacenan estos cuerpos lipídicos han sido extraídas, esto se observa en la Figura 40. De acuerdo a la Figura 41, las muestras sometidas a secado por lecho fluidizado a mayores temperaturas está asociado a mayor % de extracción de aceite y a su vez a microestructuras más complejas, heterogéneas y rugosas.

Cuadro 10. Valores de los parámetros de textura extraídos de las imágenes de la torta residual de las semillas de *R. communis* obtenias con el MEBA.

Tratamiento	Segundo momento angular	diferencia de momento inverso	Entropía	Textura fractal
nativa	0.0044±0.0036	0.3290±0.1255	6.1246±0.7324	2.3856±0.0439
80	0.0023±0.0008	0.2507±0.0509	6.54095±0.3253	2.3878±0.0529
90	0.0020±0.0006	0.2165±0.0355	6.7731±0.3081	2.4240±0.0446
100	0.0019±0.0006	0.2063±0.0308	6.8108±0.2390	2.4276±0.0470
110	0.0019±0.0005	0.2046±0.0217	6.8361±0.1964	2.4290±0.0338

De acuerdo a los resultados, se evaluó el efecto de secado por lecho fluidizado sobre el proceso de extracción y el efecto sobre la microestructura del endospermo de la semilla de *R. communis*. Se obtuvo mayor % de extracción a mayor temperatura de secado, el cual a su vez está asociado a cambios más severos en el endospermo debido al tratamiento térmicos. El análisis de textura de imágenes permitió evaluar cuantitativamente los cambios microestructurales en las tortas residuales después de 8 h de extracción para todas las condiciones de secado, lo cual sugiere que a mayor tratamiento térmico mayor escases de cuerpo lipídicos. Esto comprueba la hipótesis inicial del trabajo, en donde el secado está beneficiando la extracción del aceite, sin que este sufra modificaciones, debido a los cambios microestructurales en el endospermo de la semilla.

7. Conclusiones

- Los estudios realizados en las semillas nativas mediante técnicas de microscopia, análisis de imágenes y espectroscopía Raman permitieron evaluar de forma cualitativa y cuantitativa la estructura y componentes químicos de las semillas de *R. communis*. El microanálisis químico mostró que las células del endospermo contienen minerales como Mg, P, S, K que están asociados a las proteínas y lípidos. Se evidenció un alto número cuerpos lipídicos por célula del endospermo (9.6 por célula); células del endospermo con un diámetro mayor promedio de 44.01 μm , células del embrión con 28.2 μm y cuerpos lipídicos de 12.5 μm .
- El estudio del secado por lecho fluidizado de las semillas de *R. communis* proporciono cinéticas de secado que sugieren que las semillas se deshidratan en el periodo de velocidad decreciente y que la estructura controla la difusión del vapor de agua. El análisis de las cinéticas de secado mediante modelos matemáticos indicó que el modelo de aproximación de la difusión fue el que mejor ajuste proporcionó. Se obtuvieron coeficientes de difusividad efectiva en un intervalo de 8.21×10^{-10} a 2.61×10^{-9} m^2/s para las temperaturas ensayadas y una energía de activación de 41.41 kJ/mol, estos parámetros pueden ser útiles en el diseño y simulación de equipo de secado.
- Los estudios de microscopia fotónica y electrónica realizados en la testa y el endospermo de las semillas tratadas térmicamente facilitaron el descascarado de la semilla y una mayor destrucción de las estructuras celulares tanto en la testa como el endospermo. Este efecto fue más pronunciado a mayores temperaturas de secado.
- Los efectos del secado en la testa de las semillas fueron asociado a las pruebas de compresión mecánica, donde se obtuvo una menor fuerza para realizar su fractura en las semillas tratadas térmicamente (62 N) en comparación con las semillas sin tratamiento (67.5 N). Asimismo, un mayor número de fragmentos fue obtenido a 80 y 110 °C, y en el caso de las condiciones de 90 y 100 °C el número de fragmentos fue similar al obtenido en las semillas nativas, esto pudo explicarse desde el tipo de fracturas observadas bajo microscopia electrónica de barrido, donde a 80 y 110 °C se muestra un mayor daño estructural y un mayor número de

microfracturas. Estos datos pueden ser útiles para seleccionar las condiciones de secado que faciliten el descascarado de semillas.

- Los cambios estructurales inducidos en el endospermo mejoraron los rendimientos de extracción del aceite de las semillas tratadas térmicamente (61.23 % a 80 °C, 62.30 % a 90 °C, 63.92 % a 100 °C y 64.27 % a 110 °C) en comparación con las semillas sin tratamiento (53.16 %), esto fue asociado a un mayor daño estructural de las células del endospermo. Los estudios microestructurales permitieron observar una disminución de los cuerpos lipídicos en la torta residual a mayor temperatura de secado y después de la extracción. La complejidad de la torta de extracción evaluada mediante análisis de imágenes mostró que esta se incrementa con la temperatura de secado, los rendimientos de extracción del aceite debido a un mayor daño celular observado.
- La espectroscopía Raman realizada sugiere que las condiciones de 80 y 110°C los lípidos contenidos en las semillas sufrieron los mayores cambios conformacionales tanto en su estructura como en su composición.
- El efecto global que tiene el secado por lecho fluidizado de las semillas de *R. communis* sobre la estructura, y en la extracción del aceite pudo describirse exitosamente de forma cualitativa y cuantitativa mediante técnicas de microscopia y de espectroscopía y análisis de imágenes. La importancia de este trabajo fue evidenciar como las condiciones de procesamiento térmico de las semillas tiene una marcada influencia su estructura y funcionalidad, todo ello podrían ser de utilidad en el futuro para un aprovechamiento integral de la semilla de *R. communis* con aplicaciones en la industria alimentaria y energética.

8. Bibliografía

- AACC, 2003. International Approved Methods of Analysis. 11th433 , Edition. Method 26-95.01
- Abalone, R., Gastón, A., Cassinera, A., Lara, M.A. (2006). *Thin layer drying of Amarantha seed*. Biosystems Engineering. 93(2): 179-188.
- Aguilera, J.M. (2000a). Structure-Property Relationships in Foods in Trends in Food Engineering. Food Preservation Technology Series. Edited by Lozano, J.E., Añón, C., Parada, A.E., Barbosa, C.G.V. Pennsylvania, U.S.A. Pp. 1-15.
- Aguilera, J.M. (2000b). Microstructure and Food Product Engineering. Food Technology. 54(11):56-64.
- Aguilera, J.M. (2003a) Drying and Dried Products under the Microscope. Food Science Technology International. 9(3):137-143.
- Aguilera, J.M. (2003b). Solid-Liquid Extraction in Extraction Optimization in Food Engineering. Edited by Tzia, C., Liadakis, G. Pp. 35-56.
- Aguilera, J.M. (2005) Why food microstructure?. Journal of Food Engineering. 67:3-11.
- Aguilera, J.M., Chiralt, A., Fito, P. (2003) Food dehydration and product structure. Trends in Food Science and Technology. 14:432-437.
- Aguilera, J.M., Fretes, A., San Martin, R. (1986) Characteristics of Guindilla (Valenzuela trinervis Bert.) oil. JAOCS. 63(12): 1568-1569.
- Aguilera, J.M., Stanley, D.W. (1999) Microstructural Principles of Food Processing and Engineering. 2a. Edición. En: Food Engineering Series. Gustavo V. Barbosa-Cánovas editor. An Aspen Publication. (pp. 1-87, 185-188, 325-420).
- Akgun N., Doymaz I., 2005. Modelling of Olive Cake Thin-layer Drying Process. Journal of Food Engineering. 68(4), 455-461.
- Arzate, V.I., Chanona, P. J.J., Calderón, D. G., Terres, R. E., Garibay, F. V., Martinez, R. A., Gutierrez, L. G.F. (2012). Carbohydrate Polymers. 87 (1), 289-299.
- Haralick, R., Shanmugam, K., & Dinstein, I. (1973). Textural features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics SMC*, 3(6): 610-621.
- Gosselin, R., Duchesne, C., & Rodrigue, D. (2008). On the characterization of polymer powders mixing dynamics by texture analysis. *Powder Technology*, 183: 177-188.
- Wen-Shiung, C., Shang-Yuan, Y., & Chih-Ming, H. (2003). Two algorithms to estimate fractal dimension of gray-level images. *Optical Engineering*, 42(8): 2452-2464.
- Akpan, U.G., Jimoh, A., Mohammed, A.D. (2006) Extraction, Characterization and Modification of castor seed oil. Leonardo Journal of Sciences. 5(8): 43-52.
- Alamilla, B.L., Chanona, P.J.J., Jiménez, A.A.R., Gutiérrez, L.G.F. (2005) Description of morphological changes of particles along spray drying. Journal of Food Engineering. 67:179-184.

Ali, R.M., Elfeky, S.S., Abbas, H. (2008) Response of salt stressed *Ricinus communis* L. to exogenous application of glycerol and/or aspartic acid. *Journal of Biological Sciences*. 8(1): 171-175.

Ali, R.M., Elfeky, S.S., Abbas, H. (2008) Response of salt stressed *Ricinus communis* L. to exogenous application of glycerol and/or aspartic acid. *Journal of Biological Sciences*. 8(1): 171-175.

Al-Muhtaseb, A.H., McMinn, W.A.M., Magee, T.R.A. Shrinkage, density and porosity variations during the convective drying of potato starch gel. *Drying 2004-Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004)*, São Paulo, Brazil, 22-25 August 2004. Vol. C: 1604-1611.

Amonsou, E., Taylor, J., Minnaar, A. 2011. Microstructure of protein bodies in marama bean species. *LWT-Food Science and Technology*. 44 (1), 42-47.

Amos, W.B., White, J.G. (2003) *How the confocal laser scanning microscope entered biological research*. *Biology of the cell*. 95: 335-342.

Anaya, I., Cruz, M.T., Santiago, T., Muñoz, J.L., Vizcarra, M. (2003) Quality Assessment of Dried-Bean with Biochemical Parameters. *International Journal of Food Properties*. 6(3): 449-459.

Anwar, F., Naseer, R., Bhangar, M.I., Ashraf, S., Talpur, F.N., Aladedunye, F.A. (2008) Physico-Chemical Characteristics of Citrus Seed and Seed Oils from Pakistan. *Journal American Oil Chemical Society*. 85:321-330.

AOAC, 1995. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists*, 15th edition. AOAC, Washington, DC.

Aquerreta, J., Iguaz, A., Arroqui, C., Vírveda, P. (2007) Effect of high temperature intermittent drying and tempering on rough rice quality. *Journal of Food Engineering*. 80:611-618.

Arabhosseini, A., Huisman, W., van Boxtel, A., Müller, J., 2009. Modeling of thin layer drying of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Industrial Crops and Products*. 29, 53-59.

Arnosti Jr., S., Freire, J.T., Sartori, D.J.M. (2000). Analysis of shrinkage phenomenon in *Brachiaria brizantha* seeds. *Drying Technology*. 18(6): 1339-1348.

Asoegwu, S., Ohanyere, S., Kanu, O., Iwueke, C., 2006. Physical properties of African oil bean seed (*Pentaclethra macrophylla*). *Agric. Eng. Int.: CIGR Ej. VIII*, Manuscript FP 05 006.

Autio, K., Salmenkallio-Marttila, M. (2001) *Light microscopic investigations of cereal grains, doughs and breads*. *LWT*. 34: 18-22.

Babalís, S.J., Papanicolaou, E., Kyriakis, N., Belessiotis, V.G., 2006. Evaluation of thin-layer drying models for describing drying kinetics of figs (*Ficus carica*). *Journal of Food Engineering*. 75(2), 445 205-214.

Barrozo, M.A.S., Henrique, H.M., Sartori, D.J.M. Freire, J.T. (2006) The use of the orthogonal collocation method on the study of the drying kinetics of soybean seeds. *Journal of Stored Products Research*. 42:348-356.

Borém, F.M., Marques, E.R., Alves, E. (2008) Ultrastructural analysis of drying damage in parchment *Arabica coffe* endosperm cells. *Biosystems Engineering*. 99: 62-66.

Bradberry, S. (2007) Ricin and abrin. *Medicine*. 35(10): 576-577.

Bringas, L. (2008). Producen biocombustibles en la UNAM en Gurpo Reforma. (<http://www.presidencia.gob.mx/prensa/ultimasnoticias/?contenido=39298>).

Briones, V., Aguilera, J.M. (2005) Image analysis of changes in surface color of chocolate. Food Research International. 38:87-94.

Calzetta, R.A.N., Aguerre, R. J., Suarez, C. (2004) *Drying characteristics of amaranth grain*. Journal of Food Engineering. 65: 197-203.

Campos-Mendiola, R., Hernández-Sánchez, H., Chanona-Pérez, J.J., Alamilla-Beltrán, L., Jiménez-Aparicio, A., Fito, P., Gutiérrez-López, G.F., 2007. Non-isotropic shrinkage and interfaces during convective drying of potato slabs within the frame of the systematic approach to food engineering systems (SAFES) methodology. J. Food Eng. 83, 285–292.

Carrín, M.E.M., Crapiste, G.H. (2008) Mathematical modeling of vegetable oil-solvent extraction in a multistage horizontal extractor. Journal of Food Engineering. 85: 418-425.

Castro-Giráldez, M., Fito, P.J., Fito, P., 2011. Nonlinear thermodynamic approach to analyze long time osmotic dehydration of parenchymatic apple tissue. J. Food Eng. 102, 34–42.

Cermak, S.C., Isbell, T.A., Isbell, J.E., Akerman, G.G., Lowery, B.A., Deppe, A.B. (2005) Batch drying of cuphea seeds. Industrial Crops and Products, An International Journal. 21:353-359.

Ceylan, I., Aktasa, M., Doğana, H., 2007. Mathematical modeling of drying characteristics of tropical fruits. Applied Thermal Engineering. 27 (11-12), 1931-1936.

Chanona, P.J.J., Alamilla, B.L., Farrera, R.R.R., Quevedo, R., Aguilera, J.M., Gutiérrez, L.G.F., 2003. Description of the convective air drying of a food model by means of the fractal theory. Food Science and Technology International. 9(3), 207-213.

Chanona, P.J.J., Quevedo, R., Jiménez, A.A.R., Gumeta, C.C., Mendoza, P.J.A., Calderón, D.G., Alamilla, B.L., Gutiérrez, L.G.F., 2008. Chapter 16: Image processing methods and fractal analysis for quantitative evaluation of size, shape, structure and microstructure in food materials. In: Gutiérrez-López, G.F., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J., Parada-Arias, E. (Eds.), Food Engineering Integrated Approaches: Food Engineering Series. Springer, pp. 227–285.

Chen, C., Wu, P.C. (2000) The study of interrupted drying technique for rough rice. Drying Technology. 18(10):2381-2397.

Chen, G.Q., He, X., Liao, L.P., McKeon, T.A. (2004). 2S Albumin gene expression in castor plant (*Ricinus communis L.*). Journal of the American Oil Chemists' Society. 81(9): 867-872.

Chou, S.K., Hawlader, M.N.A., Chua, K.J. (1997) On the drying of food products in a tunnel dryer. Drying Technology. 15(3&4):857-880.

Chua, K.J., Mujumdar, A.S., Chou, S.K., Hawlader, M.N.A., Ho, J.C. (2000) Convective drying of banana, guava and potato pieces: effect of cyclical variations of air temperature on drying kinetics and color change. Drying Technology. 18(4&5):907-936.

Cihan, A., Kahveci, K., Hacihafizoglu, O., 2007. Modeling of intermittent drying of thin layer rough rice. Journal of Food Engineering. 79, 293-298.

- Crossen, A.G., Jiménez, M.J., Siebenmorgen, T.J. (2003) Rice fissuring response to high drying and tempering temperatures. *Journal of Food Engineering*. 59:61-69.
- Correa, P. C., Resende, O., Ribeiro, D. M., 2006. Drying characteristics and kinetics of coffee berry. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande*. 8 (1), 1-10.
- Crank, J. 1975. *The mathematics of diffusion*. (second ed.), Clarendon Press, Oxford, UK.
- Crespo, E. (2009). Los tipos de generación de energía más limpios en México haz algo. *Biocombustibles*. (<http://www.mexico haz algo.org.mx/tag/biocombustibles/>)
- Crossley, J.J., Aguilera, J.M. (2001). *Modeling the effect of microstructure on food extraction*. *Journal of Food Process Engineering*. 24: 161-177.
- Das, R.S., Agrawal, Y.K. (2011). Raman spectroscopy: Recent advancements, technique and applications. *Vibrational Spectroscopy*. 57: 163-176.
- Del Valle, M., Rivera, O., Mattea, M., Ruetsch, L., Daghero, J., Flores, A. (2004). Supercritical CO₂ processing of pretreated rosehip seeds: effect of process scale on oil extraction kinetics. *Journal of Supercritical Fluids*. 31: 159-174.
- Demir, V., Gunhan, T., Yagcioglu, A.K., 2007. Mathematical modelling of convection drying of green table olives. *Biosystems Engineering*. 98, 47-53.
- Deshpande, S.D., Bal, S., Ojha, T.P., 1993. Physical properties of soybean. *J. Agric. Eng. Res.* 56 (2), 89-98.
- Dincer, I. (1996) Sun drying of sultana grapes. *Drying Technology*. 14(7&8):1827-1838.
- DiScala, K., Crapiste, G. (2008) Drying kinetics and quality changes during drying of red pepper. *LWT-Food Science and Technology*. 41(5): 789-795.
- Douliá, D., Tzia, K., Gekas, V. (2000). A knowledge base for the apparent mass diffusion coefficient (DEFF) of foods. *International Journal of food properties*. 3(1): 1-14
- Doymaz, I., 2005. Drying behavior of green beans. *Journal of Food Engineering*. 69, 161-165.
- Doymaz, I., 2008. Influence of blanching and slice thickness on drying characteristics of leek slices. *Chemical Engineering and Processing*. 47, 41-47.
- Doymaz, I., 2011. Drying of green bean and okra under solar energy. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*. 17 (2), 199-205.
- Du, Cheng-Jin., Sun, Da-Wen. (2004) Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*. 15:230-249.
- Duffus, C., Slaughter, C. (1985). Capítulo 2: Formación de la semilla en Las semillas y sus usos. AGT Editor, S.A. Mexico, D.F. 41-67.
- Ellis, P.R., Kendall, C.WC., Ren, Y., Parker, C., Pacy, J.F., Waldron, K.W., Jenkins, D. JA. (2004). Role of cell walls in the bioaccessibility of lipids in almond seeds. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 80:604-613.
- Erenturk, S., Gulaboglu, M.S., Gultekin, S., 2004. The Thin-layer Drying Characteristics of Rosehip. *Biosystems Engineering*. 89, 159-166.

- Esau, K. (1972). *La semilla* en Anatomía Vegetal. 2ª. Edición. Ediciones Omega, Barcelona, España. 641-677.
- Espinosa de Aquino, W., Goddard, J.M.G., Gutiérrez, A.C., Bonfil, S.C. (2009). Los biocombustibles. ¿cómo ves?, 11: 10-14.
- Experimental milling: Temper Table. AACC International, St. Paul, MN, U.S.A. doi: 10.1094/AACCIIntMethod-26-95.01.
- Falasca, S., Ulberich, A. (2005). Potencial de Argentina para la producción de tartago (*Ricinus communis* var *communis*).
- Ferreira, P.T.L., Filho, J.M., Forti, V.A., Carvalho, C., Gomes, J.F.G. (2009). *Evaluation of the Jatropha curcas L. seed viability by tetrazolium and X-ray test*. Revista Brasileña de sementes. 31(2).
- Flores-Vindas, E., 1999. La planta: estructura y función, vol. I, II. Libro Universitario Regional, Costa Rica. ISBN, ISBN 9968-801-01-1.
- Florin, G., Bartsch, H.R. (1983) Processing of Oilseeds using Fluidbed Technology. JAOCS. 60(2):193-197.
- Foust, A.S., Wenzel, L.A., Clump, C.W., Maus, L., Andersen, L.B. (1978) Principios de Operaciones Unitarias. 11ª. Edición. Compañía Editorial Continental, S.A., México.
- Gallegos, J.A.I., Rocha, N.E.G., González, R.F.L., Gomez, D.S., Zuno, F.F., Vidaña, S.A.M. (2007) The quality of vegetable oil from three varieties of sunflower seeds (*Helianthus annuus*). Journal of Food Quality. 30: 413-423.
- Gazor, H. R., Mohsenimanesh, A., 2010. Modelling the drying kinetics 477 of canola in fluidized bed dryer. Czech Journal of Food Sciences. 28 (6), 531-537.
- Geankoplis, C.J. (1999). Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México, D.F.
- Gely, M.C., Giner, S.A. (2007). *Diffusion Coefficient relationships during drying of soya bean cultivars*. Biosystems Engineering. 96(2): 213-222.
- Gely, M.C., Santalla, E.M. (2007) Moisture diffusivity in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds: Effect of air temperature and initial moisture content of seeds. Journal of Food Engineering. 78: 1029-1033.
- Gonzales, B.U., Butler, F. (2007) Fractal texture analysis of bread crumb digital images. Eur Food Res Technol. Springer-Verlag.
- Grana, S.R., Silva, E., Ruiz, N., Pérez, M.T. (1996) Purificación de la proteína de 24KD natural (P24) del virus de inmunodeficiencia humana tipo-1 (VIH-1) utilizando inmunoafinidad. Revista Cubana Médica Tropical. 48(2).
- Greenwood, J.S., Helm, M., Gietl, C., 2005. Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (6), 2238–2243.

- Groff, R. (2002). Secado de granos. SEEDnews: La revista Internacional de las semillas. Mar/Abr.
- Guiné, R.P.F., Fernandes, R.M.C., 2006. Analysis of the drying kinetics of chestnuts. Journal of Food Engineering. 76, 460-467.
- Hashemi, G., Mowla, D., Kazemeini, M., 2009. Moisture diffusivity and shrinkage of broad beans during bulk drying in an inert medium fluidized bed dryer assisted by dielectric heating. 92, 331-338.
- Hernández, D.W.N., Ruiz, L.I.I., Salgado, C.M.A., Rodríguez, J.G.C., Garcia, A.M.A. (2008) Modeling heat and mass transfer during drying of green coffee beans using prolaten spheroidal geometry. Journal of Food Engineering. 86(1): 1-9.
- Hernández, M.A., Chávez, A., Bourges, H. (1977). Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Tablas de uso práctico. Instituto Nacional de la Nutrición. México. L.12.
- Hii, C.L., Law, C. L., Cloke, M., 2009. Modeling using a new thin layer drying and product quality of cocoa. Journal of Food Engineering. 90, 191-198.
- Honorato, G.C., Oliveira, E.L., Alsina, O.L. de S., Magalhaes, M.M.A. (2005) *Study of the kinetic drying process for shrimp cephalothorax*. Información Tecnológica. 16(4): 3-10.
- Iguaz, A., San Martin, M.B., Maté, J. I., Fernández, T., Vírveda, P., 2003. Modelling effective moisture diffusivity of rough rice (Lido cultivar) at low drying temperatures. Journal of Food Engineering. 59, 253-258.
- Ikhuria, E.U., Aiwonegbe, A.E., Okoli, P., Idu, E. (2008) Characteristics and Composition of African Oil Bean Seed (*Pentaclethra macrophylla* Benth). Journal of Applied Sciences. 8(7):1337-1339.
- Eduardo da Silva, C., Vandenabeele, P., Edwards, H.G.M., Cappa de Oliveira, L.F. (2008). NIR-FT-Raman spectroscopic analytical characterization of the fruits, seeds, and phytotherapeutic oils from rosehips. Anal Bioanalysis Chemistry. 392: 1489-1496.
- Schönemann, A., Edwards, H.G.M. (2011). Raman and FTIR microspectroscopic study of the alteration of Chinese tung oil and related drying oils during ageing. 400: 1173-1180.
- Yang, H., Irudayaraj, J., Paradkar, M.M. (2005). Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. Food Chemistry. 93: 25-32.
- Karaj, S., Müller, J., 2010. Determination of physical, mechanical and chemical properties of seeds and kernels of *Jatropha curcas* L. Ind. Crops Prod. 32 (2), 129–138.
- Karmakar, A., Karmakar, S., Mukherjee, S., 2010. Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. Bioresour. Technol. 101, 7201–7210.
- Kartika, I.A., Pontalier, P.Y., Rigal, L. (2006) Extraction of sunflower oil by twin screw extruder: Screw configuration and operating condition effects. Bioresource Technology. 97: 2302-2310.
- Kashaninejad, M., Mortazavi, A., Safekordi, A., Tabil, L.G., 2007. Thin layer drying characteristics and modeling of pistachio nuts. Journal of Food Engineering. 78, 98-108.

Kerdpi boon, S., Devahastin, S., Kerr, W.L. (2007) Comparative fractal characterization of physical changes of different food products during drying. *Journal of Food Engineering*. 83(4): 570-580.

Kim, S-K., Hancock, D.K., Wang, L., Cole, K.D., Reddy, P.T. (2006) Methods to characterize Ricin for the Development of Reference Materials. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*. 111: 313-224.

Koç, B., Eren, İ., Ertekin, F.K. (2008) Modelling bulk density, porosity and shrinkage of quince during drying: The effect of drying method. *Journal of Food Engineering*. 85:340-349.

Krishnan, H.B. (2008) *Preparative Procedures Markedly Influence the Appearance and Structural Integrity of Protein Storage Vacuoles in Soybean Seeds*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 56: 2907–2912.

Krokida, M.K., Karathanos, V.T., Maroulis, Z.B., Marinos-Kouris, D. (2003) Drying kinetics of some vegetables. *Journal of Food Engineering*. 59(4): 391-403.

Kuang, A., Xiao, Y., McClure, G., Musgrave, M.E., 2000. Influence of microgravity on ultrastructure and storage reserves in seeds of *Brassica rapa* L. *Ann. Bot.* 85, 851–859.

Kunii, D., Levenspiel, O. (1991). *Fluidization Engineering*. 2^a. Edición. Butterworth-Heinemann. U.S.A. Pp. 1-13, 71-79.

Lacerda, A.F., Lisboa, M.H., Barrozo, M.A.S. (2005) Heat and mass transfer in a countercurrent moving bed dryer. *Applied Thermal Engineering*. 25(16): 2641-2652.

López, R.G.F. (1998). *Botánica: Anatomía, morfofisiología y diversidad*. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección General de Difusión Cultural. México, D.F. Pp. 13-85, 243-259.

Lord, J.M., Roberts, L.M., Robertus, J.D.(1994) Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *The FASEB Journal*. 8:201-208. Reviews.

Lott, J.N., Spitzer, E. (1980) *X-ray analysis studies of element stored in protein body globoid crystals of Triticum grains*. *Plant Physiology*. 66:494-499.

Lott, J.N.A., Greenwood, J.S., Vollmer, C.M. (1982) Mineral reserves in castor beans: the dry seed. *Plant Physiology*. 69: 829:833.

Lott, J.N.A., West, M.M., Calrk, B., Beecroft. (1995) *Changes in the composition of globoids in castor bean cotyledons and endosperm during early seedling growth with and without complete mineral nutrients*. *Seed Science Research*. 5: 121-125.

Luangmalawat, P., Prachawarakon, S., Nathakaranakule, A., Soponronnarit, S. (2008) Effect of temperature on drying characteristics and quality of cooked rice. *LWT*. 41: 716-723.

Luna, L.G., 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the AFIP*, 3rd edition. McGraw-Hill Book Company, New York, NY, USA. McCabe, W.L., Smith, J.C., Harriot, P., 1986. *Unit Operations of Chemical Engineering*. McGraw-Hill, New York.

Ma, F. Hanna, M.A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*. 70: 1-15.

Ma, Q., Rudolph, V. (2006) Dimensional Change Behavior of Caribbean Pine Using an Environmental Scanning Electron Microscope. *Drying Technology*. 24: 1397-1403.

- Madamba, P.S., Driscoll, R.H., Buckle, K. A., 1996. The thin-layer drying characteristics of garlic slices. *Journal of Food Engineering*. 29, 75-97.
- Madamba, P.S., Yabes, R.P. (2005) Determination of the optimum intermittent drying conditions for rough rice (*Oryza sativa*, L.). *LWT*. 38:157-165.
- Markowski, M., Bialobrzewski, I., Modrzewska, A., 2010. Kinetics of spouted-bed drying of barley: Diffusivities for sphere and ellipsoid. *Journal of Food Engineering*. 96, 380-387.
- McKeon, T.A., Chen, G.Q., Lin, J.T. (2000) Biochemical aspects of castor oil biosynthesis. *Biochemical Society Transactions*. 28(6): 972-974.
- McCabe, W.L., Smith, J.C., Harriot, P., 1986. *Unit Operations of Chemical Engineering*. McGraw-Hill, New York.
- Mendes, R.C., Santos Días, D.C.F., Dias, P.M., Geraldo, B.P. (2009). *Pre-germinative treatments in castor bean (Ricinus communis L.) seeds*. *Revista Brasileira de Sementes*. 31(1).
- Mendoza, F., Dejmek, P., Aguilera, J.M. (2007) Colour and image texture analysis in classification of commercial potato chips. *Food Research International*. 40: 1146-1154.
- Misimi, E., Mathiassen, J.R., Erikson, U. (2007) Computer vision-based sorting of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets according to their color level. *Journal of Food Science: Sensory and Nutritive Qualities of Food*. 72(1): S30- S35.
- Mohsenin, N. N. (1970). *Physical properties of plant and animal materials*. New York: Gordon and Breach Science Publishers.
- Niamnuy, C., Devahastin, S., 2005. Drying kinetics and quality of coconut dried in a fluidized bed dryer. *Journal of Food Engineering*. 66, 267–271.
- Nishiyama, Y., Cao, W., Li, B. (2006) Grain intermittent drying characteristics analyzed by a simplified model. *Journal of Food Engineering*. 76:272-279.
- Notimex. (2007). Para producir biocombustibles falta una revolución del agro en Finanzas. El siglo de Torreón. (<http://www.elsiglodetorreon.com.mx/noticia/306293.html>)
- Notimex., (2008). Producción de biocombustibles aumenta previos de alimentos: FAO en La Crónica de hoy. (http://www.cronica.com.mx/nota.php?id_notas=389596).
- Ogunniyi, D.S. (2006) Castor oil: A vital industrial raw material. *Bioresource Technology*. 97: 1086-1091.
- Oje, K., Ugbor, E.C., 1991. Some physical properties of oil bean seed. *J. Agric. Eng. Res.*50 (4), 305–313.
- Okorie, -AU., Anugwa, -FOI., Anamelechi, GC., Nwaiwu, -J. (1985) Heat-treated castor oil bean (*Ricinus communis*): a potential livestock protein-supplement in the tropics. *NutritionReports-International*. 32(3): 659-666.
- Omobuwajo, T.O., Omobuwajo, O.R., Sanni, L.A., 2003. Physical properties of calabash nutmeg (*Monodora myristica*) seeds. *J. Food Eng.* 57, 375–381.

Ortiz, M.S., Fernández, G.M. (2004). El bioetanol como carburante alternativo: análisis del proceso de producción, evaluación del coste y revisión de la fiscalidad actual. Memorias VII Congreso de Ingeniería de Organización. Leganes.

Parada, J., Aguilera, J.M. (2007) Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science: Concise Reviews and Hypotheses in Food Science*. 72(2): R21-R32.

Pascual-Alberto, M.J., Pérez-Munuera, I., Lluch, M.A. (1998). *Estructura del cotiledón de la semilla de almendra (Prunus amygdalus L.) cruda, remojada y tostada*. *Food Science and Technology International*. 4: 189-197.

Pedreschi, F., León, J., Mery, D., Moyano, P. (2006) Development of a computer vision system to measure the color of potato chips. *Food Research International*. Artículo in press.

Pedreschi, F., Mery, D., Mendoza, F., Aguilera, J.M. (2004) Classification of Potato Chips using Pattern Recognition. *Journal of Food Science: Food Engineering and Physical Properties*. 69(6):E264-E270.

Perea, F.M.J., Chanona, P.J.J., Garibay, F.V., Calderón, D.G., Terrés, R.E., Mendoza, P.J.A., Herrera, B.R., 2011. Microscopy techniques and image analysis for evaluation of some chemical and physical properties and morphological features for seeds of the castor oil plant (*Ricinus communis*). *Industrial Crops and Products*. 34(1), 1057-1065.

Perera, C.O. (2005) Selected Quality Attributes of Dried Foods. *Drying Technology*. 23:717-730.

Perez, E.E., Crapiste, G.H., Carelli, A.A., 2007. Some physical and morphological properties of wild sunflower seeds. *Biosyst. Eng.* 96 (1), 41–45.

Pita, R., Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R. (2004) Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. *Revista Toxicologica*. 21: 51-63.

Murphy, D.J., Hernandez-Pinzon, I., Patel, K. (2001). Role of lipid bodies and lipid-body proteins in sedes and other tissues. *Journal of Plant Physiology*. 158: 471-478.

Popoola, T.O.S., Yangomodou, O.D. (2006). Extraction, properties and utilization potentials of Cassava seed oil. *Biotechnology*. 5: 38-41.

Prego, I., Maldonado, S., Otegui, M., 1998. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Ann. Bot.* 82, 481–488.

Prothon, F., Ahrne, L., Sjöholm, I. (2003) Mechanisms and prevention of plant tissue collapse during dehydration: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(4):447-479.

Quevedo, R., Brown, C., Bouchon, P., Aguilera, J.M. (2005) Surface roughness during storage of chocolate: fractal analysis and possible mechanisms. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*. 82 (6): 457- 462

Quevedo, R., Jaramillo, M., Díaz, O., Pedreschi, F., & Aguilera. (2009). Quantification of enzymatic browning in Apple slices applying the fractal texture Fourier image. *Journal of Food Engineering*, 95: 285-290.

Chanona, J., Alamilla, L., Gutiérrez, G. (2001). Caos y geometría de fractales, herramientas auxiliares para evaluar la complejidad del entorno biológico. *Biotecnología*, 5(3): 117-126.

Quevedo, R., Mendoza, F., Aguilera, J.M., Chanona, J., Gutiérrez, L.G. (2008) Determination of senescent spotting in banana (*Musa Cavendish*) using fractal texture Fourier image. *Journal of Food Engineering*. 84:509-515.

Rafiee, Sh., Keyhani, A., Sharifi, M., Jafari, A., Mobli, H., Tabatabaeefar, A., 2009. Thin layer drying properties of soybean (*Viliamz Cultivar*). *Journal of Agricultural Science and Technology*. 11, 289-300.

Ramos, I.N., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M. (2005) Integrated approach on solar drying, pilot convective drying and microstructural changes. *Journal of Food Engineering*. 67:195-203.

Ramos, I.N., Silva, C.L.M., Sereno, A.M., Aguilera, J.M. (2004) Quantification of microstructural changes during first stage air drying of grape tissue. *Journal of Food Engineering*. 62:159-164.

Roberts, J.S., Kidd, D.R., Padilla, Z.O. (2008) Drying kinetics of grape seed. *Journal of Food Engineering*. 89: 450-455.

Rodrigues, S., Fernandes, F.A.N. (2007) Image analysis of osmotically dehydrated fruits: melons dehydration in a ternary system. *Eur Food Res Technol*. 225: 685-691.

Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina, W. (2004) *Histología, Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular: Técnica histológica y microscopia*. 4ª. Edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 10-18.

Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina, W. (2004). *Histología, Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular: Técnica histológica y microscopia*. 4ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 10-18.

Ruiz, L.I.I., Martinez, S.C.E., Cobos, V.R., Herman, L.E., 2008. Mathematical modeling and simulation of batch with airflow reversal. *Journal of Food Engineering*. 89, 310-318.

Ruiz, R.S., Vizcarra, M.G., Martínez, C. (2008). Hydration of grain kernels and its effect on drying. *LWT*. 41: 1310-1316.

Sablani, S.S., Rahman, M.S. (2008) *Fundamentals of Food Dehydration in FOOD DRYING Science and Technology: Microbiology, Chemistry, Applications*. Edited by: Hui, Y.H., Clary, C., Farid, M.M., Fasina, O.O., Noomhorm, A., Welti-Chanes. DESTech Publications, Inc. Pennsylvania, U.S.A. 1-42.

Sacilik, K. (2007) Effect of drying methods on thin-layer drying characteristics of hull-less seed pumpkin (*Cucurbita pepo L.*) *Journal of Food Engineering*. 79(1): 23-30.

Sacilik, K., Elicin, A. K., Unal, G., 2006. Drying Kinetics of Üryani plum in a convective hot-air dryer. *Journal of Food Engineering*. 76, 362-368.

Sacilik, K., Öztürk, R., Keskin, R., 2003. Some physical properties of Hemp seed. *Biosystem Engineering*. 86 (2), 191–198.

- San Miguel, M.M.M. (2006) Ricino (*Ricinus communis*). Maleza-Ricino. 91-95.
- Sandoval, Z.E. (2005). Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos 38. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 63-64, 79-81.
- Santiago, T.P. (1999). *Estudio Hidrodinámico de un secador piloto multietapas por lecho fluidizado*. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F.
- Scholz, V., Da Silva, J.N. (2008) Review Prospects and risks of the use of castor oils as a fuel. *Biomass and Bioenergy*. 32: 95-100.
- Shafiur R.M. (2005). Dried Food Properties: Challenges Ahead. *Drying Technology*. 23: 695-715.
- Sharma, A., Khare, S.K., Gupta, M.N. (2002). Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Peanut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79: 215-218.
- Shen, F., Peng, L., Zhang, Y., Wu, J., Zhang, X., Yang, G., Peng, H., Qi, H., Deng, S., 2011. Thin layer drying kinetics and quality changes of sweet sorghum stalk for ethanol production as affected by drying temperature. *Industrial Crops and Products*. doi: 542 10.1016/j.indcrop.2011.05.027.
- Shimizu, N., Haque, M.A., Anderson, M., Kimura. (2007) Measurement and fissuring of rice kernels during quasi-moisture sorption by image analysis. *Journal of Cereal Science*. Artículo in press.
- Shivhare, U.S., Gupta, A., Bawa, A.S., Gupta, P. (2000) Drying characteristics and product quality of okra. *Drying Technology*. 18(1&2):409-419.
- Shivhare, U.S., Gupta, A., Bawa, A.S., Gupta, P. (2000). *Drying characteristics and product quality of okra*. *Drying Technology*. 18(1&2):409-419.
- Siebenmorgen, T.J., Truitt, E.F., Meullenet, J.F. (2006) Quality of Long-Grain rice dried by High-Temperature Fluidized rice quality and process. *BR Wells Rice Research Studies*. 402-410.
- Sirisomboon, P., Kitchaiya, P., 2009. Physical properties of *Jatropha curcas* L. kernels after heat treatments. *Biosystems Engineering*. 102, 244-250.
- Smith, C.G. (1979). *Oil Seeds in Food Science and Technology a series of monographs: Food Microscopy*. Edited by Vaughan, J.G. Academic Press, London. 35-71.
- Soponronnarit, S., Chiawwet, M., Prachayawarakorn, S., Tungtrakul, P., Taechapairoj, C. (2008) Comparative study physicochemical properties of accelerated and naturally aged rice. *Journal of Food Engineering*. 85:268-276.
- Soponronnarit, S., Swasdisevi, T., Wetchacama, S., Wutiwiwatchai, W. (2001) Fluidized bed drying of soybeans. *Journal of Stored Products Research*. 34(4): 133-151.
- Stenberg, C., Svensson, M., Wallström, E., Johansson, M. (2005) A study of the drying of linseed oils with different fatty acid patterns using RTIR-Spectroscopy and Chemiluminescence (CL). *Industrial Crops and Products*. 21(2): 263-272.
- Stokes, D.J. (2008) *Principles and practice of variable pressure/environmental scanning electron microscopy (VP-ESEM)*. Series editor: Mark Rainforth. Wiley. UK.

- Sujatha, M., Reddy, T.P., Mahasi, M.J. (2008). Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnology Advances*. 26: 424-435.
- Teichert, P.S. (2008). Secado de alta velocidad. *SEEDnews: La revista Internacional de las semillas*. Mar/Abr.
- Tierney, Jr.L.M., McPhee, S.J., Papadakis, M.A. (2005) Diagnostico clinico y tratamiento. 40a. Edición. *Manual moderno*. Mexico, DF. Capitulo 14: aparato digestivo. pp. 513-514.
- Tosi, E.A., Cazzoli, A., Ré, E., Tapiz, L. (1999) Soybean Drying in Fluidized Bed. Effect on the Hydratable and Nonhydratable Phosphatide Concentration in Crude and Degummed Crude Oil. *Journal of the American Oil Chemists´Society(JAOCS)*. 76(12): 1467-1470.
- Treybal, R.E. (1988). Operaciones de transferencia de masa. 2ª. Edición. McGraw-Hill/Interamericana de México, S.A. de C.V. México.
- Tunde-Akintunde, T.Y., Akintunde, B.O., 2004. Some physical properties of Sesame seed. *Biosyst. Eng.* 88 (1), 127–129.
- Umar, G.M., Alhassan, M., Kovo, A.S. (2006) A review of Advances and Quality Assessment of Biofuels. *Leonardo Journal of Sciences*. 5(9): 167-178.
- Varela, P., Aguilera, J.M., Fiszman, S. (2008). Quantification of fracture properties and microstructural features of roasted Marcona almonds by image analysis. *LWT*. 41:10-17.
- Vega, A., Andrés, A., Fito, P. (2005) Modeling the drying kinetics of red pepper (*Capsicum annuum* L. cv Lamuyo). *Información Tecnológica*. 16(6): 3-11.
- Vega, A.G., Miranda, M., Puente, L., Lopez, L., Rodriguez, K., 2010. Effective moisture diffusivity determination and mathematical modelling of drying curves of the olive-waste cake. 101, 7265-7270.
- Waewsak, J., Chindaruksa, S., Punlek, C., 2006. A mathematical modelling study of hot air drying for some agricultural products. *Thammasat International Journal of Science and Technology*. 11 (1), 14-20.
- Young, C.T., Pattee, H.E., Schadel, W.E., Sanders, T.H. (2004b). Microstructure of peanut (*Arachis hypogaea* L. cv. 'NC 7') cotyledons during development. *LWT*. 37: 439-445.
- Young, C.T., Schadel, W.E., Pattee, H.E., Sanders, T.H. (2004a). The microstructure of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb cv. 'Nonpareil') cotyledon. *LWT*. 37: 317-322.
- Zachhuber, B., Ramer, G., Hobro, Al., Chysostom, E. T. H., Lendl, B. (2010). Stand –off Raman spectroscopy: a powerful technique for qualitative and quantitative analysis of inorganic and organic compounds including explosives. *Anal Bioanalysis Chemistry*. 400: 2439-2447.
- Zhang, Q., Yang, W., Sun, Z. (2005) Mechanical properties of sound and fissured rice kernels and their implications for rice breakage. *Journal of Food Engineering*. 68:65-72.
- Zielinska, M., Markowski, M., 2007. Drying behavior of carrots dried in a spout-fluidized bed dryer. *Drying Technology*. 25, 261-270.

Zogzas, N.P., Maroulis, Z.B., Marinos-Kouris, D. (1994) Densities, shrinkage and porosity of some vegetables during air drying. *Drying Technology*. 12(7):1653-1666.

Purkrtova, Z., Jolivet, P., Miquel, M., Chardot, T. (2008). Structure and function of seed lipid body-associated proteins. *C.R. Biologies*. 331, 746-754.