



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional

Unidad Oaxaca

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO
DE LOS RECURSOS NATURALES

(INGENIERÍA DE PROCESOS)

Caracterización del Perfil de Ácidos Grasos del Aceite de Emú (*Dromaius novaehollandiae*)

Tesis

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Ana María Pineda Reyes

Dirigida por:

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Diciembre de 2010

CIIDIR
OAXACA



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 20 del mes de octubre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA) para examinar la tesis de grado titulada: "**Caracterización del perfil de ácidos grasos del aceite de Emú (*Dromaius novaehollandiae*)**"

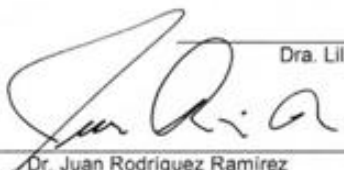
<u>Pineda</u> <small>Apellido paterno</small>	<u>Reyes</u> <small>materno</small>	<u>Ana María</u> <small>nombre(s)</small>							
		Con registro: <table border="1"><tr><td>B</td><td>0</td><td>8</td><td>1</td><td>3</td><td>3</td><td>7</td></tr></table>	B	0	8	1	3	3	7
B	0	8	1	3	3	7			

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

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

LA COMISION REVISORA
Directora de tesis


Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas


Dr. Juan Rodríguez Ramírez


Dr. Sadoth Sandoval Torres


Dra. Rosa Isela Guzmán Geronimo


Dr. Samuel Siles Rivarado

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Juan Rodríguez Ramírez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR
UNIDAD OAXACA
IPN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día **20** del mes **octubre** del año **2010**, el (la) que suscribe **Pineda Reyes Ana María** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B081337**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas y cede los derechos del trabajo titulado: "**Caracterización del perfil de ácidos grasos del aceite de Emú (*Dromaius novaehollandiae*)**" 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 la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó veneciaita@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Pineda Reyes Ana María



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.



RESUMEN GENERAL

El aceite de emú es un valioso recurso para la industria farmacéutica y cosmética, debido a sus propiedades particulares relacionadas con efectos potenciales sobre la salud y ventajas terapéuticas. Su importancia, deriva de la funcionalidad que este puede conferir, por sus características químicas y estructurales, que dependen de la composición y proporción de los ácidos grasos presentes en el aceite.

El emú en México es criado sobre todo para la comercialización de la carne, mientras que en Norte América es criado principalmente para la obtención de aceite, sin embargo, se sabe muy poco sobre su composición, la cual es probable que pueda variar por factores como la alimentación del animal o en función del método de extracción. En el año 2000, fue introducido exitosamente en los estados de Coahuila, Hidalgo y Nuevo León, pero también hay otros estados como Oaxaca, donde se ha desarrollado su reproducción.

La extracción del aceite de emú involucra el uso de solventes o la aplicación de calor, donde la temperatura es un factor crítico para su composición y los solventes generan diversos inconvenientes por su uso. La composición del aceite de emú, ha sido reportada para extracciones con solventes a través de cromatografía de gases. No encontrando reportes relacionados con otros métodos de extracción, así como reportes de su composición a través de otras técnicas espectroscópicas.

Al no existir un método estandarizado, para la extracción del aceite de emú y considerando que existen factores que pueden variar su composición, se desarrolló el presente trabajo, con el objetivo de caracterizar el perfil de ácidos grasos del aceite de emú, proveniente de emús criados en México, y extraído a través de métodos sin el uso de solventes. Los métodos evaluados en algunos casos, utilizaron temperaturas moderadas, para minimizar una posible degradación en la composición original, así mismo se evaluaron métodos modernos a través de microondas y baño ultrasónico, ambos también sin el uso de



solventes. El aceite obtenido, fue analizado a través de algunas propiedades físicas, y caracterizado por técnicas espectroscópicas como ***FT-IR***, ***UV-Vis*** y ***GC-MS***.

Los métodos evaluados, mostraron la factibilidad de obtener aceite de emú, de propiedades físicas similares a lo reportado en bibliografía, observando el mayor rendimiento de extracción, en el método de baño ultrasónico.

La espectrometría ***FT-IR*** y ***UV-Vis***, permitió observar a través de los espectros, la presencia de bandas características asociadas a los enlaces, de los grupos funcionales principales de un aceite, los cuales, no mostraron algún daño estructural por la temperatura o la interacción con el oxígeno del aire, entre otros. Los ácidos grasos identificados por ***GC-MS*** fueron, palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolenico (C18:3) y eicosenoico (C20:1).

El análisis de los perfiles entre sí, mostraron similitud en su composición y proporción no significativas, observando que en el caso del ácido linoleico, se encontraron diferencias significativas, en comparación con las muestras de referencia y con lo reportado en bibliografía.



ABSTRACT GENERAL

Emu oil is a valuable resource for pharmaceutical and cosmetic industries because of their special properties related to potential health effects and therapeutic benefits. Its importance stems from the functionality that it can confer, by their chemical and structural characteristics, which depend on the composition and proportion of fatty acids in the oil.

The emu in Mexico is being reared mainly for the marketing of meat, while in North America is grown mainly for oil extraction, however, little is known about its composition, which is likely to vary by factors such as animal feed or depending on the method of extraction. In 2000, was successfully introduced in the states of Coahuila, Hidalgo and Nuevo Leon, but other states like Oaxaca, where it has developed its reproduction recently.

The emu oil extraction involves the use of solvents or heat application, where the temperature is a critical factor for the solvent composition and generates several problems for its use. The composition of emu oil has been reported for solvent extraction by gas chromatography. Finding no other reports related to extraction methods, as well as reports of its membership through other spectroscopic techniques.

As there is no standardized method for extraction of emu oil and considering that there are factors that can change its composition, this work was developed with the aim of characterizing the fatty acid profile of emu oil, emus reared from in Mexico, and extracted by methods without the use of solvents. The methods evaluated in some cases, moderate temperatures used to minimize possible degradation in the original composition and the same modern methods were evaluated by microwave and ultrasonic bath, both also without the use of solvents. The oil obtained was analyzed through some physical properties, and characterized by spectroscopic techniques like FT-IR, UV-Vis and GC-MS.



The methods evaluated showed the feasibility of obtaining emu oil, physical properties similar to those reported in literature, noting the highest yield of extraction in ultrasonic bath method.

The FT-IR spectroscopy and UV-Vis, allowed observing through the spectra, the presence of characteristic bands associated with the links, the main functional groups of an oil, which showed no structural damage or temperature interaction with oxygen in the air, among others. Fatty acids identified by GC-MS were palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1), stearic (C18:0), oleic (C18: 1), linoleic (C18: 2), linolenic (C18:3) and eicosenoic (C20: 1).

The profiles were analyzed together, showed similarity in composition and proportion isn't significant, noting that in the case of linoleic acid, significant differences compared to reference samples with those reported in literature.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (*CONACYT*) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de maestría.

Al Centro Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional (*CIIDIR*), IPN-Unidad Oaxaca, por la oportunidad brindada en mi desarrollo profesional, en especial a la Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas.

Al Instituto Politécnico Nacional (*IPN*) por permitirme utilizar su infraestructura durante el desarrollo del presente trabajo, por sus programas de apoyo económicos, Programa Institucional de Formación de Investigadores (*PIFI*) y Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas (*COFAA*).

A la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del IPN (*ESIQUIE*), laboratorio Química Analítica, por permitirme utilizar sus instalaciones durante el proceso de extracción; al laboratorio de Investigación de Nanotecnología por las facilidades prestadas para la realización de las pruebas físicas y en especial al laboratorio de Catálisis y Materiales por permitirme realizar las pruebas instrumentales a través del apoyo del Dr. Miguel Ángel Valenzuela, quien en momentos críticos me brindo su apoyo y comprensión.

A Espacio Común de Educación Superior (*ECOES*), por las facilidades económicas otorgadas durante mi estancia de investigación en el periodo agosto-diciembre 2009.

A la Universidad Autónoma de Chihuahua (*UACH*), por el apoyo brindado durante mi estancia de investigación, en especial al Dr. Raúl León Hernández Ochoa.

A la Universidad Veracruzana por haberme recibido en sus instalaciones, donde pude revisar el proceso de derivatización a través del apoyo de la Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo.

Al productor José Manuel De Leo Blanco, propietario de la granja de emú en San Juan Bautista la Raya, Xoxocotlán, Oaxaca, por su apoyo en la obtención de grasa de emú, para la elaboración de pruebas preliminares.

DEDICATORIAS

Desearía escribir el nombre de cada una de las personas a quienes les dedico el presente trabajo, por que hicieron posible su culminación, no obstante, los llevaré a cada uno tatuados en mi corazón, solo que, sería imposible no plasmar el nombre de *Dios* a quien le estoy infinitamente agradecida por permitirme existir y *a mis padres* por permitir que existiera.

Con todo mi amor y respeto. . .



ÍNDICE

Índice	i
Índice de figuras	ii
Índice de tablas	iii
Introducción general	1
Capítulo I. Extracción de aceite de emú sin el uso de solventes	5
Capítulo II. Aplicación de técnicas espectroscópicas en el análisis de aceite de emú...	30
Capítulo III. Análisis del perfil de ácidos grasos del aceite de emú por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas	44
Conclusiones generales	73
Recomendaciones generales	74
Bibliografía general	75
Anexos	77
Artículo “ <i>Evaluation of Emu Oil. Extraction method and their effects on physical and Rheological behavior</i> ”	100



INDICE DE FIGURAS

Capítulo I.....	6
Figura 1. Emú.....	6
Figura 3. Efecto del rendimiento durante el tiempo del proceso.....	18
Figura 2. Extracto obtenido por baño ultrasónico.....	18
Figura 4. Rendimiento del extracto obtenido por métodos sin el uso de solventes.	20
Capítulo II.....	37
Figura 1. Espectro <i>IR</i> de la muestra M.....	37
Figura 2. Espectros <i>UV-Vis</i> a) M, b) CI, c) CN, d) ES, e) BM, f) FH, g) R y h) BU.....	40
Capítulo III.....	53
Figura 1. Cromatogramas TIC de aceite de emú.....	53
Figura 2. Cromatograma <i>TIC</i> del estándar externo.	54
Figura 3. Espectros de masas del pico1, estándar (a), NIST (b) y muestra ES (c).....	55
Figura 4. Espectros de masas del pico 2, estándar (a), NIST (b) y muestra BM (c).....	55
Figura 5. Espectros de masas del pico 3, estándar (a), NIST (b) y muestra M (c).....	56
Figura 6. Espectros de masas del pico 4, estándar (a), NIST (b) y muestra M (c).....	56
Figura 7. Espectros de masas del pico 5, estándar (a), NIST (b) y muestra BU (c).....	57
Figura 8. Espectros de masas del pico 6, muestra ES (a), NIST (b) y muestra BU (c).....	58
Figura 9. Espectros de masas del pico 7, estándar (a), NIST (b) y muestra ES (c).....	58
Figura 10. Espectro del ácido palmítico proveniente del TIC de la muestra ES.....	60
Figura 11. Espectro del ácido palmitoleico proveniente del TIC de la muestra M.....	60
Figura 12. Espectro del ácido esteárico proveniente del TIC de la muestra FH.....	61
Figura 13. Espectro del ácido oleico proveniente del TIC de la muestra FH.....	62
Figura 14. Espectro del ácido linoleico proveniente del TIC de la muestra BM.	62
Figura 15. Espectro del ácido linolenico proveniente del TIC de la muestra BU.....	63
Figura 16. Espectro del ácido 11-Eicosenoico proveniente del TIC de la muestra BM.....	64
Figura 17. Contenido porcentual del grupo de ácidos grasos del aceite de emú.....	67



ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo I	19
Tabla 1. Rendimiento porcentual del extracto a 40 y 60°C.....	19
Tabla 2. Parámetros L, a y b de extractos obtenidos por métodos sin el uso de solventes.	21
Tabla 3. Parámetros L, a y b de aceite de emú comercial.....	21
Tabla 4. Índice de refracción y densidad a 25.5°C de extractos de grasa de emú.	22
Capítulo II.....	37
Tabla 1. Bandas analizadas en espectros de aceite de emú.....	37
Capítulo III.....	53
Tabla 1. Aceite de emú de diversas fuentes de obtención.....	53
Tabla 2. Tabla 3.1.1. Tiempos de retención de muestras de aceite de emú y estándar externo.....	54
Tabla 3. Composición de FA de diferentes métodos de extracción sin el uso de solventes*.	64
Tabla 4. Composición de FA de muestras control*.....	65
Tabla 5. Perfil de ácidos grasos de diversas fuentes.....	66



INTRODUCCIÓN GENERAL

Desde épocas antiguas, el aceite de emú, ha sido utilizado en la curación y cicatrización de heridas, así como en el control o alivio de dolores reumáticos de varios músculos [1]. El aceite de emú es extraído de la grasa de los depósitos adiposos del emú; en comparación con otras aves consideradas dentro del mismo grupo como el avestruz y el ñandú, posee una proporción superior de tejido graso [2]; antiguamente fueron conocidas como grupo de aves corredoras o ratites [3]. El emú es considerado entre los granjeros como una buena alternativa para su reproducción en cautiverio [4].

En México, ha sido introducido exitosamente en Coahuila, Hidalgo y Nuevo León [5], sin embargo hay otros estados, como Oaxaca, donde se ha desarrollado su reproducción.

Dentro de los principales productos obtenidos de la cría del emú, se encuentra la comercialización del aceite en el campo farmacéutico y cosmético, sin embargo, en México en su mayoría son criados para la comercialización de la carne, en cuanto al aceite, se sabe muy poco al respecto, así como de su composición, la cual es probable que puede variar en función de algunos factores, como el método de extracción [6], la alimentación, entre otros, aunque este último no se ha estudiado en profundidad [7].

Como todos los aceites, está constituido predominantemente de esteres de glicerina con ácidos grasos, llamados triacilglicéridos [8]. Son compuestos bioactivos insolubles en agua, pero solubles en disolventes, sus propiedades fisicoquímicas dependen del tipo y contenido de ácidos grasos (perfil de ácidos grasos). Dichos compuestos son extraídos de la fase sólida (grasa), a través de métodos tradicionales como la aplicación de calor y el uso de solventes, este último es muy utilizado por su alto rendimiento y su factibilidad en la extracción total de lípidos [9].

El perfil de ácidos grasos es un factor importante en la calidad del aceite de emú, en la actualidad la mayoría de las referencias científicas están relacionadas con el estudio de los



ácidos grasos de emús criados en Australia, Estados Unidos y Canadá, extraídos con el uso de solventes. Los trabajos publicados acerca de la composición de este aceite, son escasos [2], entre los que se encuentran disponibles, se reporta que la composición del aceite de emú está formada casi de un 100% de triacilglicéridos, sin embargo, puede variar durante el proceso de obtención, modificando su estructura original.

Los métodos de extracción tradicionales, utilizan la aplicación de calor o el uso de solventes. En ambos casos, se pueden presentar diversos inconvenientes, como el uso de temperaturas elevadas para ablandar el tejido adiposo, permitiendo así la salida del aceite; la temperatura es un factor crítico para la composición y proporción de los ácidos grasos, los cuales pueden sufrir reacciones de degradación, como oxidación e isomerización, alterando la composición original. Por su parte el uso de solventes es perjudicial para el medio ambiente, así como en su manejo durante el proceso [10].

Al no existir un método estandarizado para la extracción del aceite de emú y considerando que es más susceptible a la descomposición en comparación con otro tipo de grasas de origen animal, se evaluaron diversos métodos sin el uso de solventes, utilizando condiciones moderadas de temperatura y una exposición mínima al aire, como alternativas para minimizar un posible daño en la composición original del aceite; evaluando métodos a través de diferentes condiciones de proceso. Todo esto descrito en el **capítulo I**, titulado “Extracción de aceite de emú sin el uso de solventes”.

Una forma rápida de caracterizar los extractos obtenidos de la grasa de emú, fue aplicando técnicas instrumentales como la espectroscopía infrarroja y la espectroscopía ultravioleta-visible, permitiendo el estudio de la estructura de los extractos y sus posibles cambios por efecto de los tratamientos [12]. Los resultados obtenidos, se presentan en el **capítulo II**, titulado “Aplicación de técnicas espectroscópicas en el análisis de aceite de emú”.

La técnica ampliamente utilizada para la identificación de ácidos grasos, ha sido la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas **GC-MS**, requiriendo



previamente la derivatización de los ácidos a sus esteres metílicos, debido a que son muy polares y poco volátiles, dificultando su análisis. La asociación de **GC-MS** dio lugar a una técnica combinada que permite la separación e identificación de mezclas complejas de manera inequívoca [13]. Presentando los resultados en el **capítulo III**, titulado “Análisis del perfil de ácidos grasos del aceite de emú por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas”.

Lo antes mencionado permitió establecer en el presente trabajo la siguiente hipótesis ***“la composición y proporción del perfil de ácidos grasos del aceite de emú varía dependiendo del proceso de extracción”***, contrastándola con el objetivo general ***“Caracterizar el perfil de ácidos grasos del aceite de emú proveniente de diferentes métodos de extracción sin el uso de solventes para evaluar el efecto en la composición y proporción del aceite”***, del cual se desprendieron los siguientes objetivos específicos:

1. Extraer aceite de emú a través de diversos métodos sin el uso de solventes, así como con el uso de solventes.
2. Determinar propiedades físicas en el aceite crudo (color, densidad e índice de refracción).
3. Evaluar el aceite crudo por espectrometría infrarroja y ultravioleta visible.
4. Identificar y analizar el perfil de ácidos grasos del aceite crudo por GC-MS, incluyendo muestras comerciales (testigo), comparando los perfiles entre sí.

La metodología utilizada en el presente trabajo, comprendió tres etapas importantes, que permitieron caracterizar el perfil de ácidos grasos del aceite de emú, concernientes a:

- a) Extracción del aceite, determinando algunas propiedades físicas.
- b) Caracterización rápida a través de la espectrometría infrarroja y ultravioleta-visible.
- c) Caracterización por cromatografía acoplada a la espectrometría de masas, previa preparación de los extractos, que consistió en la derivatización de los ácidos grasos.



El aceite fue extraído de la grasa del emú por deshidratación y digestión, así como a través del uso de microondas y ondas ultrasónicas. Todos ellos permitieron la salida del extracto, a través del daño provocado en la pared celular. La deshidratación fue a través de un baño maría asistido con vacío y en un rotavapor, la digestión se llevó a cabo por el calentamiento directo con agua destilada (método tradicional conocido como fusión húmeda), así como, a través de un microondas convencional y en un baño ultrasónico. El aceite de emú, también fue extraído con solventes como método de comparación, por ser el método más estudiado en la extracción de aceites por su alto rendimiento a temperatura ambiente. La grasa de emú fue adquirida de dos criaderos, una en Nuevo León y otra en Oaxaca, ambas almacenadas a temperaturas bajas, con la finalidad de evitar reacciones de degradación. Así mismo, fueron adquiridos aceites de emú comerciales como muestras control, una en Nuevo León (aceite refinado de importación) y otra en Oaxaca (aceite crudo nacional).

Los extractos (aceite crudo) obtenidos de los diferentes métodos, fueron analizados a través de algunas propiedades físicas como el color, la densidad y el índice de refracción, debido a que, las propiedades físicas de los aceites están muy ligadas a sus triacilglicéridos y ácidos grasos que los componen; estas pueden variar con base a las técnicas de obtención respecto a los valores clásicos, por lo que su medida puede proporcionar alguna idea en cuanto a su caracterización [14]. Estos también fueron analizados por las técnicas de espectrometría infrarroja y ultravioleta-visible, utilizando los equipos (Marca Nicolet, modelo Nexus 470 FT-IR), usando un rango MIR de 4000 a 400 cm^{-1} y (Marca Perkin Elmer, modelo lambda 25), de doble haz con lámpara de deuterio y un rango de longitud de onda de 200-700 nm, respectivamente.

Previo a la identificación del perfil de ácidos grasos por **GC-MS**, las muestras fueron derivatizadas con la finalidad de convertir los ácidos grasos en sus ésteres metílicos correspondientes, los cuales son más estables, menos polares y más volátiles que el ácido graso original, con trifluoroborano-metanol al 14% como agente metilante y catalizador; la técnica fue la de Guzmán [15], modificada.



Las muestras metiladas, fueron analizadas en cromatógrafo de gases autosystem XL acoplado a un espectrómetro de masas TurboMass, ambos (Marca Perkin Elmer). El espectrómetro utilizó una fuente de ionización de 70eV por impacto electrónico. Los analitos fueron separados en una columna capilar BPX-70 de 60 m de largo y 0.25 mm de diámetro interior (Marca SGC).

La identificación de los ácidos grasos fue comparando los tiempos de retención de cada pico obtenido del cromatograma TIC con un estándar externo de 37 componentes de metil ésteres de ácidos grasos (No. 47885-U, Supelco, Co), así como por el análisis de los espectros de masas correspondientes por comparación con los espectros de la librería de la base de datos (NIST Mass Spectral versión 1.7) y por el análisis de las fragmentaciones abundantes observadas en los espectros.

Se utilizó un diseño experimental de un factor aleatorio por duplicado, donde los perfiles de ácidos grasos fueron analizados por ANOVA.

Las etapas del presente estudio, fueron estructuradas en formato artículo, con la finalidad de proporcionar orden y coherencia en los resultados obtenidos en cada etapa que conformaron el trabajo titulado “**Caracterización del perfil de ácidos grasos del aceite de emú (*Dromaius novaehollandiae*)**”, de los cuales, los resultados del capítulo I, fueron aceptados en la revista, *European Journal of Lipid Science and Technology*, con número de manuscrito ejlt.201000498, titulado *Evaluation of Emu Oil. Extraction method and their effects on physical and Rheological behavior*. El resto de los resultados, se encuentran en preparación para su publicación.

Al final de este trabajo, se muestran las conclusiones generales de los resultados obtenidos de los capítulos y su relación entre sí, así como la verificación de la hipótesis propuesta en el presente estudio.



EXTRACCIÓN DE ACEITE DE EMÚ SIN EL USO DE SOLVENTES

Ana María Pineda Reyes

¹Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca
Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN Oaxaca). Calle Horno 1003. Santa Cruz Xoxocotlan.
C.P. 71230. Oaxaca. México. anamaria_pinedareyes@hotmail.com

Resumen: La extracción de aceites es comúnmente realizada con solventes o a través de la aplicación de calor. Ambos métodos tradicionales conllevan a diversos inconvenientes. La digestión de la grasa de emú utilizando agua destilada a ebullición (método convencional o fusión húmeda) y la deshidratación por calentamiento indirecto a temperaturas controladas utilizando un baño maría y un rotavapor, así como, la aplicación de métodos modernos como el ultrasonido y el microondas no asistidos, fueron evaluados para obtener aceite de emú sin el uso de solventes. Los aceites obtenidos presentaron características similares en las propiedades físicas evaluadas. El mayor rendimiento de extracción fue obtenido a través del método de baño ultrasónico.

Palabras Clave: *Aceite de emú, extracción, emú, microondas, ultrasónico.*

Abstract: The oil extraction is commonly performed through the use of solvents or through of direct thermal application. However, both traditional methods lead to several problems. The digestion of emu's fat using boiling distilled water (traditional method) and indirect heating dehydration at controlled temperatures, using a rotary evaporator in water bath, and the modern methods like a ultrasonic and microwave unassisted, were evaluated in emu's oil obtaining without the use of solvent. The oils obtained were comparable in the evaluated physical properties. The higher yield was observed in the ultrasonic method.

Key words: *Emu oil, extraction, emú, microwave, ultrasonic.*



1. Introducción

1.1. Aceite de emú

El aceite de emú es considerado como una receta natural para aliviar dolores musculares, reumáticos, heridas, tratar inflamaciones, atenuar cicatrices, curar quemaduras y enfermedades de la piel [1], siendo valorado extensamente por ser un recurso importante para la industria cosmética y farmacéutica [2], debido a, sus propiedades relacionadas con la penetración en la piel y efectos hidratantes, así como, por su efecto potencial sobre la salud [3]; sus ventajas terapéuticas y cosméticas están relacionadas con la composición del aceite de emú; el cual, proviene de los depósitos adiposos del emú [3]. Desde épocas antiguas los aborígenes nativos y colonos blancos de Australia frotaban la grasa líquida proveniente del emú para facilitar la curación y cicatrizar heridas, además de emplearse para controlar o aliviar el dolor reumático de varios músculos [4,5].

El trabajo realizado por Rabasco y col. [6], informo de su efecto antiartrítico e inflamatorio en pruebas realizadas en ratas, así como de sus propiedades hidratantes, entre otros.

1.2. El Emú

El Emú (*Dromaius novaehollandia*. Latham, 1790) es un ave no voladora originaria de Australia (Fig. 1); sus principales características consisten en ser un animal terrestre corredor, de alas reducidas y provisto de abundantes plumas; puede alcanzar una altura de 2 m y pesar aproximadamente 45 kg; su alimentación consiste de vegetales e insectos [7].



Figura 1. Emú.



Según un reporte del año 2000, por el Instituto Nacional de Ecología y de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, esta especie fue introducida exitosamente en los estados de Coahuila, Hidalgo y Nuevo León [8], pero existen otros estados, donde se ha desarrollado su reproducción, como Oaxaca.

Las aves tienen cantidades variables de tejido graso bajo la piel y en su cavidad peritoneal [9], por su parte, el emú posee una estructura elevada de tejido graso, comparada con otras aves del mismo grupo como el avestruz y el ñandú [2]; antiguamente conocidas como grupo de aves corredoras o ratites [10]. La recuperación del aceite contenido en el tejido adiposo de las aves es conveniente en diversos usos [9] como en el campo farmacéutico, así como en formulaciones cosméticas [6].

En los últimos años, la reproducción del emú en cautiverio, ha dado lugar a un crecimiento rápido para la industria, convirtiéndose en un ganado popular entre los granjeros que buscan la ganadería alternativa [3]. Los principales productos que se obtienen de la cría del Emú son para la industria restaurantera: platillos con la carne (baja en grasas y colesterol), en la industria de pieles: curtido de la piel, cueros de patas y corporal, en la industrias químicas y cosmética: aceites, finalmente en artesanías: y joyería: plumas, huevos y uñas.

Mientras que en México el emú es criado principalmente para la comercialización de la carne, en Norte América es criado principalmente para la obtención de aceite. Aunque se sabe muy poco sobre la composición del aceite, la cual es probable que puede variar por la alimentación, esto aún no ha sido estudiado a profundidad [6], también puede variar en función del método de extracción [11], entre otros.

1.3. Características del aceite de emú

El aceite de emú, como todos los aceites, contienen predominantemente ésteres de alcoholes trihidroxilados con tres moléculas de ácidos grasos, llamadas triacilglicéridos [12]; son moléculas orgánicas complejas y principales componentes de los aceites y grasas



[6,13]. El aceite de emú se encuentra contenido en las células grasas en forma de pequeñas gotas (moléculas de triacilglicéridos), contenidas a su vez en el tejido adiposo.

Los triacilglicéridos se clasifican dentro del grupo de los lípidos simples o saponificables o no polares [14] y sus características físicas dependen básicamente de su composición en ácidos grasos [15]. El concepto de aceite es empleado para las sustancias líquidas [12].

Belton [16], mencionaron que “la importancia de los aceites deriva de la funcionalidad que estos pueden conferir, debido a sus características químicas y estructurales”. Algunos autores reportaron que el aceite de emú está formado casi de un 100% de triacilglicéridos, lo cual significaría que es un lípido neutro [1,17], otros autores comentan que es rico en ácidos grasos poliinsaturados y que los aceites obtenidos de las ratites parecen ser similares en su composición básica, predominando los ácidos grasos oleico, palmítico, esteárico y linoleico [3,17].

Los aceites también contienen en proporciones bajas otras sustancias lipofílicas, como ácidos grasos libres, vitaminas, pigmentos, entre otras [6].

1.4. Obtención de aceite de emú

Considerando que para recuperar el aceite se deben destruir las células adiposas, el método comúnmente empleado es el tratamiento térmico de la grasa una vez que se ha retirado de las aves [9]. La eficacia del proceso depende del método empleado así como de los dispositivos utilizados.

Grompone y cols. [20], mencionaron que el aceite de emú es extraído por procesos convencionales, donde los parámetros deben ser modificados con el fin de obtener un mejor rendimiento.

No hay un método estandarizado para obtener aceite de emú [11]; por lo general los métodos utilizados dependen de las posibilidades tecnológicas regionales o de las necesidades del mercado; entre los más comunes tenemos el método tradicional y la



extracción con solventes. El método tradicional requiere de un tratamiento térmico a ebullición que ablanda el tejido adiposo permitiendo la salida del aceite; sin embargo, la temperatura es un factor crítico en la composición y/o proporción del producto final, debido a que los ácidos grasos sufren de reacciones de descomposición al someterlos a temperaturas elevadas en presencia o en ausencia de oxígeno; por ejemplo, la degradación de los ácidos grasos saturados en presencia de oxígeno forman monohidroperóxidos, cuya ruptura produce sustancias de peso molecular bajo, responsables de ciertos olores característicos; algunas de estas sustancias son semejantes a las que se identifican en reacciones de oxidación de los ácidos grasos insaturados [9]; esto demerita la composición original del aceite [18].

Por otra parte, la extracción con solventes, a pesar de ser la más utilizada por su alto rendimiento y eficiencia, requiere de tiempos largos y de grandes cantidades de solvente [18]; esto genera inconvenientes tanto por su uso, como por los altos costos en el equipo y/o en la operación [19].

Los métodos más utilizados para la obtención de aceite de emú son: extracción con solventes, en su mayoría utilizando la mezcla cloroformo-metanol [1,3,9,20-24] o por tratamiento térmico con agua a ebullición [11,23] y en un autoclave [20], a una temperatura de 115°C y presión de 0.70 kg/cm² [25].

Los lípidos neutros o triacilglicéridos (aceites) son hidrófobos y pueden ser extraídos de los tejidos grasos con solventes no polares [13]. Diversos solventes, o combinaciones de los mismos, son utilizados en la extracción de los aceites; tomando en cuenta algunas consideraciones para que la recuperación sea completa, minimizando o eliminando cualquier reacción indeseable [21]. Berk [26], mencionó que la extracción con solventes es un proceso de separación basada en las diferencias de solubilidad. Un solvente es utilizado para solubilizar y separar un soluto de otro material con menos solubilidad en ese solvente [27]. El proceso de extracción sólido-líquido requiere la penetración del solvente en el interior del sólido para disolver lo extraíble, por medio de la difusión y la dispersión de los solutos en el solvente; sin embargo, en algunos casos el soluto puede sufrir algunos cambios químicos promovidos por el solvente [26]. Folch y cols. [24]



proponen el uso de una mezcla cloroformo-metanol para aislar el contenido total de lípidos a partir de tejidos animales. El método es lento y los solventes son utilizados en cantidades considerables; por otra parte, además de ser tóxicos e irritantes de la piel, aun en pequeñas cantidades, el metanol puede promover la esterificación de los ácidos grasos libres o la transesterificación de los triacilglicéridos. Una alternativa de sustitución a esta mezcla fue el diclorometano-metanol (2:1, v/v), la menor toxicidad del diclorometano se considera una ventaja relativa, aunque no siempre se puede predecir el comportamiento de un solvente de extracción, sobre todo durante los tratamientos térmicos de eliminación [21].

Otros trabajos [1,9,28] reportan el uso del método de Folch con mezcla cloroformo-metanol 2:1 o 10:1 obteniendo rendimientos entre el 75 y el 78 %.

Mahesar y cols. [29], estudiaron la extracción del contenido total de los lípidos de alimentos para aves de corral incluyendo el emú, usando un microondas doméstico como un procedimiento rápido respecto a la aplicación de ondas ultrasónicas y a la extracción convencional de Soxhlet. Comentaron que recientemente, la extracción por microondas-asistida va teniendo mayor interés para la extracción rápida de solutos a partir material vegetal, con rendimientos semejantes a los de las técnicas clásicas, en aplicaciones a la extracción de aceites esenciales de hierbas y especias.

Márquez y cols. [17], utilizaron el método de baño maría para la extracción del aceite proveniente de la grasa del abdomen del Ñandú, obteniendo aceite para su comercialización en la industria cosmética, con características de calidad aceptables para los requerimientos internacionales.

Sales [30], extrajo aceite de avestruz por el método de Folch, identificando los ácidos grasos palmítico, esteárico, palmitoleico, oleico, linoleico, linolenico, eicosatrienoico, eicosatetraenoico, eicosapentaenoico, docosapentaenoico.

Salvi y cols. [10], extrajeron aceite de ñandú a través del calentado y prensado de la grasa.



Existen otras tecnologías para la recuperación de aceites vegetales y marinos, como son: microondas, ultrasonido asistidos y fluidos supercríticos entre otros. Por su parte la AOCS (American Oil Chemists' Society) estableció métodos para la extracción de diversos tipos de tejidos, sin embargo, cuando son llevados a la práctica podrían requerir de modificaciones al método [13] o no siempre son confiables para otro tipo de aceite [11]. En los últimos años, los fluidos supercríticos han sido evaluados en la extracción de lípidos, si bien estos parecen prometedores para lípidos simples, por el momento parece haber pocas perspectivas para un uso más general [21].

Algunas alternativas pueden ser utilizadas para la extracción de aceite de emú, las cuales podrían minimizar el riesgo de daño estructural y evitar el uso de solventes, como el microondas y el ultrasonido (baño ultrasónico).

La energía de microondas de frecuencia 2.45 GHz, tiene un efecto significativo sobre la velocidad de varios procesos en la industria química. En química analítica se ha puesto atención en el calentamiento por microondas dieléctricas, debido a la reducción en el tiempo de análisis, simplificación en la manipulación y una alta pureza en el producto obtenido; con una eficiencia de extracción de aceites a partir de tejido animal, semejantes a la obtenida con el uso de solventes [31]. El uso del microondas permite que la radiación penetre en la materia orgánica, transformándola rápidamente en energía calorífica, siendo su principal ventaja [29,31], porque provoca que las moléculas polares tiendan a alinearse en el campo electromagnético producido, oscilando a frecuencias tales que generan la fricción intermolecular, provocando, en los sólidos, el calentamiento por conducción [29,31], esto se debe al mecanismo de rotación dipolar, siendo el factor más importante [32]. Dicho fenómeno puede presentarse también en moléculas de alto peso molecular que tienen un grupo carboxilo, es decir, una parte polar como los ácidos grasos; sin embargo, la interacción de las microondas en los triacilglicéridos, puede presentarse si el material no tiene presencia de humedad [48]. Las microondas interactúan selectivamente con las moléculas polares como el agua libre presente en el material, calentado e incrementando la temperatura rápidamente cerca o por encima del punto de ebullición del agua, provocando la ruptura del tejido por una expansión dramática del volumen en el interior de la materia, permitiendo así que el



aceite fluya hacia el exterior [Benkaci-Ali]. Esto es diferente de la extracción asistida, donde el solvente se difunde en la matriz y el extracto es solubilizado [47].

Por otro lado, la eficiencia del calentamiento depende de la habilidad del material para absorber la energía de microondas y convertirla en calor; calentando todo el volumen simultáneamente y eliminando ligeramente los puentes de hidrogeno; de esta manera se promueve la rotación de las moléculas polares [32], sin afectar la estructura molecular [29].

Por su parte, la aplicación del ultrasonido es muy amplia, entre sus aplicaciones recientes se encuentra la extracción de aceites con solventes [33]. Hasta el momento esta técnica ha sido evaluada en la extracción asistida de aceites de semillas [34]; por ejemplo, la elaboración de aceite de oliva virgen [33,35]. Esta técnica es considerada como una ciencia joven, a pesar de sus usos de gran alcance [36].

El ultrasonido transfiere una gran cantidad de energía que puede propagarse a través de toda la muestra. Dependiendo de la frecuencia usada y la amplitud de la onda de sonido, se pueden observar muchos efectos físicos, químicos y biológicos [37]. Esta radiación genera choques violentos que dañan la pared celular y facilitan la salida del aceite [36-37].

En vista de que no existe un método estandarizado para la extracción del aceite de emú y considerando que es más susceptible a la descomposición en comparación con otro tipo de grasas de origen animal, se utilizaron condiciones moderadas de temperatura y una exposición mínima al aire; de esta manera se evaluaron métodos a través de diferentes condiciones de proceso.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes métodos de extracción sin el uso de solventes, para obtener aceite de emú (crudo), considerando el método de extracción sólido-líquido a través del procedimiento descrito por Folch y cols. [24] como método de comparación. El aceite comercial de importación (refinado) y nacional (crudo) fueron utilizados como muestras de referencia.



2. Metodología

2.1. Materia Prima

La grasa de emú fue adquirida en dos criaderos: en Cd. Benito Juárez, Ejido el Carrizo, Nuevo León y en San Juan Bautista, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. Una de faena julio 28 del 2009, hembra de 25 meses de edad, del depósito adiposo espalda baja y la otra de enero 17 del 2009, hembra de 60 meses de edad, del depósito adiposo vísceras, respectivamente. Fueron transportadas de origen a destino en una envoltura de plástico color negro y en una hielera respectivamente, para evitar la interacción con la luz. La primera faena fue utilizada para la evaluación de los diferentes métodos de extracción y la segunda para la evaluación de las condiciones del proceso correspondiente al método de ultrasonido.

La grasa, fue almacenada en refrigeración, con la finalidad de evitar reacciones de degradación.

Las muestras de referencia fueron adquiridas en Cd. Benito Juárez, Ejido el Carrizo, Nuevo León (aceite refinado de importación) y en Santa Cruz, Xoxocotlán, Oaxaca (aceite crudo nacional).

Todos los solventes utilizados fueron grado analítico.

2.2. Extracción de aceite crudo

Los métodos de extracción sin el uso de solventes fueron a través de la deshidratación y digestión de la grasa de emú, así como, por la interacción de la radiación con la grasa en un microondas convencional **M** y en un baño de ultrasonido **BU**. La deshidratación fue en un baño maría asistido con vacío **BM** y en un rotavapor **R**. La digestión se llevó a cabo aplicando calor a través de agua destilada a ebullición, método tradicional conocido como fusión húmeda **FH**. Todos ellos permitieron la salida del extracto, provocando daño en la pared celular.



El peso de las muestras de grasa en todos los métodos fue de aproximadamente 10 g, previamente triturada en un molino convencional, para romper la estructura celular y homogeneizarla. El aceite crudo fue recolectado en envases de vidrio ámbar, para protegerlo de la luz, evitando reacciones de degradación y almacenándolo en refrigeración. Los ensayos se realizaron por duplicado.

En todos los métodos el extracto obtenido fue filtrado en un embudo Büchner unido a un matraz kitazato, conectado a una bomba de vacío (≈ 40 HP), a través de papel filtro de poro grande, para separar residuos de tejido y partículas de alto peso molecular.

2.2.1. Baño maría asistido con vacío (BM)

La grasa colocada en un matraz kitazato conectado a una bomba de vacío fue introducida en un baño maría a 60°C , incrementando la temperatura gradualmente hasta que el extracto alcanzó 70°C , calor mínimo para una fusión completa de la grasa. El extracto fue filtrado y almacenado (ver sec. 2.2). Este método fue una adaptación del método de Márquez y cols. [17].

2.2.2. Rotavapor (R)

La muestra de grasa fue expuesta al calor en un matraz de destilación con vacío, sumergido en un baño de agua caliente a 60°C con agitación durante 15 minutos, utilizando un rotavapor (Marca Büchi, modelo R-110). El extracto fue filtrado y almacenado (ver sec. 2.2). Este método fue una adaptación del método de Márquez y cols. [17].

2.2.3. Fusión Húmeda (FH)

La grasa fue introducida en agua destilada a ebullición durante 20 minutos, la suspensión formada, fue filtrada a través de lana de vidrio para separar los residuos de tejido de la fase orgánica contenida en el agua y filtrado (ver sección 2.2), posteriormente fue disuelto en cloroformo, para facilitar el filtrado a través de carbonato de sodio (Na_2CO_3), eliminando el residuo de agua. El cloroformo fue evaporando



calentándolo ligeramente con una pistola de aire (Marca Master, HG-501) y desplazando con aire.

2.2.4. Microondas (M)

La grasa colocada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml fue expuesta a calentamiento en un microondas convencional por 3 min. El extracto fue filtrado y almacenado (ver sec. 2.2). El procedimiento utilizado fue una adaptación del método descrito por Guzmán [38], modificando el tiempo de exposición, la cantidad y el soporte de la muestra.

2.2.5 Baño Ultrasónico (BU)

2.2.5.1 Condiciones del proceso

Con la finalidad de determinar el tiempo de exposición y la preparación de la muestra, la grasa de emú molida y entera (20 g) fue colocada en envases de vidrio de 50 ml y expuestas en un baño de ultrasonido (Marca Karl Roll, modelo D-713), de frecuencia de trabajo y potencia de 50 kHz y 200 W respectivamente, de dimensiones internas 30 x 25 x 20 cm. La temperatura experimental fue de 40 y 60°C. Las muestras fueron expuestas durante 180 minutos, midiendo el volumen obtenido cada 30 min. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

2.2.5.2 Extracción de aceite crudo

La grasa colocada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml fue introducida en un baño ultrasónico (Marca Fisher Scientific, modelo FS36H) por 90 min a temperatura ambiente. El extracto fue filtrado y almacenado (ver sec. 2.2).

2.3 Extracción con sólido-líquido (ES)

El método de extracción con solventes es comúnmente utilizado en la obtención de aceites por ser el más estudiado y de mejor rendimiento. Este método de extracción fue



evaluado con fines comparativos debido a que es aplicado a temperatura ambiente. El procedimiento utilizado fue el descrito por Folch y cols. [24], modificando la agitación a través de una parrilla (Marca Cimarec). El solvente fue eliminado en un rotovapor (Marca Büchi). El extracto obtenido se almacena en un envase de vidrio ámbar para protegerlo de la luz y almacenado a -4°C , desplazando el oxígeno con nitrógeno gaseoso.

2.4. Cálculo del rendimiento

El cálculo del porcentaje de aceite obtenido se realizó a través de la fórmula típica siguiente:

$$\% \text{ de aceite} = \frac{\text{Gramos de muestra}}{\text{Gramos de aceite}} * 100$$

2.5 Determinación de propiedades físicas

Las propiedades físicas de los aceites, están muy ligadas a sus triacilglicéridos y ácidos grasos que los componen; estas pueden variar con base a las técnicas de obtención respecto a los valores clásicos, por lo que su medida puede proporcionar alguna idea en cuanto a su caracterización [39].

2.5.1 Color

El color del aceite de emú fue medido en un equipo (Hunter Lab, Mini Scan), utilizando un soporte de plástico cilíndrico. El instrumento fue calibrado con una teja blanca de patrón de referencia (X\79.1, Y\83.9 y Z\90.5) y una trampa negra de acuerdo con el procedimiento establecido en el manual del equipo. Para cuantificar el color se ajustó el equipo a parámetros *L*, *a* y *b*. Los ensayos se realizaron por triplicado considerando como resultado final el promedio. La lectura se llevó a cabo colocando la muestra contenida en el soporte cilíndrico en la abertura de la parte inferior del equipo, cuidando que está ocupara todo el diámetro de la abertura, evitando así el paso de luz. Los valores positivos de *a* y *b*, representan el color rojo y amarillo respectivamente, los



valores negativos de a y b , muestran el verde y azul respectivamente, L representa la luminosidad que va de 0 (negro) a 100 (blanco).

2.5.2 Densidad e Índice de refracción

Muestras de aceite de emú fueron evaluadas en un refractómetro (Marca Reichert, modelo Abbe II plus) y en un densímetro (Marca Anton Paar, modelo DMA), ambos a 25.5°C. Los ensayos se realizaron por triplicado, calibrado los equipos previamente a valores de agua y aire respectivamente.

2.6 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental de un factor por duplicado

3. Resultados y Discusión

Los extractos procedentes de los diferentes métodos de extracción sin el uso de solventes, fueron identificados según el equipo utilizado (baño maría asistido con vacío **BM**, fusión húmeda **FH**, Microondas **M**, rotavapor **R** y baño ultrasónico **BU**), en el caso de la extracción con solventes **ES**. Para las muestras de referencia, nacional **CN** e importación **CI**.

Previo a la extracción del aceite crudo por el método de baño ultrasónico, este fue evaluado con la finalidad de determinar las condiciones óptimas del proceso.

3.1. Evaluación de las condiciones de extracción del método BU

Dos tipos de muestra fueron evaluadas molida **BUM** y entera **BUE**, observando que los extractos obtenidos, mostraron una consistencia turbia y líquida a temperatura ambiente y de olor característico. El color presentó diferentes tonalidades entre blanco y amarillo paja a la vista (Fig. 2).



El tiempo del proceso es observado en la figura 3, mostrando el efecto en función del rendimiento del extracto obtenido, donde el comportamiento fue igual para ambos tipos de muestras **BUM** y **BUE**. Durante los primeros 90 minutos, el rendimiento incremento gradualmente conforme el tiempo transcurrió, disminuyendo considerablemente en los siguientes 90 minutos, indicando el efecto de las ondas ultrasonicas, siendo más eficaces durante los primeros 90 min. Esto puede deberse a que las ondas rompen la pared celular de la grasa, permitiendo la salida del extracto, el área de contacto es grande entre el gas (vapor de agua) y el material, siendo cada vez más débil a medida que aumenta la distancia hacia la pared interna de la célula; esto ocurre muy rápido en el comienzo de la extracción [40].

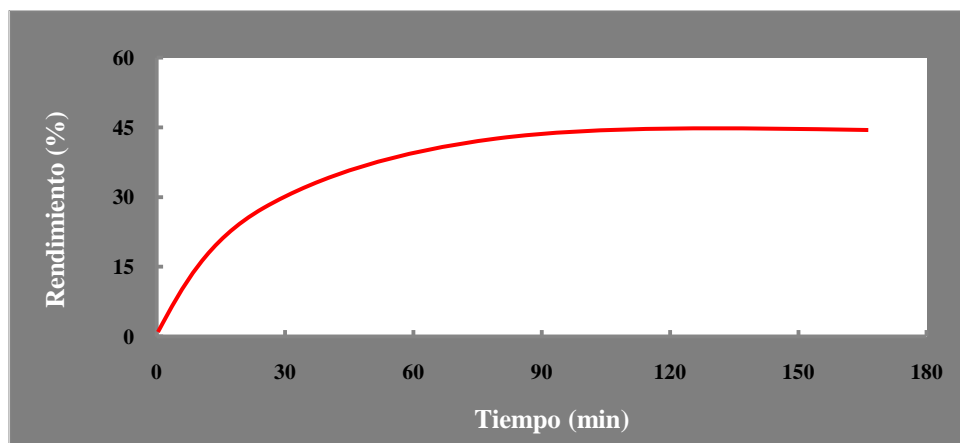


Figura 3. Efecto del rendimiento durante el tiempo del proceso.

Este comportamiento fue reportado por Stanisavljevic´ y cols. [35], para extracción de aceite de semilla, obteniendo el mayor rendimiento en 60 min.

El trabajo de Zhang y cols. [40], reportaron una tendencia similar y el rendimiento mayor en 30 min.



Estos resultados pueden deberse a factores a factores como la variación de la potencia, el uso de solventes, lo cual mejora la difusividad de la extracción, entre otros.

Stanisavljević y cols. [35] y Zhang y cols. [40], mencionaron que el ultrasonido puede seguir siendo eficaz incluso en la última fase de la extracción a través de una mejora de en la difusividad interna y que hasta el momento, se ha encontrado que un tiempo de 30 minutos puede ser óptimo en el funcionamiento del baño ultrasónico.

Si bien, el tiempo de extracción observado en el presente trabajo, fue mayor a lo reportado, puede deberse a la influencia del uso de solventes, así como a equipos donde la potencia puede variar.

La tabla 1, muestra el rendimiento obtenido, indicando que el mejor rendimiento fue observado en **BUM**, en casi un 38% mayor que **BUE**.

Tabla 1. Rendimiento porcentual del extracto a 40 y 60°C.

Tipo de muestra	Temperatura (°C)	
	40	60
BUM	67.21 (± 5.5004)	64.97 (± 7.3256)
BUE	35.76 (± 0.0354)	46.44 (± 2.1894)

La diferencia en rendimiento observado en **BUM** y **BUE**, podría deberse a un aumento en el área de exposición a la cavitación producida (formación de burbujas) [41] o a una menor resistencia a la difusividad por el tamaño de la muestra [35].

Estudios realizados en aceite de linaza, mostraron un rendimiento del 83% a 30°C y 77% a 50°C, para una extracción asistida con *n*-Hexano [40].

3.2 Extracción de aceite crudo

El método de baño maría, mostro un tiempo de extracción de 7 minutos, tiempo en que el extracto alcanzo la temperatura de 70°C sugerida por Márquez y cols. [17].



Los extractos resultantes de los diferentes métodos, mostraron para **BM** y **FH** una consistencia turbia y para **R**, **BU** y **M** poco turbia; todas las muestras fueron líquidas a temperatura ambiente y de olor característico.

El rendimiento obtenido en cada método se observa en figura 4, el método de mayor rendimiento fue **BU** ($41.3\% \pm 2.0789$), seguido del método de **BM** ($36.4\% \pm 2.4749$) y **R** (35.7%), el de menor rendimiento fue **FH** ($27.1\% \pm 1.1314$), seguido por **M** ($25.7\% \pm 2.7153$).

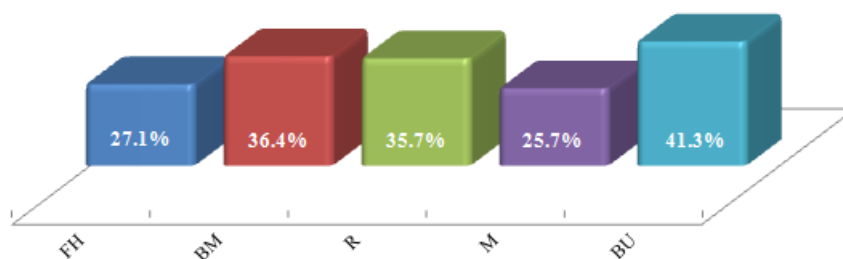


Figura 4. Rendimiento del extracto obtenido por métodos sin el uso de solventes.

El rendimiento en todos los métodos, fue menor al obtenido en **ES** de 68.0% (± 6.8094). La razón, puede deberse al mecanismo de extracción sólido-líquido, donde, el solvente penetra en el interior del sólido, disolviendo los triglicéridos [26] y aisándolo el contenido total a partir de los tejidos; siendo este método aceptado por la mayoría de los analistas para la extracción a fondo de los lípidos del tejido de origen animal, entre otros, por su alto rendimiento según estudios reportados en bibliografía [21]. El rendimiento obtenido en **ES** fue muy próximo a lo reportado por Shimizu y col. [1] de 75.5% y al de Beaudoin y col. [9] de 78.5% .

Acorde con los resultados obtenidos los métodos **BM** y **R**, mostraron un rendimiento similar, lo cual, pudo deberse a que en ambos casos, la obtención del extracto fue por deshidratación indirecta y las condiciones de operación fueron muy similares. El tiempo de proceso no mostro una diferencia considerable, siendo el de menor tiempo **BM** en 7 min.



Los rendimientos mostrados en los métodos sin solventes (**MSD**) fueron menores en comparación con pruebas previas realizadas en grasa adquirida en el estado de Oaxaca, por ejemplo de 63% en **R** y de 68% en **FM**. Por su parte, resultados obtenidos por Márquez y cols. [17] en **BM** reporto un 80% de rendimiento para aceite crudo. Estas diferencias podrían deberse al método.

Lo antes mencionado, puede relacionarse con lo observado por Grompone y cols. [20], donde reporto que al obtener aceite de emú por procesos convencionales, estos requieren modificaciones a los parámetros del proceso con el fin de obtener un mejor rendimiento.

3.3 Análisis del color

La determinación del color en forma instrumental se muestra en la Tabla 2. La cromaticidad de colores (*a* y *b*), mostraron para *a* un matiz de color verde claro y *b* una intensidad de color amarillo, tendiendo a este último color, así mismo se observó cierta uniformidad a los tonos amarillos, con variaciones en intensidad, presentando la mayor intensidad en **M** y menor intensidad en **FH**.

Tabla 2. Parámetros L, a y b de extractos obtenidos por métodos sin el uso de solventes.

Método	a	b	L
BU	-2.4	2.78	74.22
M	-3.54	7.17	65.18
BM	-3.56	3.46	69.47
R	-3.31	3.23	68.06
FH	-3.12	0.8	69.93

En comparación con muestras comerciales (Tabla 3), mostraron para *a* y *L* valores similares, sin embargo, en *b* la muestra nacional mostro la mayor intensidad hacia el color amarillo.

Tabla 3. Parámetros L, a y b de aceite de emú comercial.

Método	a	b	L
Importación	-3.37	0.79	70.04
Nacional	-3.54	15.26	63.99



Las variaciones observadas, pueden deberse a los parámetros utilizados en el proceso como, temperatura, tiempo de exposición, entre otros, los cuales podrían permitir la extracción de sustancias liposolubles de menor importancia y que pueden determinar el color del producto [42], como pigmentos naturales [43]. En general el color del aceite de emú es blanco a un color paja claro, no obstante, algunos pueden ser de color más oscuro [44].

3.4 Análisis del Índice de Refracción y Densidad

Los resultados obtenidos de índice de refracción y densidad se muestran en la Tabla 3.4.1, encontrando que tanto el índice de refracción y la densidad fueron similares entre los diferentes métodos.

Tabla 4. Índice de refracción y densidad a 25.5°C de extractos de grasa de emú.

Método	Densidad (g/cm ³)	Índice de refracción
BU	0.9112 ± 0.000	1.4653 ± 0.000
M	0.9113 ± 0.000	1.4655 ± 0.000
BM	0.9104 ± 0.000	1.4659 ± 0.000
R	-	1.4650 ± 0.000
FH	0.9112 ± 0.000	1.4648 ± 0.000

El índice de refracción observado en **ES** (1.4657 ± 0.000) y **CI** (1.4639 ± 0.000), fueron similar a los extractos **MSD**, al igual que con los rangos mencionados por Thompson [44] para aceite de emú refinado (índice de refracción 1.456-1.467 y densidad 0.897-0.920 g/cm³), de la misma forma con Hernández [11] de aproximadamente 1.46 a 20°C.

En comparación con aceites de origen vegetal, Briceño y col. [45], mencionan que el índice refracción y la densidad en aceite de oliva fueron de 1.467 y 0.910 g/cm³ a 25°C. Bora y cols. [46], reportaron un índice de refracción y una densidad de 1.4608 y 0.927 g/cm³ a 28°C respectivamente en aceite de aguacate.

Algunos autores mencionan que el aceite de emú es similar al aceite de oliva [44].



Si bien, los valores antes mencionados fueron similares a los observados en los extractos **MSD**.

El índice de refracción se relaciona con las insaturaciones de los ácidos grasos, teniendo indicio de una posible degradación por las condiciones del proceso, por ejemplo la temperatura, entre otros. Si el valor del índice de refracción se aleja marcadamente de su valor especificado, esto podría ser un indicio de la presencia de enlaces conjugados [13,43], indicios de una degradación posicional.

Conclusiones

El método de baño ultrasónico permitió extraer aceite en un tiempo de 90 min, a una temperatura de 40°C, en grasa molida, obteniendo casi un 20% menos en rendimiento que lo reportado en la literatura para aceites de origen vegetal.

Los métodos de microondas y baño maría proporcionaron el menor tiempo de extracción de 3 y 7 minutos respectivamente.

El mejor rendimiento fue observado en el método de baño ultrasónico.

Los resultados mostraron que las técnicas evaluadas tienen la factibilidad de obtener aceite de emú, bajo las condiciones evaluadas, de propiedades físicas similares a lo reportado en bibliografía (aceite refinado de emú y de origen vegetal), así como de un valor considerable al permitir la extracción sin el uso de solventes; siendo técnicas rápidas y de tecnologías accesibles, sin embargo requieren de un análisis más profundo para optimizar el rendimiento.

El rendimiento obtenido a través de la extracción sólido-líquido, fue próximo a lo reportado por estudios anteriores.



Recomendaciones

Los métodos utilizados en el presente trabajo deben ser evaluados más a fondo, debido a que el rendimiento resultó bajo comparado el método control, sin embargo, las características del extracto resultante son similares a los extractos citados en referencias bibliográficas, los cuales, están más cerca de un método general; permitiendo así un mejor rendimiento.

Agradecimientos

A la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del IPN y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, por las facilidades prestadas para la obtención de los extractos.

Al Dr. Raúl León Hernández Ochoa por su apoyo en la evaluación del método de baño ultrasónico.

Referencias Bibliográficas

1. Shimizu, S., y Nakano, M. (2003). Molecular Species of Triacylglycerol isolated from Depto Fats of ratites. *Journal of Oleo Science*, 52, 57-63.
2. Grompone, M. A., Irigaray, B., y Gil, M. (2005a). Composition and thermal properties of Rhea oil and its fractions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 107, 762–766.
3. Wang, Y. W., Sunwoo, H., y Sim, J. S. (2000). Lipid characteristics of emu meat and tissues. *Food and Nutritional Science*, 7, 71-82.
4. Tapia, P. A. (2006). *Estudio comparativo de la Capacidad Humectante*. Santiago, Chile.



5. Whitehouse, M. W., Turner, A. G., Davis, C. K. C., y Roberts, M. S. (1998). Emu oil(s): A source of non-toxic transdermal anti-inflammatory agents in aboriginal medicine. *Inflammopharmacology*, 6, 1-8.
6. Rabasco, A. M., y González, M. L. (2000). Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y Aceites*, 51, 74-96.
7. Padilla F., y Cuesta, A. E. (2003). *Zoología aplicada*. España: Díaz de Santos. ISBN: 84-7978-5888-8.
8. Guzmán de Silva, H., Oliveras de Ita, A., y Medellín, R.A. (2005). *Dromaius novaehollandiae*. *Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales*. Obtenida el 7 de febrero de 2005, de <http://www.conabio.gob.mx/>
9. Beaudoin, A., y Martin, G. (2003). Process for the extraction of lipids from fatty bird tissues. U.S. Patent 6521768.
10. Salvi, M. A., Hilbing, A., Sereno, M., Sereno, J., y Rotondo, J. (2007). Aceite de ñandú: su uso para favorecer la cicatrización en equinos. *Clínica veterinaria*, 2, 1-6.
11. www.emufacts.com. Hernández, E. (n.d.). Food Protein Research & Development Center, Texas A&M University.
12. Graham, T. W. (1999). *Química Orgánica*. México, D.F.: Limusa Wiley.
13. Shahidi, F., y Wanasundara, P. K. J. P. D. (2008). Extraction and analysis of lipids. En D. B. Min, y C. C. Akoh (Eds.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (pp. 125-153). Canada: RC Press/Taylor & Francis Group.
14. Badui Dergal, S. (1988). *Química de los alimentos*. Alhambra Mexicana.



15. Gunstone, F. D. (2008). *Oils and fats in the food industry* (1a. Ed.). USA: A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. ISBN: 978-1-4051-7121-2.
16. Belton. P. (2000). The functional properties of fats and oils-Richness of diversity. *Grasas y Aceite*, 51, 1-5.
17. Márquez, R., Repiso, L., A., Salié, L., y Silvera, C. (2007). Estudio de una tecnología de extracción y fraccionamiento de aceite de ñandú de alta calidad para su utilización en la industria cosmética y farmacéutica. *Laboratorio de tecnológico del Uruguay*, (2).
18. Velasco, R., Villada, H., y Carrera, J. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información Tecnológica*, 18, 53-65.
19. Ortuño, M. F. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Aiyana Ediciones.
20. Grompone, M. A., Irigaray, B., y Gil, M. (2005b). Uruguayan Nandu (*Rhea americana*) Oil: A Comparison with Emu and Ostrich Oils. *JAOCS*, 82, 687-689.
21. <http://lipidlibrary.aocs.org>. Christie, W. W. (2009). The Scottish Crop Research Institute.
22. García, J. A. y Díaz, I. (n.d.). Nuevas tendencias en el análisis de ácidos grasos. Centro de Tecnología de la Carne. Unidad de Química Alimentaria.
23. Yúfera, E. P. (2003). *Química Orgánica Básica y Aplicada*. Valencia, España: Reverté, S.A.
24. Folch, J., Lees, M., y Sloane, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 497-509.



25. Reyes, L., Gárnica, A., y Cruz, M.J. (2008). Diseño de una forma farmacéutica de uso tópico de acción inflamatoria y analgésica a base de emú. Oaxaca, 21-24 octubre, (poster).
26. Berk, Z. (2009). *Food Process Engineering and Technology* (1er Ed.). Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-373660-4.
27. Rydberg, J., Cox, M., Musikas, C., y Choppin, R. G. (2004). *Solvent Extraction and Practice* (2nd. Ed.). ChaZmers.
28. Monziols, M., Bonneau, M., Davenel, A., y Kouba, M. (2006). Comparison of the lipid content and fatty acid composition of intermuscular and subcutaneous adipose tissues in pig carcasses. *Meat Science*, 76, 54–60.
29. Mahesara, S. A., Sherazi, S. T. H., Abroa, K., Kandhro, A., Bhanger, M. I., Van de Voort, F.R., y Sedman, J. (2008). Application of microwave heating for the fast extraction of fat content from the poultry feeds. *Talanta*, 75, 1240–1244.
30. Sales, J. (1998). Fatty Acid Composition and Cholesterol Content of Different ostrich Muscles. *Elsevier Science Ltd*, 49, 489-492.
31. Virot, M., Tomao, V., Ginies, C., Visinoni, F., y Chemat, F. (2008). Microwave-integrated extraction of total fats and oils. *Journal of Chromatography A*, 1196–1197, 57–64.
32. Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., y Cintas, P. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 898–902.
33. Jiménez, M. E., Aguilar, M. R., Zambrano, M. L., y Kolar, E. (2001). Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate obtenido de puré deshidratado por microondas. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 45 (2), 89-92.



34. Jiménez, A., Beltrán, G., Uceda, M., y Aguilera, M. P. (2006). Empleo de ultrasónicos de potencia en el proceso de elaboración del aceite de oliva virgen. Resultados a nivel de planta de laboratorio. *Grasas y Aceites*, 57, 253-259.
35. Stanisavljević, I. T., Lazić, M. L., y Veljković, V. B. (2007). Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotianatabacum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 646–652.
36. Wei, F., Gao, G. Z., Wang, X. F., Dong, X. Y., y Li, P. P. (2008). Quantitative determination of oil content in small quantity of oilseed rape by ultrasound-assisted extraction combined with gas chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 938-942.
37. Dolatowski, Z. J., Stadnik, J., y Stasiak, D. (2007). Applications of Ultrasound in Food Technology. *Technol. Aliment*, 6(3), 89-99.
38. Guzmán, R. I. (2003). Efecto del Tratamiento Térmico con Microondas en los Lípidos y Volátiles del Aguacate (*Persea americana*). (Tesis de Doctorado-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN).
39. Graciani, E. (2006). *Los aceites y las grasas: composición y propiedades* (1er Ed). Graficas Rogar. ISBN: 84-87440-36.
40. Zhang, Z. S., Wang, L. J., Li, D., Jiao, S. S., Chena, X. D., y Mao, Z. H. (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 62, 192–198.
41. Azuola, R., y Vargas P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasónico (eua). *Tecnología en Marcha*, 20(4), 30-40.
42. Akoh, C. C. (2006). *Handbook of Functional Lipids*. CRC Press Taylor and Francis Group. ISBN 0-8493-2162-X.



43. Bailey, A. (2001). *Aceites y grasas industriales* (2nd. Ed.). Reverté, S.A.
44. Thompson, P. (2002). “Second Draft” Emú oil research and documentation collation. Tjurinda Emu Products Maleny. Q. 4552.
45. Briceño, J. V., y Navas, P. B. (2005). Comparación de las características químicas, físicas y perfil de ácidos grasos de los aceites de seje, oliva, maíz y soja. *Rev. Fac. Agron*, 3(1), 109 -119.
46. Bora, P.S., Narain, N., Rocha, R., y Queiroz, M. (2001). Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado. *Grasas y Aceites*, 52, 171-174.
47. Benkaci-Ali, F., Baaliouamer, A. y Meklati, Y. (2006). Kinetic Study of Microwave Extraction of Essential Oil of *Nigella sativa* L. Seeds. *Chromatographia*, 64, 227–231.
48. Orrego, C. E. (2003). *Procesamiento de alimentos* (Primera Edición). Universidad Nacional de Colombia.



APLICACIÓN DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EN EL ANÁLISIS DE ACEITE DE EMÚ

Ana María Pineda Reyes

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN Oaxaca). Calle Horno 1003. Santa Cruz Xoxocotlan. C.P. 71230. Oaxaca. México. anamaria_pinedareyes@hotmail.com

Resumen: La espectroscopía infrarroja y la espectroscopía de absorción visible, combinada con la absorción ultravioleta, además de ser técnicas de análisis utilizadas para caracterizar compuestos de una forma rápida, son utilizadas en el estudio de la estructura de los compuestos y sus posibles cambios por efectos de algún tratamiento. El análisis de la muestra, no requiere de preparaciones elaboradas o tratamientos especiales, ventaja sobre otros tipos de análisis instrumentales. El objetivo del presente trabajo, fue utilizar estas técnicas de análisis en extractos de grasa de emú, para identificar de forma rápida, su estructura y posibles cambios por las condiciones del proceso. Los espectros mostraron una estructura característica a la de un aceite, presentándose el mismo comportamiento en todos los extractos, los cuales, no presentaron bandas que indicaran alguna reacción de degradación.

Palabras Clave: *Aceite de emú, espectrometría UV-Vis, espectrometría FT-IR.*

Abstract: The infrared spectroscopy and visible absorption spectroscopy combined with UV absorption, as well as being analytical techniques used to characterize compounds quickly, are used in the study of the structure of the compounds and their potential effects of any changes treatment. The analysis of the sample does not require elaborate preparations or special treatment, advantage over other types of instrumental analysis. The aim of this study was to use these techniques of analysis in extracts of emu fat to quickly identify, structure and possible changes in process conditions. The spectra showed a characteristic structure of oil, presenting the same behavior in all the extracts, which did not show any reaction bands indicating degradation.

Key words: *Emu oil, UV-Vis spectroscopy, infrared spectroscopy.*



Introducción

En la actualidad los análisis químicos están siendo sustituidos por métodos instrumentales, encaminado a mejorar el medio ambiente, debido al uso de fuertes volúmenes de solventes y reactivos, todos ellos utilizados en los análisis químicos [1].

Técnicas de análisis actualmente disponibles como la espectroscopía *UV-Vis* y la espectroscopía *IR*, son utilizadas para caracterizar compuestos de una forma rápida, donde la muestra, no requiere de una preparación elaborada o de tratamientos especiales; tampoco requieren de procesos de separación, ventajas sobre otros tipos de análisis instrumentales [2]. Así mismo, son utilizadas para el estudio de la estructura de compuestos y sus posibles cambios por efectos en los tratamientos [3], como el grado de oxidación, alteraciones producidas por la refinación o en análisis de calidad [4], entre otros.

El uso de *IR* puede llevarse a cabo sobre todo tipo de materia (sólida, líquida o gaseosa) [2].

La espectroscopía *UV-Vis* e *IR*, permiten la interacción de la radiación electromagnética con la materia; la energía interactúa con las moléculas, estas absorben energía de ciertas longitudes de onda y transmiten otras, permitiendo establecer el espectro de absorción del compuesto por la relación de la longitud de onda y la cantidad de radiación transmitida [5]. *UV-Vis*, involucra la absorción molecular en la región ultravioleta y visible por las moléculas, promoviendo los electrones desde un orbital en su estado fundamental, hasta orbitales de mucha energía en un estado excitado [1]. La energía absorbida corresponde a la cantidad necesaria para promover un electron de un orbital a otro $\pi \rightarrow \pi^*$ [5]. En muchos casos, la absorción no es observable, limitándose a estructuras conjugadas [1]. La región del espectro electromagnético, va de una longitud de onda baja, en el visible de 400 a 800 nm; la región de mayor interés, está en el intervalo de 200 a 400 nm [5].



IR es una técnica establecida para la identificación y el análisis estructural de compuestos químicos, a través de los distintos modos de vibración de las moléculas, por la excitación de las mismas; la energía absorbida por la molécula orgánica, es convertida en energía de vibración molecular, dando origen a dos tipos de vibración, de extensión (*stretching*) y de flexión (*bending*). Las vibraciones de extensión pueden ser simétricas y asimétricas; las de flexión, de tijera (*scissoring*), oscilación o balanceo (*wagging*), sacudida (*twisting*) y de torsión (*rocking*), las cuales tienen que ver con el cambio en el ángulo de dos enlaces, según sea el movimiento relativo de cada uno los átomos; todas ellas se representan por picos en el espectro infrarrojo [6]. Las vibraciones son asociándose a los enlaces químicos y a los grupos funcionales presentes, permitiendo la identificación de moléculas orgánicas [1]. La región del infrarrojo de mayor interés se encuentra entre 4000 y 400 cm^{-1} (recíproco de la longitud de onda en centímetros), conocida como región media MIR [6]. Los compuestos moleculares, tienen un comportamiento único, frente a un haz de infrarrojo, que manifiestan una serie de bandas de absorción, cada banda corresponde con un movimiento de vibración, de un enlace en concreto, dentro de la molécula [2]. Si bien, la espectroscopia UV-Vis es utilizada con menos frecuencia que la IR, debido a la información especializada que proporciona [5].

La espectroscopia infrarroja no contamina; la muestra se analiza en un tiempo corto, y es relativamente barata; en los últimos años esta técnica ha sido importante, sobre todo, desde la aparición de los equipos con técnicas de transformadas rápidas de Fourier **FT**, utilizándose en el estudio de materiales y sistemas biológicos, como para la identificación de autenticación de grasas y aceites, la detección de adulteraciones en el aceite de oliva con aceite de avellana, entre otras [2]. Además **FT-IR**, es una herramienta, para el análisis cuantitativo, debido a la relación entre la intensidad de las bandas y la concentración [7]. También puede ser utilizada en la determinación de algunas propiedades químicas, como el índice de iodo, la cual es una medida del grado de insaturaciones totales, el índice de saponificación, que es una medida del peso molecular medio de los triacilglicéridos, entre otros [1].



El espectro de **IR** es obtenido por un cambio en el momento dipolo durante la vibración [8], por su parte, el espectro de **UV-Vis** de compuestos orgánicos, es atribuible a la transición electrónica, de los electrones de grupos funcionales, con una alta densidad electrónica, como el carboxilo, grupos con dobles enlaces, dobles enlaces conjugados, entre otros, los cuales, absorben fuertemente en el rango ultravioleta o visible en longitudes de ondas (λ_{\max}) características dependiendo del solvente usado [9]. Los picos y bandas de los espectros **IR** y **UV-Vis** a una específica frecuencia y longitud de onda, son característicos de los grupos funcionales que constituyen los componentes de una muestra [2].

La mayoría de los grupos funcionales tienen bandas características de absorción infrarroja que no cambian de un compuesto a otro, por ejemplo, la absorción del (C=O) de una cetona casi siempre está en el intervalo de 1680 a 1750 cm^{-1} ; la de un alqueno (C=C) entre 1640 y 1680 cm^{-1} etc.; al conocer las absorciones de los grupos funcionales característicos, es posible obtener información estructural de los espectros infrarrojos [5], por su parte, la absorción en **UV** de los dobles enlaces del grupo acilo (C=O) de los ácidos, es detectada en la región 203-210 nm [9].

En el infrarrojo se observan docenas de bandas de absorción, siendo esta complejidad valiosa, porque un espectro **IR** es una huella digital única de un compuesto específico [5]. En el caso de los lípidos esta es observada a una frecuencia baja en la región 1500-900 cm^{-1} , conocida como huella digital de los lípidos, debido a la flexión que presentan los dobles enlaces (-HC=CH-), así como el grupo (C-H) [9].

El espectro de **IR** de un aceite, provee información substancial de la estructura, y grupos funcionales de los lípidos, también acerca de las impurezas asociadas con este. Esta información se representa como picos u hombros en el espectro; en la frecuencia alta al final del espectro (3700-3400 cm^{-1}); una región donde absorben los grupos hidroxilo (RO-H), agua, hidroperóxidos y productos de rompimiento, es en una frecuencia menor (3025-2850 cm^{-1}), encontrándose también la región de estiramiento del (C-H), donde 3 bandas son visibles, una débil del enlace *cis* (HC-H₂C=CH) y dos fuertes debido al grupo metil (CH₂), correspondientes a las cadenas alifáticas y al grupo



metilo (CH_3); un poco más allá de esta región, están los productos de oxidación secundarios, como los aldehídos y cetonas que absorben energía débilmente [9]; cerca de la región $1740\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$, se identifican los aldehídos alifáticos, la principal muestra de aldehídos absorbe en la región $2830\text{-}2695\text{ cm}^{-1}$, observándose 2 bandas de intensidad moderada, donde frecuentemente son observadas en esta región; la absorción del grupo aldehído carbonilo responde a cambios estructurales de la misma manera que las cetonas [6]. Hacia el centro del espectro se encuentra una banda muy fuerte, debido a la vinculación del enlace éster, que fija al ácido graso con el glicerol ($\text{C}=\text{O}$) [9]. La absorción de la banda del grupo éster alifático está en la región $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$; la vibración de estiramiento del ($\text{C}-\text{O}$) de los ésteres, consiste de dos vibraciones de acoplamiento asimétricas [$\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}$] y [$\text{O}-\text{C}-\text{C}$], siendo el primero el más importante; las bandas que aparecen en la región $1300\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, en ésteres insaturados (α , β) resultan múltiples bandas en la región $1160\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ [6]. En seguida de esta banda, se encuentra el grupo (COOH) de los ácidos grasos libres [9].

Un enlace *trans* monoinsaturado, absorbe en la región 967 cm^{-1} , aproximadamente, como resultado de la deformación de el enlace ($\text{C}-\text{H}$), adyacente al doble enlace *trans* [10].

Paré y col. [1], mencionan que la absorción característica del enlace *trans* monoinsaturado se encuentra alrededor de 967 cm^{-1} , está presente en grasas y aceites procesados, debido a la isomerización durante el procesamiento o a consecuencia de la oxidación, entre otros tipos de procesamientos.

Thompson [11], reportó la presencia de enlaces *trans* en el aceite de emú, procedente de la alimentación o por el procesamiento.

La aplicación de **IR** en la determinación de isómeros *trans* en ácidos grasos monoinsaturados, es un método oficial para la AOCS (American Oil Chemists' Society), AOAC (Association of Official Analytical Chemists) y para la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), basado en la medida de la banda a 966 cm^{-1} , debido al enlace ($\text{C}=\text{C}-\text{H}$), por la vibración de flexión fuera del plano [12].



La banda correspondiente a los ácidos grasos libres *FFA* es difícil de identificar, debido a que aparece como un hombro en la banda de absorción correspondiente al enlace éster, la cual es intensa por el grupo carbonilo, donde a niveles bajos de *FFA*, no puede ser percibida, sin embargo, existen en la literatura métodos para la identificación de la banda correspondiente [12].

Castorena y cols. [2], analizaron los grupos funcionales más importantes a través de *FT-IR*, en pasta y aceite de aguacate, aceite de oliva extra virgen, de almendras y de girasol comercial, observando la presencia de bandas asociadas al enlace (C=C) en la cadena principal de los ácidos grasos insaturados.

Sinelli y cols. [13], evaluaron por *IR* aceite virgen de oliva, encontrando bandas en 2924, 2852, 1743, 1463, 1377, 1238, 1163, 1114, 1099 y 721 cm^{-1} ; asignando las bandas 2924 y 2852 cm^{-1} a la vibración de extensión CH_2 asimétrica y simétrica respectivamente; 1743 cm^{-1} a la vibración de extensión C=O; 1463, 1377 cm^{-1} a la vibración de flexión de tijera CH_2 y CH_3 ; 1238, 1163, 1114, 1099 a las vibraciones de extensión C-O y 721 cm^{-1} al modo de vibración de torsión de CH_2 .

Yang y cols. [8], analizaron aceites comestibles y grasas por *FT-IR*, mencionando que puede ser usada como una técnica rápida de calcificación en aceites comestibles.

Vieira y col. [14], utilizaron *UV-Vis*, para evaluar la estabilidad oxidativa en el aceite de maíz, encontrando que dicha técnica fue un índice bueno para medir las alteraciones oxidativas.

El principal objetivo de este trabajo fue utilizar técnicas de análisis instrumental, para la identificación rápida de la estructura en extractos de grasa de emú, provenientes de diferentes métodos de extracción sin el uso de solventes, así como, la identificación de posibles cambios formados por el efecto de los tratamientos térmicos; como muestras de referencia, aceite comercial nacional (crudo) y de importación (refinado). La extracción con solventes fue utilizada como método de comparación.



2. Metodología

Se utilizaron extractos de aceite de emú (crudo) extraídos de diversos métodos sin el uso de solventes y como muestra de comparación extractos extraídos con solventes, ambas del depósito adiposo espalda baja, faena julio 28 del 2009, hembra de 25 meses de edad, proveniente de Cd. Benito Juárez, Ejido el Carrizo, Nuevo León. México.

Las muestras de referencia fueron adquiridas en Cd. Benito Juárez, Ejido el Carrizo, Nuevo León (aceite refinado de importación) y en Santa Cruz, Xoxocotlán, Oaxaca (aceite crudo nacional).

Los extractos fueron almacenados en refrigeración, con la finalidad de evitar reacciones de degradación, hasta su análisis.

Los solventes utilizados fueron grado analítico.

2.1 Análisis FT-IR

Las muestras fueron colocadas en una pastilla de silicio, formando una ligera película, en un equipo (Marca Nicolet, modelo Nexus 470 FT-IR), usando un rango MIR de 4000 a 400 cm^{-1} , en un cuarto frío, obteniendo el espectro correspondiente a través del software OMNIC E.S.P. (Ver. 5.2). El espectro fue compensado para eliminar la relación de las bandas del CO_2 .

2.2 Análisis UV-Vis

El aceite fue diluido en hexano grado analítico y colocado en una cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor, midiendo la absorbancia en un espectrómetro UV-Vis (Marca Perkin Elmer, modelo lambda 25), de doble haz con lámpara de deuterio y un rango de longitud de onda de 200-700 nm.



3. Resultados y Discusión

Las muestras evaluadas fueron identificadas con base al método de obtención, baño maría asistido con vacío **BM**, fusión húmeda **FH**, Microondas **M**, rotavapor **R** y baño ultrasónico **BU**; para el método de compración **ES** y las muestras de referencia, aceite crudo nacional **CN** y refinado de importación **CI**.

3.1 Espectrometría FT-IR

En la figura 1, se muestra un ejemplo de los espectros obtenidos, enumerando las bandas analizadas. Todos los espectros mostraron el mismo comportamiento.

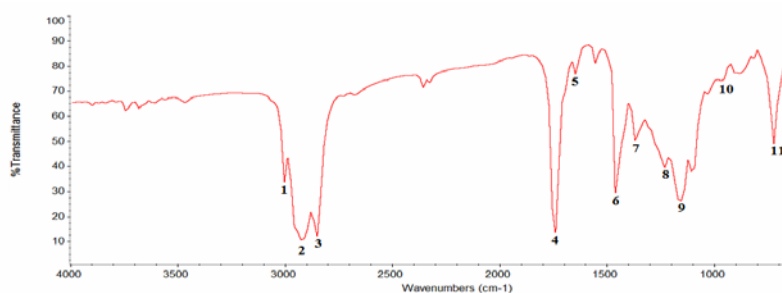


Figura 1. Espectro *IR* de la muestra **M**.

Los espectros mostraron bandas significativas en valores próximos a 3005, 2924, 2856, 1646, 1461, 1369 y 1238 cm^{-1} , dos bandas fuertes en 1744 y 1164 cm^{-1} , una banda en 960 cm^{-1} y otra en 727 cm^{-1} (Tabla 1).

Las bandas observadas en los espectros, se observan en la tabla 1.

Tabla 1. Bandas analizadas en espectros de aceite de emú.

Muestra	Banda (cm^{-1})										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BU	3006	2924	2854	1748	1644	1459	1373	1237	1163	965	721
BM	3001	2909	2853	1744	1641	1463	1373	1239	-	944	763
FH	3007	2930	2858	1746	1646	1459	1378	-	-	959	739
M	3004	2922	2855	1745	1642	1462	1371	1233	1163	960	707
R	3003	2920	2855	1744	1641	1463	1371	1237	1173	945	701
ES	3005	2923	2856	1745	1646	1461	1369	1237	1164	961	722
CI	3003	2918	2854	1744	1644	1460	1369	1236	1155	955	726
CN	-	2932	2870	1744	xxxx	1464	1385	-	1171	955	740



La banda observada en 3005 cm^{-1} fue asignada a las vibraciones de tensión de los dobles enlaces *cis* ($=\text{C-H}$) [1,15,16].

Bandas en 2924, 2856, 1461 y 1369 cm^{-1} , indican la presencia de grupos funcionales alifáticos, donde las bandas 2924, 2856 cm^{-1} , corresponden a la vibración de tensión del grupo metil (CH_3), resultado del estiramiento asimétrico del enlace (C-H) y estiramiento simétrico respectivamente; así mismo, cerca de estas bandas, surge la presencia del grupo metileno (CH_2) de vibración asimétrica y simétrica respectivamente, las cuales se encuentran traslapadas [2,6,8,13,16,18]. Las bandas 1461 y 1369 cm^{-1} , ocurren del enlace (C-H) de los grupos alifáticos (CH_2) y (CH_3) por las vibraciones de flexión asimétrica y simétrica respectivamente; la vibración de flexión del grupo metileno, generalmente traslapadas [13,16].

Una banda a 1744 cm^{-1} que indican la presencia del grupo funcional carbonilo unido al éster ($-\text{C}=\text{O}$) de los triacilglicéridos [1,2,13,16]; concordando con el rango mencionado por Silverstein y cols. [6] entre $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$ para ésteres alifáticos saturados. Murcia y cols. [18], reportó que la vibración de la banda del grupo cabonyl éster se centra aproximadamente a 1735 cm^{-1} , siendo un modo de absorción en el monitoreo del contenido de lípidos.

Otra banda cerca de 1646 cm^{-1} fue asociada a la vibración de tensión del doble enlace *cis* ($\text{C}=\text{C}$) [2,12].

Las bandas cercanas a 1238 y 1163, fueron asociadas a la vibración de tensión del grupo éster y a la vibración de flexión del grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), las cuales se relación con la proporción de los grupos acilo saturados [6,13,16].

La banda observada en 960 cm^{-1} fue asociada a la vibración de flexión del grupo funcional ($-\text{HC}=\text{CH}-$) del enlace *trans* en olefinas monoinsaturados. Paré y col. [1] y Ratnayake [10], reportaron que aproximadamente la banda 967 cm^{-1} , corresponde al enlace *trans* monoinsaturado, así como Lerma y cols. [16], mención que este enlace fue identificado en la banda 968 cm^{-1} , por su parte comentan que el rango correspondiente



al enlace es de $1006-929\text{ cm}^{-1}$ debido a la vibración de flexión fuera del plano. Sedman [12], reporta esta banda en 966 cm^{-1} . La diferencia mostrada con la bibliografía, posiblemente se debe a que todos los triacilglicéridos muestran una banda de absorción débil que se traslapa con la banda de absorción del enlace aislado *trans*, la intensidad de las bandas traslapadas varía dependiendo de la composición de los triacilglicéridos, lo que contribuye a la medida del valor de la banda de 3 a 5 puntos porcentuales [12].

La banda en 727 cm^{-1} , se asigna a la vibración de torsión del grupo metileno $-(\text{CH}_2)_n-$ de cadenas alifáticas de más de cuatro grupos metilenos, así como a las vibraciones que están fuera del plano por la distribución *sic* del doble enlace (C-C) de la cadena hidrocarbonada [13,16].

Los espectros no muestran formación de bandas correspondientes a grupos peróxidos, lo que podría ser un indicio del daño por temperaturas elevadas o por la influencia del oxígeno del medio ambiente [3]. Paré y col. [1], reportan frecuencias de aldehídos y cetonas entre $1735-1715$ y $1720-1710\text{ cm}^{-1}$ respectivamente; por su parte Silverstein y cols. [6], reportan estas vibraciones entre $1740-1720\text{ cm}^{-1}$.

3.2 Espectrometría UV-Vis

Los espectros UV-Visible fueron prácticamente iguales, en todas las corridas (Fig. 2), presentando un máximo de absorción electrónica, menor que el índice de interés espectrofotométrico de absorción a 206 nm , no se observaron alteraciones que indicaran la presencia de oxidación, la cual, es acompañada del aumento de la radiación ultravioleta *UV*, por algún cambio en la posición de los dobles enlaces, en los ácidos grasos poliinsaturados, presentando una absorción intensa a $232-234\text{ nm}$ [14,12].

Paz y col. [4], mencionaron que los compuestos de oxidación primarios como peróxidos e hidropéroxidos absorben a 232 nm , concordante con Vieira y col. [14]. Tampoco se observaron alteraciones por la presencia de oxidación secundaria, a decir, aldehídos en 262 nm o cetonas en 268 nm [4]. Lo antes mencionado, podría deberse a



alteraciones en el aceite durante el proceso de extracción por la temperatura de calentamiento al que fue expuesto.

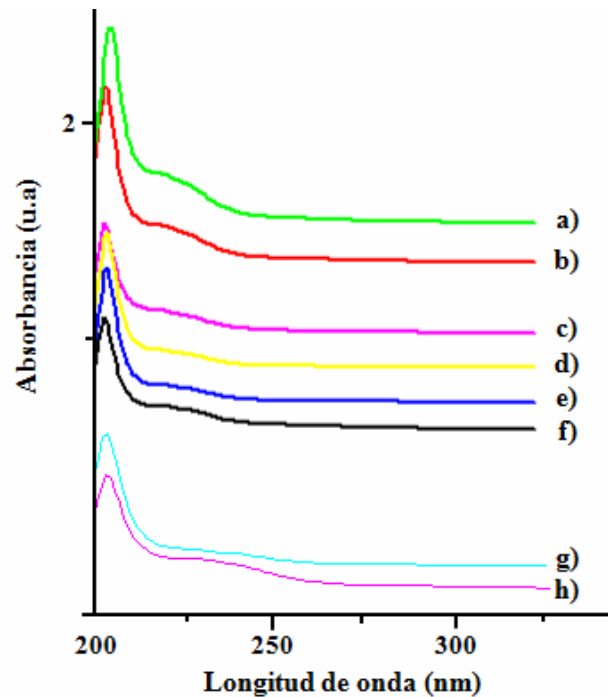


Figura 2. Espectros *UV-Vis* a) *M*, b) *CI*, c) *CN*, d) *ES*, e) *BM*, f) *FH*, g) *R* y h) *BU*.

Conclusiones

Las técnicas analizadas pudieron contribuir de manera rápida e importante a la investigación de la estructura de las muestras analizadas, así como, de otros componentes que pudieran estar presentes debido a cambios a nivel molecular en el aceite debido a diversos factores como temperatura, oxidación, entre otros.

A través de la espectroscopia infrarroja (MIR), se pudo observar de manera clara la presencia de las bandas características asociadas a los enlaces de los grupos funcionales principales característicos de un aceite. Identificando especies de grupos funcionales correspondientes a los diferentes componentes del aceite de emú.

Los espectros no mostraron formación de peróxidos lo que podría ser un indicio del daño sobre el aceite por temperaturas elevadas, lo cual, se pudo confirmar con los resultados observados en UV-Visible, al no mostrar bandas características de oxidación.



Recomendaciones

La existencia de la banda aproximada en 2363 cm^{-1} en todos los espectros, puso de manifiesto la posible presencia de CO_2 , a pesar de que los espectros fueron compensados para eliminar la banda correspondiente, razón por la que se debe considerar revisar el procedimiento de análisis, considerando que en pruebas preliminares en un equipo Perkin Elmer con una técnica de muestreo de reflectividad total atenuada (ATR), reflejo la presencia de esta banda en una menor intensidad.

Agradecimientos

A la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del IPN, laboratorio de Catálisis y Materiales, laboratorio de Investigación de Nanotecnología por las facilidades prestadas en la realización de las pruebas instrumentales.

Referencias Bibliográficas

1. Paré, J. R. J., y Bélanger, J. M. R. (1997). *Instrumental Methods in food analysis*. Netherlands, Amsterdam: Elsevier Science B.V. ISBN: 0-444-81868-5.
2. Castorena, H.; Robles, M. R.; Rojas, M.; Robles, R. R. (n.d.). Aplicación de la espectroscopia infrarroja sobre pasta de aguacate. *CIBA-IPN*. .
3. Jiménez, M. E., Aguilar, M., Zambrano, M., y Kolar, E. (2001). Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate obtenido de puré deshidratado por microondas. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 45, 89-92.
4. Paz, I., y Molero, M. (2000). Aplicación de la espectrofotometría UV-visible al estudio de la estabilidad térmica de aceites vegetales comestibles. *Grasas y Aceites*, 51, 424-428.
5. McMurry, J. (2000). *Química Orgánica* (5a edición). Thomson International.



6. Silverstein, R., Webster, F., y Kiemle, D. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds* (7th Ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-39362-2.
7. Lerma, M.J., Ramis, G., Herrero, J. M., y Simó, E. F. (2010). Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 118, 78–83.
8. Yang, H., Irudayaraj, J., y Paradkar, M. (2005). Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food chemistry*, 93, 25-32.
9. Shahidi, F., y Wanasundara, P. K. J. P. D. (2008). Extraction and analysis of lipids. En D. B. Min, y C. C. Akoh (Eds.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (pp. 125-153). Canada: RC Press/Taylor & Francis Group.
10. Ratnayake, W. M. N. (1995). *Determination of trans fatty acids in dietary fats*. New trends in lipid and Lipoprotein Analyses. J.-L. Sebedio and E.G. Perkins, Editors. LC number:95-13519. Pp: 61-68.
11. Thompson, P. (2002). “Second Draft” Emú oil research and documentation collation. Tjurinda Emu Products Maleny. Q. 4552.
12. Sedman, J. (2000). *Application of fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Analysis of Edible fats and oils*. ¿?: McGill University.
13. Sinelli, N., Cerretani, L., Di Egidio, V., Bendini, A., y Casiraghi, E. (2010). Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity. *Food Research International*, 43, 369–375.



14. Vieira, T., y Regitano-d'Arce, M. (1999). Ultraviolet Spectrophotometric Evaluation of Corn Oil Oxidative Stability during Microwave Heating and Oven Test. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2203-2206.
15. Sena Jr., D. M., Rodrigues, F. F. G., Freire, P. T. C., de Lima, S. G., Coutinho, H. D. M., Carvajal, J. C. J., y da Costa, J. G. M. (2010). Physicochemical and spectroscopical investigation of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) pulp oil. *Grasas y Aceites*, 61, 191-196.
16. Lerma, M.J., Ramis, G., Herrero, J. M., y Simón, E. F. (2010). Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 118, 78–83.
17. Alvarez, F., Álvarez, C., y Trejo, M. A. (2004). Proceso de extracción, optimización y caracterización del aceite de la semilla de mango para su aplicación como sustituto de manteca de cacao.
18. Murcia, M. A., Cano, C., y Bretón, J. (1994). FT-IR spectroscopy as a tool for the study of the quality of processed meat products. *Grasas y Aceites*, 45 (5), 297-299.
19. Folch, J., Lees, M., y Sloane, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 497-509.



ANÁLISIS DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE EMÚ POR CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Ana María Pineda Reyes

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN Oaxaca). Calle Horno 1003. Santa Cruz Xoxocotlan. C.P. 71230. Oaxaca. México. anamaria_pinedareyes@hotmail.com

Resumen: La combinación de la cromatografía de gases *GC*, para la separación de mezclas complejas y la espectrometría de masas *MS* en la identificación, constituye un instrumento poderoso que se está convirtiendo rápidamente en una herramienta importante en el análisis de ácidos grasos, previa derivatización de los mismos. El análisis del perfil de ácidos grasos *PAG* del aceite de emú extraído de diferentes métodos sin el uso de solventes, fue el objetivo del presente trabajo. La identificación se consiguió por la comparación directa de los tiempos de retención con un estándar externo, los cuales fueron identificados a su vez, por el uso de una biblioteca digital, así como, por el análisis de los espectros de masas. Observando que la composición del aceite de emú fue en todos los analitos de cinco ácidos grasos mayoritarios, a decir: palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2). El perfil proveniente del método de baño maría fue el más sobresaliente con una menor proporción de ácidos grasos saturados *SFA* y una mayor proporción de ácidos grasos monoinsaturados *MUFA*.

Palabras Clave: *Perfil de ácidos grasos, cromatografía de gases, espectrometría de masas, aceite de emú, espectro de masas.*

Abstract: The combination of gas chromatography (GC), for the separation of complex mixtures and the mass spectrometry (MS) in the identification, is a powerful tool that is rapidly becoming an important tool in the analysis of fatty acids after derivatization of the same. The analysis of fatty acid profile of emu oil (PAG), extracted from different methods without the use of solvents, and was the objective of this work. The identification was achieved by direct comparison of retention times with an external standard, which in turn were identified by the use of a digital library, as well as for the analysis of mass spectra.



Noting that the composition of emu oil was all analytes of five major fatty acids, to say, palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1), stearic (C18: 0), oleic (C18:1) and linoleic (C18:2). The profile from the water bath method was the most outstanding with a lower proportion of saturated fatty acids (SFA), and a higher proportion of monounsaturated fatty acids (MUFA).

Key words: Fatty acid profile, gas chromatography, mass spectrometry, *oil emu*, *mass spectrum*.

1. Introducción

El perfil de ácidos grasos del aceite de emú es un factor crítico en su calidad; el interés radica en la tendencia que este tiene al modificar su composición y proporción durante la extracción o bien en el proceso de análisis, estos son muy polares y poco volátiles, lo que conlleva a una serie de desafíos y problemas, debido a la posible presencia de reacciones de degradación por la formación de isómeros posicionales y/o geométricos, demeritando la composición original. La concentración y presencia de ácidos grasos **FA** es fundamental en la estabilidad del aceite [1].

El aceite de emú tiene una amplia gama de aplicaciones terapéuticas, muchas de ellas, se encuentran patentadas [2]; su valor terapéutico depende del **PFA**, sin embargo, Shimizu y cols. [3] comentaron que las características químicas del aceite de emú, no han sido divulgadas. Grompone y cols. [4] mencionan que son escasas las publicaciones de trabajos científicos, acerca de la composición del aceite del emú. Wang y cols. [5] señalaron que son pocos los estudios de investigación, conducidos a las características de los lípidos del emú. Por su parte, el aceite crudo de emú, es rico en ácidos grasos poliinsaturados, predominando el ácido oleico y linoleico [6].

Márquez y cols. [6] y Shimizu y col. [3] mencionan que el aceite de emú, está formado de casi un 100% de triacilglicéridos, lo cual, significa que es un lípido casi neutro.



Wang y cols. [5] detectaron que la composición del depósito adiposo espalda baja del emú, fue de 100% de ácidos grasos, predominando el oleico (C18:1n-9), en un 49.91%, seguido del palmítico (C16:0), en un 21.51%; en total detectaron 10 ácidos grasos, 5 mayoritarios y 5 minoritarios, identificados por cromatografía de gases.

Shimizu y col. [3], determinaron la composición en el depósito adiposo espalda baja, observando los ácidos grasos oleico en 54.3%, seguido del palmítico en 22.5% y el linoleico en 10.4%, en total detectaron 6 ácidos grasos, 5 mayoritarios y 1 minoritario, identificados por cromatografía de gases.

Grompone y cols. [4], identificaron el perfil de ácidos grasos en muestras comerciales, reportando 7 ácidos grasos, entre los que se encontraron el oleico (47.5%), seguido del palmítico (22.7%) y el linoleico (15%), observando también el mirístico (0.3%).

Estos estudios se relacionan con emús criados en Australia, Estados Unidos y Canadá, mientras que en México, no se cuenta con información disponible del perfil de ácidos grasos. Sin embargo, un estudio aun no publicado de Reyes y cols. [7] en el estado de Oaxaca, reveló que la composición del aceite de emú es de 47.9% de oleico, 23.3% de palmítico, 14.7% de linolénico, 8.4% de esteárico y 4.5% de palmitoleico, así como 0.9% de linoléico.

Los ácidos grasos que no contienen enlaces dobles se conocen como saturados (SFA), como el palmítico (C16:0), los que contienen solo un doble enlace se llaman monosaturados (MUFA), como el oleico (C16:1), presentando en la mayoría de ellos la doble ligadura entre los átomo de carbono 9 y 10; con más de un doble enlace, como el linoleico (C18:2), se conocen como poliinsaturados (PUFA), el doble enlace, tiende a comenzar en el carbono 12 y 15 como el linoleico y linolenico, razón por la que los dobles enlaces no son conjugados [8].



La presencia de insaturaciones hace que los ácidos grasos tengan una gran reactividad química, ya que están propensos a transformaciones oxidativas y de isomerización [8]. Las insaturaciones presentan dos tipos de isómeros, geométrico *cis* (c ó Z), y *trans* (t ó E), así como, posicional, según sea la localización de la doble ligadura en la cadena de átomos de carbono; en estado natural la mayoría son *cis* [1].

Diferentes metodologías han sido desarrolladas para la determinación de la composición de aceites, siendo la técnica más utilizada *GC* con un detector de ionización de flama *FID*; ha sido la técnica más elegida en la identificación de ácidos grasos y el método ampliamente utilizado para la separación e identificación de los perfiles de ácidos grasos en el aceite de emú [3,4,5,6,9], considerando previamente la derivatización de los ácidos grasos a sus ésteres metílicos *FAME's*; práctica común para el análisis por *GC*, debido a su baja volatilidad en compuestos de más de 6 carbonos, no permitiendo su análisis directo [8,10]. Los *FAME's* son más estables, menos polares y más volátiles que el ácido graso original; pueden ser preparados a través de diversos métodos de derivatización; comúnmente es utilizada la saponificación alcalina seguida del uso del trifluoroborano-metanol, este tiene una alta habilidad de esterificar y transesterificar, la saponificación alcalina, solo permite minimizar el tiempo de velocidad de reacción [11]. La separación de los *FAME's* se lleva a cabo a través de una columna capilar, por ejemplo, *CPSil 88*, *BPX-70* o *SP2340*, reportadas con excelente resolución para su análisis, y sobre todo en isómeros de posición y geométricos [8,11]. La introducción de nuevas fases polares como la columna *BPX-70*, permite estabilidad a temperaturas elevadas y se considera de sangrado bajo en análisis de *MS* [12]; por su parte las columnas empacadas son prácticamente obsoletas; la tecnología capilar posee una precisión alta, posibilitando que los ácidos grasos puedan por lo general ser identificados por *GC* con una certeza razonable, debido a los tiempos de retención, mejora si el análisis se realiza con una variedad de fases estacionarias; para una confirmación definitiva de la estructura, deben ser considerados otros procedimientos espectroscópicos [8].



El principio de **GC** radica en un fluido llamado fase móvil, que circula a través de un líquida o sólida llamado fase estacionaria [13], cual se encuentra fija la columna capilar, ubicada en el horno del **GC**. La muestra debe ser volátil y térmicamente estable; la fase móvil es un gas inerte que permita la elución [15]; la fase estacionaria líquida es la más usada, el líquido es inmovilizado sobre un soporte sólido inerte y debe ser estable y no volátil a las temperaturas empleadas en el análisis y de naturaleza similar a las muestras que se desea separar [14]. La muestra se inyecta y se arrastra por la fase móvil, los distintos componentes pasan a través de la fase estacionaria, reteniéndolos con base a su afinidad, permitiendo el paso más rápido a través de la columna a compuestos menos retenidos, por ser menos afines, los más afines pasan lentamente, por ser fuertemente retenidos; llevándose a cabo la separación; la presión de vapor del compuestos juega un papel importante en el equilibrio entre el analito y la fase estacionaria, a mayor presión, el tiempo de retención es menor en la columna [15].

Una de las técnicas analíticas más completas es la espectrometría de masas **MS**; en la actualidad es utilizada no solo para fines de investigación, sino para análisis de rutina en procesos industriales, en control de calidad, entre otros; permite identificar cualitativamente y cuantitativamente cualquier tipo de mezcla de sustancias de forma inequívoca, permitiendo identificar la masa molecular del compuesto y la estructura molecular de forma eficaz a través de los fragmentos resultantes del impacto electrónico controlado [15]; se ha demostrado que es una herramienta importante en el análisis de lípidos [8].

La asociación de **GC** y **MS** da lugar a una técnica combinada **GC-MS** que permite la separación e identificación de mezclas complejas. **GC** permite la separación de mezclas muy complejas, sin embargo, una vez separados los componentes individuales de la muestra problema, solo se cuenta con el tiempo de retención para la identificación de los correspondientes picos cromatográficos, lo que resulta insuficiente para una identificación inequívoca, sobre todo si la muestra contienen un número elevado de componentes; **MS** no es capaz de identificar de manera inequívoca cualquier sustancia pura, sin que esta sea



separada previamente en sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros individuales de cada componente [15]. Este acoplamiento requiere de sistemas especiales de conexión, porque trabaja en fase gaseosa, necesitando solo una pequeña cantidad de muestra para su análisis, lo que los hace muy compatibles; sin embargo, su acoplamiento resulta fácil si este es directo con la columna capilar del *GC*, siendo este el caso más habitual, además, el espectrómetro de masas actúa como detector cromatográfico, al registrar la corriente iónica total *TIC* generada en la fuente iónica, representada gráficamente por un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado, dicha grafica es conocida como cromatograma *TIC* [15]. El resultado de este acoplamiento es el registro de cada componente en forma de pico cromatográfico, que se identifica por su respectivo espectro de masas.

Dobson y col. [10], mencionaron que este sistema es extensamente utilizado en el análisis de metil ésteres de ácidos grasos y que es posible identificar la localización de la posición del doble enlace en la cadena hidrocarbonada, especialmente cuando se cuenta con un estándar para su comparación. El doble enlace es una de las características estructurales de los ácidos grasos, pueden ser localizables a través del acoplamiento *GC-MS*, entre otras características [10], sin embargo, en el caso de los monoinsaturados y diinsaturados deben ser interpretados con precaución [16].

Los espectros de masas, contiene información relevante para identificar la masa molecular y la estructura química de un muestra molecular [12]; pueden ser comparados con un espectro estándar que se obtienen de alguna biblioteca de espectros para una mayor confiabilidad.

El objetivo del presente trabajo consistió en identificar y analizar el perfil de ácidos grasos del aceite de emú (crudo), por *GC-MS*, en muestras provenientes de diferentes métodos de extracción sin el uso de solventes, considerando como método de comparación la extracción con solventes y como muestras de referencia, aceite de emú adquirido del



comercio de importación (refinado) y nacional (crudo), por cromatografía de gases acoplada a masas.

2. Metodología

2.1 Materia Prima

Las muestras de aceite de emú fueron extraídas de métodos sin el uso de solventes y como muestra de comparación con el uso de solvente, ambas del depósito adiposo espalda baja, faena julio 28 del 2009, hembra de 25 meses de edad, proveniente de Cd. Benito Juárez, Ejido el Carrizo, Nuevo León. México.

Las muestras de referencia fueron adquiridas en Cd. Benito Juárez, Ejido el Carrizo, Nuevo León (aceite refinado de importación) y en Santa Cruz, Xoxocotlán, Oaxaca (aceite crudo nacional).

El aceite crudo fue almacenado en refrigeración, con la finalidad de evitar reacciones de degradación.

Los solventes utilizados fueron grado analítico y grado capilar GC al 99.99%.

El estándar externo con número de parte 47885-U fue adquirido en Supelco, Co, de 37 componentes de metil ésteres de ácidos grasos.

2.2 Derivatización de ácidos grasos

El aceite de emú fue derivatizado con trifluoroborano-metanol al 14% como agente metilante y catalizador, convirtiendo los ácidos grasos en sus ésteres metílicos correspondientes, utilizando la técnica modificada de Guzmán [17], como sigue:



Una muestra de 50 mg de aceite fue diluida en 5 ml de hidróxido de potasio 0.5 M (KOH), en un matraz redondo de fondo plano esmerilado, adicionando 2 gotas de butilhidroquinona terciaria (TBHQ) al 2% disuelto en metanol, y perlas de ebullición, reflujo por 5 min, al término, se añadieron 6 ml de BF_3 , reflujo por 7 min, adicionando posteriormente 2 ml de heptano grado capilar, agitando por 30 seg y añadiendo 20 ml de solución saturada de cloruro de sodio (NaCl), la parte orgánica fue separada, adicionándole 2 ml de solución acuosa de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 10%, filtrada a través de sulfato de sodio anhidro (NaSO_4), recolectando los ésteres metílicos en un vial ámbar, adicionando 2 ml de heptano y refrigerándolo para su posterior análisis.

2.3 Análisis por GC-MS

Los analitos (*FAME's*) fueron analizados por *GC-MS* en un cromatógrafo de gases autosystem XL acoplado a un espectrómetro de masas TurboMass, ambos (Marca Perkin Elmer). El espectrómetro utilizó una fuente de ionización de 70eV por impacto electrónico. Los *FAME's* fueron separados en una columna capilar *BPX-70* de 60 m de largo y 0.25 mm de diámetro interior (Marca SGC). El programa de temperaturas del horno del *GC* fue: temperatura inicial 140°C por 5 min; 4°C por min hasta alcanzar la temperatura final de 240°C que se mantuvo por 8 min. Como gas acarreador se utilizó He a un flujo de 1.5 ml/min. El inyector fue operado en modo split 5:1, a una temperatura de 240°C. El rango de masas fue de 40 a 650 u.m.a. La temperatura de la fuente y línea de transferencia fue de 250°C. Todos los analitos fueron inyectados a las mismas condiciones cromatográficas.

2.4 Identificación de ácidos grasos

La identificación de cada ácido graso a través de su correspondiente metil ésteres, se realizó a través de la comparación con los tiempos de retención de cada pico obtenido del cromatograma *TIC* del estándar externo. Los espectros de masas del estándar externo fueron identificados por comparación con los espectros de la librería de la base de datos



(NIST Mass Spectral versión 1.7), los cuales fueron también analizados a través de las fragmentaciones abundantes observadas en los espectros.

2.4.1 Determinación de la proporción relativa

La proporción de cada ácidos graso fue expresada como la composición relativa de los ácidos grasos en %, referidos al total de ácidos grasos (Ec. 1). Considerando que la cantidad de cada componente es proporcional al área del pico correspondiente, considerado como aceptable para los ácidos grasos.

$$p(\%) = \frac{A_i}{A_T} \cdot 100 \quad \dots\dots\dots \text{Ec. 1}$$

De donde:

A_i = área correspondiente al pico del ácido graso.

A_T = su.m.a de las áreas de todos los picos identificados como ácidos grasos.

2.5 Análisis Estadístico

Los perfiles de ácidos grasos fueron analizados por ANOVA (Analysis of Variance), a través del software NCSS (Number Cruncher Statistical Systems, versión 2007).

3. Resultados y Discusión

La identificación del perfil de ácidos grasos **PFA** de las muestras analizadas por **GC-MS**, se realizó con base a la identificación del método de extracción (Tabla 1).

El **PFA** de todas las muestras fue analizado en el mismo **GC-MS**, bajo las mismas condiciones, así como el estándar externo. Este se consiguió primeramente identificando los tiempos de retención de cada pico obtenido del cromatograma **TIC** de las muestras y comparándolo con los tiempos de retención del **TIC** del estándar externo. Los espectros



resultantes fueron cotejados con los espectros de la librería NIST, asignando el ácido graso correspondiente por este criterio.

Tabla 1. Aceite de emú de diversas fuentes de obtención.

Método de extracción
Baño maría asistido con vacío (<i>BM</i>)
Fusión húmeda (<i>FH</i>)
Microondas (<i>M</i>)
Rotavapor (<i>R</i>)
Baño ultrasónico (<i>BU</i>)
Extracción sólido-líquido (<i>ES</i>)
Referencia nacional (<i>CN</i>)
Referencia de importación (<i>CI</i>)

3.1 Identificación del perfil de ácidos grasos a través de la librería

Todos los cromatogramas mostraron el mismo comportamiento, observando la presencia de 7 picos (Fig. 1), con excepción del *TIC* de la muestra *CN* de 5 picos. El tiempo de interés se observó en el minuto 27.36 a 35.56.

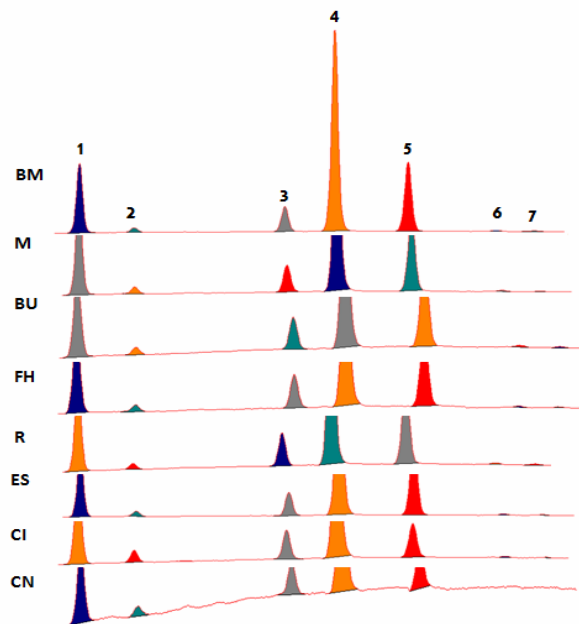


Figura 1. Cromatogramas TIC de aceite de emú.



El cromatograma del estándar se observa en la figura 2, señalando los picos correspondientes a las muestras, con base a los tiempos de retención mostrados en la tabla 2. El análisis del *TIC* a través del software TurboMass, permitió identificar un total de 34 picos de los 37 correspondientes al estándar; uno pico no resuelto en el correspondiente al disolvente del cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y el otro pico en el ácido araquídico ($\text{C}_{20:0}$), identificados con un asterisco. Los picos de los tres ácidos restantes podrían identificarse a través de pruebas experimentales más detalladas.

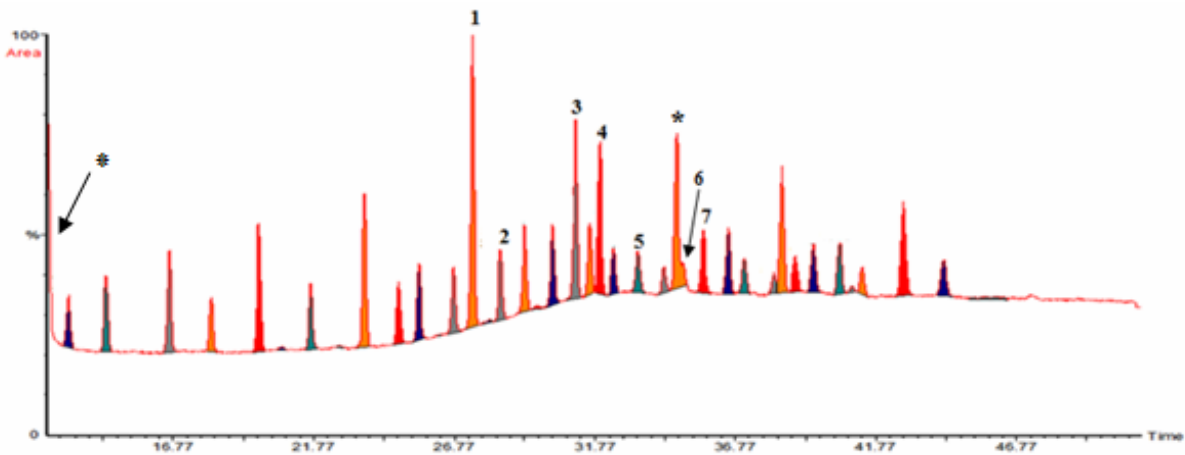


Figura 2. Cromatograma *TIC* del estándar externo.

Tabla 2. Tabla 3.1.1. Tiempos de retención de muestras de aceite de emú y estándar externo.

Muestra	Método	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7
1	BM	27.16	28.15	30.90	31.82	33.16	34.75	35.43
2	BM	27.35	28.34	30.99	31.89	33.21	34.84	35.56
1	FH	27.36	28.35	31.03	31.89	33.25	34.83	35.54
2	FH	27.12	28.13	30.88	31.76	33.12	34.75	35.41
1	M	27.42	28.41	31.07	31.95	33.29	34.88	35.61
2	M	27.11	28.10	30.85	31.74	33.08	34.71	35.43
1	R	27.35	28.34	30.99	31.89	33.21	34.83	35.54
2	BU	27.40	28.39	31.07	31.95	33.29	34.90	35.58
1	BU	27.11	28.13	30.85	31.73	33.08	34.71	35.39
1	ES	27.36	28.35	31.03	31.89	33.25	34.86	35.61
2	ES	27.12	28.13	30.86	31.78	33.12	34.71	35.45
1	CI	27.38	28.37	31.06	31.93	33.27	34.90	35.60
1	CN	27.40	28.41	31.05	31.93	33.29		
Estándar Externo		27.42	28.41	31.08	31.94	33.32	34.90	35.63



Los tiempos de retención de la tabla 2, no mostraron fluctuaciones considerables, siendo estas acordes a las condiciones experimentales (temperatura, inyección, fase estacionaria, gas portador, caudal, entre otros), lo que permitió la comparación de los mismos entre las muestras y el estándar.

La figura 3, muestra los espectros del pico 1 de tiempo de retención en 27min, observando que los iones en m/z 270, 239, 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 101, 87 y 74, fueron de acuerdo con la estructura del espectro del ácido Hexadecanoico o palmítico (C16:0), mostrado en el espectro *b*.

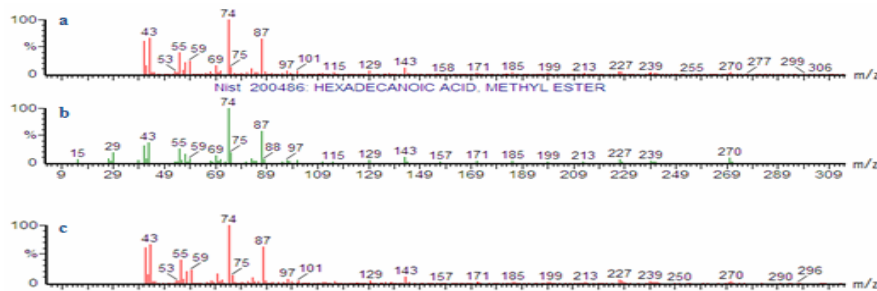


Figura 3. Espectros de masas del pico1, estándar (a), NIST (b) y muestra ES (c).

La figura 4, muestra los espectros del pico 2 de tiempo de retención en 28 min, observando que los iones en m/z 236, 194, 152, 138, 124, 110, 96, 87, 83, 74, 69, 55 y 41, los cuales, se encontraron de acuerdo con la estructura del espectro del ácido 9-Hexadecenoico o palmitoleico (C16:1), mostrado en el espectro *b*.

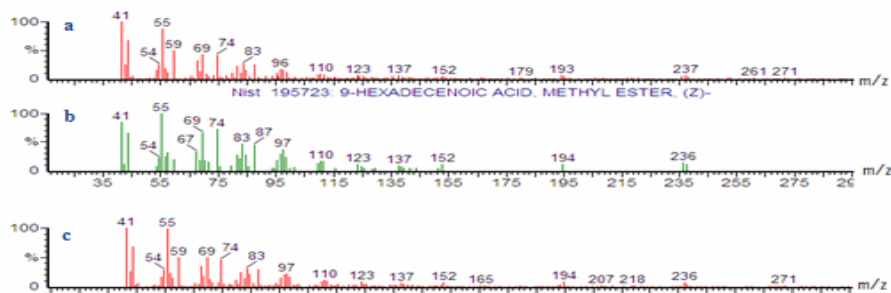


Figura 4. Espectros de masas del pico 2, estándar (a), NIST (b) y muestra BM (c).



La figura 5, muestra los espectros del pico 3 de tiempo de retención en 31 min, observando que el tiempo de retención de las muestras se presento entre 30.8 y 31.0. Los iones en m/z 298, 267, 255, 241, 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 101, 87 y 74, fueron de acuerdo con la estructura del espectro del ácido Octadecanoico o esteárico (C18:0), mostrado en el espectro *b*.

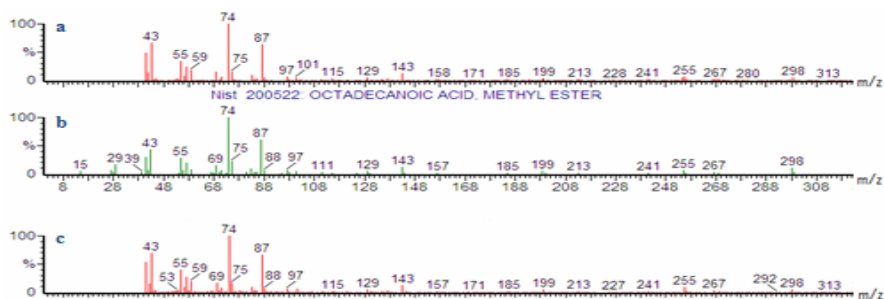


Figura 5. Espectros de masas del pico 3, estándar (a), NIST (b) y muestra M (c).

La figura 6, muestra los espectros del pico 4 de tiempo de retención en 31.9 min, observando que los iones en m/z 264, 222, 180, 152, 138, 124, 110, 97, 74, 55 y 41, estuvieron acorde con la estructura del espectro del ácido 9-Octadecenoico u oleico (C18:1), mostrado en el espectro *b*.

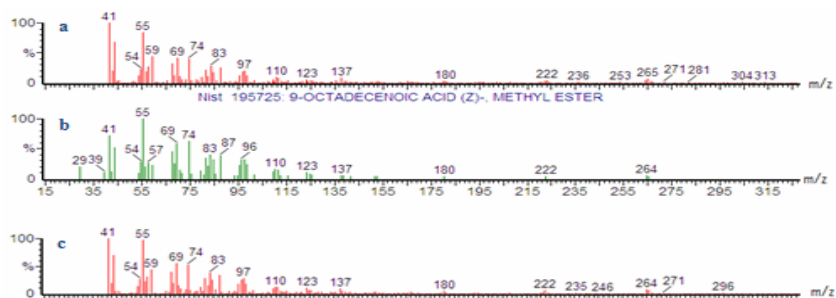


Figura 6. Espectros de masas del pico 4, estándar (a), NIST (b) y muestra M (c).

La figura 7, muestra los espectros del pico 5 de tiempo de retención en 33 min, observando que el tiempo de retención de las muestras se presento entre 33.08 y 33.29 min. Los iones en m/z 294, 263, 178, 164, 150, 136, 123, 109, 95, 81, 67, 55 y 41, fueron de



acuerdo con la estructura del espectro del ácido 9,12-Octadecadienoico o linoleico (C18:2n6), mostrado en el espectro *b*.

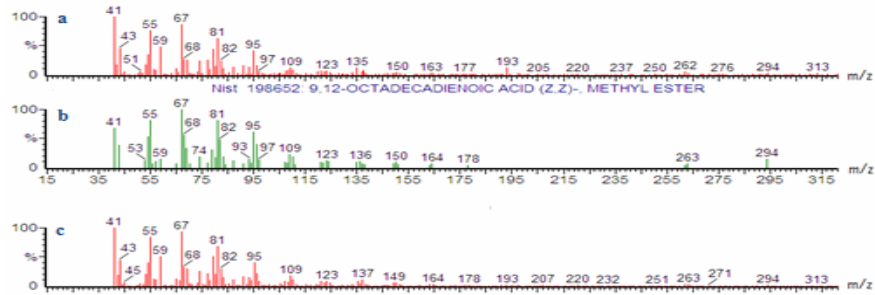


Figura 7. Espectros de masas del pico 5, estándar (a), NIST (b) y muestra BU (c).

La figura 8, muestra los espectros del pico 6 de tiempo de retención en 34 min, correspondientes a la muestra y a la librería NIST, observando que los iones en m/z 292, 163, 149 o 150, 121, 107 o 108, 93, 81, 79, 67, 55 y 41, fueron de acuerdo con la estructura del espectro del ácido linolenico, sin embargo no fue posible su identificación por medio del espectro de masas del estándar externo, este se encontró en dos tiempos de retención diferentes (34.24 y 34.90 min), los cuales corresponden al ácido graso 6, 9, 12-Octadecatrienoico (γ -linolenico o C18:3n6) y 9, 12, 15-Octadecatrienoico (α -linolenico o C18:3n3), de la familia n-6 y n-3 respectivamente, donde sus espectros fueron confusos en cuanto a los iones que los caracterizan, mencionados posteriormente. Por su parte en el caso de los ácidos con más de 3 dobles enlaces, existen pocos iones característicos que ayudan a la identificación del mismo, en especial la familia n-6 y n-3, gama y alfa respectivamente [16]. Esto pudo deberse a un incremento en la energía de fragmentación, donde el exceso de esta es cedida a un ion, generando fragmentaciones posteriores de manera que el espectro resultante contenga un gran número de iones de abundancia que dependerán de diversos factores como la vida media y la estabilidad acorde a sus precursores.

Por su parte Dobson y col. [10] y Christie [16], mencionan que el espectro del C18:3n6 contiene un ion en m/z 150, que puede ser considerando por la escisión del doble enlace entre el carbono C7 y C8; análogamente para el C18:3n3, sería el ion en m/z 108 por la escisión del doble enlace entre el C10 y C11, los cuales pueden ser identificados como



iones característicos de los ácidos poliinsaturados de la familia n-6 y n-3 resp., considerando que no siempre pueden estar presentes o ser únicos de estos ácidos grasos, sin embargo se consideran una guía útil. Adicionalmente Christie [16], comenta que existen iones de intensidad baja como en m/z 194, formados por la escisión del doble enlace entre el C11 y C12 para el espectro del C18:3n6 y en m/z 236, formados por la escisión del doble enlace entre el C14 y C15 para C18:3n3.

Se podría decir que este ácido corresponde a la familia n-3, debida a la secuencia en que fue identificado en la hoja de datos del producto. Sin embargo, los espectros de las muestras no mostraron claridad de los picos característicos (m/z 236 y 108 para alfa, 194 y 150 para gamma), como se puede observar en la figura 8.

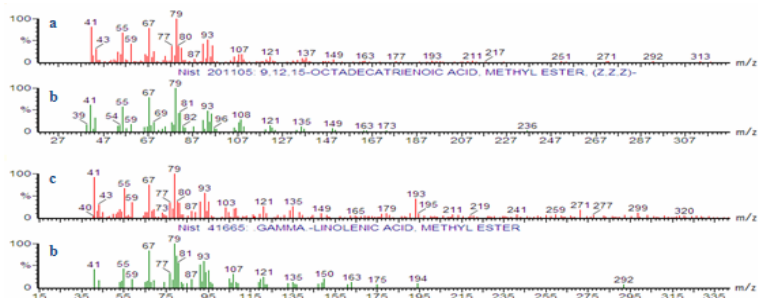


Figura 8. Espectros de masas del pico 6, muestra ES (a), NIST (b) y muestra BU (c).

La figura 9, muestra los espectros del pico 7 de tiempo de retención en 35 min, observando que los iones en m/z 324, 292, 250, 194, 152, 138, 124, 111, 97, 83, 74, 69 y 55, fueron de acuerdo con la estructura del espectro del 11-Eicosenoico, mostrado en el espectro *b*.

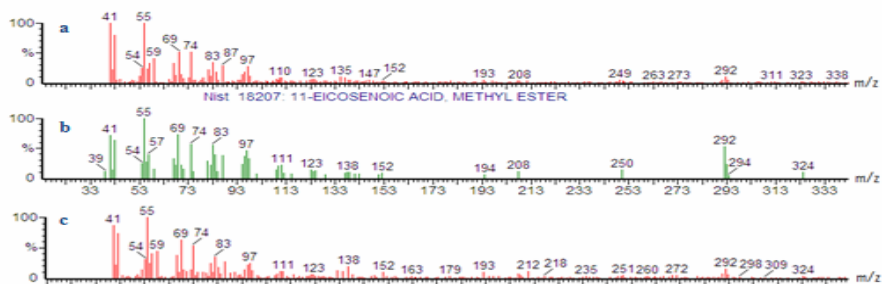


Figura 9. Espectros de masas del pico 7, estándar (a), NIST (b) y muestra ES (c).



3.2 Análisis de los espectros de masas

Las fragmentaciones iónicas interpretables características de los espectros antes mencionados, fueron analizados con la finalidad de confirmar el ácido asignado por la comparación de espectros; encontrando que en todos los espectros se presentó el ion en m/z 74 $[\text{H}_2\text{C}=\text{C}:\text{OCH}_3(\text{OH})]^+$, debido a, la transposición de McLafferty o transposición específica de H , por un reordenamiento del H en posición γ (gama), así como, la fragmentación de masas por la pérdida consecutiva de 14 u.m.a (CH_2), la cual, es ocasionada por escisión C-C y ruptura alílica, dicha fragmentación permitió que el ion molecular (M^+) se observara a baja intensidad, porque en cadenas alifáticas, el rompimiento de los enlaces preferentemente se lleva a cabo en el enlace C-C, para formar iones de mayor estabilidad (ruptura alquílica). Sin embargo, no en todos los casos fue posible observar el ion molecular, siendo este, el primer indicio en la identificación de un ácido graso [16]. Lo antes mencionado observado en el apéndice 2.

Los espectros de cada ácido graso presentaron iones diferentes entre sí, mencionados a continuación:

a) El espectro del ácido palmítico (Fig. 10) en todas las muestras, mostro un ion a m/z 270 de intensidad débil y con isotopía en el ion 271, no mayor a su intensidad máxima de 19.49%, identificado entre los conglomerados en masas altas que es el que posee las características de ion molecular (M^+), concordando con su peso molecular (270 u.m.a), siendo esto, el primer indicio en la identificación de un ácido graso, así mismo, el ion molecular fue par y el resto de las masas abundantes impares. También se encontró, una pérdida lógica del ion molecular en m/z 239 $[\text{M}-31]^+$ (radical metoxilo $^+\text{OCH}_3$); un ion en m/z 227 $[\text{M}-43]^+$ representando la pérdida del radical propilo $^+\text{C}_3\text{H}_7$, debido a un reordenamiento complejo; los iones en m/z 199, 185, 171, 157, etc., por la pérdida del radical metilo H_2C^+ $[\text{M}-14]^+$ y el ion en m/z 87 $[\text{M}-183]^+$, por la pérdida del radical $^+\text{COOCH}_3$.

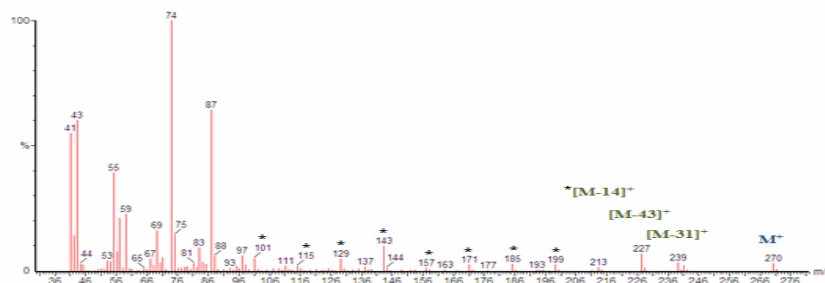


Figura 10. Espectro del ácido palmítico proveniente del TIC de la muestra ES.

b) El espectro del ácido palmitoleico (Fig. 11) en todas las muestras, no fue posible observar el ion molecular a m/z 268, correspondiente a su peso molecular (268 u.m.a). Por su parte, se observó una pérdida lógica del ion molecular en m/z 236 $[M-32]^+$ (radical metoxilo $^+OCH_3$ mas un H); otra pérdida a m/z 194 $[M-74]^+$, siendo el ion McLafferty, antes mencionado. El ion en m/z 152, se forma por la pérdida de un fragmento que contiene al grupo carboxilo por la escisión entre el carbono 5 y 6 con la adición de un H [16]. Los iones en m/z 138, 124, 110, 96, etc., por la pérdida del radical metilo H_2C^+ $[M-14]^+$. A diferencia del espectro del ácido saturado palmítico, los iones hidrocarburos de fórmula $[C_nH_{2n-1}]^+$ son representados en m/z 55 de abundancia notable.

Es importante notar que la ubicación del doble enlace no cuenta con alguna característica que permita definir su posición en la cadena hidrocarbonada, debido a que puede transponerse a cualquier posición al ionizar la cadena y el espectro de masas será prácticamente igual en casi todos los isómeros *cis* del ácido 16:1 [16].

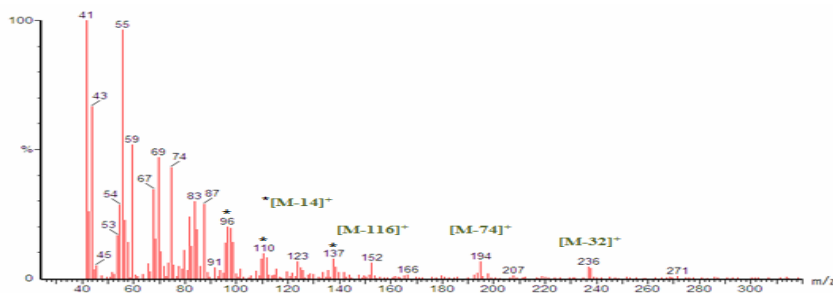


Figura 11. Espectro del ácido palmitoleico proveniente del TIC de la muestra M.



c) El espectro del ácido esteárico (Fig. 12) mostro en todas las muestras, un ion a m/z 298 de intensidad débil, sin percibir su isotopía en el ion 299 de intensidad no mayor a 21.78%, sin embargo, se identificó como el ion molecular (M^+), concordando con su peso molecular (298 u.m.a), su confirmación, fue con el análisis de los siguientes iones, un ion en m/z 267 $[M-31]^+$ (radical metoxilo $^+OCH_3$), considerado como una perdida lógica del ion molecular, así como el ion en m/z 255 $[M-43]^+$ representando la pérdida del radical propilo $^+C_3H_7$, debido a un reordenamiento complejo. Los iones en m/z 241, 227, 213, etc., por la pérdida del radical metilo H_2C^+ $[M-14]^+$.

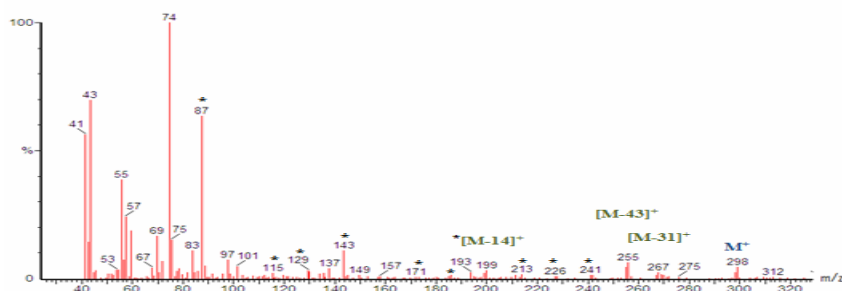


Figura 12. Espectro del ácido esteárico proveniente del TIC de la muestra FH.

d) El espectro del ácido oleico (Fig. 13) para todas las muestras, mostro los siguientes iones, en m/z 296 de intensidad muy débil, sin percibir su isotopía en el ion 296 de intensidad no mayor a 21.75%, sin embargo, se identificó como el ion molecular (M^+), concordando con su peso molecular (296 u.m.a), su confirmación, fue posible con el análisis de los iones en m/z 264 $[M-32]^+$ (radical metoxilo $^+OCH_3$ mas un H), correspondiente a una perdida lógica del ion molecular; otra perdida a m/z 222 $[M-74]^+$, siendo el ion McLafferty, antes mencionado. El ion en m/z 180, se forma por la pérdida de un fragmento que contiene al grupo carboxilo por la escisión entre el carbono 5 y 6 con la adición de un H [16]. Los iones en m/z 166, 152, 138, 124, 110, etc., por la pérdida del radical metilo H_2C^+ $[M-14]^+$. A diferencia del espectro del ácido saturado palmítico, los iones hidrocarburos de formula $[C_nH_{2n-1}]^+$ son representados a m/z 55 de abundancia notable.



De igual forma la ubicación del doble enlace no cuenta con alguna característica que permita su posición, como se mencionó en el análisis del espectro de masas del ácido C16:1.

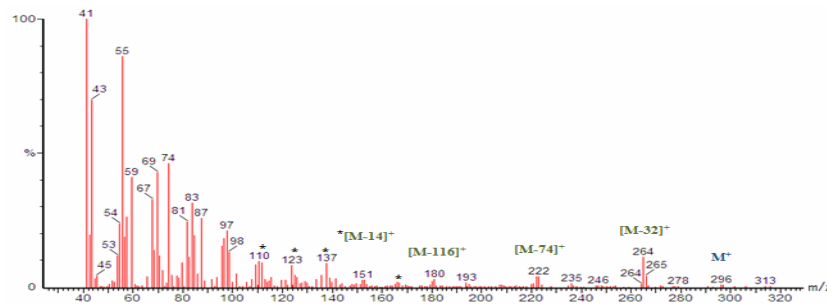


Figura 13. Espectro del ácido oleico proveniente del TIC de la muestra FH.

e) El espectro del ácido linoleico (Fig. 14) en todas las muestras, mostro un ion en m/z 294 de intensidad débil, sin percibir su isotopía en el ion en m/z 293 de intensidad no mayor a 21.72%, sin embargo, se identificó como el ion molecular (M^+), concordando con su peso molecular (294 u.m.a), donde su confirmación, fue a través del análisis de los iones siguientes, en m/z 263 $[M-31]^+$ (radical metoxilo $^+OCH_3$); una pérdida lógica del ion molecular en m/z 222 $[M-74]^+$ correspondiente al ion McLafferty antes mencionado; la pérdida del radical metilo H_2C^+ $[M-14]^+$ en m/z 177, 163, 149, 135, etc.; en m/z 81 se debió a la escisión del enlace alílico en el carbono $\beta-CH_2$, proceso comúnmente encontrado. Del mismo modo que en los ácidos monoinsaturados, existe muy poca evidencia que ayude con la localización de los dobles enlaces [16].

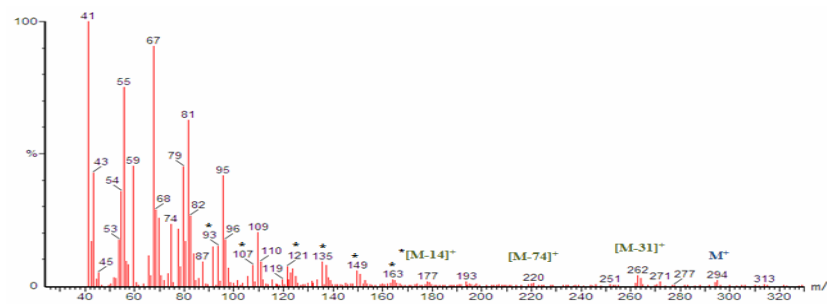


Figura 14. Espectro del ácido linoleico proveniente del TIC de la muestra BM.



f) El espectro del ácido linolenico (Fig. 15) en todas las muestras se observó un ion en m/z 292 de intensidad débil, sin percibir su isotopía en el ion en m/z 291 de intensidad no mayor a 21.69%, sin embargo, se identificó como el ion molecular (M^+) de peso molecular (292 u.m.a), el cual fue confirmado a través de las pérdidas de iones característicos como, un ion en m/z 260 $[M-32]^+$ (radical metoxilo $^+OCH_3$ mas un H), correspondiente a una perdida lógica del ion molecular; otra perdida en m/z 218 $[M-74]^+$, siendo el ion McLafferty, antes mencionado. El ion en m/z 176, se forma por la pérdida de un fragmento que contiene al grupo carboxilo por la escisión entre el carbono 5 y 6 con la adición de un H [16]. Los iones en m/z 149, 135, 121, 107, etc., por la pérdida del radical metilo H_2C^+ $[M-14]^+$.

Debido a que la información de la posición del doble enlace es limitada, se puede considerar que la identificación del peso molecular es un dato importante en la identificación del ácido graso [16].

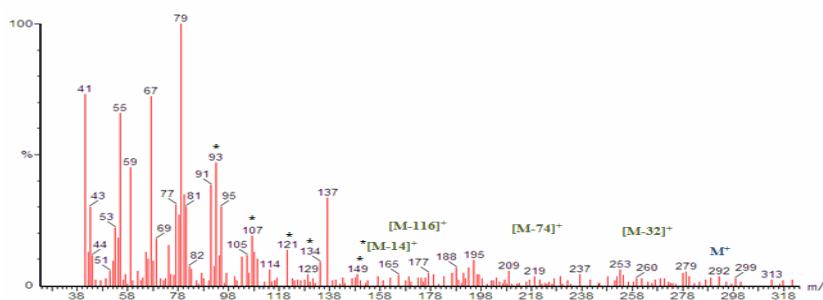


Figura 15. Espectro del ácido linolenico proveniente del TIC de la muestra BU.

g) El espectro del ácido eicosenoico (Fig. 16) en todas las muestras, mostro los siguientes iones, en m/z 324 de intensidad muy débil, sin percibir su isotopía en el ion en m/z 325 de intensidad no mayor a 24.03%, sin embargo, se identificó como el ion molecular (M^+), concordando con su peso molecular (324 u.m.a), su confirmación, fue posible con el análisis de los iones en m/z 292 $[M-32]^+$ (radical metoxilo $^+OCH_3$ mas un H), correspondiente a una perdida lógica del ion molecular; otra perdida en m/z 250 $[M-74]^+$, siendo el ion McLafferty, antes mencionado. El ion en m/z 208, se forma por la pérdida de un fragmento que contiene al grupo carboxilo por la escisión entre el carbono 5 y 6 con la



adición de un H [16]. Los iones en m/z 152, 138, 124, etc., por la pérdida del radical metilo H_2C^+ $[M-14]^+$. El ion en m/z 55 mencionado anteriormente por los iones hidrocarburos de formula $[C_nH_{2n-1}]^+$.

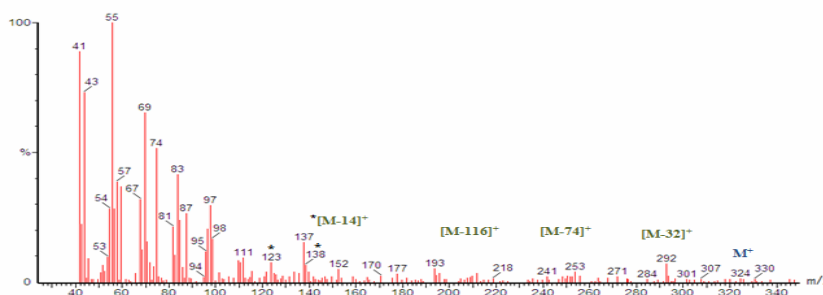


Figura 16. Espectro del ácido 11-Eicosenoico proveniente del TIC de la muestra BM.

3.3 Análisis del perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos FA identificados, se muestran en la tabla 3, observando la proporción relativa promedio expresada en porcentaje respecto al área total de $FA \pm$ error estándar identificados en el cromatograma, de los cuales, 5 ácidos fueron mayoritarios MFA y 2 minoritarios $MiFA$, estos últimos no observados en el TIC de la muestra CN , mencionado anteriormente. Los FA fueron el palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9), linoleico (C18:2n6), linolenico (C18:3) y eicosenoico (C20:1). Se puede decir que el tipo de ácidos grasos del perfil fueron iguales en todas las muestras analizadas.

Tabla 3. Composición de FA de diferentes métodos de extracción sin el uso de solventes*.

FA	BM ¹	FH ¹	M ¹	R ²	BU ¹
16:0	18.88±0.02	20.06±0.00	19.42±0.02	19.19	22.85±0.04
16:1	1.43±0.00	1.83±0.00	1.58±0.00	1.44	1.98±0.00
18:0	7.33±0.00	8.41±0.00	8.09±0.01	8.31	7.36±0.01
18:1	51.36±0.03	48.25±0.01	50.47±0.05	49.34	45.83±0.03
18:2	20.30±0.01	20.80±0.01	19.85±0.01	21.00	21.14±0.01
18:3	0.41±0.00	0.35±0.00	0.32±0.00	0.33	0.51±0.00
20:1	0.27±0.00	0.20±0.00	0.21±0.00	0.36	0.23±0.00

*valores promedio (%), ¹ n=2, ² n=1.



Los **FA** más abundantes en promedio en términos porcentuales fueron el C18:1 (49.05), C18:2 (20.62) y C16:0 (20.08). En comparación con **ES** estos fueron similares C18:1 (50.23), C18:2 (21.92) y C16:0 (18.34). En relación con las muestras de referencia, en **CI** se observaron proporciones mayores en C18:1 (53.48) y C16:0 (23.82), así como proporciones menores en C18:2 (10.51); en el caso de **CN**, mostro una proporción similar en C18:1 (50.93), mayor en C16:0 (22.03) y menor en C18:2 (13.61) (Tabla 4). En comparación con otros estudios como el de Wang y cols. [5], los valores fueron similares en C18:1 (49.90), menores en C16:0 (21.51) y en C18:2 (10.95), de igual manera fueron comparados con los obtenidos por Shimizu y col. [3], observando una similitud en C18:1 (49.90), mayores en C16:0 (24.60) y menores en C18:2 (10.00).

Tabla 4. Composición de FA de muestras control*.

FA	ES¹	CI²	CN²
C16:0	18.34±0.03	23.82	22.03
C16:1	1.72±0.00	3.44	3.15
C18:0	7.07±0.01	8.28	10.17
C18:1	50.23±0.05	53.48	50.93
C18:2	21.91±0.01	10.51	13.61
C18:3	0.42±0.00	0.33	0.00
C20:1	0.25±0.00	0.12	0.00

*valores promedio (%), ¹ n=2, ² n=1.

Por su parte, el contenido de C16:1, fue bajo en comparación con el aceite comercial, así como, por lo reportado en diversos estudios [3,4,5,7,18], de igual forma en C18:0.

El ácido graso más abundante en todas las muestras evaluadas fue el oleico, lo cual, fue acorde con diversos autores [3,4,5,7,18], siendo el método de mayor proporción **BM** (51.36%) y **M** (50.47%), el cual fue ligeramente mayor de lo reportado por Wang y cols. [5] y Shimizu y col. [3]; dicho ácido puede mejorar la penetración de compuestos biológico activos, que son benéficos para la piel y es ampliamente utilizado como soporte de bases en la industria cosmética [5]. Por su parte se identificaron 2 ácidos grasos esenciales uno de la familia n-6 (linoleico) y el otro no fue posible determinar la familia al que pertenece



(linolenico); por su parte los ácidos considerados de la familia n-6 son muy importantes por su doble enlace localizado en el C6 del metilo terminal, la cual se considera una posición importante que permite la actividad de algunas enzimas [19]. Sin embargo, Wang y cols. [5] no reportaron presencia de linolenico.

Se puede decir que mediante el análisis de su composición porcentual el **PFA** del aceite extraído sin el uso de solventes, en comparación con las muestras de referencia y de comparación (**ES**, **CI** y **CN**), mostro un perfil igual y de concentraciones similares con excepción del ácido esencial linoleico C18:2, observando una diferencia importante de casi el doble de su proporción en comparación con las muestras de referenci; dicho comportamiento fue observado también en los estudios de Wang y cols. [5] y Shimuzu y col. [3], los cuales, provienen del depósito adiposo espalda baja. En comparación con otros estudios provenientes de diferentes depósitos adiposos, se observo el mismo comportamiento [4,7,18].

Un análisis comparativo del **PFA** de la bibliografía consultada y el obtenido en el presente trabajo (Tabla 5), mostro en todos los perfiles, los mismos ácidos grasos mayoritarios (palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico y linoleico), observando diferencias en los ácidos minoritarios.

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos de diversas fuentes.

FA	MSD*	Thompson, 2002	Grompone y cols., 2005	Wang y cols., 2000	Reyes y cols., 2008	Shimizu y col., 2003
C14:0		+				
C16:0	+	+	+	+	+	+
C16:1	+	+	+	+	+	+
C18:0	+	+	+	+	+	+
C18:1t		+				
C18:1n9	+	+	+	+	+	+
C18:1n7				+		
C18:2n6c	+	+	+	+	+	+
C18:3	+				+	+
C20:0		+	+	+		
C20:1	+			+		
C20:4n6				+		

*Aceite extraído con métodos sin disolventes



Si bien, Thompson [18], publicó un rango porcentual de cada ácido, proveniente de diversos estudios de científicos australianos, observando que los valores reportados por los autores mencionados en la figura 17, se encontraron dentro de dicho rango, sin embargo, la identificación de ácidos minoritarios fue diferente para cada autor, al igual que en el presente trabajo; diferencias que podrían deberse al proceso de extracción y refinación, así como del hábitat del emú [2].

La figura 17, muestra la composición porcentual de los ácidos grasos saturados *SFA*, monoinsaturados *MUFA*, poliinsaturados *PUFA*, así como, los ácidos grasos mayoritarios *MFA* y minoritarios *MiFA*.

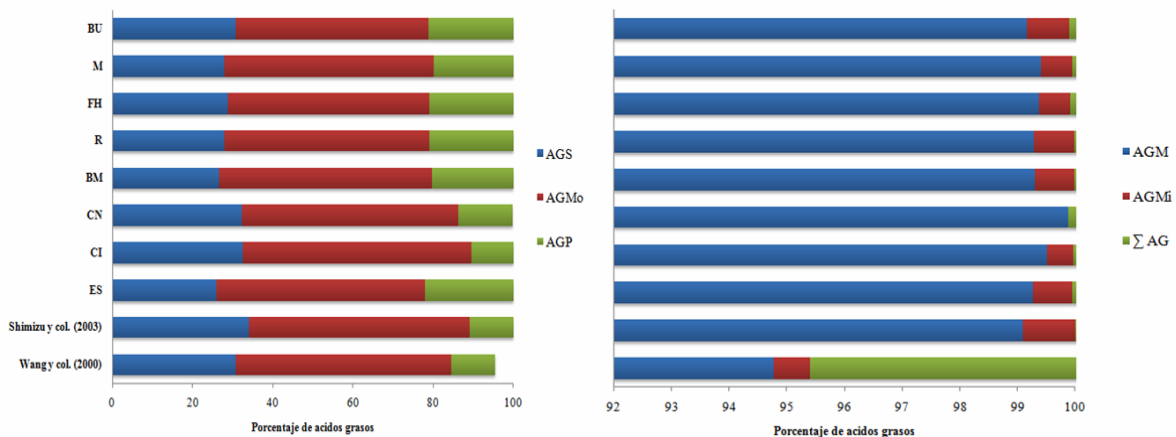


Figura 17. Contenido porcentual del grupo de ácidos grasos del aceite de emú.

El grupo de *FA* en todas las muestras fue similar, su composición porcentual fue de aproximadamente 99.9, de los cuales 99.35 corresponden a *MFA* y 0.65 de *MiFA*. La proporción de *MUFA* representó poco más del 50% de la composición, seguido de *SFA* con un poco más del 28% y aproximadamente un 20% de *PUFA*.

Comparando el grupo de *FA* presentes en el aceite de emú extraído sin el uso de solventes con lo reportado en la literatura, se observó una proporción menor en promedio de 4% en *SFA*, una proporción mayor de 3.4% en *MUFA* y de 9.69% en *PUFA*.



El método **BM**, mostro la menor proporción de **SFA** y la mayor proporción en **MUFA** entre los métodos de extracción sin el uso de solventes. **BU**, mostro la proporción mayor en **PUFA**.

La muestra nacional mostro un perfil con valores mayores en **SFA** en un 82% y una producción menor de **PUFA** de casi un 100%, sin embargo, para el ácido palmitoleico este fue mayor en casi un 50%, en comparación con el resto de las muestras evaluadas y lo reportado en bibliografía.

3.2.1 Análisis estadístico

Los perfiles de ácidos grasos fueron analizados a través del análisis de varianza (ANOVA), usando el software NCSS 2007. Observando que el **PAG** no fue significativo, lo cual puede indicar que los métodos utilizados en la extracción del aceite de emú, no muestran un efecto en la composición del aceite.

Conclusiones

El aceite de emú proveniente del depósito adiposo espalada baja, extraído sin el uso de solventes, a través de los cromatogramas **TIC**, mostraron un total de 7 ácidos grasos, de los cuales, 5 son acordes con los perfiles de ácidos grasos reportados por diversos autores.

La identificación de 34 ácidos grasos de los 37 componentes del estándar externo, permitió la identificación de los ácidos grasos mayoritarios y minoritarios en muestras de aceite de emú.

De acuerdo con los análisis realizados, se puede concluir que, los ácidos grasos presentes en los aceites extraídos sin el uso de solventes son el ácido palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolenico (C18:3) y eicosenoico (C20:1), dicho perfil de ácidos grasos fue acorde con lo reportado por diferentes autores, mismo que fueron identificados en el aceite extraído con solventes y



el adquirido de importación, sin embargo, en el aceite comercial nacional, no fue posible visualizar los ácidos linolenico (C18:3) y 11-Eicosenoico (C20:0).

El análisis de los fragmentos principales de cada espectro de las muestras evaluadas, dio como resultado el mismo ácido graso identificado por comparación con el estándar y la librería NIST.

El perfil de ácidos grasos reflejó diferencias en ácidos minoritarias vs. lo reportado en otros estudios, donde el ácido graso C18:3 solo es reportado por Shimizu y col. [7], respecto al mismo depósito adiposo, por su parte Reyes y cols. [8], también lo reportaron sin especificar el depósito adiposo, en el caso del C20:1 fue reportado por Wang y cols. [6], el resto de los autores no reportan estos ácidos grasos [9, 18].

El perfil de ácidos grasos del aceite de emú mostró una proporción promedio del 99.94%, constituida de 7 ácidos grasos, de los cuales el 28.36% son saturados, 50.96% son monoinsaturados y 20.62% son poliinsaturados, los cuales son ácidos grasos esenciales.

No se observó diferencia significativa entre los perfiles de ácidos grasos, en el análisis estadístico realizado, debido a que los métodos utilizados no degradaron el aceite obtenido.

Agradecimientos

A la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del IPN, laboratorio de Catálisis y Materiales por las facilidades prestadas en la realización de las pruebas instrumentales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado durante el desarrollo del presente trabajo.



Recomendaciones

El estudio detallado del estándar externo a través de GC-MS en la identificación de los 37 componentes, es importante para la caracterización de trazas que pudieran estar presentes en el aceite de emú.

Es importante realizar análisis más detallados que permitan confirmar la presencia del ácido graso de configuración *trans* (elaídico), el cual, pudo ser identificado en pruebas previas en un **GC-MS** marca (Varian, Satur 2100 D), así como, otros ácidos grasos de configuración *cis* (laurico, mirístico, oleico n-7, araquídico y araquidónico).

El estudio de la composición química, permitiría confirmar si el aceite extraído sin solventes puede tener un perfil de calidad sin la necesidad de someterlo a un proceso de refinación.

Bibliografía

1. Badui Dergal, S. (1988). *Química de los alimentos*. Alhambra Mexicana.
2. Snowden, J. M., y Whitehouse, M. W. (1997). Anti-inflammatory Activity of Emu Oil in Rats. *Inflammopharmacology*, 5, 127–132.
3. Shimizu, S., y Nakano, M. (2003). Molecular Species of Triacylglycerol isolated from Depto Fats of ratites. *Journal of Oleo Science*, 52, 57-63.
4. Grompone, M. A., y Irigaray, B.; Gil, M. (2005). Composition and thermal properties of Rhea oil and its fractions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 107, 762–766.
5. Wang, Y. W., Sunwoo, H., y Sim, J. S. (2000). Lipid characteristics of emu meat and tissues. *Food and Nutritional Science*, 7, 71-82.
6. Márquez, R., Repiso, L., Sala, A., Salié, L., y Silvera, C. (2007). Estudio de una tecnología de extracción y fraccionamiento de aceite de ñandú de alta calidad para



- su utilización en la industria cosmética y farmacéutica. *Laboratorio de tecnológico del Uruguay*, (2).
7. Reyes, L., Gárnica, A., y Cruz, M. J. (2008). Diseño de una forma farmacéutica de uso tópico de acción inflamatoria y analgésica a base de emú. Oaxaca, 21-24 octubre, (poster).
 8. Gunstone, F. D. (2008). *Oils and fats in the food industry* (1a. Ed.). USA: A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. ISBN: 978-1-4051-7121-2.
 9. Whitehouse, M. W., Turner, A. G., Davis, C. K. C., y Roberts, M. S. (1998). Emu oil(s): A source of non-toxic transdermal anti-inflammatory agents in aboriginal medicine. *Inflammopharmacology*, 6, 1-8.
 10. Dobson, G., y Christie, W. W. (2002). Spectroscopy and spectrometry of lipids – Part 2. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 104, 36-43.
 11. Lumley, I. (n.d.). Procedures used to quantitatively determine fatty acids: An Examination of Critical Points in the Analytical Procedure. MAFF Project AN0639. Pp. 10-13 y 20-22.
 12. William, C. (1998). Gas Chromatography-Mass Spectrometry Methods for Structural Analysis of Fatty Acids. *Lipids*, 33, 343-353.
 13. Ábalos, A., Espuny, M. J., Bermúdez, R. C., y Manresa, A. (2003). Aplicación de la Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (GC/MS) en la caracterización química de los polihidroxicanoatos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Revista cubana de Química*, 15, 3-10.
 14. Gutiérrez, R., y Pérez, M. C. (2000). Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J. Chromatogr. A.*, 885, 321–341.



15. Gutiérrez, M. C. y Droguet, M. (2002). La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín intexter (U.P.C.)*, 122, 35-41.
16. www.lipidlibrary.co.uk/topics/extract2/index.htm. Christie, W.W. (2009). The Scottish Crop Research Institute.
17. Guzmán, R. I. (2003). Doctor en Ciencias con especialidad en Alimentos. Tesis: “Efecto del Tratamiento Térmico con Microondas en los Lípidos y Volátiles del Aguacate (*Persea americana*). Departamento de Alimentos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. México, D.F. Fecha de Examen de Grado: 17 de Noviembre de 2003.
18. Thompson, P. (2002). “Second Draft” Emú oil research and documentation collation. Tjurinda Emu Products Maleny. Q. 4552.
19. Vielma, R., Usubillaga, A., y Medina, A. (2003). Estudio preliminar de los niveles de ácidos grasos de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 45, 39-44.



CONCLUSIONES GENERALES

Los métodos utilizados para la extracción fueron factibilidad para la obtener aceite de emú, de propiedades físicas como el color, densidad e índice de refracción, similares a lo reportado en bibliografía. Además fueron técnicas rápidas y de tecnologías accesibles, así como de un valor considerable, al no requerir el uso de solventes, los cuales son eficientes, sin embargo, es una técnica lenta, que requiere de cantidades considerables de solventes, aunado a los altos costos en el equipo o en el proceso de producción.

El aceite obtenido, no mostro daño estructural por las condiciones utilizadas en los procesos, confirmado en el análisis espectroscópico. Los perfiles de ácidos grasos identificados, no mostraron diferencias en su composición entre si y las proporciones no variaron significativamente, permitiendo observar que los métodos evaluados no influyeron en la composición y proporción de los ácidos grasos del aceite. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en comparación con muestras comerciales y referencias bibliográficas, tal es el caso del ácido linoleico de proporción promedio (20.5%), en comparación con lo reportado en estudios anteriores de aproximadamente (10.5%), de igual manera en muestras comerciales.

Con estos resultados se rechaza la hipótesis planteada donde la composición y proporción del perfil de ácidos grasos del aceite de emú no varió en fusión del proceso de extracción, entre los métodos evaluados en el presente estudio.



RECOMENDACIONES GENERALES

Si bien, el presente estudio permitió obtener resultados importantes en la caracterización del aceite de emú, queda trabajo por realizar en busca de confirmar que el aceite de emú proveniente de emús criados en México, puede ser explorado con miras a su comercialización en la industria cosmética y farmacéutica, entre otras aplicaciones, apegándose a la calidad requerida a través de un análisis sistemático de factores determinantes como el proceso de extracción, así como de mecanismos de análisis apegados a una caracterización más detallada.

Lo antes mencionado, propone evaluar otros métodos de extracción, considerando condiciones de operación, para determinar el efecto en las propiedades fisicoquímicas y el rendimiento.

Por su parte, se propone una evaluación más profunda de la columna y del detector del espectrómetro de masas, debido a que fueron detectadas diferencias en la identificación de los perfiles de ácidos grasos minoritarios, indicando su influencia en los resultados.

Con base a las diferencias observadas en los estudios realizados, diversos factores pueden influir en los resultados, que deben ser analizados, tal como: la parte adiposa, la edad, la alimentación, el entorno de desarrollo del emú, entre otros.



BIBLIOGRAFÍA GENERAL

1. Whitehouse, M. W., Turner, A. G., Davis, C. K. C., y Roberts, M. S. (1998). Emu oil(s): A source of non-toxic transdermal anti-inflammatory agents in aboriginal medicine.
2. Grompone, M. A., Irigaray, B., y Gil, M. (2005). Composition and thermal properties of Rhea oil and its fractions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 107, 762–766.
3. Salvi, M. A., Hilbing, A., Sereno, M., Sereno, J., y Rotondo, J. (2007). Aceite de ñandú: su uso para favorecer la cicatrización en equinos. *Clínica veterinaria*, 2, 1-6.
4. Wang, Y. W., Sunwoo, H., y Sim, J. S. (2000). Lipid characteristics of emu meat and tissues. *Food and Nutritional Science*, 7, 71-82.
5. Gómez de Silva, H., Oliveras de Ita, A., y Medellín, R.A. (2005). *Dromaius novaehollandiae*. *Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales*. Obtenida el 7 de febrero de 2005, de <http://www.conabio.gob.mx/>
6. www.emufacts.com. Hernández, E. (n.d.). Food Protein Research & Development Center, Texas A&M University.
7. Rabasco, A. M., y González, M. L. (2000). Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y Aceites*, 51, 74-96.
8. Graham, T. W. (1999). *Química Orgánica*. México, D.F.: Limusa Wiley.
9. <http://lipidlibrary.aocs.org>. Christie, W. W. (2009). The Scottish Crop Research Institute.
10. Hara, A., y Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90, 420-426.



11. Silverstein, R., Webster, F., y Kiemle, D. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds* (7th Ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-39362-2.
12. Jiménez, M. E., Aguilar, M., Zambrano, M., y Kolar, E. (2001). Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate obtenido de puré deshidratado por microondas. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 45, 89-92.
13. Gutiérrez, R., y Pérez, M. C. (2000). Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J. Chromatogr. A.*, 885, 321–341.
14. Graciani, E. (2006). *Los aceites y las grasas: composición y propiedades* (1er Ed). Graficas Rogar. ISBN: 84-87440-36.
15. Guzmán, R. I. (2003). Doctor en Ciencias con especialidad en Alimentos. Tesis: “Efecto del Tratamiento Térmico con Microondas en los Lípidos y Volátiles del Aguacate (*Persea americana*). Departamento de Alimentos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. México, D.F. Fecha de Examen de Grado: 17 de Noviembre de 2003.

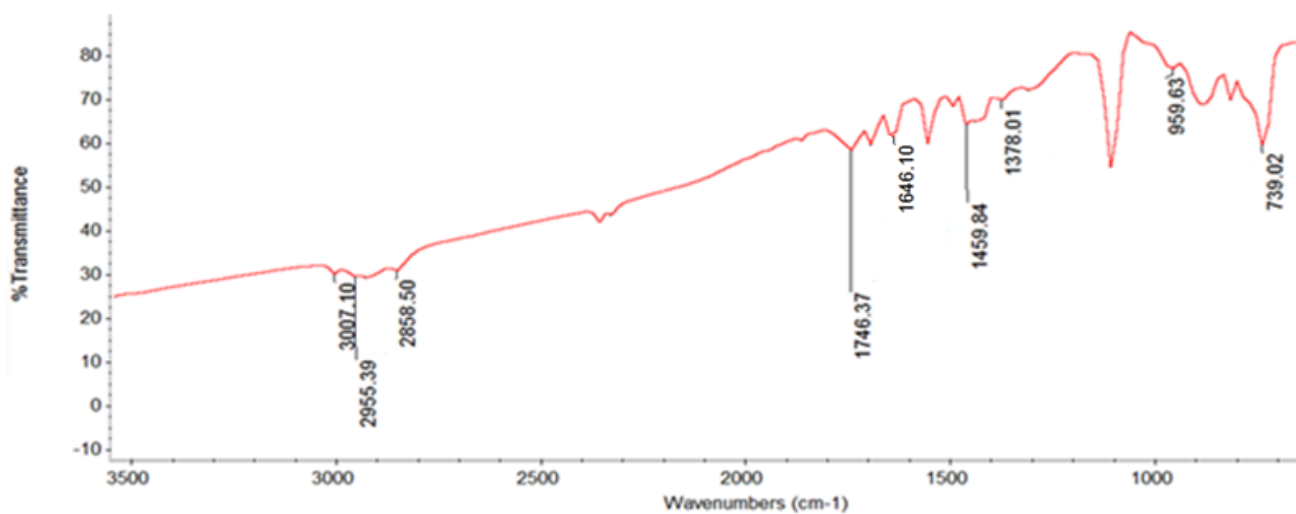


ANEXOS

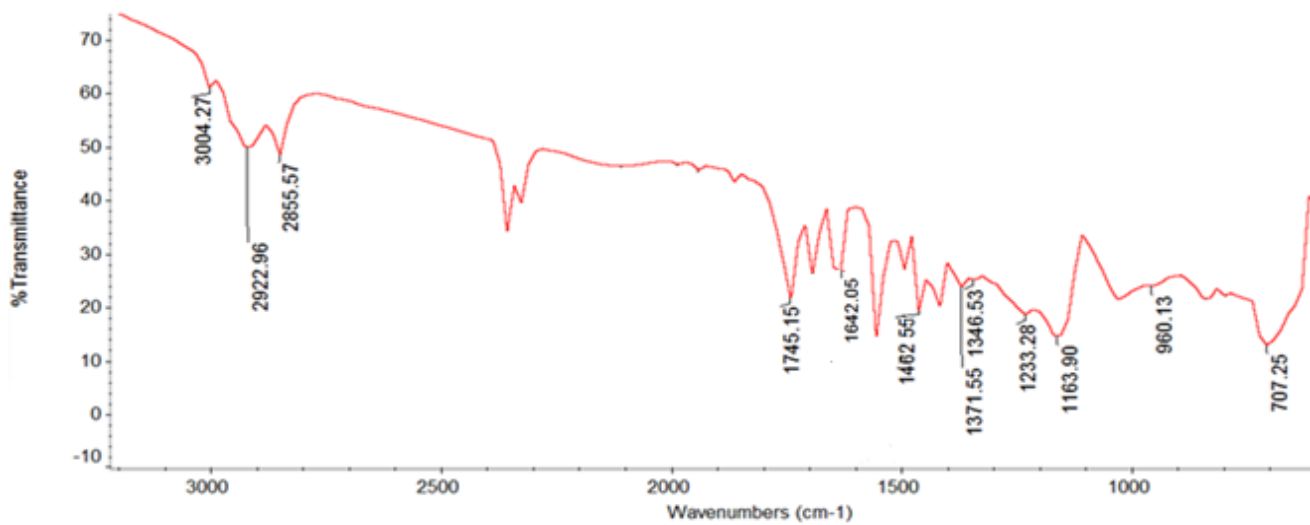
Anexo 1

Espectros IR correspondientes a los extractos evaluados.

FH

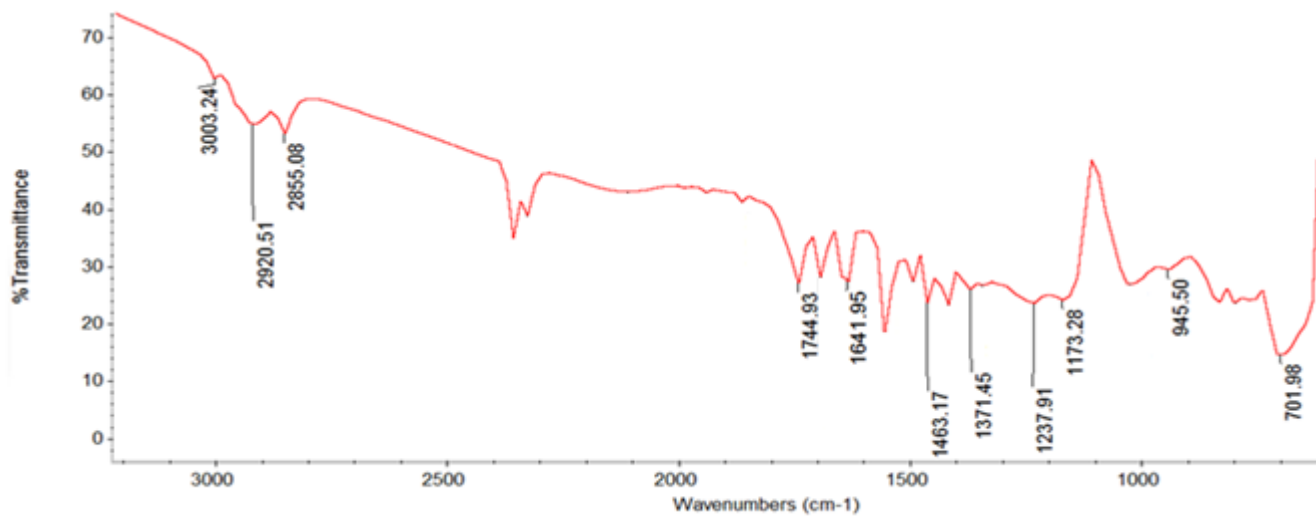


M

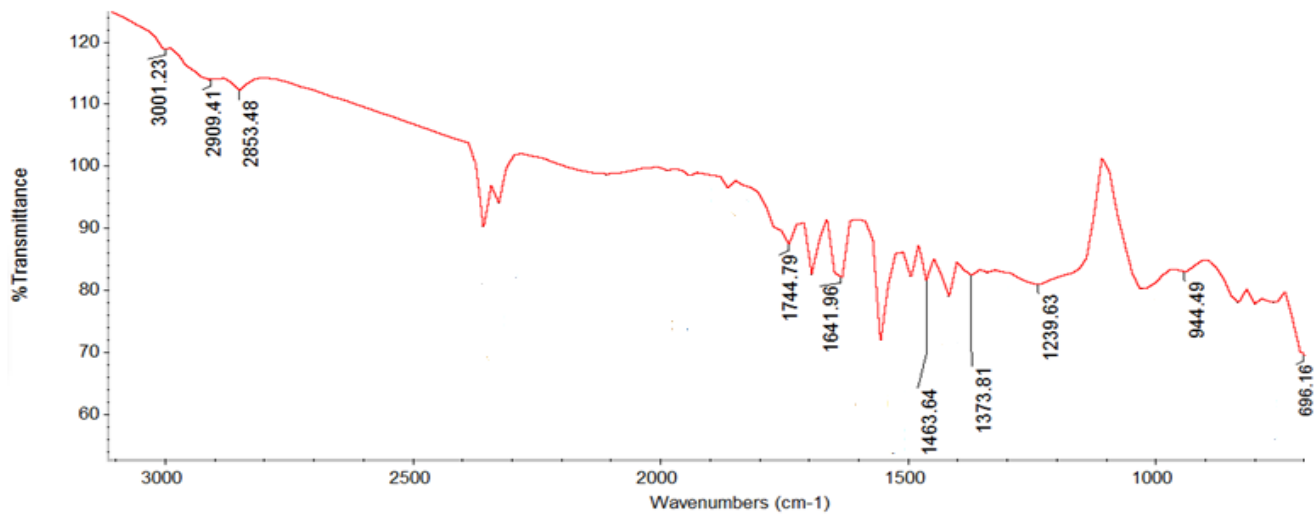




R

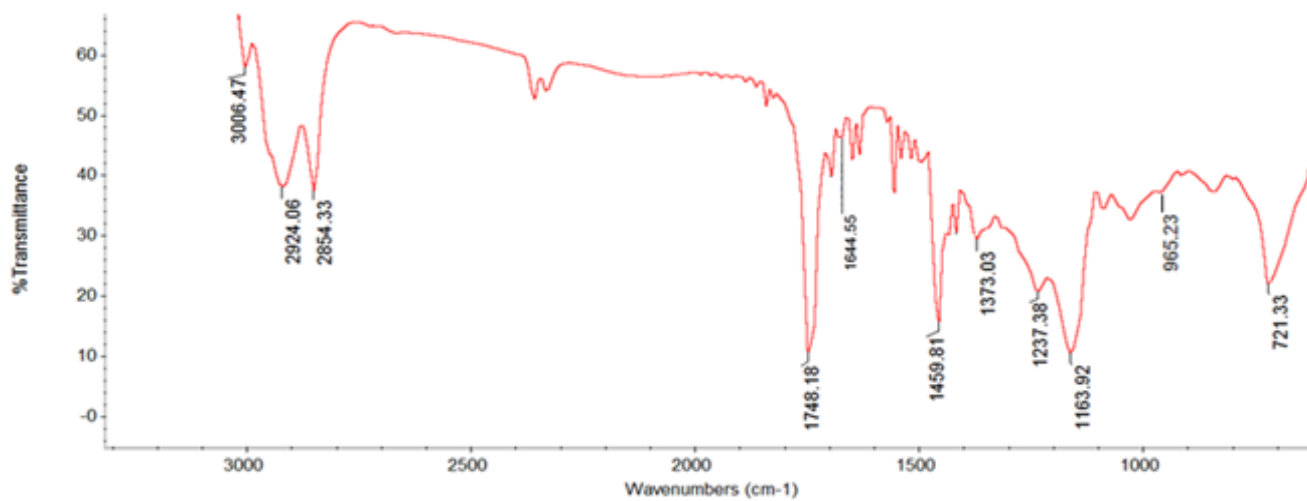


BM

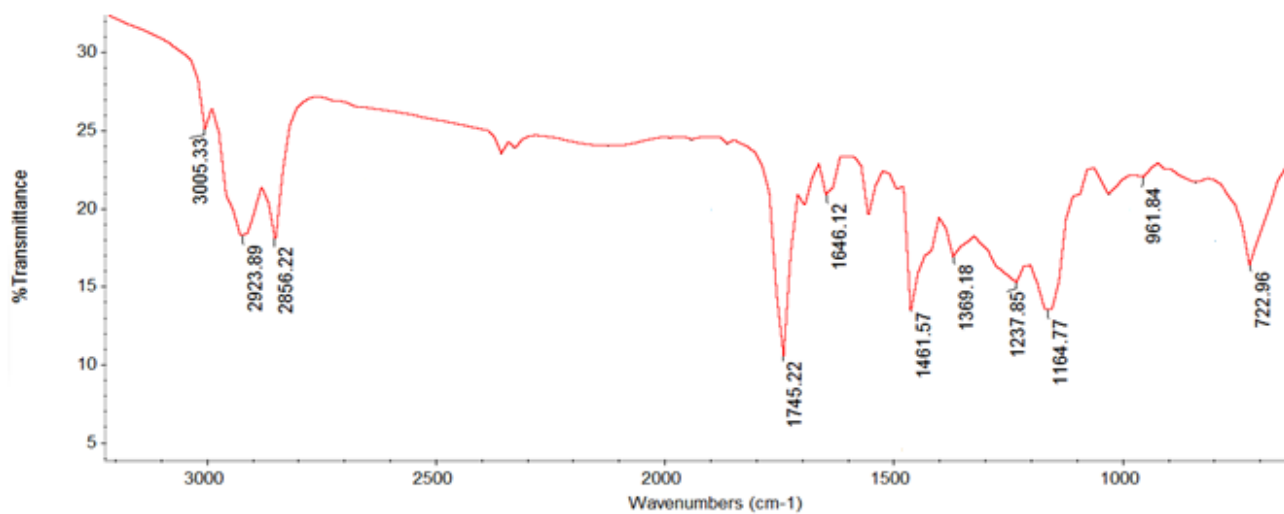




BU

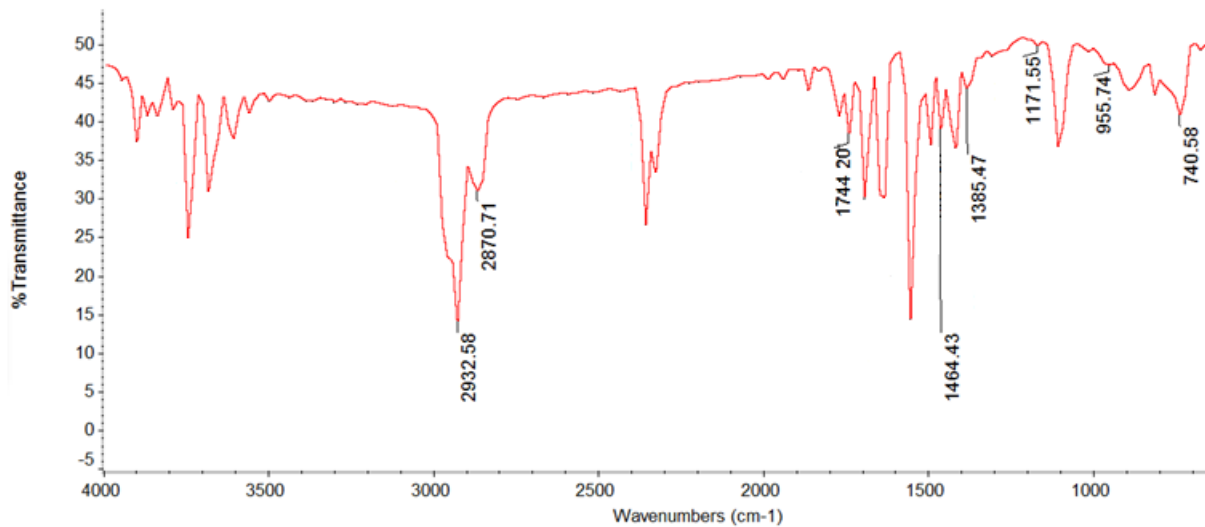


ES

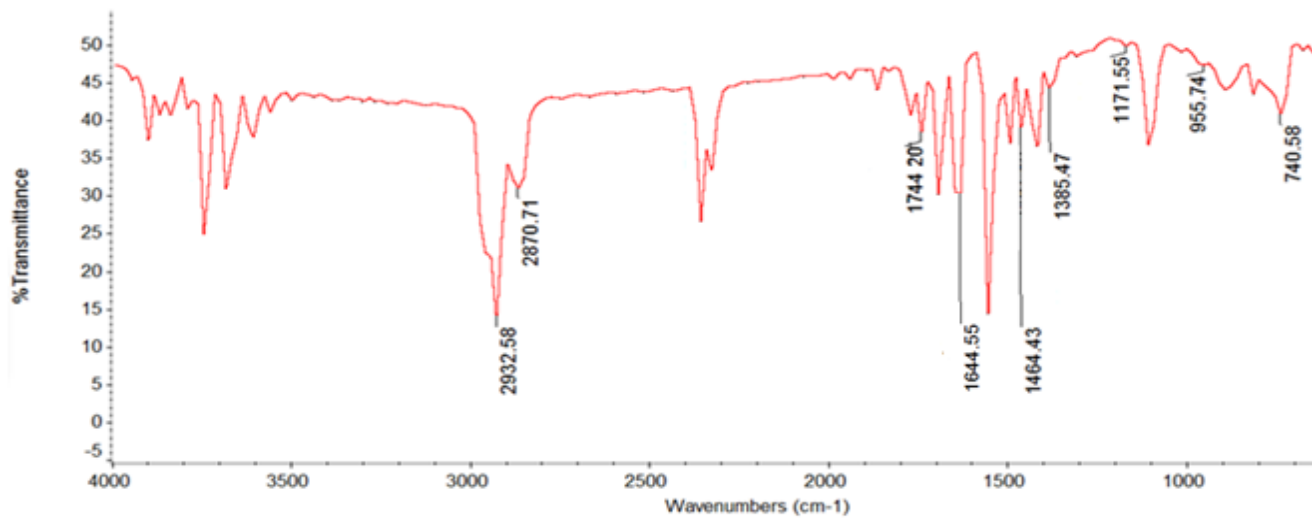




CN



CI





Anexo 2

Concentrado: tiempos de retención y áreas, obtenidos de los cromatogramas TIC.

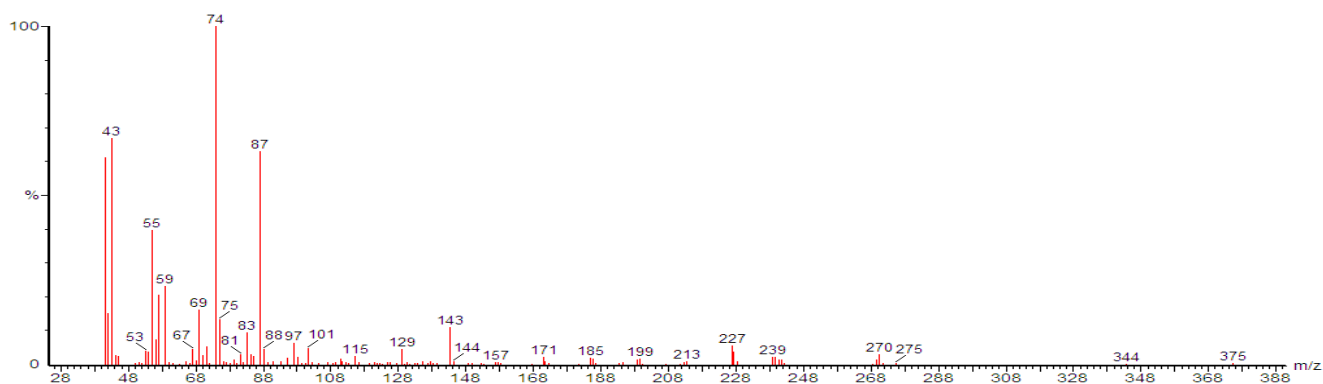
Muestra	Método	Pico 1		Pico 2		Pico 3		Pico 4		Pico 5		Pico 6		Pico 7	
		TR	AREA	TR	AREA	TR	AREA	TR	AREA	TR	AREA	TR	AREA	TR	AREA
1	ES	27.36	85214	28.35	8366	31.03	31782	31.89	189923	33.25	91188	34.86	1817	35.61	1031
2	ES	27.12	64431	28.13	5649	30.86	25925	31.78	219526	33.12	87440	34.71	1626	35.45	1041
1	BM	27.16	111511	28.15	8189	30.90	43856	31.82	336813	33.16	122524	34.75	2085	35.43	1573
2	BM	27.35	240133	28.34	18648	30.99	92238	31.89	589339	33.21	253130	34.84	5814	35.56	3442
1	FH	27.36	87950	28.35	8073	31.03	37180	31.89	210849	33.25	95333	34.83	1738	35.54	792
2	FH	27.12	32817	28.13	2990	30.88	13645	31.76	79167	33.12	32501	34.75	488	35.41	346
1	M	27.42	79196	28.41	6553	31.07	32840	31.95	175816	33.29	78434	34.88	1294	35.61	720
2	M	27.11	63853	28.10	5067	30.85	26744	31.74	194853	33.08	67726	34.71	1074	35.43	807
1	R	27.35	227288	28.34	17094	30.99	98386	31.89	584338	33.21	248658	34.83	3931	35.54	4311
2	BU	27.40	118986	28.39	10593	31.07	47021	31.95	286508	33.29	132169	34.90	2903	35.58	1986
1	BU	27.11	31092	28.13	2629	30.85	8274	31.73	52794	33.08	24354	34.71	641	35.39	167
1	CI	27.38	175742	28.37	25350	31.06	61104	31.93	394621	33.27	77549	34.90	2431	35.60	913
1	CN	27.40	29625	28.41	4232	31.05	13681	31.93	68501	33.29	18312				

Anexo 3

Espectros de masas de los picos de interés de los cromatogramas correspondientes a las muestras extraídas de los diferentes métodos y muestras comerciales.

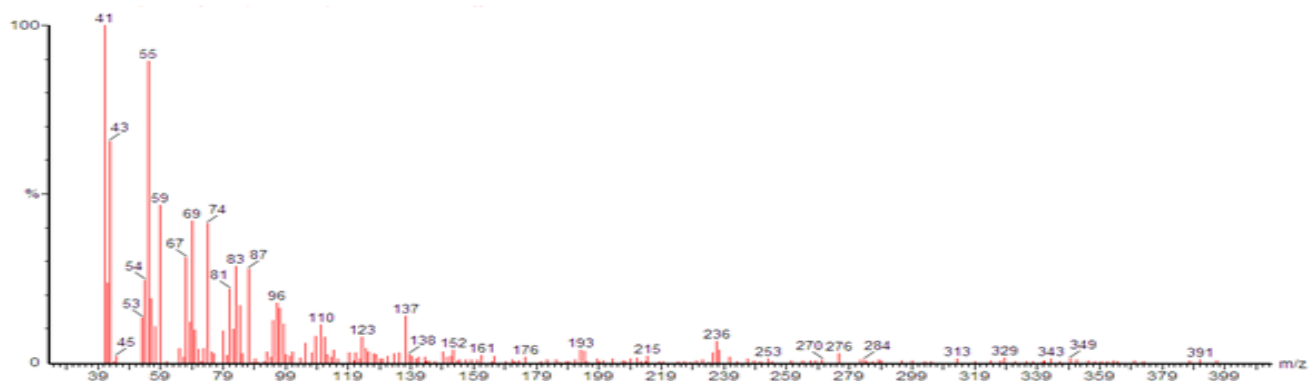
Método ES

Pico 1 ($R_T=27.36$)

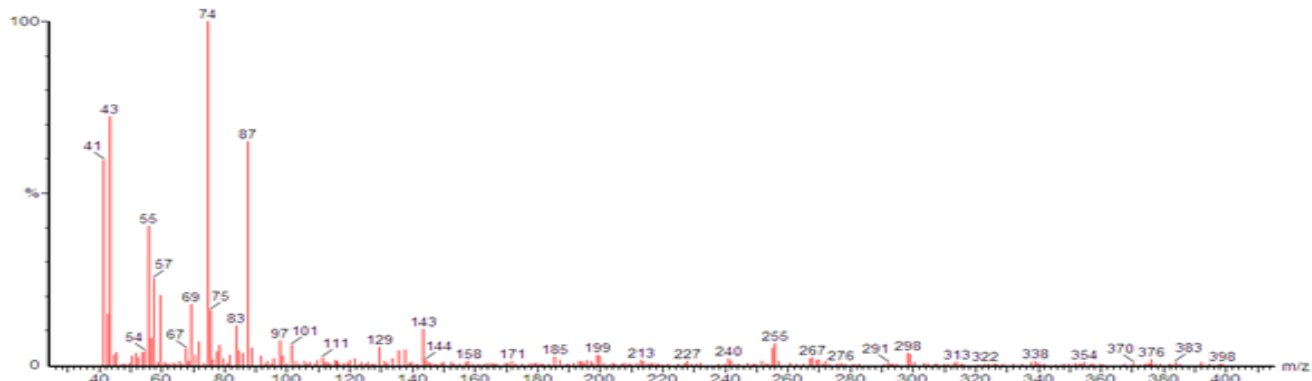




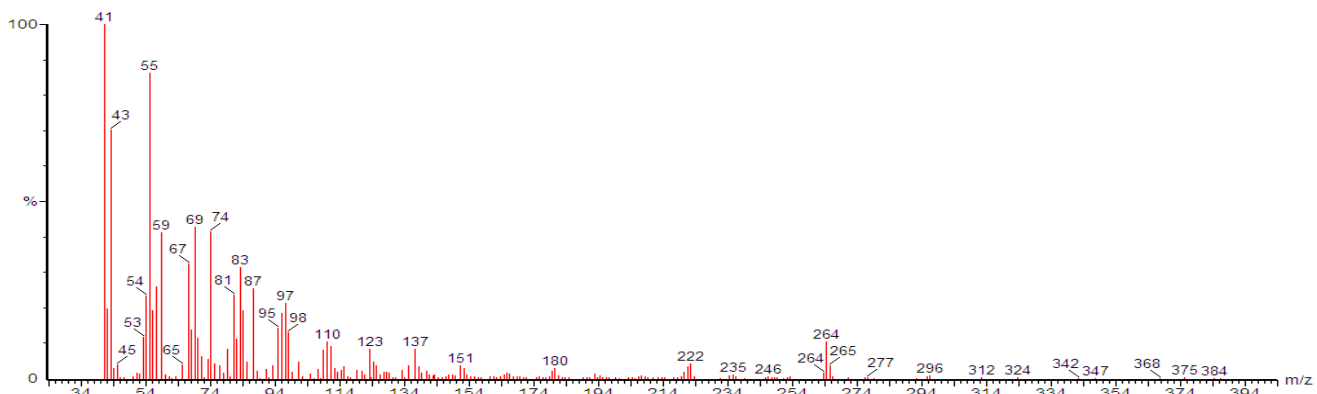
Pico 2 ($R_T=28.35$)



Pico 3 ($R_T=31.03$)

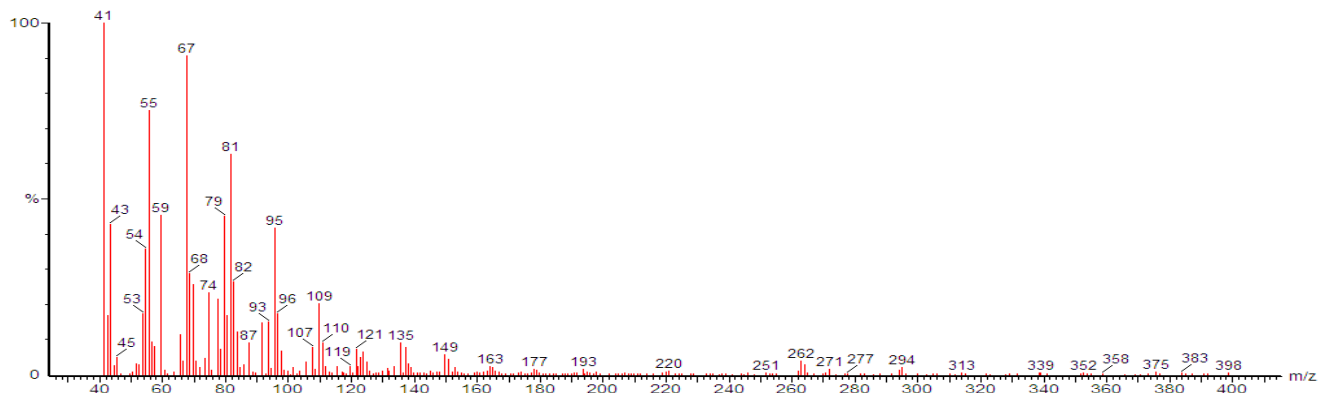


Pico 4 ($R_T=31.89$)

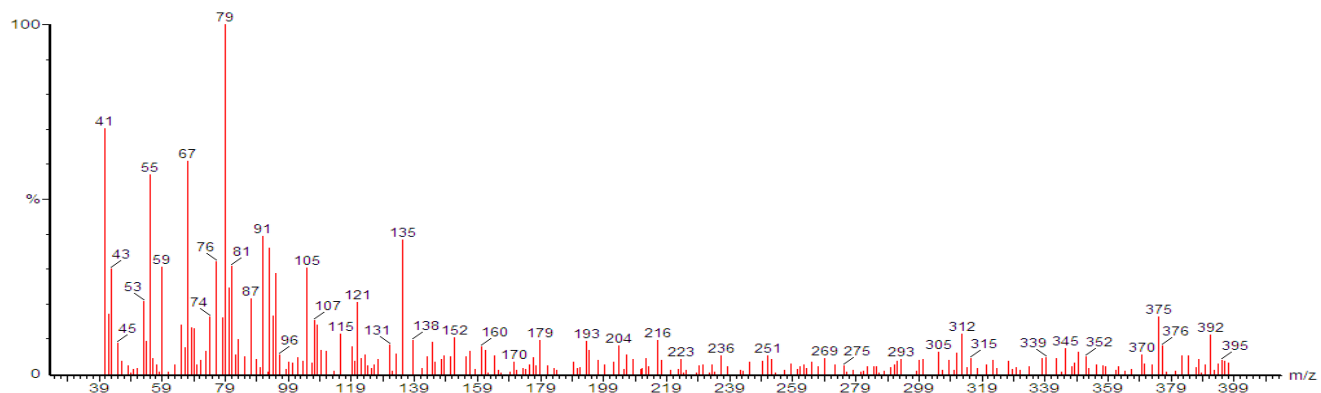




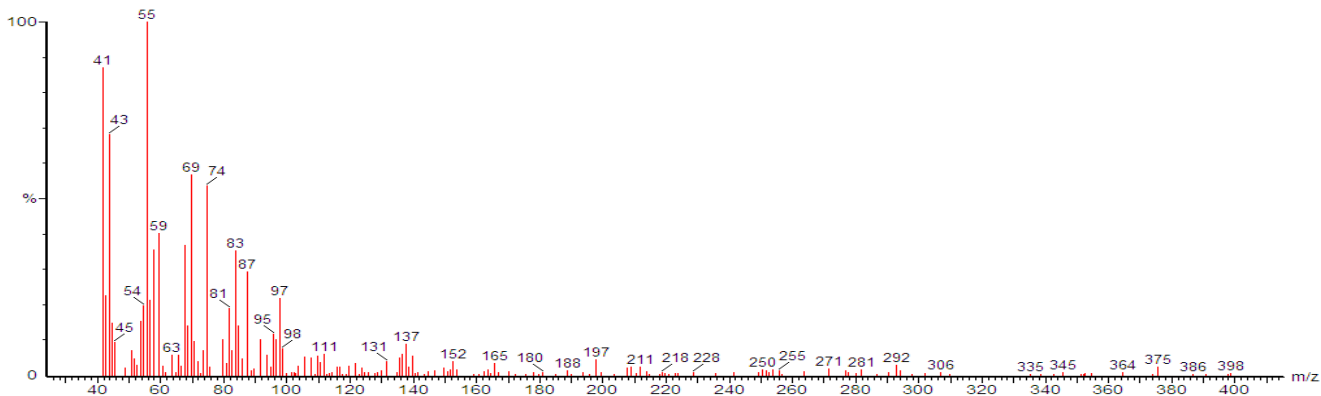
Pico 5 ($R_T=33.24$)



Pico 6 ($R_T=34.86$)



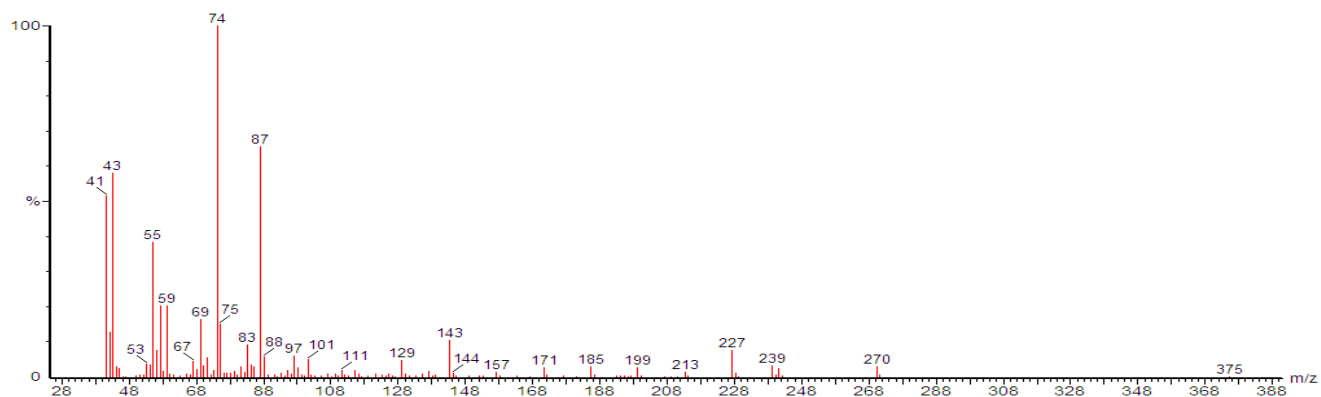
Pico 7 ($R_T=35.44$)



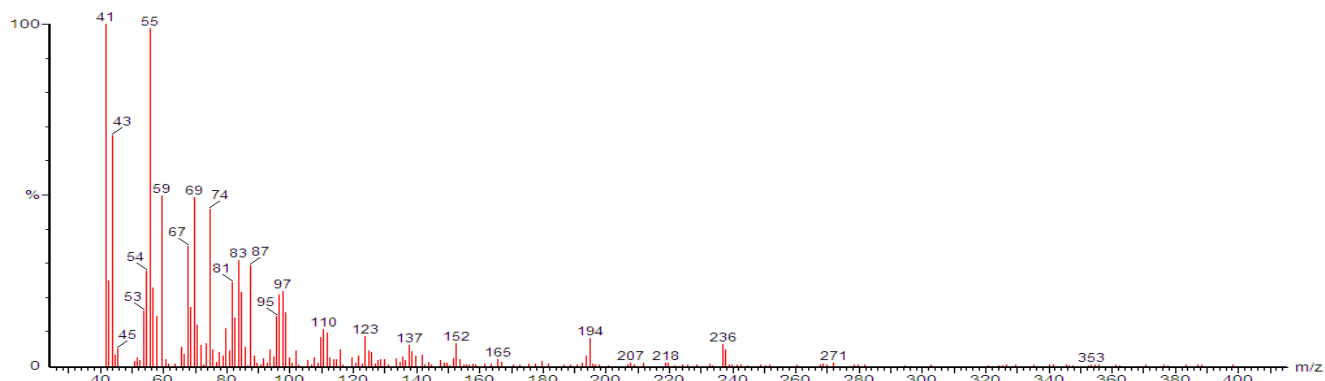


Método *BM*

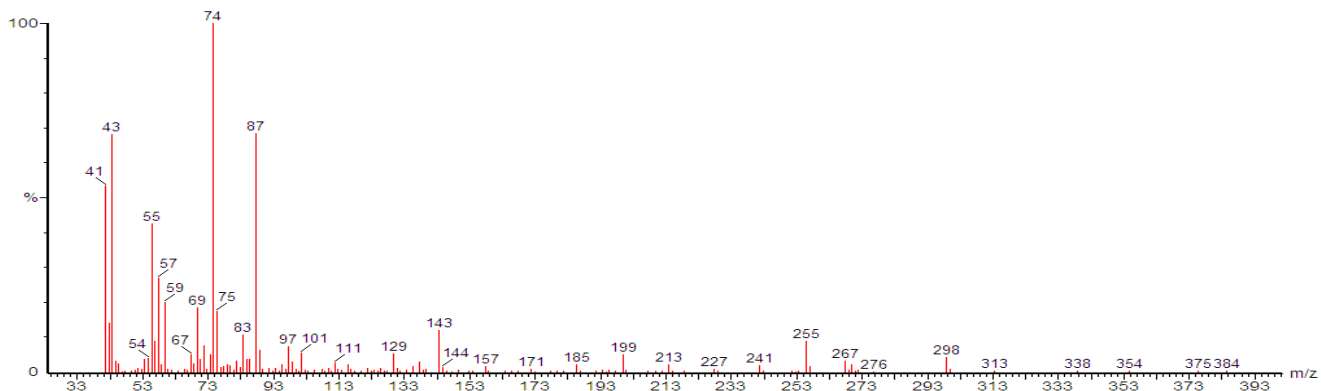
Pico 1 ($R_T=27.16$)



Pico 2 ($R_T=28.15$)

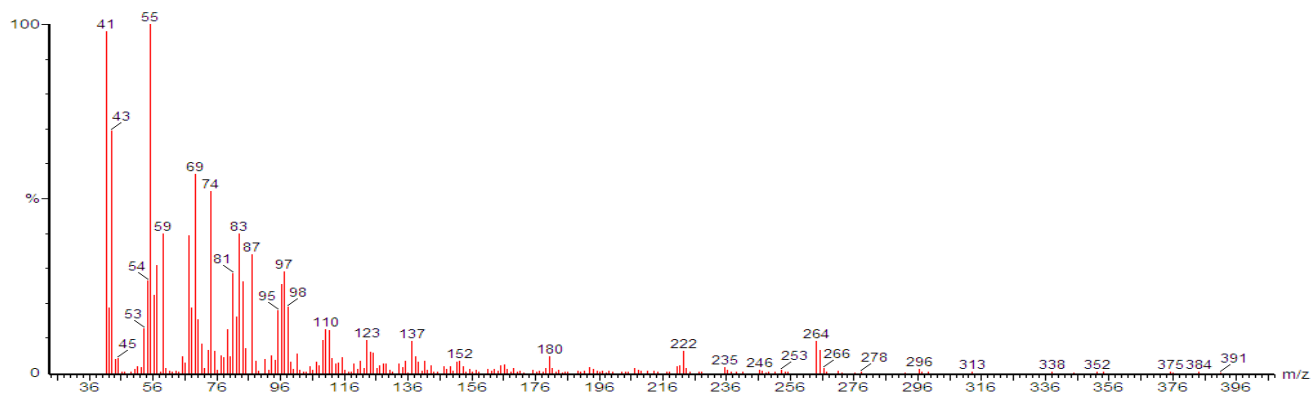


Pico 3 ($R_T=30.90$)

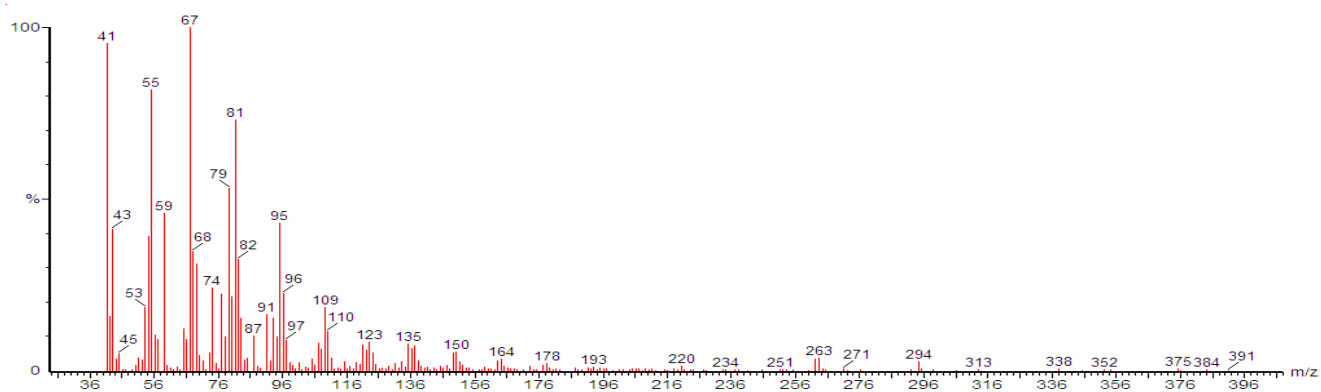




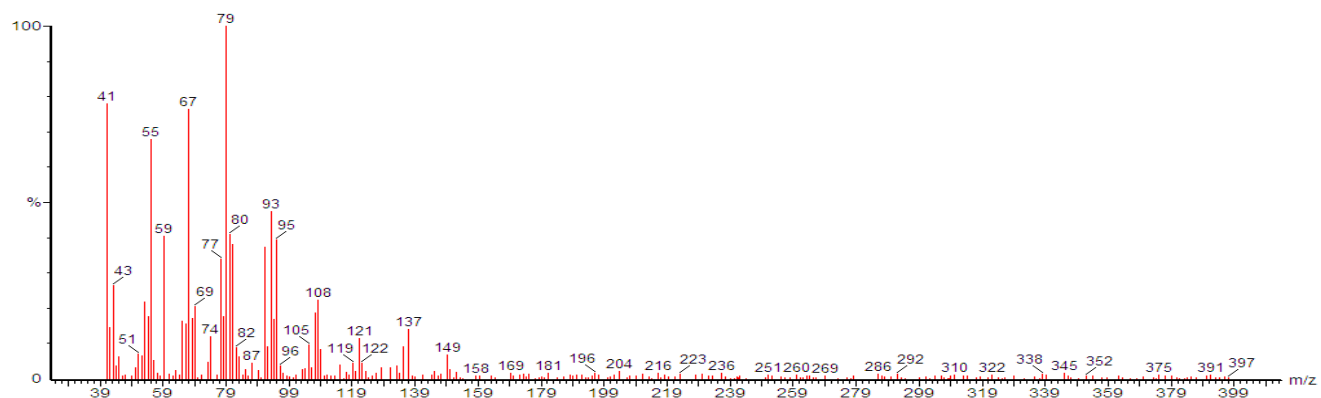
Pico 4 ($R_T=31.81$)



Pico 5 ($R_T=33.15$)

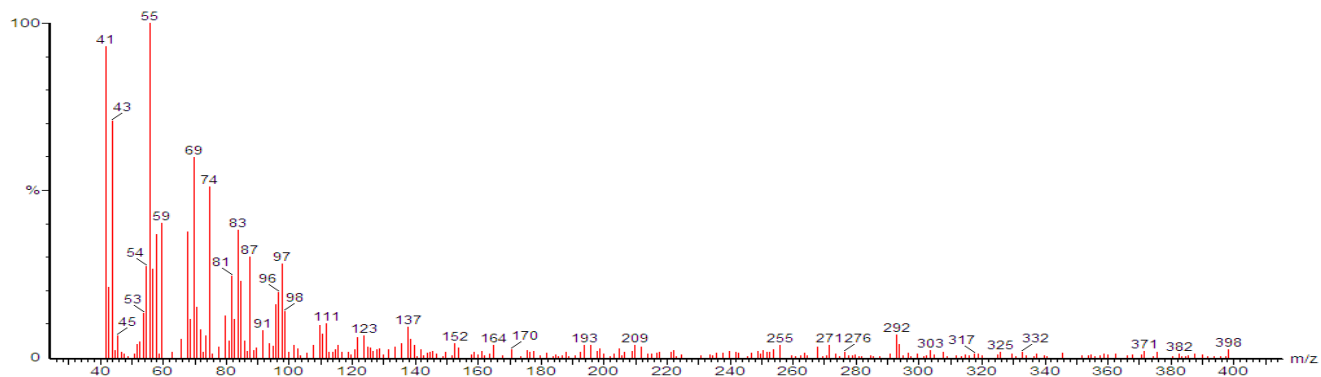


Pico 6 ($28R_T=384.75$)



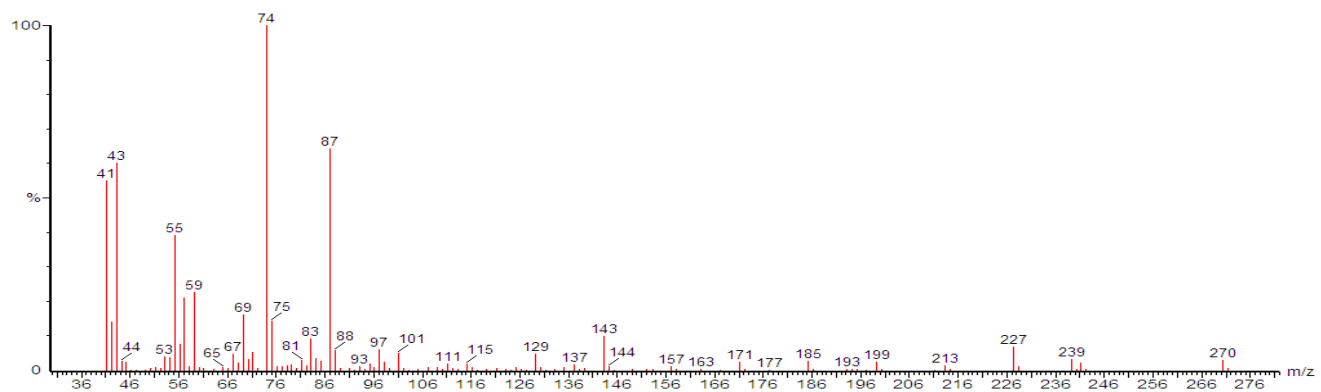


Pico 7 ($R_T=35.42$)

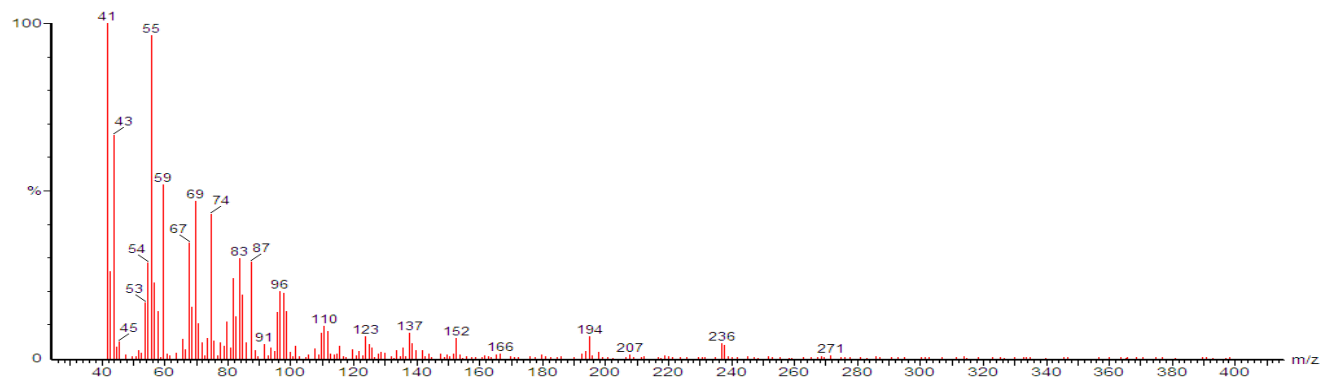


Método M

Pico 1 ($R_T=27.06$)

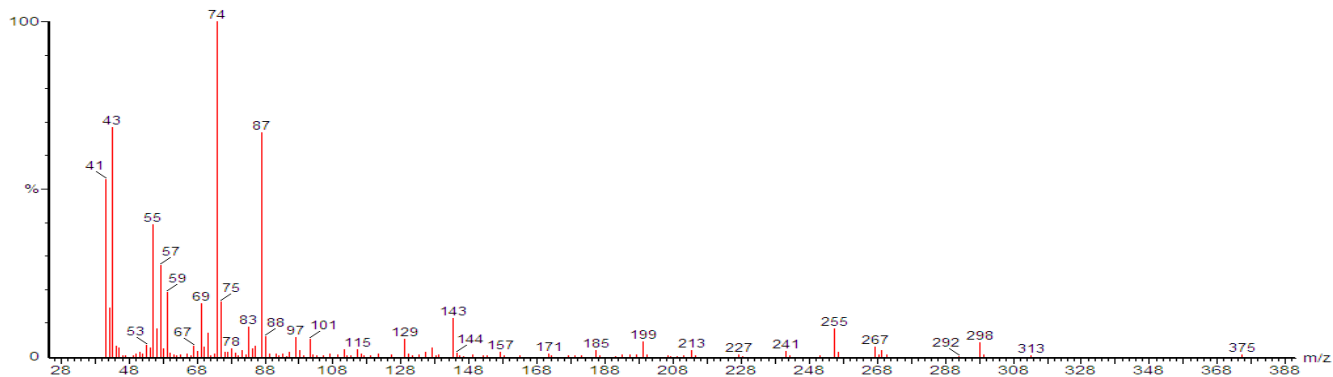


Pico 2 ($R_T=28.07$)

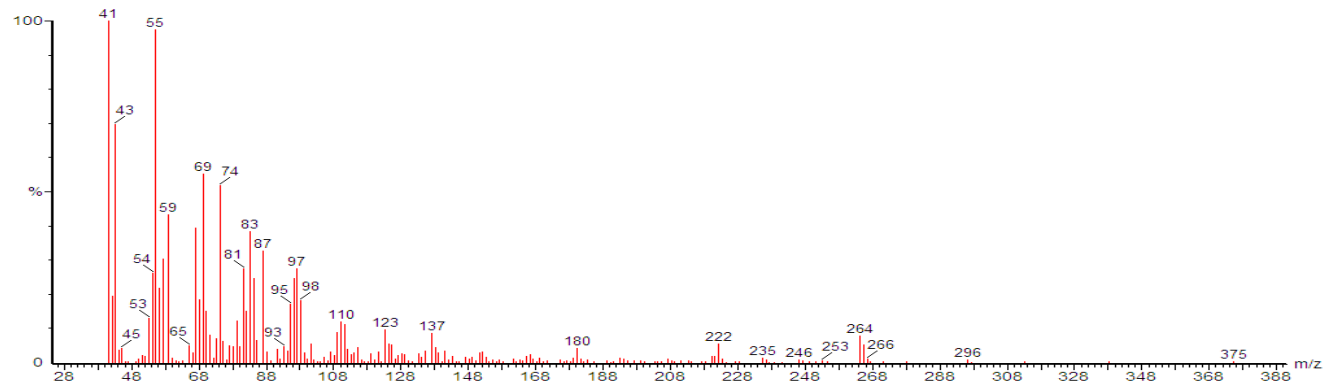




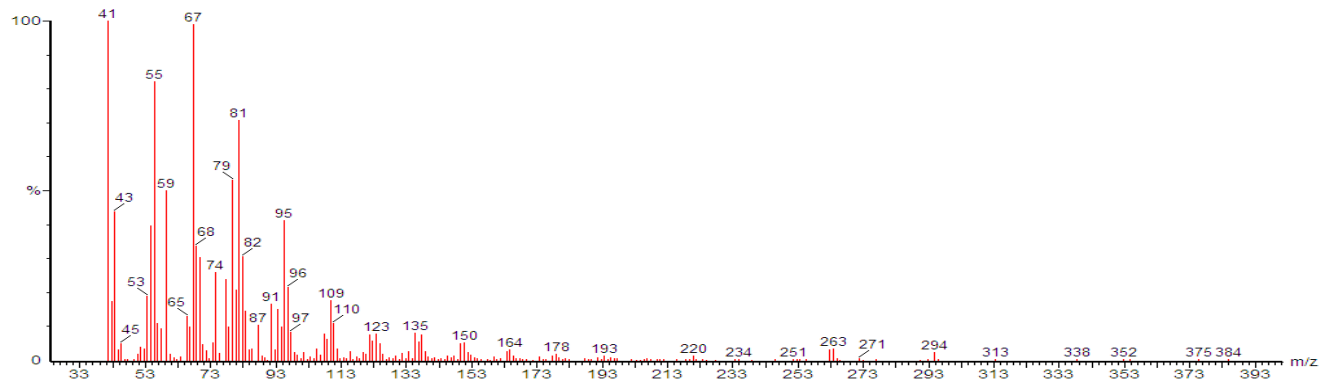
Pico 3 ($R_T=30.80$)



Pico 4 ($R_T=31.72$)

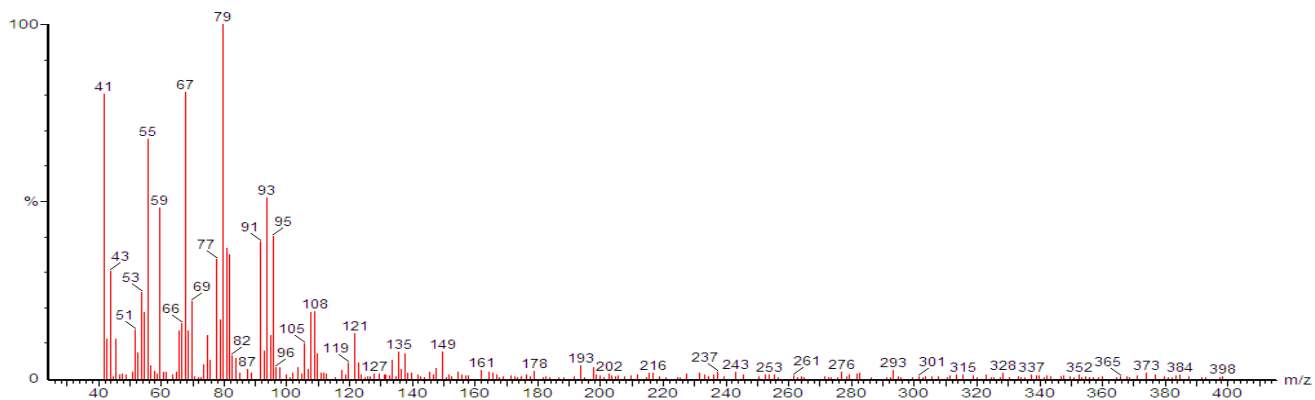


Pico 5 ($R_T=33.04$)

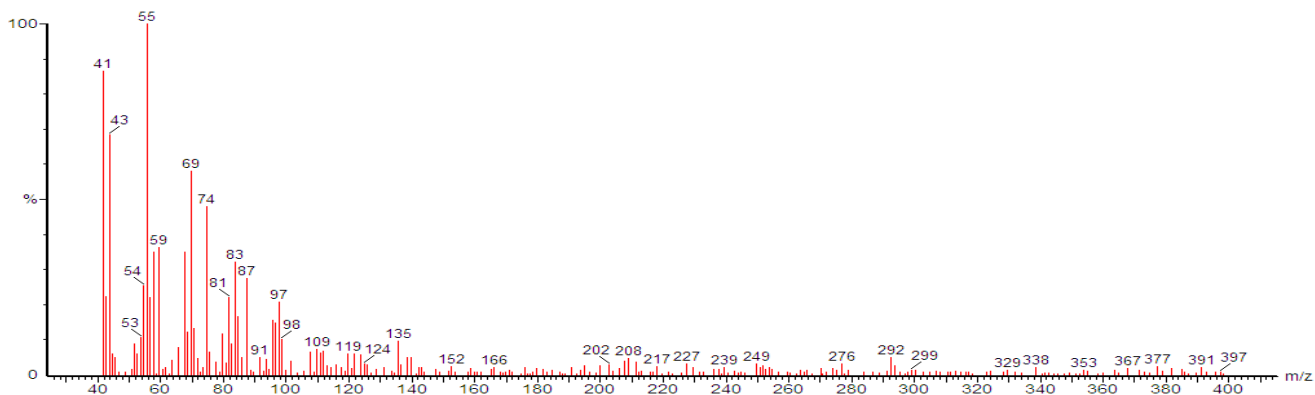




Pico 6 ($R_T=34.65$)

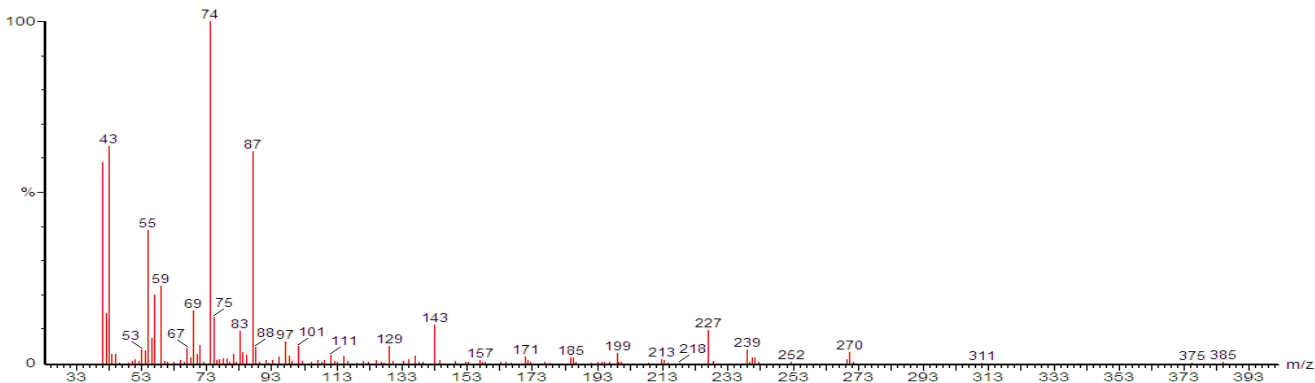


Pico 7 ($R_T=35.33$)



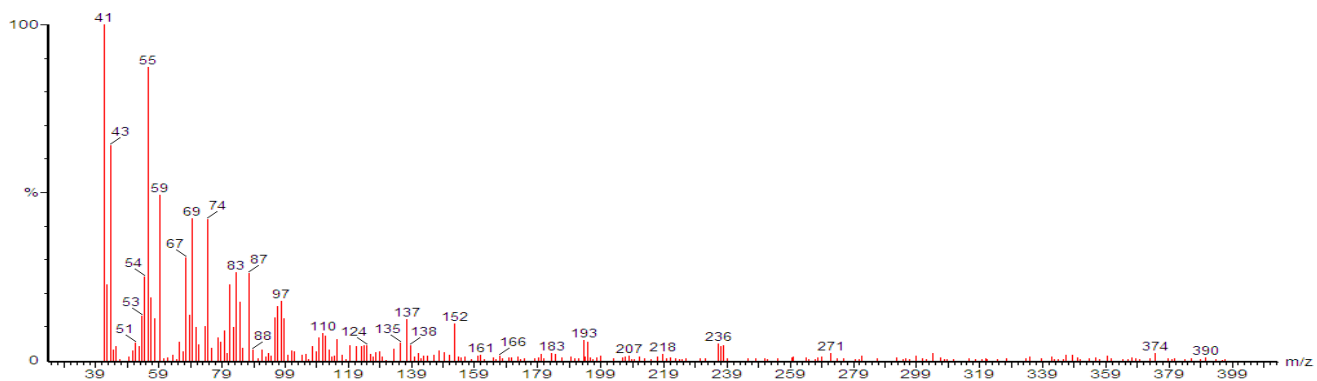
Método BU

Pico 1 ($R_T=27.40$)

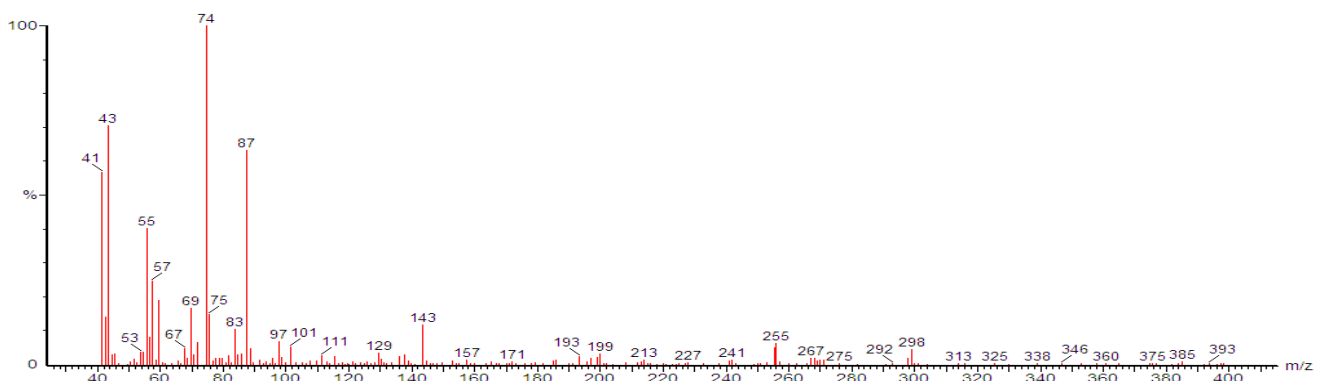




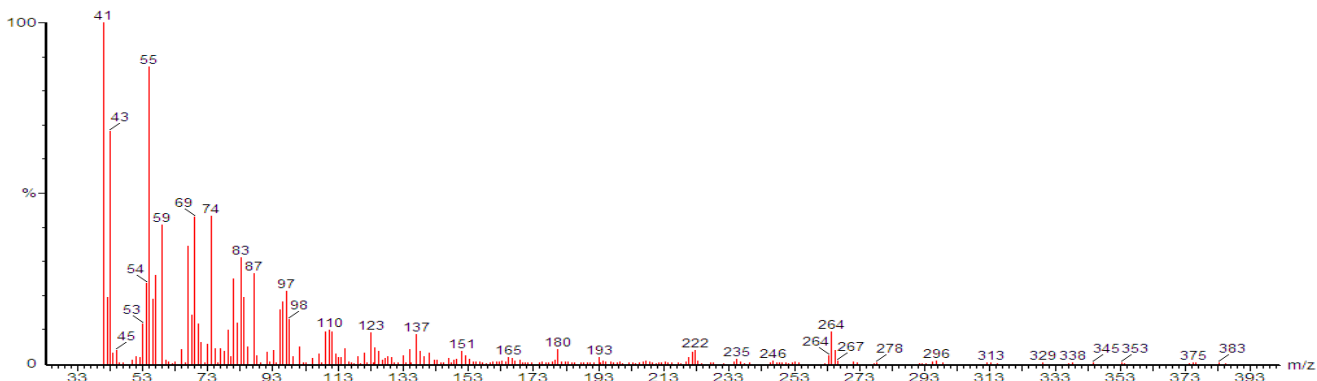
Pico 2 ($R_T=28.39$)



Pico 3 ($R_T=31.06$)

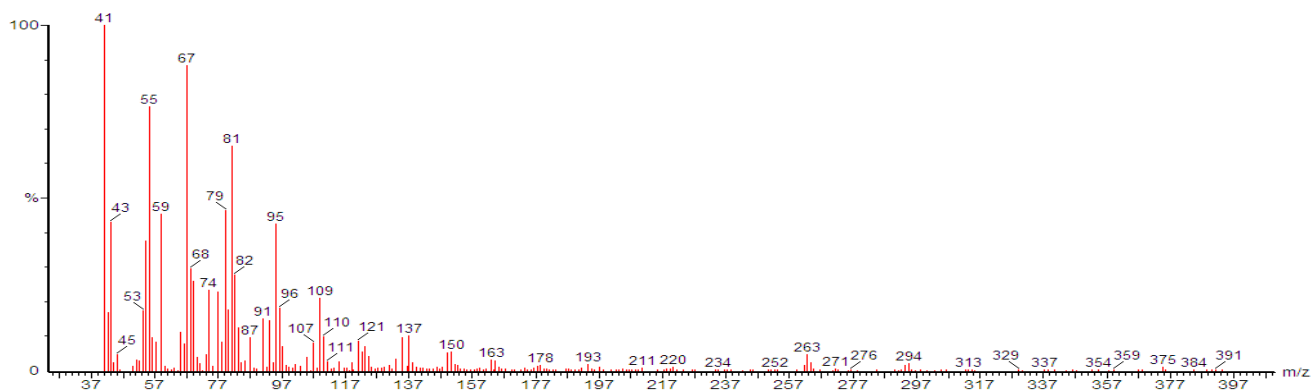


Pico 4 ($R_T=31.94$)

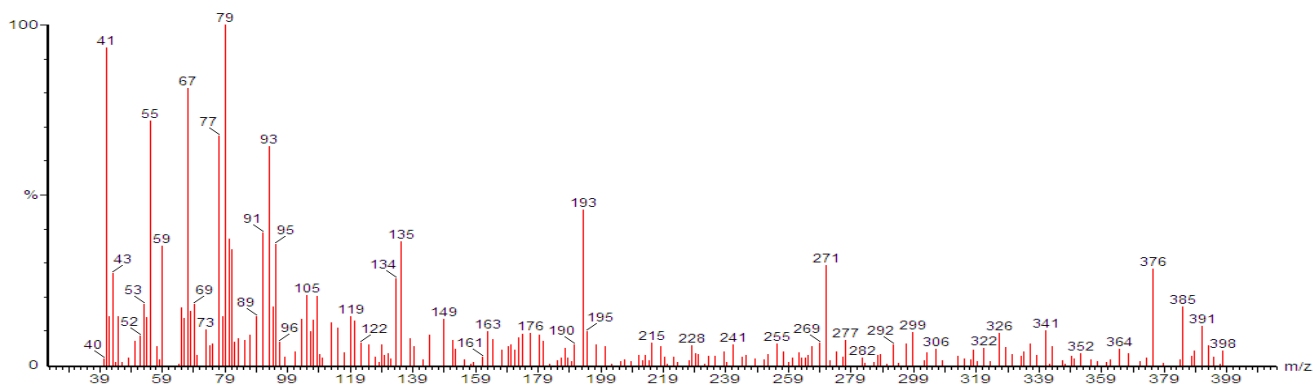




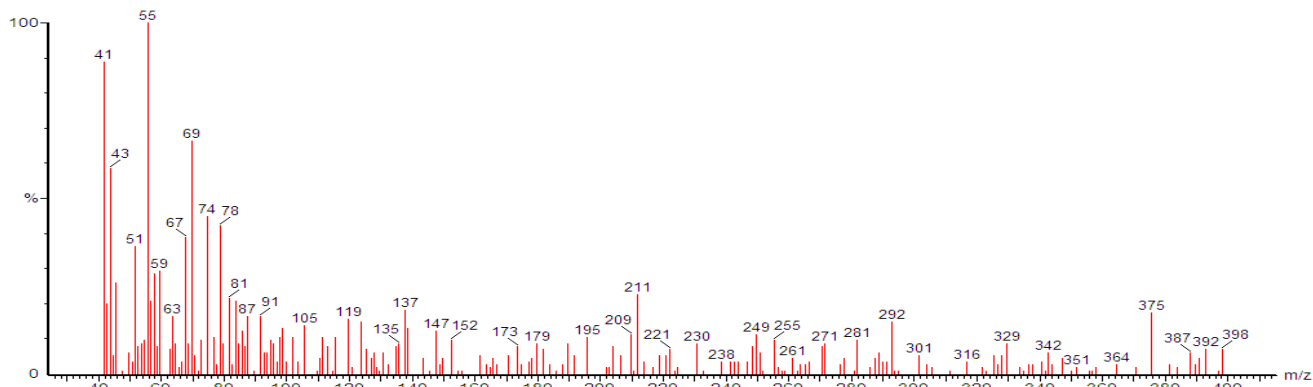
Pico 5 ($R_T=33.28$)



Pico 6 ($R_T=34.89$)



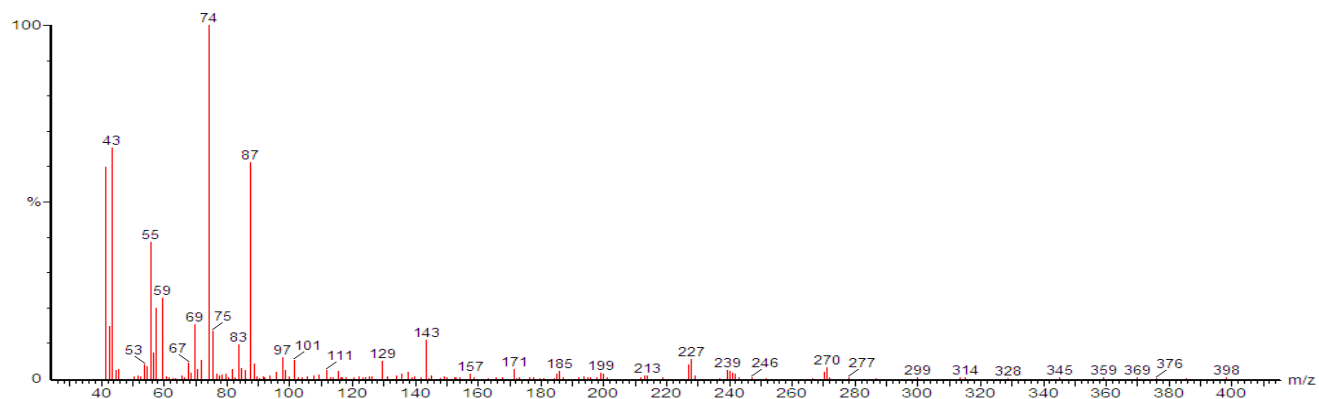
Pico 7 ($R_T=35.39$)



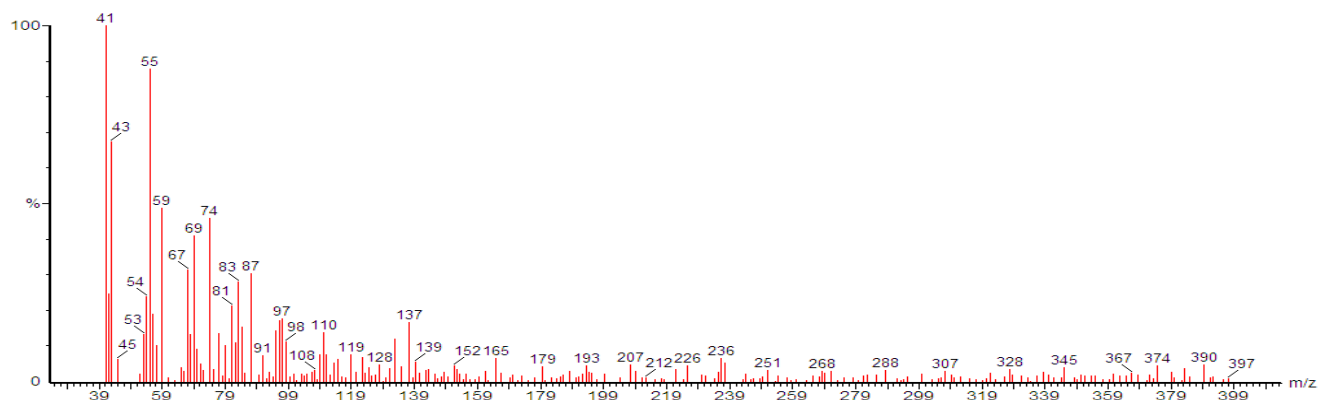


Método FH

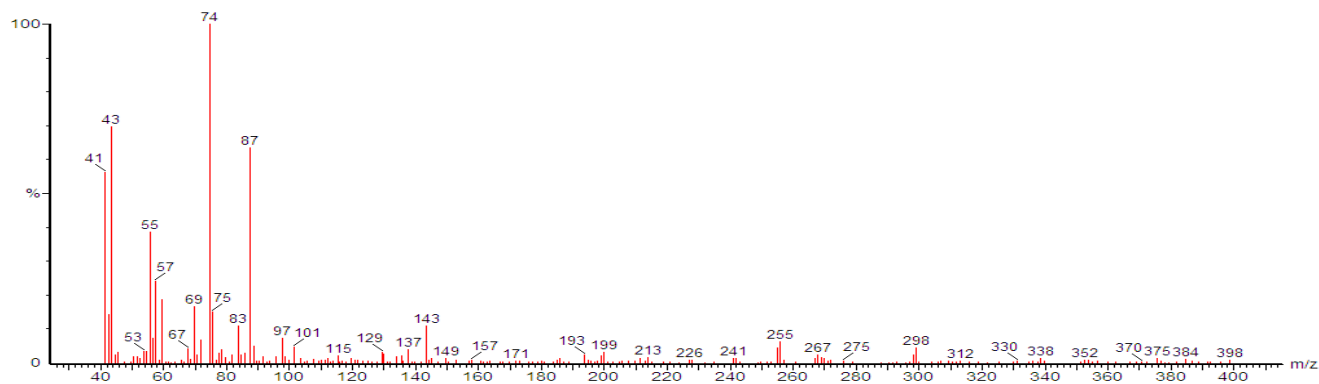
Pico 1 ($R_T=27.36$)



Pico 2 ($R_T=28.35$)

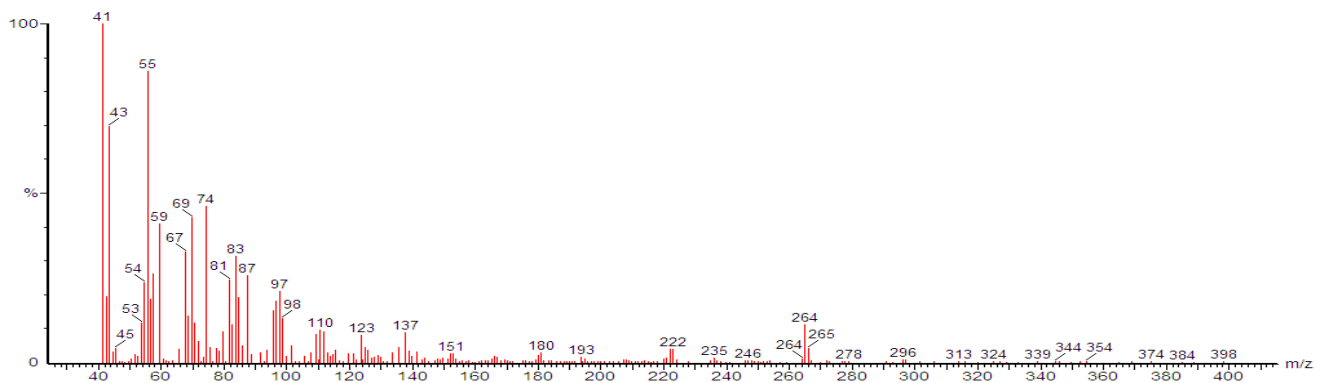


Pico 3 ($R_T=31.03$)

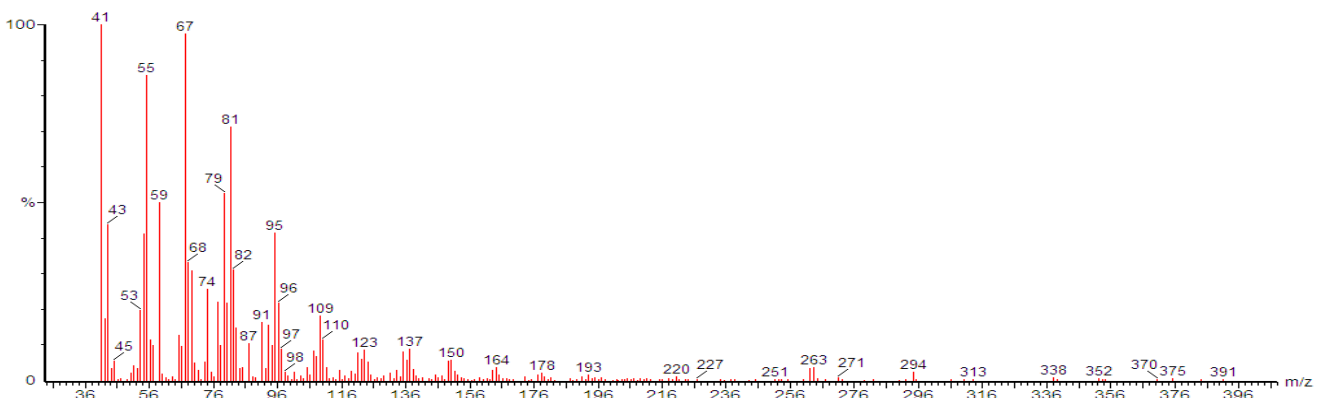




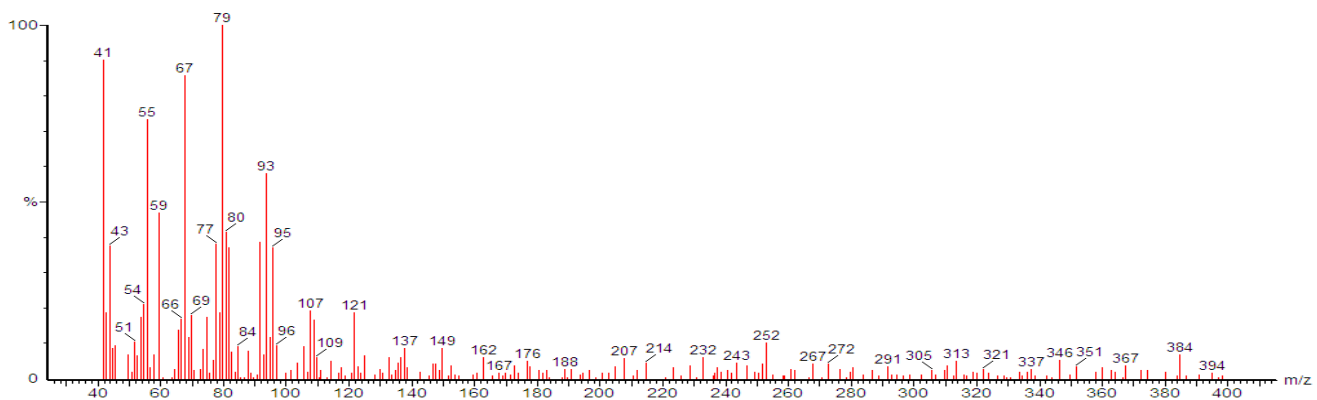
Pico 4 ($R_T=31.89$)



Pico 5 ($R_T=33.11$)

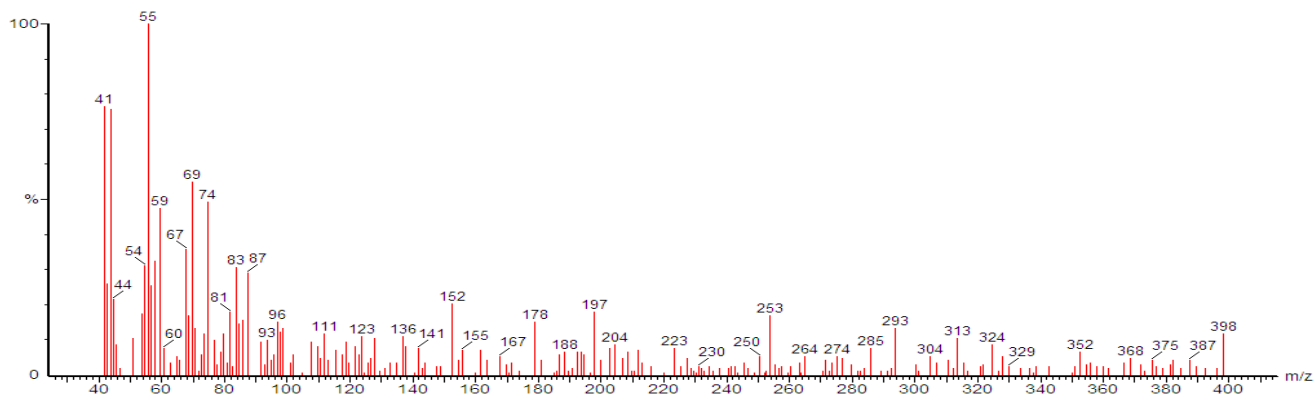


Pico 6 ($R_T=34.75$)



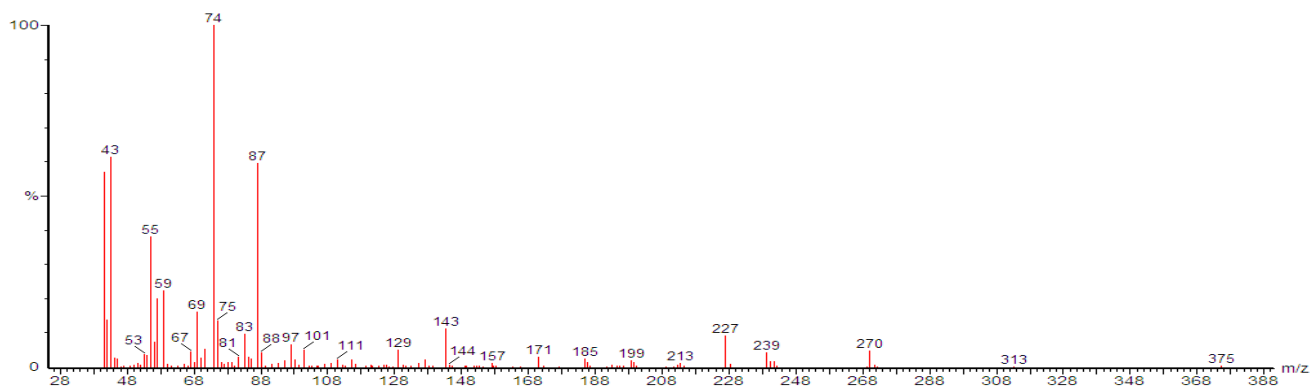


Pico 7 ($R_T=35.41$)

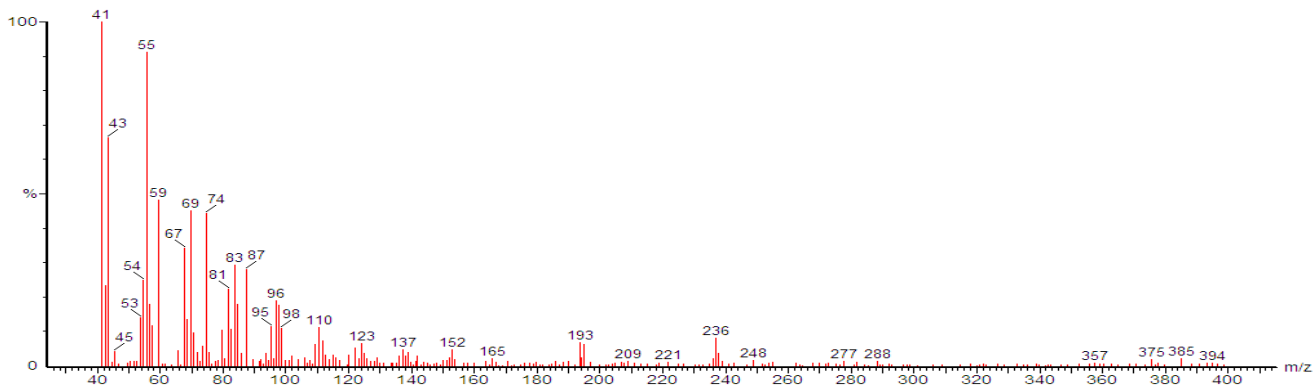


Método R

Pico 1 ($R_T=27.36$)

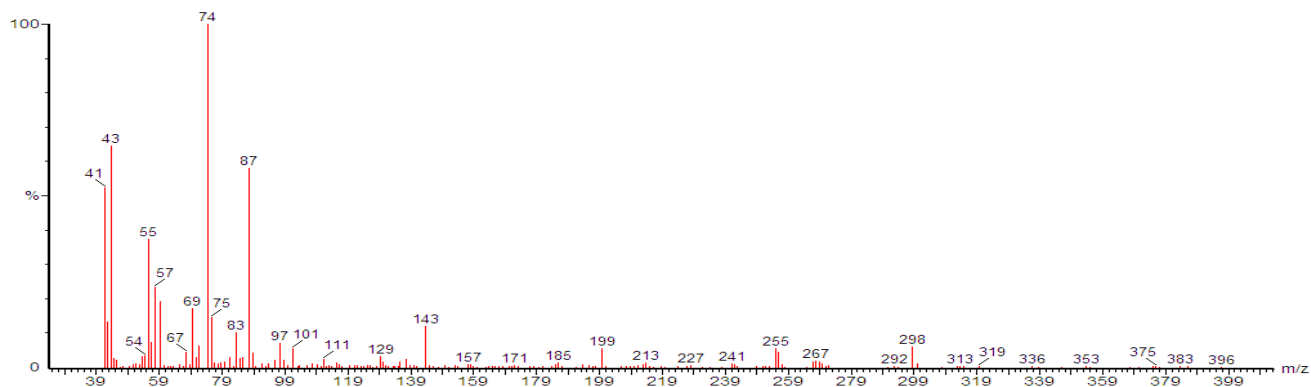


Pico 2 ($R_T=28.33$)

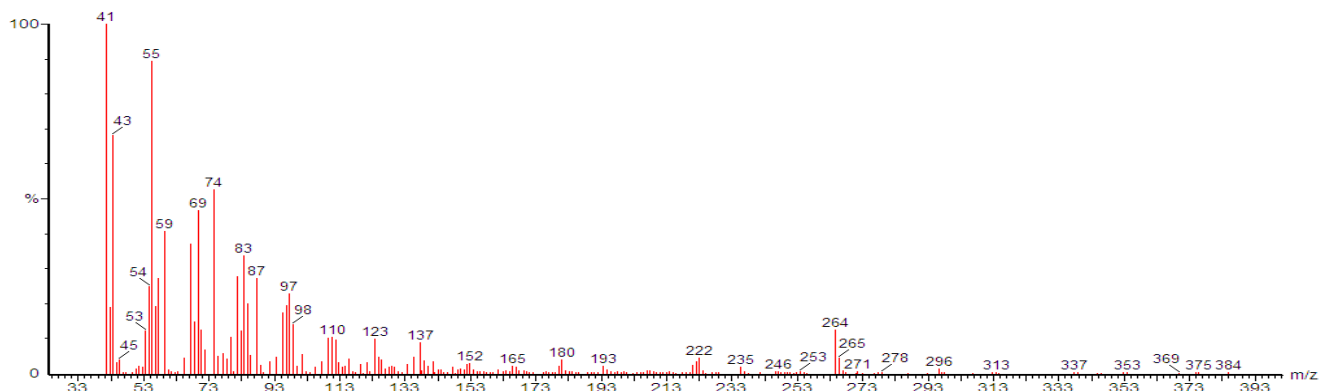




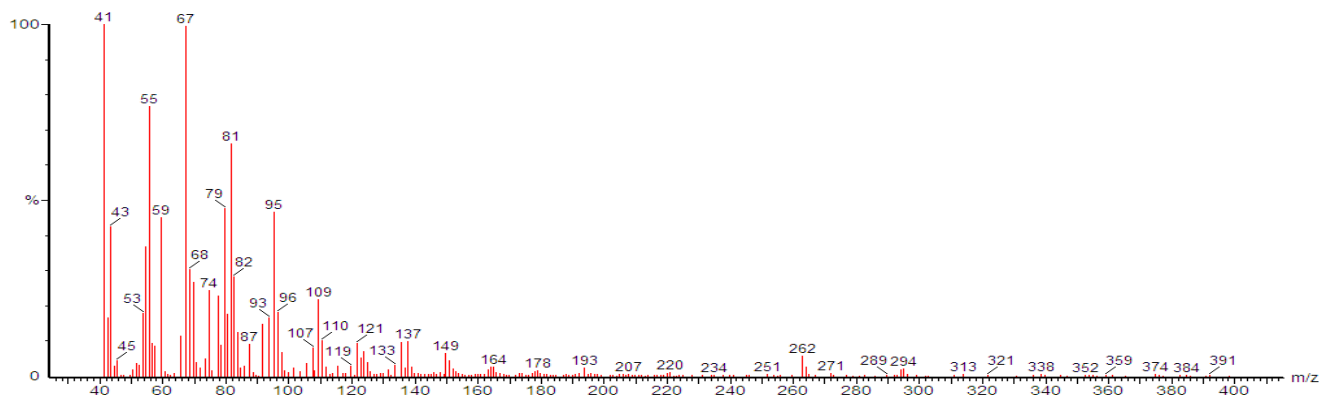
Pico 3 ($R_T=30.99$)



Pico 4 ($R_T=31.89$)

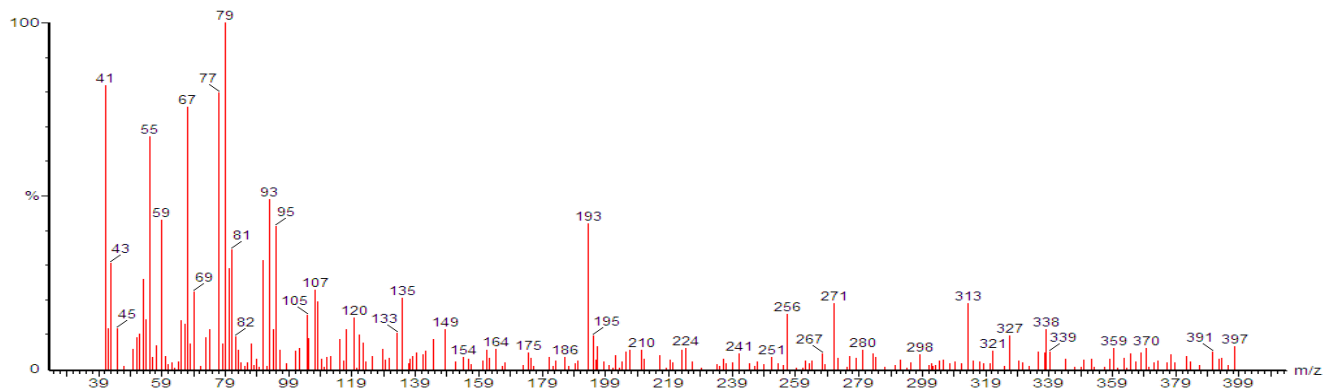


Pico 5 ($R_T=33.21$)

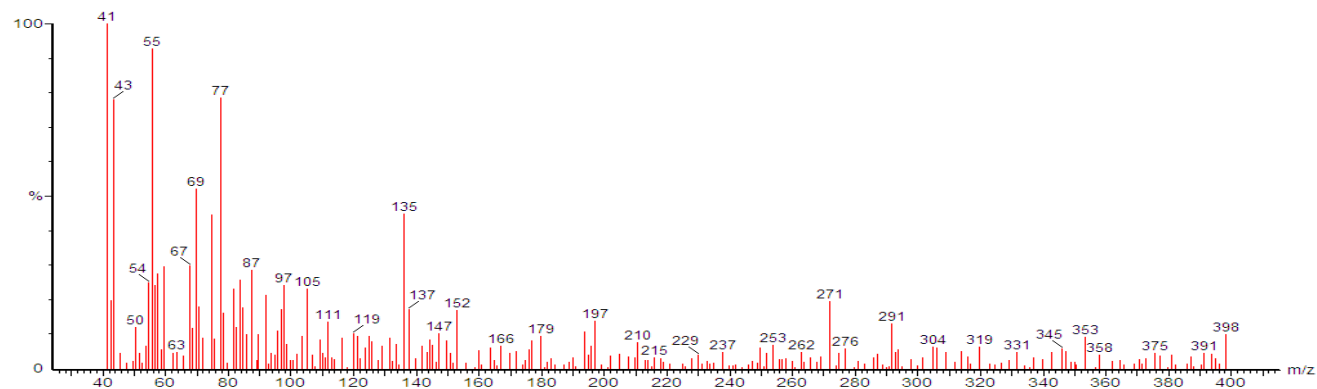




Pico 6 ($R_T=34.82$)

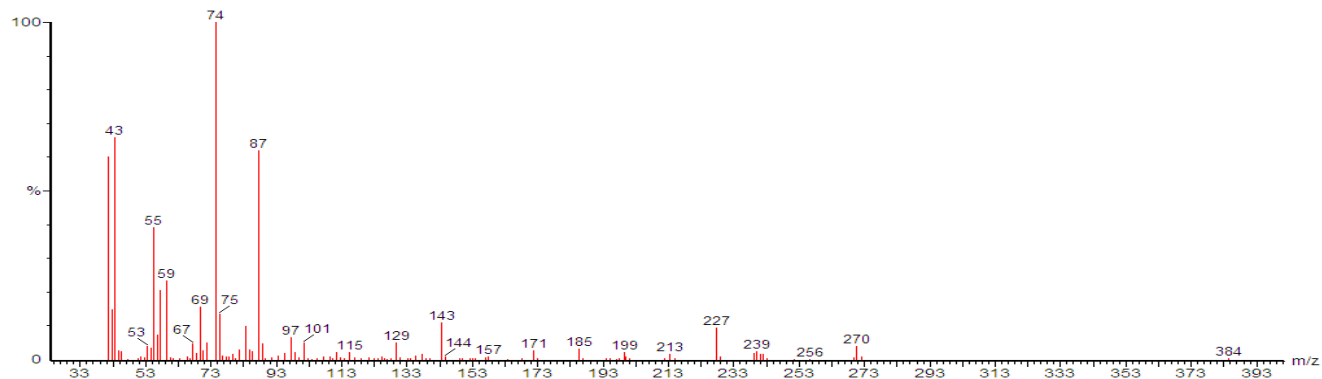


Pico 7 ($R_T=35.59$)



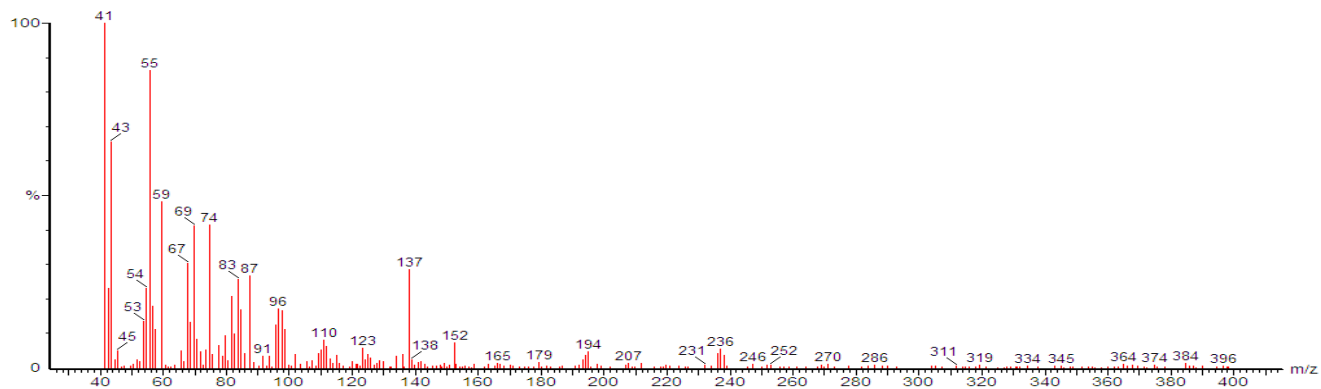
Muestra de importación CI

Pico 1 ($R_T=27.38$)

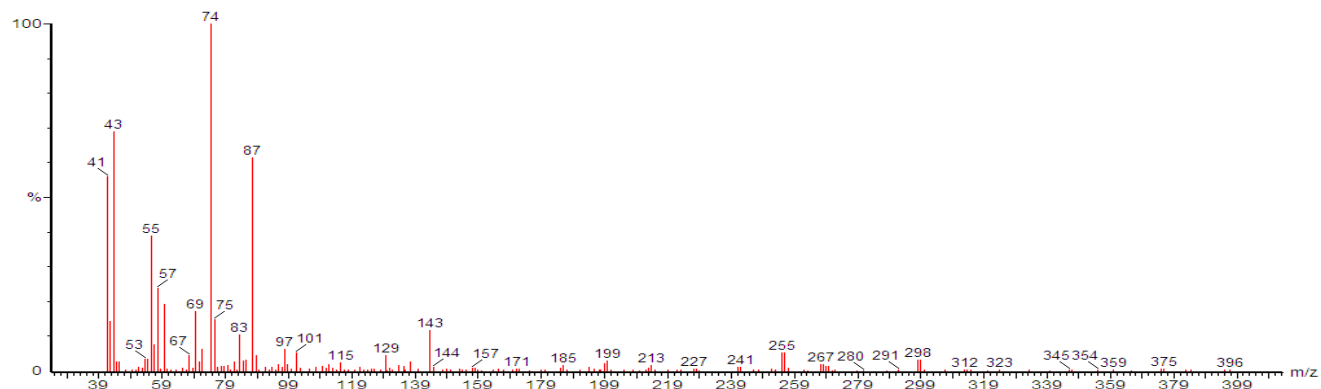




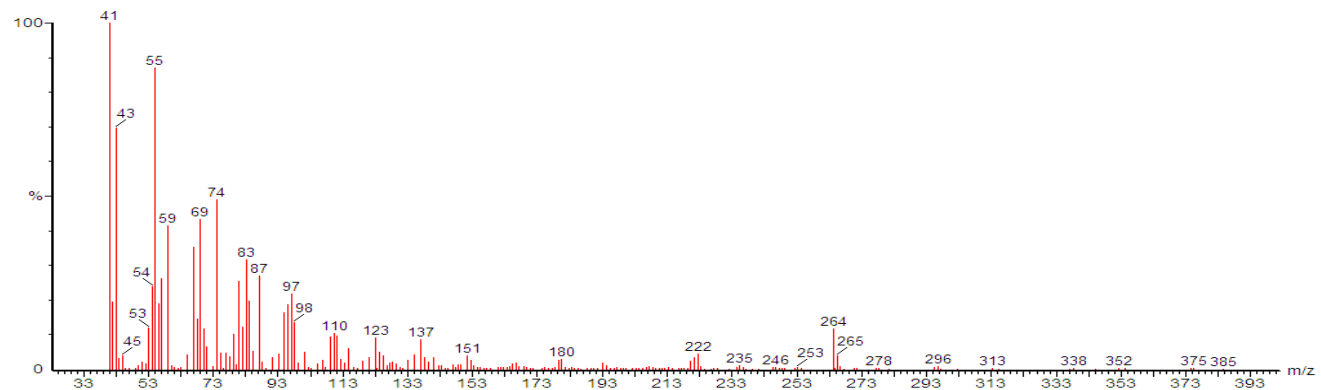
Pico 2 ($R_T=28.37$)



Pico 3 ($R_T=31.04$)

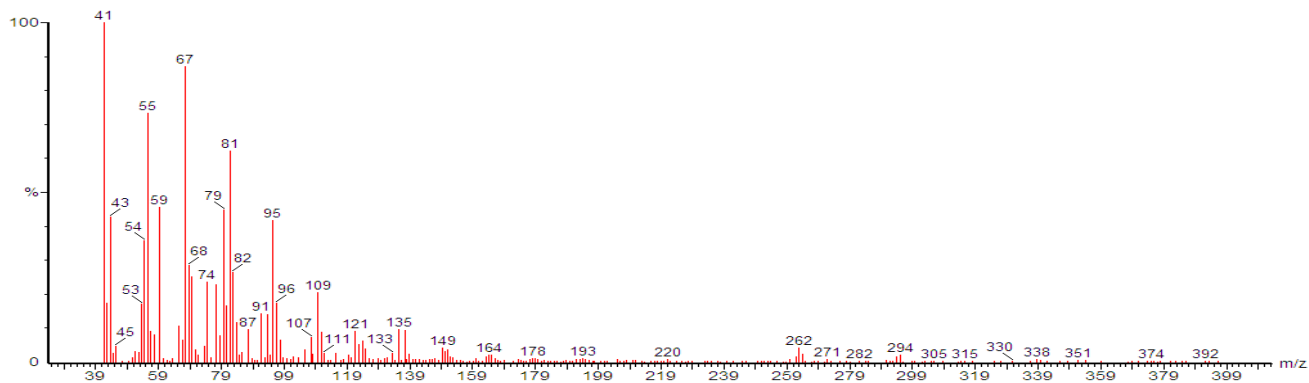


Pico 4 ($R_T=31.92$)

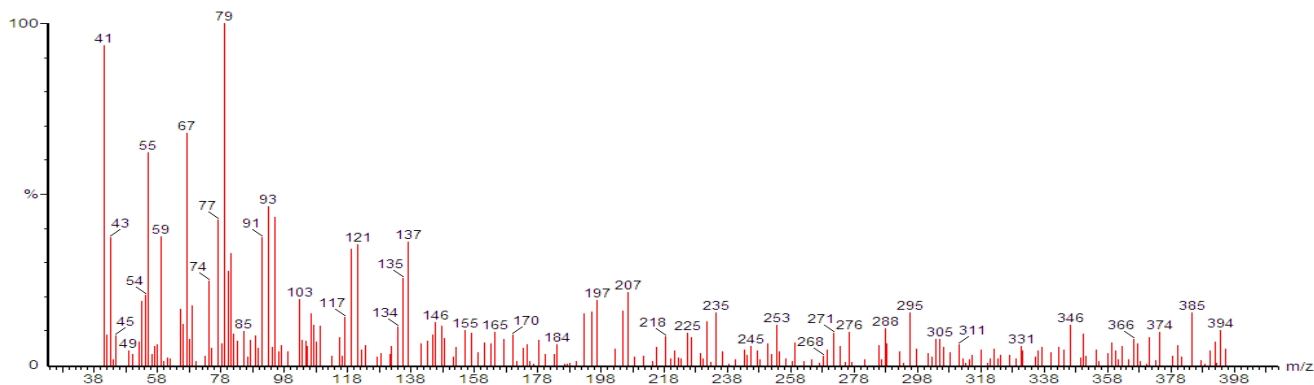




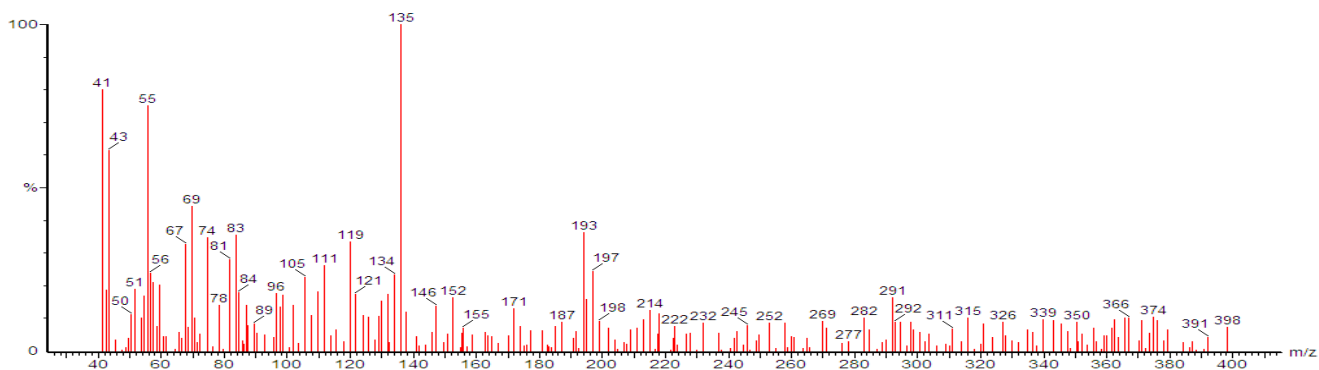
Pico 5 ($R_T=33.26$)



Pico 6 ($R_T=34.89$)



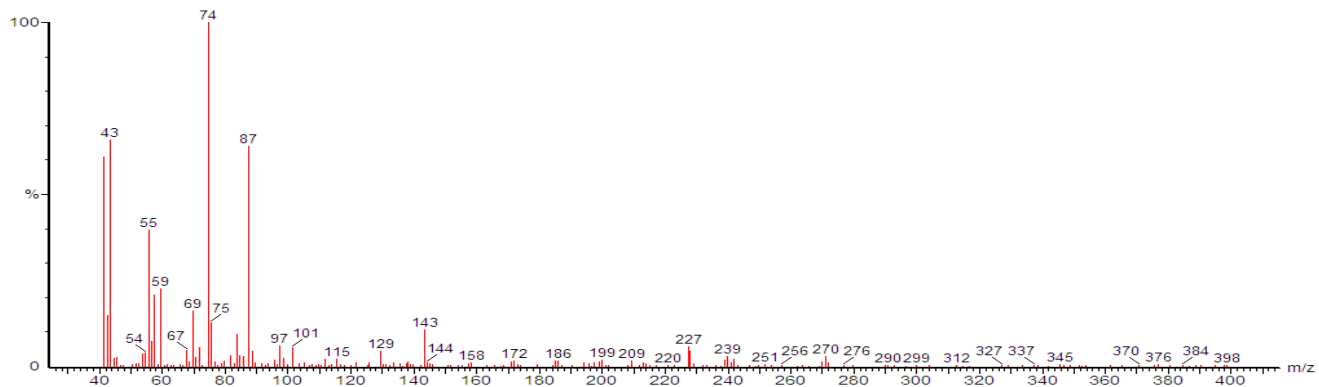
Pico 7 ($R_T=35.59$)



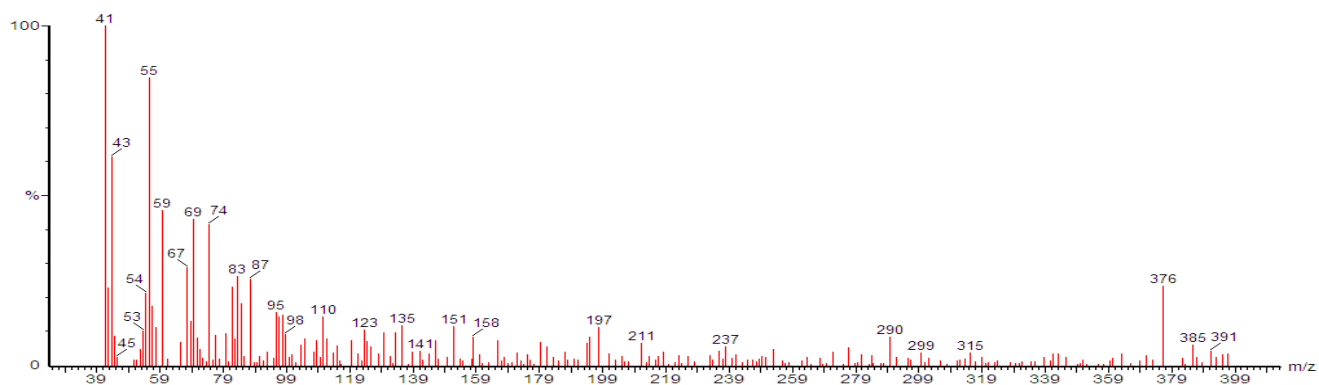


Muestra nacional CN

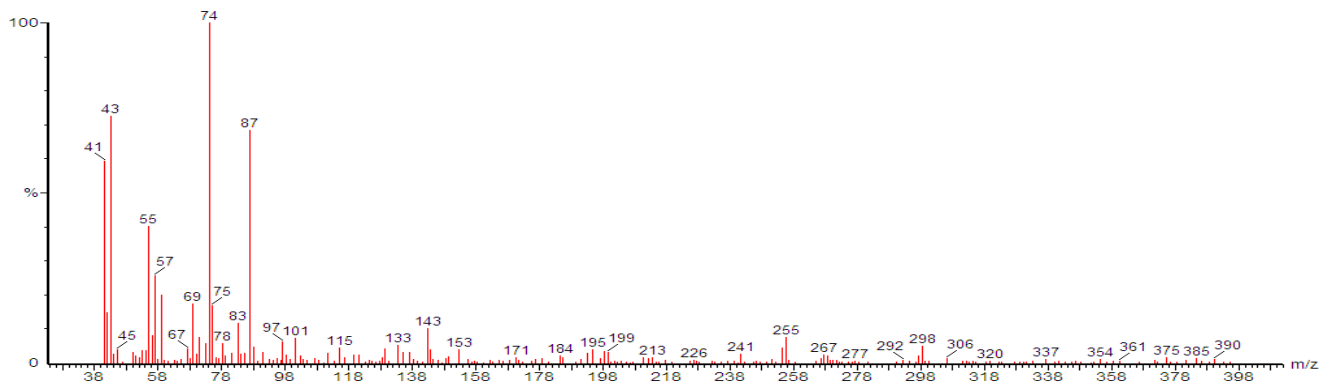
Pico 1 ($R_T=27.40$)



Pico 2 ($R_T=28.40$)

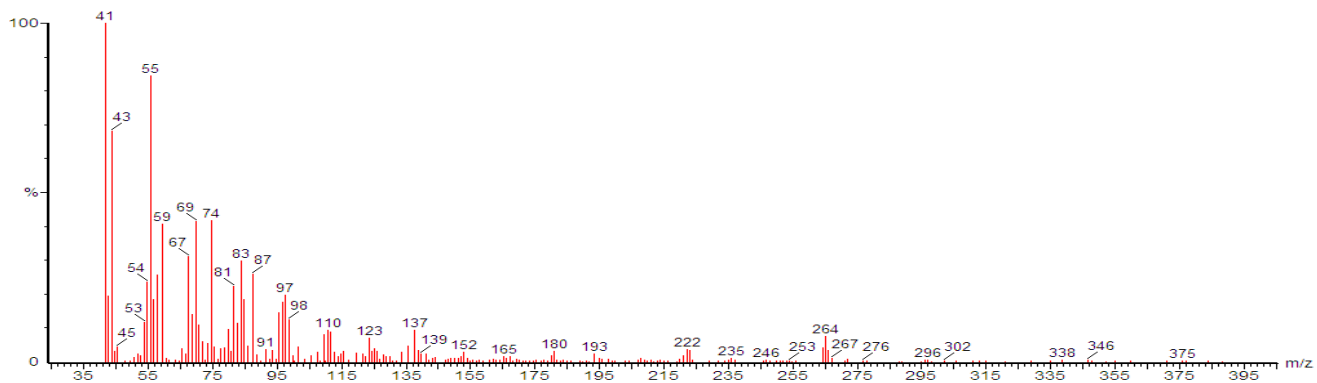


Pico 3 ($R_T=31.04$)

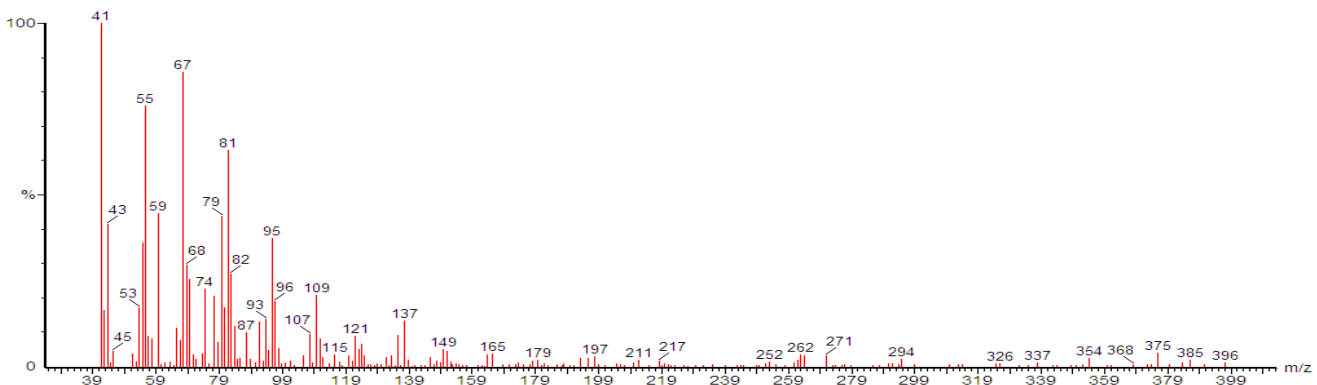




Pico 4 ($R_T=31.92$)



Pico 5 ($R_T=33.28$)



Evaluation of Emu Oil Extraction Methods and Their Effects on Physical and Rheological Behavior

Lilia L. Méndez Lagunas^a, Ana María Pineda Reyes^a, Juan Rodríguez Ramírez^a, León Raúl Hernández Ochoa^b

^a CIIDIR-Oaxaca, Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlan, Oaxaca, Oax. México, C.P. 71230, Tel. +52(951)5170610 e-mail:mendezll@hotmail.com, veneciaita@hotmail.com, jrodrigr@hotmail.com

^b Av. Escorza No. 900, Chihuahua, Chih., México, CP. 31000, Tel. +52(614) 4391500; lhernandez@uach.mx

Abstract

This study evaluates the efficiency of six extraction methods for emu fat based on the quantification of yield, color, density, refraction index and rheological behavior. Both physical methods (Bain Marie, rotary evaporator, fusion, ultrasound, and microwave) and chemical methods (solvents) were evaluated. Oil properties were compared with commercial emu oil as a reference. Solvent-based extraction produced the greatest yield (72.8%). Among the physical methods, the greatest yield was produced by the ultrasound method (42.8%). In general, properties were similar to those reported for vegetable oils. The rotary evaporator method showed the greatest difference in total color (ΔE) in comparison with a commercially-produced reference, while the fusion method showed the smallest ΔE . No statistically significant differences were found between the density and refraction index of the treated samples and those of the reference. Kinematic viscosity increased significantly in samples extracted via microwave method. All samples displayed pseudoplastic behavior. The data showed a good fit to the Power Law Model ($R^2 > 0.90$). The consistency coefficient and flow behavior index were determined for all methods.

Keywords: *Emu oil, extraction method, physical properties, rheological behavior.*

Practical applications

Therapeutic applications oil have been posited for emu oil. In pharmaceutical products, oils are used as emollients and as carriers for medicinal substances. The practical importance of an oil depends on its physical properties, thus a thorough understanding of those physical properties is very important for identifying potential applications. These properties are affected by the extraction method employed; the

present paper evaluates the effects of a range of extraction methods on yield efficiency, as well as physical and rheological properties. Novel extraction methods such as ultrasound and microwave are also evaluated in this study.

1. Introduction

In recent years, interest in lipids obtained from emus (*Dromaius Novae-Hollandiae*) has increased due to potential applications in the cosmetics and pharmaceutical industries. Recently, a wide range of therapeutic applications for the oil have been claimed [2], for example, the anti-inflammatory and anti-arthritic activity shown by Snowden and Whitehouse [3] in laboratory animals. Other studies have suggested its usefulness in tissue restoration, burn treatment, and the treatment of skin diseases [4]. In pharmaceutical products, oils are used as emollients and as carriers for medicinal substances. In the cosmetics industry, the hydrating and transdermal efficacy of the oil has garnered great interest [5]. Although natural fats were replaced in the past by high-purity hydrocarbon oils, this tendency has been reversed in Europe in recent years due to concerns over dermatologic and toxicological safety [6].

The physical and therapeutic properties of emu oil may be altered during the separation of the liquid fat of aqueous tissue fluids from solid structures composed of protein. Physical properties are known to be determined by the number, geometry, and position of double bonds, and the degree of unsaturation in the fat.

Extraction of animal fats is carried out by rendering processes, a term which applies to the process of removing all fat from fatty animal tissues or other materials with a high ratio of fat to solid matter. Animal fat rendering methods are determined by the nature of the fatty stock and the desired characteristics in the rendered fat. The most common methods are dry rendering, wet rendering, and digestive rendering [6]. The Bain Marie method, the rotary evaporator method, and the fusion method all belong to the wet rendering category. The ultrasound method and the microwave method belong to the dry rendering category, and the solvent method is a digestive rendering method. Both dry and wet rendering methods can cause deterioration in the quality of the native fat due to prolonged exposure to heat. Some solvents in the digestive rendering method are suspected of being carcinogenic and dangerous to the visual system [7]. Additionally, solvent extraction equipment is relatively expensive. Mechanical methods have been proposed, but the practical difficulties of commercial applications have led to other approaches.

In terms of the extraction of emu oil, specifically, the digestive method [4], [8], [9], [10], [11], wet rendering method [12],[11] and autoclave method [13] have most commonly been used.

It has been demonstrated that the use of different extraction methods results in different lipid recoveries. Very few studies have been done comparing lipid extraction methods for avian meat products [14]. Comparative investigations evaluating two or three solvent systems have been performed vis-à-vis the extraction of lipids of various animal origins [7]. Marquez *et al.*[15] used a Bain Marie system for the extraction of rhea abdominal fat, while Sales [16] extracted ostrich oil using the Folch method. Variations were found in physicochemical characteristics, extraction efficiency, and lipid content.

The practical importance of an oil depends on its physical properties: oiliness, viscosity, density in the liquid state, color, and refraction index, among other factors. In the cosmetics industry, information on shear forces is useful in spraying, pumping, spreading and pouring products. Density information is used in the determination of specific gravity for medical preparations. For the design of cosmetic and medical formulas, it is necessary to establish the refraction index and color parameters for identification and purity purposes. The success of a dermatological drug to be used for systemic drug delivery depends on the ability of the drug to penetrate through skin in sufficient quantities to achieve the desired effect [18], [19].

All of the previously mentioned properties are affected by the extraction method employed, due to the changes each to cause in the molecular structure of the fat. A greater understanding of the physical and chemical changes that occur as a result of these methods would make it possible to choose the appropriate one for a given industrial application due to a thorough understanding of the specific characteristics produced via each form of extraction.

Physical properties have been reported for numerous vegetal and animal fats and oils [20], but there is little if any such data on emu oil. The present study aimed to evaluate the efficiency of six lipid extraction methods (Bain Marie, rotary evaporator, fusion, ultrasound, microwave and solvent), and identify their effects on physical and rheological properties.

2 Methodology

Emu fat obtained from adipose deposits in the lower back was purchased from an emu farm in Nuevo Leon, Mexico. A 25-month-old female emu was butchered in July of 2009, and its fat was stored at -4°C until the time of use.

The properties of the oil samples obtained via each extraction method were compared with commercial refined emu oil as a reference.

2.1 Extraction of Raw Oil

Homogenized 10 g samples blended in a household blender were used for all tests. For extraction via rotary evaporator (Yamamoto, RE52), the material was exposed to 60°C heat for a period of 15 minutes, as per the method used by Marquez *et al.* [15] modified. Rotation velocity was set at 40 rpm and vacuum was set at 25 inHg. The extract was filtered using Whatman num. 1 paper.

Fusion extraction was performed using a sample submerged in distilled water at the boiling point for 20 minutes, at a ratio of 10 ml of water per gram of the sample. It was subsequently filtered through fiberglass wool. The organic phase was separated with a separatory funnel. The oil obtained was filtered through fiberglass wool and Whatman num. 1 paper. Subsequently, the sample was dissolved in analytical grade chloroform to facilitate filtration through sodium carbonate in order to eliminate any water. The solvent was evaporated using air displacement and mild heating.

A modified version of the method proposed by Marquez *et al.* [15] was used for the Bain Marie extraction. The sample was placed in a kitasato flask connected to a vacuum system (25 inHg) and placed in a Bain Marie at 70°C for 7 minutes. The extract was filtered through Whatman num. 1 paper.

For the ultrasonic method, samples were placed in a 250 ml Erlenmeyer flask and submerged in an ultrasonic bath at a frequency of 50 kHz and a power of 200 W (Fisher Scientific, FS36H) at room temperature for 90 minutes. The extract was filtered through fiberglass wool and Whatman num. 1 paper.

For the microwave method, emu fat samples were exposed to microwave energy for a period of 3 minutes in a 750 W household microwave, as per the method proposed by Gomez [21] for microwave lipid extraction. The extract was filtered through fiberglass wool and Whatman num. 1 paper.

For solvent extraction, a modified version of the method proposed by Folch, Lees and Sloane [17] was employed, using a chloroform-methanol mix at a ratio of 2:1.

All samples were stored in refrigeration at -4°C in dark vials until analysis.

2.2 Yield Determination

Yield was calculated using the following equation:

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{oil extracted mass (g)}}{\text{mass of total in the sample (g)}} * 100$$

2.3 Color

The CIELAB scale was used to determine color values. Values were taken using a MiniScan XE Spectrophotometer (Hunter Associates Laboratory, Inc. USA). Lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) were captured three times for each sample. Color differences between the commercial reference sample and experimental samples are represented by $\Delta L = (L^* - L_0^*)$, $\Delta a = (a^* - a_0^*)$ and $\Delta b = (b^* - b_0^*)$. Total color difference ΔE was calculated using the Hunter-Scotfield equation [22]:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

2.4 Density and Refraction Index

A refractometer with an accuracy of $\pm 0.0001 n_D$ (Reichert, Abbe Mark II plus) and a density meter (Anton Parr, DMA 5000) were used to determine the refraction index and the density of the samples at 25.5°C. Prior to these measurements, values were calibrated with water and air, respectively. All measurements were carried out in triplicate.

2.5 Rheological Behavior

Shear viscosity was determined using a rheometer (Anton Parr, MCR301), utilizing a cone-plate geometry with a diameter of 50mm at an angle of 1°. Measurements were taken in controlled shear rate mode, and shear stress was measured in simple shear flow. All measurements were carried out at a

constant temperature of 25.5°C, and at shear rates ranging from 1 to 1500 1/s. All tests were performed in triplicate.

Rheological behavior was adjusted to the Power Law model as a two-parameter model:

$$\eta = k(\dot{\gamma})^{n-1}$$

where η is apparent viscosity (Pa·s), $\dot{\gamma}$ is deformation velocity (1/s), k is the consistency coefficient (Pa·sⁿ), and n is the flow behavior index (dimensionless). The last parameter constitutes a measurement of the degree of deviation from Newtonian behavior.

2.6 Statistical Analysis

Data are reported as mean \pm standard deviation of duplicate determinations. Statistical analysis was executed by General Linear Model (GLM) procedure using the NCSS (Number Cruncher Statistical Systems, version 2003).

3 Results

The raw oil obtained by the evaluated methods displayed a liquid consistency at room temperature. Oil obtained by the fusion and Bain Marie methods was turbid; extracts obtained via the rotary evaporator and solvent methods displayed very little turbidity. Visually, the color of the extracts varied from white to a pale yellowish-cream color. On the CIELAB scale, all samples were off-white and greenish. Nevertheless, significant differences in the b^* parameter were found for samples extracted via the Bain Marie and rotary evaporator methods; these samples tended towards blue, while samples extracted using the solvent method tended towards yellow (Table 1).

Table 1. Physical Properties of Emu Oil

Extraction Method	L*	a*	b*	ΔL	Δa	Δb	ΔE	Density [kg/m ³]	Refractive index	Kinematic viscosity [cSt]
Bain marie	69.47	-3.6	3.46	-0.57	-0.19	2.67	2.73	910.4	1.466	34.21
Rotary evaporator	68.06	-3.3	3.23	-1.98	0.60	2.44	3.14	1.465	----
Fusion	69.93	-3.1	0.80	-0.11	0.25	0.01	0.27	911.2	1.464	35.63
Ultrasound	74.22	-2.4	2.78	4.18	0.97	1.99	4.73	911.2	1.465	22.30
Microwave	65.18	-3.5	7.17	-4.86	-0.17	6.38	8.02	911.3	1.4655	41.91
Solvent	68.23	-2	-	-1.81	1.38	-	2.97	1.4657	----
Reference	70.04	-3.4	0.79	-	-	-	-	916.0	1.4639	22.30

... In some samples, there was insufficient material to determine the properties.

Comparisons between all samples with a commercial refined emu oil reference showed minimal differences in the lightness (L^*) and redness (a^*) parameters. The yellowness parameter (b^*) of the commercial reference was similar to that of the raw oil obtained via the fusion method, but differed from that of samples extracted via the other methods (Table 1). Oil color is often used as an indicator of quality; however, fresh oils vary in color. The differences found could be a result of the origin and natural pigments of the samples.

Ultrasound extraction (Fig. 1) produced a relatively high yield (42.8%), while fusion extraction produced the lowest (18.06%). High yields using ultrasound extraction were reported by Zhen-Shan Zhang *et al.* [23] and Li, Pordesimo, and Weiss [24] for flaxseed and soybean oil. Results were attributed to mechanical effects due to ultrasonically induced cavitation increasing the permeability of tissues.

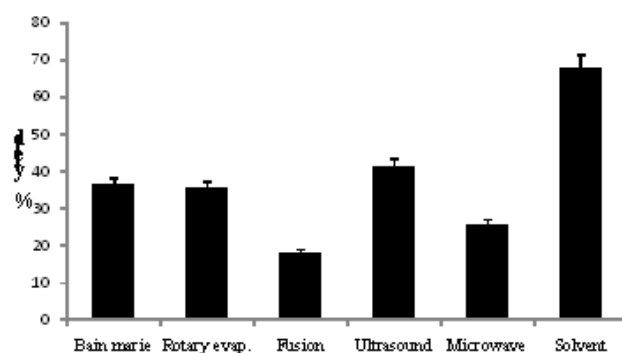


Figure. 1 Effect of Extraction Method on Emu Oil Yield.

Digestive rendering with solvents doubled the yield produced with ultrasound extraction (68 %). This result is consistent with values reported by Beaudoin and Martin [25], who extracted emu lipids with a chloroform-methanol mixture at a ratio of 10:1, and obtained a yield of 78.5%. This method, proposed by Folch, Lees and Sloane [17] is widely accepted in the extraction of lipids from animal and vegetable tissues [26]. The use of a relatively non-polar solvent such as chloroform favors the separation of lipids with molecular structures with a hydrophobic end, but not membrane-associated lipids which have hydrophilic structures and are more polar. The use of polar solvents such as methanol to disrupt the hydrogen bondings or electrostatic forces is more efficient for extraction. Statistics confirmed that yield was significantly affected ($\alpha=0.05$) by extraction method.

No significant differences in density and refraction index were observed between extraction methods (Table 1). Liquid density at 25°C was very similar to oils of vegetable and marine animal origin, such as coconut oil (919 kg/m³), sunflower oil (915 kg/m³), refined cottonseed oil (916 kg/m³), peanut oil (910 kg/m³), olive oil (909-915 kg/m³), sesame oil (914 kg/m³) corn oil (915 kg/m³) and whale oil (910-920 kg/m³). However, it was higher than that found for lard oil (864 kg/m³ at 15.5 °C) and poultry fat (880 kg/m³ at 23.9°C) [20], [27].

The refraction index at 25 °C was found to be in the range reported by Formo *et al.* [20] for oils with vegetable origins, such as refined cottonseed oil (1.468), peanut oil (1.467), olive oil (1.469) and crude palm oil (1.459). This property could be useful in identifying the length of hydrocarbon chains and number of double bonds in the structure of fatty acids. Values between duplicates were found equal so standard deviation for those measurements were zero.

Apparent viscosity diminished when deformation velocity increased, while shear force increased with deformation velocity (Fig. 2). All samples exhibited pseudoplastic behavior ($0 < n < 1$). This shear thinning behavior is common in oils and some polymers [28]. The resulting measurements were fitted to a Power Law model ($R^2 > 0.9$) to obtain values for the consistency coefficient and the flow behavior index (Table 2). A significant effect of extraction methods on apparent viscosity was observed; the majority of samples displayed n values close to 1. Samples extracted via the microwave method displayed the highest viscosity, with an n value of 0.7138, whereas samples extracted via the solvent method showed the lowest viscosity, with an n value of 0.98. Samples which underwent microwave method displayed clearly pseudoplastic viscous behavior, and desirable transdermal delivery properties due to their low flow resistance.

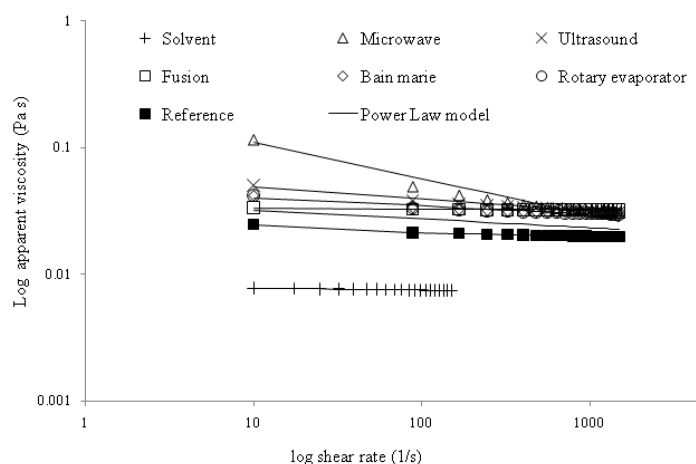


Figure. 2 Rheological Behaviour of Emu Oil.

This property is important in oils which are to be used as carriers. In fluids with newtonian behavior ($n=1$), stress is linearly proportional to its strain rate. This suggests that extracted samples with n values close to 1 may have greater stability against deformation, a property which is important in lubricants submitted to stress. Monia *et al.* [29] reported similar behavior in prickly pear seed oils.

The kinematic viscosity of the oils obtained via the Bain Marie and fusion methods was close to those found by Formo *et al.* [20] for cottonseed (35.88 cSt) and sunflower (33.31 cSt) at 37.8°C. The samples extracted via the ultrasound method and the commercial reference displayed the lowest kinetic viscosity (22.30 cSt), similar to those reported for sperm whale oil (22.99 cSt) [20]. The highest value found was for samples extracted via the microwave method. The pseudoplastic behavior of samples extracted using the microwave method made determining a constant kinematic viscosity impossible; a range of 33-125cSt as a function of shear rate was found (Fig. 3). Increased kinematic viscosity after microwave treatment has been reported for olive and sunflower oils [30].

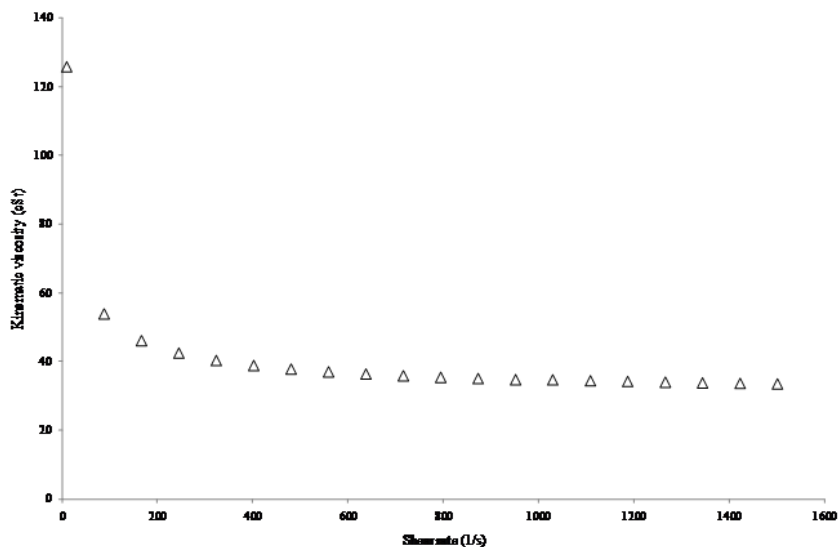


Figure 3 Kinematic Viscosity of Samples in Microwave Extraction Treatments

This behavior has been explained by the possible isomerisation of the double bonds of fatty acids as a consequence of exposure to the high temperatures reached by microwave energy (Albi *et al.* [30]). Kinematic viscosity values (Table 1) are consistent in orders of magnitude with those reported for common oils; nevertheless, the results suggest that extraction method has a significant effect on fatty acid distribution and composition. In general, the kinetic viscosity of oils diminishes slightly with an increase in unsaturation. Oils containing fatty acids of low molecular weight are slightly less viscous

than oils of an equivalent degree of unsaturation containing high weight acids [20]. The results are consistent with the oleic acid (49.9%) and palmitic acid (24.6%) contents reported for emu oil by Shimizu and Nakano [4], two fatty acids which are unsaturated and saturated, respectively.

4 Conclusions

Differences were found in the physical properties and yield for the oils obtained by the compared extraction methods. In general, the properties found were similar to those reported for vegetable oils. The fusion extraction method had a significant effect on color, whereas microwave significantly affected apparent and kinetic viscosity. The ultrasound extraction technique was shown to be very efficient in the extraction of emu oil without the use of solvents, which may be toxic or otherwise undesirable in pharmaceutical and cosmetic applications. Pseudoplastic behavior was found in samples extracted using the microwave method, whereas samples extracted by the other methods displayed behaviors approaching Newtonian behavior. These differences in physical properties may be of interest for certain industrial applications.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Universidad Autónoma de Chihuahua, the Espacio Común de Educación Superior, the ESQUIE, the SIP and the COFAA of the Instituto Politécnico Nacional for the facilities provided to carry out this investigation, and their generous financial support of the project. SIP 20100262.

References

1. E. Fein, J. Caputo, A.K. Nagal., K. Nagal: Therapeutic uses of emu oil, United States Patent 5472713(1995)
2. R. Nicolasi, S. Yoganathan, T. Wilson, H. Sasaki, F. Orthoefer: Biological activity of emu oil, *American Oil Chemist Society Conference*. 2001
3. J.M. Snowden, M.W. Whitehouse: Anti-inflammatory activity of emu oils in rats, *Inflammopharmacology*. 1997, **5**,127-132.
4. S. Shimizu, M. Nakano: Molecular species of triacylglycerol isolated from depot fats of ratites. *J. Oleo Sci.* , 2003, **52**,57-63.
5. A. Zemtsov, M. Gaddis, V. Montalvo-Lugo: Moisturizing and cosmetic properties of emu oil, a double blind study. *Australas J. Dermatol.*, 1996, **37**,159-61

6. R.R. Allen, M.W. Formo, R.G. Krishnamurthy, G.N. McDermott, F.A. Norris, N.O.V. Sonntag: *Bayley's Industrial Oil and Fat Products*, Wiley'Interscience Publication, US, Vol. 2, 1982.
7. I. Undeland, M. Harrod, H. Lingnert: Comparison between methods using low-toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*clupea harengus*), *Food Chem.*, 1998, **6**,355-365
8. Y.W. Wang, H. Sunwoo, J.S. Sim, Lipid characteristics of emu meat and tissues, *Food Nutr. Sci.*, 2000, **7**,71-82.
9. E.P. Yúfera: *Química Orgánica Básica y Aplicada*. Edición Reverté, S.A. Universidad Politécnica de Valencia, Spain.
10. J.A. García, I. Díaz : Nuevas tendencias en el análisis de ácidos grasos. **Dipòsit** de la Recerc de Catalunya. <http://hdl.handle.net/2072/4751>, 2006
11. S.A. Mahesar, S.T.H. Sherazi, K. Abro, A. Kandhro, M.I. Bhangar, F.R. van de Voort and J. Sedman: Application of microwave heating for the fast extraction of fat content from the poultry feeds, *Talanta*, 2008, **75**, 1240-1244.
12. R. Velasco, H. Villada ,J. Carrera: Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria, *Inf. Tec.*, 2007, **18**:53-65.
13. M.A.Grompone, B. Irigaray, M. Gil: Composition and thermal properties of Rhea oil and its fractions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2005, **107**,762–766.
14. T. Pérez-Palacios, J. Ruiz, D. Martín, E. Muriel, T. Antequera: Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products, *Food Chem.* 2008, **110**, 1025–1029
15. R. Márquez, L. Repiso, A. Sala, L. Salié, C. Silvera: Estudio de una tecnología de extracción y fraccionamiento de aceite de ñandú de alta calidad para su utilización en la industria cosmética y farmacéutica, *InnLatuTec.* 2007, **2**:4-6
16. J. Sales: Fatty acid composition and cholesterol content of different ostrich muscles,. *Meat Sci.* 1998, **49**,489-492.
17. J. Folch; M. Lees, G.H. Sloane : A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, **226**, 497-509
18. N. Kanikkannan, K. Kandimalla, S.S. Lamba, M. Singh: Structure activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery, *Current Med. l Chem.* 1999, **6**, 593-608
19. A.M. Rabasco, M.L. González: Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y Aceites*, 2000,**51**,74-96.
20. M.W. Formo, E. Jungermann, F.A. Norris, N. O.V. Sonntag: *Bayley's Industrial Oil and Fat Products*, Wiley'Interscience Publication, US, Vol. 1, 1979.

21. R.I. Gómez: Ph. D. Thesis, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN (Mex) 2003.
22. S. Prachayawarakorn, S. Sawangduanpen, S. Saynampheung, T. Poolpatarachewin, S. Soponronnarit A. Nathakarakule: Kinetics of colour change during storage of dried garlic slices as affected by relative humidity and temperature, *J. Food Eng.* 2004, **62**, 1, 2 -7.
23. Z. Zhen-Shan, W. Li-Jun, J. Shun-Shun, X. Dong Chen, M. Zhi-Huai: Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed, *Separ. Purif. Tech.* 2008, **62**, 192-198
24. H. Li, L. Pordesimo, J. Weiss: High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans, *Food Res. Int.* 2007, **37**, 731-738.
25. A. Beaudoin, G. Martin: Process for the extraction of lipids from fatty bird tissues. U.S. Patent 6521768 (2003)
26. M. Gómez Brandón, M. Lores, J. Domínguez Comparison of extraction and derivatization methods for fatty acid analysis in solid environmental matrixes. *Anal Bioanal Chem.* 2008, **392**, 505-514.
27. J.W. Goodrum, D.P. Geller, T.T. Adams: Rheological Characterization of Yellow Grease and Poultry Fat, 2002, *JAOCS*, 79, 961-964.
28. B.R. Munson, D.F. Young, T.H. Okiishi, *Fundamentals of Fluid Mechanics*, 4th edn., John Wiley & Sons, New York, 2001.
29. E. Monia, E. Bourret, L. Mondolot , H. Attia: Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils, 2005, *Food Chem.*, **93**, 431-437.
30. T. Albi, A. Lanzón, A. Guinda, M. León, M.C. Pérez-Camino: Microwave and conventional heating effects on thermoxidative degradation of edible fats. 1997, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3795–3798.