



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO**

**Recuperación de tocotrienoles de las semillas de *Bixa orellana* L. mediante extracción supercrítica con CO<sub>2</sub>**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTORA:** Araque Espinoza, Ileana Stephanie

**DIRECTOR:** Meneses Chamba, Miguel Ángel, Ph.D.

**LOJA – ECUADOR**

**2017**



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

*Septiembre, 2017*

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Miguel Ángel Meneses Chamba

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: "Recuperación de tocotrienoles de las semillas de *Bixa orellana* L. mediante extracción supercrítica con CO<sub>2</sub>", realizado por Ileana Stephanie Araque Espinoza, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2017

f).....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Ileana Stephanie Araque Espinoza declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Recuperación de tocotrienoles de las semillas de *Bixa orellana* L. mediante extracción supercrítica con CO<sub>2</sub>”, de la Titulación de Ingeniería Química, siendo Ph.D. Miguel Ángel Meneses director del presente trabajo, y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos, y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....

Ileana Stephanie Araque Espinoza  
CI. 1105683104

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo investigativo a mis padres, Augusto y Mireya quienes han sido mis pilares, enseñándome que la honestidad, bondad, rectitud y responsabilidad son los principios más importantes en la vida, ellos con su gran amor me continúan incentivando y apoyando a alcanzar mis metas y sueños, yo los amo y los llevo en mi corazón.

A mi hermana, mi modelo y ejemplo que me ha mostrado que con perseverancia y constancia las metas se cumplen.

A Stan, quien ha estado apoyándome y escuchándome desde el primer día, gracias por estar conmigo, creer en mí y brindarme tus sabios consejos, te quiero mucho.

A mi familia, especialmente a Carolina e Isabella, las más pequeñas, sean curiosas y luchen por sus sueños, el mundo es suyo.

A la memoria de mi abuelito José, como se lo prometí, he culminado mi trabajo.

## **AGRADECIMIENTO**

La realización del presente trabajo de investigación fue la suma de un trabajo arduo y constante, agradezco gratamente a todos quienes me brindaron su apoyo de una u otra manera para la finalización del mismo. Doy gracias primeramente a Dios por guiarme durante y en la finalización de la carrera de mis sueños; a mis profesores que a través de los años de carrera universitaria me compartieron los conocimientos y herramientas que fueron claves durante el desarrollo del proyecto, a mi tutor de tesis Ph.D. Miguel Ángel Meneses, por sus enseñanzas, que incentivaron en mí la investigación, permitiéndome desarrollar las destrezas necesarias para la realización del presente trabajo, al Mg. Sc. Geovanny Figueroa, por su asesoría y plena disposición a responder a mis dudas, a la Srta. Andrea Padilla, por brindarme su ayuda y amistad través de las largas horas de experimentaciones y finalmente a mi familia quienes han creído en mí siempre y me han brindado su apoyo incondicional.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA .....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN .....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	VI
ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Generalidades de <i>Bixa orellana</i> L. ....	6
1.1.1.    Achiote ( <i>Bixa orellana</i> L.) .....	6
1.1.2.    Historia y trascendencia del achiote.....	6
1.1.3.    Situación a nivel mundial.....	7
1.1.4.    Situación en Ecuador. ....	7
1.1.5.    Vitamina E y tocoles. ....	8
1.1.5.1.  Tocotrienoles.....	9
1.1.6.    Química de las semillas de <i>Bixa orellana</i> L.....	11
1.2.    Métodos de extracción de Tocolos.....	12
1.2.1.    Extracción con fluidos supercríticos (ESC). ....	14
1.2.1.1.  Fluido supercrítico. ....	14
1.2.1.2.  Procesamiento de sólidos. ....	16
1.2.1.3.  Procesamiento de matrices líquidas. ....	17
1.2.1.4.  Extracción antisolvente.....	18
1.2.2.    Extracción supercrítica de compuestos tocotrienoles de <i>Bixa orellana</i> L. ....	19
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS DEL PROYECTO .....	21
2.1.    Objetivo general .....	22
2.2.    Objetivos Específicos .....	22
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23

3.1.	Materiales .....	24
3.1.1.	Semillas de <i>Bixa orellana</i> L. ....	24
3.1.2.	Reactivos .....	25
3.2.	Métodos .....	26
3.2.1.	Recuperación de extractos mediante extracción supercrítica .....	26
3.2.2.	Análisis experimental.....	27
3.2.3.	Análisis de extractos.....	28
3.2.3.1.	<i>Rendimiento de extracción supercrítica</i> .....	28
3.2.3.2.	<i>Capacidad antioxidante DPPH</i> .....	29
3.2.4.	Determinación de tocotrienoles mediante CG-MS.....	29
3.2.4.1.	<i>Preparación de los estándares</i> .....	29
3.2.4.2.	<i>Preparación de los extractos</i> .....	29
3.2.4.3.	<i>Corrida cromatográfica de los extractos</i> .....	30
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....		31
4.1.	Obtención de extractos mediante extracción supercrítica con dióxido de carbono de las semillas de <i>Bixa orellana</i> L.....	32
4.2.	Rendimiento de extracción.....	34
4.3.	Determinación de capacidad antioxidante mediante método DPPH. ....	35
4.3.1.	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox. ....	35
4.3.2.	Capacidad antioxidante equivalente a BHT. ....	37
4.3.3.	Análisis de capacidad antioxidante. ....	38
4.4.	Determinación de compuestos tocotrienoles en extractos mediante CG-MS.....	39
4.4.1.	Contenido de $\delta$ -Tocotrienol. ....	39
4.4.2.	Contenido de $\gamma$ -Tocotrienol .....	41
4.4.3.	Análisis del contenido de compuestos tocotrienoles mediante extracción supercrítica con CO <sub>2</sub> .....	42
CONCLUSIONES.....		43
RECOMENDACIONES .....		44
BIBLIOGRAFÍA.....		45
ANEXOS.....		49
Anexo A. Actividad antioxidante mediante método DPPH.....		50
Anexo B. Análisis estadístico .....		55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Usos aislados y efectos individuales de tocotrienoles.....	10
<b>Tabla 2.</b> Composición química de la semilla de <i>Bixa orellana</i> L. ....	11
<b>Tabla 3.</b> Composición del pigmento de <i>Bixa orellana</i> L. ....	11
<b>Tabla 4.</b> Ventajas y desventajas de los métodos comunes usados en la extracción de tocoles .....	13
<b>Tabla 5.</b> Propiedades críticas de algunos solventes .....	15
<b>Tabla 6.</b> Parámetros del proceso de extracción supercrítica a partir de sólidos .....	17
<b>Tabla 7.</b> Tocotrienoles recuperados mediante extracción soxhlet y extracción con CO <sub>2</sub> SC.....	19
<b>Tabla 8.</b> Tocotrienoles recuperados mediante extracción supercrítica en modo semicontinuo.....	20
<b>Tabla 9.</b> Parámetros de estudio estadístico del proceso.....	28
<b>Tabla 10.</b> Resultados obtenidos mediante ESC .....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fruto y semillas de Achiote ( <i>Bixa orellana</i> L.).....	6
<b>Figura 2.</b> Estructuras químicas de la vitamina E. <b>a.</b> Tocoferoles; <b>b.</b> Tocotrienoles .....	9
<b>Figura 3.</b> Cuadro comparativo de porcentaje de Tocoles en aceite de arroz, palma y achiote .....	10
<b>Figura 4.</b> Estructura química de tocotrienoles presentes en semillas de <i>Bixa orellana</i> L: a. $\gamma$ -Tocotrienol; b. $\delta$ -Tocotrienol .....	12
<b>Figura 5.</b> Diagrama de fases para un compuesto puro.....	15
<b>Figura 6.</b> Diagrama de flujo de la extracción supercrítica de una matriz sólida.....	16
<b>Figura 7.</b> Diagrama de flujo de la extracción supercrítica en matriz líquida .....	17
<b>Figura 8.</b> Esquema de la extracción supercrítica antisolvente .....	19
<b>Figura 9.</b> Mapa de la provincia de Zamora Chinchipe .....	24
<b>Figura 10.</b> Fruto y semillas secas de Achiote ( <i>Bixa orellana</i> L.) .....	25
<b>Figura 11.</b> Semillas secas de Achiote ( <i>Bixa orellana</i> L.).....	25
<b>Figura 12.</b> Esquema de la planta de extracción supercrítica UTPL. ....	26
<b>Figura 13.</b> Muestra de extracto de semillas de <i>Bixa orellana</i> L. de ESC.....	32
<b>Figura 14.</b> Diagrama de pareto estandarizado para rendimiento .....	34
<b>Figura 15.</b> Gráfica de efectos principales para rendimiento.....	35
<b>Figura 16.</b> Diagrama de pareto estandarizado para A. A. mediante método DPPH ( $\mu\text{M ET/g ext}$ ) .....	36
<b>Figura 17.</b> Gráfica de efectos principales para A. A. mediante el método DPPH ( $\mu\text{M ET/g ext}$ ). .....	36
<b>Figura 18.</b> Diagrama de pareto estandarizado para A. A. mediante método DPPH ( $\mu\text{M ET/g SE}$ ) BH .....	37
<b>Figura 19.</b> Cromatograma correspondiente a corrida 1 de ESC, incluyendo al estándar interno $\alpha$ -Tocoferol .....	39
<b>Figura 20.</b> Gráfico comparativo de respuesta de contenido de $\delta$ -Tocotrienol en extractos..	40
<b>Figura 21.</b> Gráfica de efectos principales para contenido de $\delta$ -Tocotrienol en extractos .....	40
<b>Figura 22.</b> Gráfico comparativo de respuesta de contenido de $\gamma$ -Tocotrienol en extractos .	41
<b>Figura 23.</b> Gráfica de efectos principales para contenido de $\gamma$ -Tocotrienol en extractos ....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A. A.</b>	Actividad antioxidante
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>Atm</b>	Atmósferas
<b>BH</b>	Base húmeda
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>Cal</b>	Caloría
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante equivalente al Trolox
<b>cm</b>	Centímetro
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración correspondiente al 50% de inhibición
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>CG-MS</b>	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<b><math>\delta</math></b>	Delta
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CO<sub>2</sub> SC</b>	Dióxido de carbono supercrítico
<b>GAE</b>	Equivalente a Ácido Gálico
<b>ET</b>	Equivalentes Trolox
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>ESC</b>	Extracción Supercrítica
<b>ext.</b>	Extracto
<b>FSC</b>	Fluido Supercrítico
<b><math>\gamma</math></b>	Gamma
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>BHA</b>	Hidroxibutilanisol
<b>MPa</b>	Megapascascales
<b>MeOH</b>	Metanol
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromoles
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Millilitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>min</b>	Minutos

<b>ng</b>	Nanogramos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>Pa</b>	Pascales
<b>P</b>	Presión
<b>PC</b>	Punto crítico
<b>p/v</b>	Relación peso-volumen
<b>S/F</b>	Relación Solvente/Fluido
<b>R</b>	Rendimiento
<b>SE</b>	Semilla
<b>ST</b>	Solución de trabajo
<b>T</b>	Temperatura
<b>T3</b>	Tocotrienol

## RESUMEN

*Bixa orellana* L., conocida comúnmente como achiote, es una planta originaria de las zonas tropicales, sus semillas poseen los compuestos de mayor actividad antioxidante de la vitamina E, por lo que se ha incrementado el interés por su estudio. La presente investigación tuvo como objetivo la recuperación de extractos de dichas semillas utilizando tecnología de extracción supercrítica. Los extractos se analizaron respecto a su capacidad antioxidante a través del método DPPH y respecto al contenido de tocotrienoles presentes en ellos mediante CG-MS. El mayor rendimiento de extracción SC fue 3.44% correspondiente a las condiciones de 47.5 °C, 100 Bar y 20 L/min, la actividad antioxidante de 357.19  $\mu\text{M}$  ET/g ext. y 185.95  $\mu\text{M}$  EBHT/g extr., mientras que el mayor rendimiento en relación al contenido de  $\delta$ -T3 y  $\gamma$ -T3 en extractos se evidenció a condiciones de 47.5°C, 100 Bar y 50 L/min de CO<sub>2</sub>, que correspondió al 10.73% y 0.8% respectivamente, demostrando la efectividad del uso de dióxido de carbono supercrítico en la recuperación de extractos libres de solvente a partir de las semillas de achiote de eficiente capacidad antioxidante.

**Palabras clave:** *Bixa orellana* L., dióxido de carbono supercrítico, capacidad antioxidante, semillas de achiote, extracción supercrítica.

## ABSTRACT

*Bixa orellana* L., commonly known as achiote, is a plant native of tropical areas, its seeds possess the compounds with the highest antioxidant activity of vitamin E, which has increased interest in its study. The objective of the present investigation was to recover pure extracts of these seeds using supercritical fluid technology. The extracts were analyzed for their antioxidant capacity using the DPPH method and the content of tocotrienols present in them by GC-MS. The greatest SC-extraction yield was 3.44% corresponding to the conditions of 47.5 °C, 100 Bar and 20 L/min and the antioxidant activity 357.19  $\mu$ MET/g ext and 185.95  $\mu$ M EBHT/g ext. While the greatest yield in relation to the contents of  $\delta$ -T3 and  $\gamma$ -T3 in extracts was evidenced to conditions of 47.5 °C, 100 Bar and 50 L/min of CO<sub>2</sub> corresponding to 10.73% and 0.8% respectively. There by it proved the effectiveness of using supercritical carbon dioxide in the recovery of solvent-free extracts from achiote seeds with an efficient antioxidant capacity.

**Key words:** *Bixa orellana* L., supercritical carbon dioxide, antioxidant capacity, annatto seeds, supercritical extraction.

## INTRODUCCIÓN

El achiote es un arbusto de aproximadamente 2 a 5 metros de altura, se desarrolla en zonas tropicales de varios países, sus semillas han sido utilizadas tradicionalmente como colorante y condimento; actualmente cumplen un papel importante dentro de la producción de alimentos, bebidas y tejidos, cosméticos, pinturas, medicamentos, y balanceados para ave de corral. Conforman uno de los cultivos más importantes dentro del Ecuador; siendo la provincia de Manabí la de mayor producción de achiote en el país, cuyo 80% se destina a la exportación, además su uso como tintura forma parte de la cultura de varias denominaciones indígenas como son los Tsáchilas, los Cofán, los Cobayas y los Cayapas.

Las fracciones lipídicas de las semillas de achiote carecen de tocoferoles y constituyen una gran fuente de tocotrienoles, específicamente  $\delta$ -tocotrienol y  $\gamma$ -tocotrienol, compuestos de mayor actividad de la vitamina E que poseen propiedades antioxidantes, disminuyen el colesterol, los triglicéridos y han demostrado tener efectos anticancerígenos y radioprotectores efectivos.

Los extractos de achiote pueden usarse en la prevención de la peroxidación lipídica, protección de alimentos, además como base de excipientes y medicamentos contra el daño oxidativo. Existen tres métodos principales que se aplican en la extracción del pigmento de las semillas de achiote: extracción con aceite vegetal, solución alcalina y extracción con solventes orgánicos.

La demanda de consumo de productos que brinden beneficios para la salud crece continuamente, esto ha incentivado a que tanto empresas como investigadores estudien nuevas fuentes de compuestos bioactivos, en reemplazo de los sintéticos, usados comúnmente. Sin embargo el procesamiento de las matrices naturales mediante métodos tradicionales de extracción generalmente presenta varias limitantes, como el requerimiento de grandes volúmenes de solventes y largos tiempos de contacto, así como etapas de procesamiento posterior para la separación y purificación de los extractos obtenidos.

Mediante la presente investigación, se buscó optimizar los principales parámetros de extracción supercrítica con dióxido de carbono para obtener extractos a partir de las semillas de achiote (*Bixa orellana* L.), analizando la actividad antioxidante de dichos extractos y cuantificando sus compuestos tocotrienoles.

El capítulo 1 aborda el marco teórico de la investigación, éste proporciona información respecto a *Bixa orellana* L. y los compuestos tocotrienoles encontrados en sus semillas.

Además se nombran algunos métodos de extracción, destacando la aplicación de fluidos supercríticos. En el capítulo 2 se muestran los objetivos de la investigación, y dentro del capítulo 3 se encuentran los materiales y métodos utilizados en la experimentación, haciendo énfasis en los parámetros de operación. Finalmente en el capítulo 4 se exhiben los resultados de la investigación y su discusión respecto a rendimiento, capacidad antioxidante y contenido de tocotrienoles bajo las condiciones de extracción supercrítica empleadas.

Para la obtención y aprovechamiento de las semillas de achiote como recurso natural se propuso emplear la tecnología de extracción supercrítica con dióxido de carbono como una alternativa viable, económicamente sustentable, segura y amigable con el ambiente. A través de este proceso se obtuvieron extractos ricos en tocotrienoles de alta calidad, libres de compuestos tóxicos, con eficiente capacidad antioxidante y un mayor rendimiento de extracción respecto al de extracciones clásicas.

Durante la investigación se estudiaron los principales parámetros de extracción supercrítica con dióxido de carbono: presión, temperatura y flujo; estos fueron analizados respecto a su capacidad antioxidante mediante el método DPPH y composición de tocotrienoles a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La investigación permitió desarrollar experticia en la aplicación de una tecnología nueva y segura, siendo beneficioso el uso de dióxido de carbono dentro de las extracciones, por ser un solvente de alta pureza, bajo costo, inodoro, no flamable, ni tóxico, que garantizó condiciones de operación fáciles de alcanzar, previniendo la posible degradación de compuestos termolábiles. Pese a que la inversión para la instalación del equipo de ESC es alta, esta puede ser compensada por los resultados que se obtienen en cuanto a rendimientos de extracciones en cortos tiempos, selectividad de compuestos y las aplicaciones en la industria de alimentos y farmacéutica.

**CAPÍTULO 1.**  
**MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Generalidades de *Bixa orellana* L.

### 1.1.1. Achiote (*Bixa orellana* L.)

*Bixa orellana* L., achiote, annatto, bija o urucú es la planta más significativa de la familia Bixácea, es un arbusto que pertenece originalmente a la América Tropical, puede encontrarse en varias partes del mundo, preferentemente en países como, Perú, Ecuador, Colombia, República Dominicana, Bolivia, Brasil y Jamaica. Esta especie posee una altura que varía entre los 2 a 5 metros, presenta hojas simples, floración escalonada de una coloración que varía entre el blanco y rosa; sus frutos (Figura 1) se presentan como cápsulas fototrópicas, protegidas por varias espinas que pueden ser marrones, rojas o púrpuras, estas pueden abrirse y en su interior se encuentran las semillas que presentan una coloración rojiza o naranja.<sup>1-4</sup>



**Figura 1.** Fruto y semillas de Achiote (*Bixa orellana* L.)  
Fuente: Maui, Hawaii.<sup>5</sup>

### 1.1.2. Historia y trascendencia del achiote.

El origen de *Bixa orellana* L. corresponde a la América tropical y se remonta a épocas precolombinas, extendiéndose desde Brasil hasta México. A lo largo de la historia varios grupos indígenas han usado los pigmentos de las semillas de este arbusto como un recurso ornamental, religioso o de guerra, el que posee acciones repelentes, cicatrizantes y ofrece protección contra la radiación solar, siendo en Norteamérica uno de los grupos más notorios los Pieleros Rojos, mientras que en Sudamérica el uso de estos pigmentos se ha evidenciado en indígenas de la Amazonía.<sup>1,6</sup>

La distribución del achiote ocurrió por varios factores, entre ellos, el intercambio sus semillas entre las poblaciones de zonas tropicales y de zonas templadas que hacían uso de sus propiedades colorantes y medicinales. Por otro lado, los colonizadores españoles dieron uso

a la planta como condimento, contribuyendo con la distribución de esta especie a través del continente Americano y simultáneamente al Europeo, llegando su conocimiento inclusive al Sureste de Asia, a países como Filipinas y Vietnam.<sup>1,7</sup>

Durante el precolombino el achiote se usó como alimento, cosmético y tintura para tejidos, dentro de grupos indígenas como los aztecas se destacó como alimento, mientras que en Sudamérica los indígenas lo usaron para colorear su cuerpo. En Europa fue un producto de gran importancia en la coloración del chocolate hasta el siglo XVII.<sup>6,7</sup>

La aparición de colorantes artificiales ocasionó que la demanda de achiote disminuyera a partir de 1984, no obstante, la prohibición de colorantes sintéticos en algunos países, ha conseguido que este pigmento y otros naturales puedan reposicionarse en el mercado principalmente en la industria alimenticia y cosmética.<sup>8</sup> Además, CATIE<sup>9</sup> citando a Barreto<sup>10</sup>, menciona que la Organización Mundial de la Salud ha reconocido que los pigmentos de achiote no presentan ningún nivel de toxicidad, siendo seguro su consumo tanto para la alimentación animal, como para la humana.

### **1.1.3. Situación a nivel mundial.**

En varios países el achiote se emplea como colorante y condimento en la preparación de alimentos, estos incluyen a Costa Rica, Perú, Bolivia y en Ecuador, en donde además forma parte de la identidad de varios grupos indígenas como los Cofán, los Cobayas y los Cayapas que lo usan como pigmento en su piel, mientras que los indígenas Tsáchilas lo usan para teñirse el cabello.<sup>11</sup>

Las semillas, corteza, raíces y hojas secas de *Bixa orellana* L. suelen usarse con fines terapéuticos. Se ha despertado especial interés por sus semillas, pues cuando se pulverizan, pueden aprovecharse como remedio natural sobre quemaduras para evitar cicatrices, sobre contusiones como desinflamatorio y además sobre afecciones de la piel; varias poblaciones de Latinoamérica, España, Asia, India y Nativos Americanos las usan como colorante y especia alimentaria en variedad de productos; también suelen usarse frecuentemente como colorantes de cosméticos y textiles.<sup>1,12,13</sup>

### **1.1.4. Situación en Ecuador.**

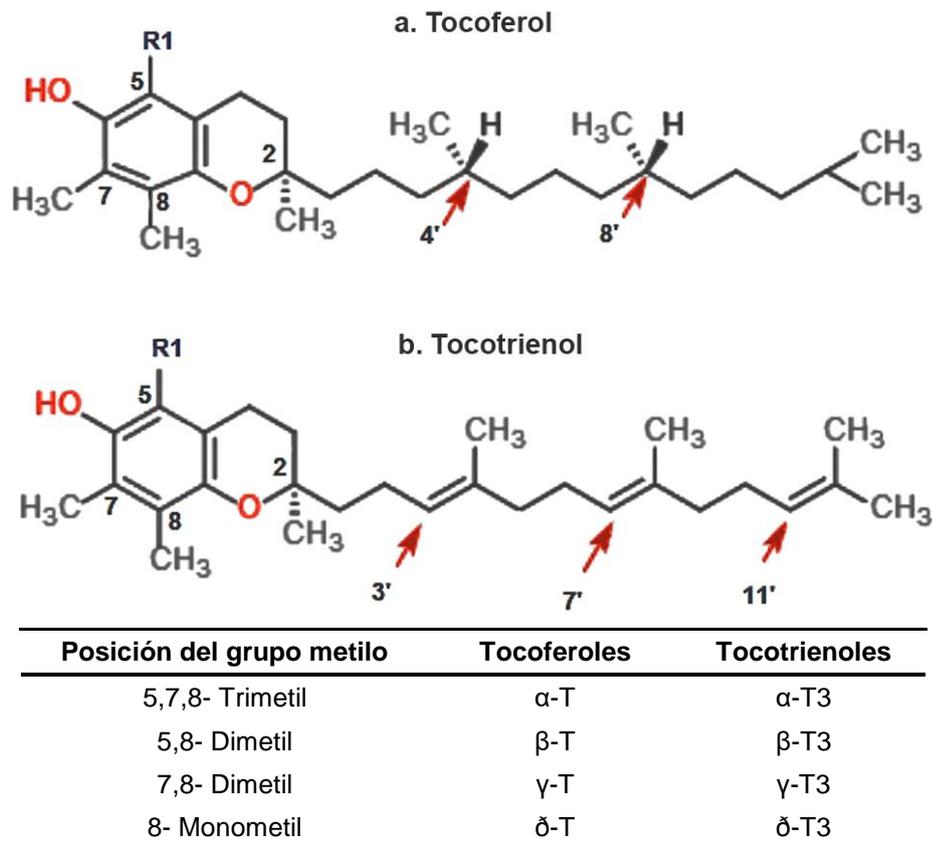
La provincia que aporta con la mayor producción de achiote en Ecuador es Manabí, el 80% de esta se destina a la exportación, la que desde el 2011 ha experimentado un incremento a países como Estados Unidos, Puerto Rico, Japón, España y Francia.<sup>14</sup>

Durante el 2013, el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) apoyó a diferentes zonas de Manabí en busca de fortalecer la producción de achiote, motivando a los productores a aplicar criterios de calidad para el cultivo, incluyendo podas, manejo integrado de plagas y fertilización agrícola.<sup>15</sup>

Ya que el achiote conforma uno de los cultivos más importantes del país, durante el 2014 el Ministerio del Ambiente, la Agencia de Desarrollo Empresarial del Sur (ADES) y la Corporación Naturaleza y Cultura (NCI) firmaron un convenio, con el objeto de implementar el cultivo de achiote en la cuenca del río Jambué en la Provincia de Zamora Chinchipe, como una opción viable para la recuperación de ecosistemas degradados, promoción del emprendimiento sostenible y conservación de patrimonio natural. En el proyecto se incluyeron 10 productores que realizaron sembríos en comunidades de Santa Cecilia, La Pituka, Numbami y Romerillos Bajo; complementario a esto se encuentran las innovativas investigaciones que la Universidad Técnica Particular de Loja se encuentra ejecutando actualmente, siendo una de estas la presente.<sup>16,17</sup>

#### **1.1.5. Vitamina E y tocoles.**

La vitamina E se conforma de compuestos llamados tococromanoles o tocoles, estos engloban a tocoferoles (T1) y tocotrienoles (T3), cuya diferencia radica en la terminación de su estructura, pues los tocoferoles poseen una cola phytyl saturada, mientras los tocotrienoles se caracterizan por su cola farnesil insaturada con 3 triples enlaces, que tiene una longitud de un tercio de la primera. Los compuestos tocoles se presentan dispuestos en sus formas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - y las letras griegas denotan el nivel de sustituciones metílicas que posee la estructura (Figura 2).<sup>18,19</sup>



**Figura 2.** Estructuras químicas de la vitamina E. **a.** Tocoferoles; **b.** Tocotrienoles  
**Fuente:** Tan, Watson, & Preedy.<sup>20</sup>  
 Elaboración: La autora

La cantidad de compuestos recuperados de determinado producto dependerán de la planta que se esté estudiando y del método que se emplee para su extracción.<sup>20</sup>

#### 1.1.5.1. Tocotrienoles.

Dentro de la vitamina E destacan los compuestos tocotrienoles por sus variadas propiedades (Tabla 1), entre las que destacan su poder reductor de colesterol y triglicéridos, propiedades de las que carecen sus análogos tocoferoles.<sup>4</sup> Además, Tan & Amherst llobrera<sup>19</sup> citando a Theriault, A., et al.<sup>21</sup> y Watkins, T. et al.<sup>22</sup>, mencionan que estos compuestos, son capaces de disminuir la apolipoproteína B y los niveles de lipoproteínas en el plasma, tienen gran aporte en la lucha contra la enfermedad cardiovascular y el cáncer; adicionalmente Tan & Amherst llobrera<sup>19</sup> hacen referencia a estudios realizados por Serbinova, E. et al.<sup>23</sup> y Packer, L., et al.<sup>24</sup>, mencionando que las propiedades antioxidantes de tocotrienoles sobrepasan a las de tocoferoles, debido a que la longitud de su cola farnesil les proporciona mayor movilidad en las membranas celulares.

A su vez Saini & Keum<sup>25</sup> citando a Jiang<sup>26</sup>, manifiestan que sus capacidades antiinflamatorias y antioxidantes superan a las de tocoferoles en la prevención y tratamiento de importantes

enfermedades crónicas. Tan<sup>4</sup> afirma que la combinación de  $\gamma$ -T3 y  $\delta$ T3 es la más efectiva en el tratamiento del síndrome metabólico, pre-diabetes, enfermedad cardiovascular y cáncer.

Debido a que se ha demostrado que  $\alpha$ -tocoferol puede reducir el poder de acción de tocotrienoles en el organismo, se prioriza encontrar matrices que contengan estos compuestos en gran proporción respecto a tocoferoles, o libres de ellos.<sup>4,27</sup>

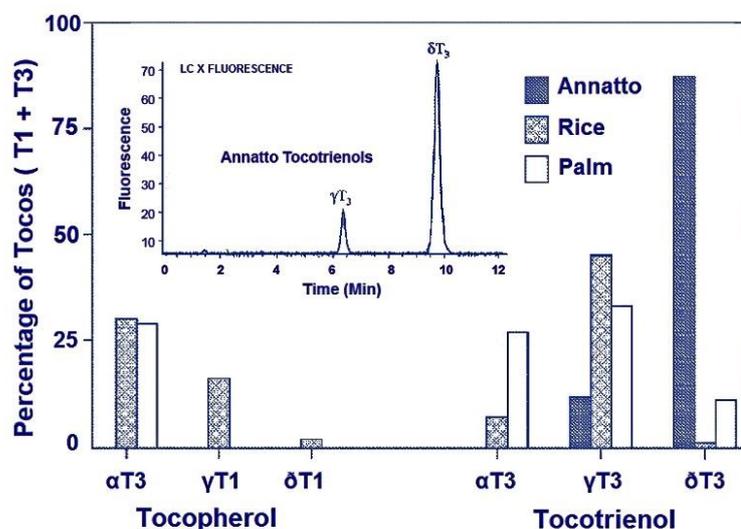
**Tabla 1.** Usos aislados y efectos individuales de tocotrienoles

Compuesto	Usos
$\alpha$ -tocotrienol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Abundante en arroz y palma.</li> <li>• Poderoso antioxidante en comparación a <math>\alpha</math>-tocoferol.</li> <li>• Bajo poder reductor de colesterol.</li> <li>• Inhibe neurotoxicidad, señalización celular, deposición de la piel.</li> </ul>
$\beta$ -tocotrienol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poco abundante en plantas, presente en germen de trigo.</li> <li>• No es un contribuidor biológico significativo, de acción similar a <math>\alpha</math>-T3</li> </ul>
$\gamma$ -tocotrienol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Abundante en arroz, palma y achiote.</li> <li>• Natriurético, inhibe el cáncer, aterosclerosis, osteoporosis, colesterol e hipertensión.</li> </ul>
$\delta$ -tocotrienol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Abundante en achiote</li> <li>• Compuesto más activo de los tocotrienoles</li> <li>• Repara daño nervioso, inhibe estímulos inflamatorios, colesterol y cáncer</li> </ul>

**Fuente:** Tan & Amherst Ilobrera.<sup>19</sup>

Elaboración: La autora

Existen varios aceites vegetales como fuente de tocotrienoles, entre los que destacan, el aceite de salvado de arroz, el aceite de palma y el aceite de achiote (Figura 3), siendo este último libre de T1 y el mayor poseedor de  $\delta$ -tocotrienol.<sup>4,27</sup>



**Figura 3.** Cuadro comparativo de porcentaje de Tocoferoles en aceite de arroz, palma y achiote

**Fuente:** Tan & Amherst Ilobrera.<sup>19</sup>

### 1.1.6. Química de las semillas de *Bixa orellana* L.

La composición de las semillas del fruto de *Bixa orellana* L. es variada (Tabla 2), entre sus principales compuestos se encuentra el apocarotenoide cis-bixina ( $C_{25}H_{30}O_4$ ) que conforma su revestimiento externo, es soluble en una amplia gama de solventes polares y responsable de aproximadamente 80% de los pigmentos existentes en ella; también se encuentra el pigmento norbixina en menor proporción, que es soluble en agua. Otros de sus compuestos incluyen carotenoides y apocarotenoides.<sup>12,28,29</sup>

**Tabla 2.** Composición química de la semilla de *Bixa orellana* L.

Composición química (%)	
Humedad	8.00 – 13.00
Proteína	13 – 14.24
Celulosa	13.8
Fibra Cruda	18.48
Almidones	11.45
Carbohidratos totales	39.91
Ceniza	4.50 – 7.97
Energía	54 kcal

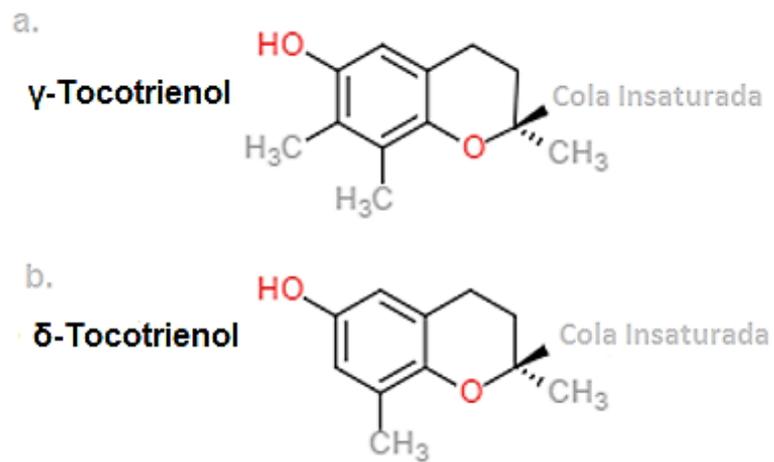
**Fuente:** Enrique, Pineda, & Calderón.<sup>28</sup>

Los pigmentos de achiote contienen varios compuestos (Tabla 3), de estos, destacan la bixina y orellina; sus extractos encuentran libres de tocoferoles y poseen tocotrienoles generalmente en proporciones de 90%  $\delta$ -T3 y 10%  $\gamma$ -T3, cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 4; suelen presentarse además trazas de  $\beta$ -T3, geranil geranioles, junto con compuestos de materiales oleorresinosos exclusivos del extracto que se encuentran en menor cantidad.<sup>4,19,30,31</sup>

**Tabla 3.** Composición del pigmento de *Bixa orellana* L.

Composición por 100 g	
Proteínas	12.3 – 13.2
Pectina	0.23
Carbohidratos	39.91 – 47.90
Ceniza	5.44 – 6.92
Taninos	0.33 – 0.91
Pentosanos	11.35 – 14.97
Carotenoides	1.21 – 2.30
$\beta$ -carotenos	6.8 – 11.30 mg

**Fuente:** Enrique, Pineda, & Calderón.<sup>28</sup>



**Figura 4.** Estructura química de tocotrienoles presentes en semillas de *Bixa orellana*  
 L: a.  $\gamma$ -Tocotrienol; b.  $\delta$ -Tocotrienol  
**Fuente:** Tan et al.<sup>20</sup>  
 Elaboración: La autora

## 1.2. Métodos de extracción de Tocolos.

Se denotan varios métodos para la extracción de tocoles, algunas de sus ventajas y desventajas se evidencian en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Ventajas y desventajas de los métodos comunes usados en la extracción de tocoles

<b>Método de extracción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Extracción con solventes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de solventes o mezclas de solventes para recuperar compuestos de la matriz natural.</li> <li>• Método más simple de extracción.</li> <li>• Extracción con solventes y saponificación elimina impurezas y reduce interferencias en los análisis cromatográficos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Largos tiempos de extracción con alto consumo de solventes.</li> </ul>
<b>Extracción asistida por ultrasonido (UAE)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de ondas de ultrasonido para mejorar la penetración de los solventes en las células de la matriz natural, intensificando la transferencia de masa.</li> <li>• Técnica barata, simple, rápida y eficiente.</li> <li>• Bajas temperaturas permiten la extracción de compuestos termolábiles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La eficiencia depende de la clase de matriz de la planta.</li> <li>• No existe reproductibilidad por la falta de uniformidad de la distribución de la energía de ultrasonido.</li> <li>• Es necesario mantener a una temperatura constante el recipiente de sonicación por la alta generación de calor.</li> </ul>
<b>Extracción con dispersión en fase sólida de la matriz (MSPD)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Usa un agente de dispersión adecuado que se mezcla con la matriz natural, luego se transfiere a una columna para la extracción con solventes.</li> <li>• Simultánea ruptura y extracción de muestras sólidas, semisólidas y viscosas.</li> <li>• Fácil elución selectiva de un compuesto individual.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere de tiempo y arduo trabajo.</li> </ul>
<b>Extracción con fluidos supercríticos (SCFE)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de un fluido en estado supercrítico como solvente que puede ser recuperado sin dañar el sustrato y extracto.</li> <li>• Selectividad y fraccionamiento respecto a características fisicotérmicas como, densidad, viscosidad, difusividad y constante dieléctrica del fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>) que pueden ser variadas cambiando la presión y temperatura</li> <li>• La alta difusividad del fluido supercrítico permite la rápida transferencia de masa, que aumenta la eficiencia.</li> <li>• El fluido comúnmente usado es el CO<sub>2</sub>, que no es tóxico, tampoco flamable, ni corrosivo en presencia de agua, además es económico</li> <li>• Muy conveniente para la extracción de compuestos termolábiles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto costo del equipo y posible obstrucción del sistema por presencia de agua en las muestras</li> </ul>
<b>Extracción líquida presurizada (PLE)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se usa un conjunto de solventes que se mezclan con la matriz natural y se someten a una temperatura por encima de su punto de ebullición y una alta presión.</li> <li>• Reduce el uso de solventes orgánicos en la extracción.</li> <li>• Las altas temperaturas y presiones facilitan la solubilidad y transferencia de masa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No es conveniente para los compuestos termolábiles y que se encuentren en bajas concentraciones</li> </ul>

**Fuente:** Saini & Keum.<sup>25</sup>

Elaboración: La autora

### **1.2.1. Extracción con fluidos supercríticos (ESC).**

La extracción con fluidos supercríticos se enfoca principalmente en obtener compuestos libres de solventes contaminantes, a partir de matrices naturales. Para el éxito de las extracciones se deben tener en cuenta parámetros como, la solubilidad y ubicación del compuesto de interés en la matriz vegetal, la resistencia a la transferencia de masa por la estructura de la materia prima, entre otras. Es imperativo además, el conocimiento de la termodinámica y cinética del proceso, pues estas intervienen de manera directa en la solubilidad y transferencia de masa del mismo, respectivamente.<sup>32</sup>

La extracción supercrítica se realiza mediante dos procesos, el primero consiste en el arrastre y la solubilidad de los componentes de interés por el fluido supercrítico y el segundo comprende la separación de estos componentes del fluido; el proceso es favorecido por la baja viscosidad y alta difusividad del fluido supercrítico, por lo que puede ser aplicado fácilmente a matrices sólidas, líquidas o viscosas. La separación de los compuestos de interés del fluido supercrítico se logra por la modificación de las propiedades termodinámicas de este, como presión y temperatura, o mediante métodos de adsorción o absorción, ambos procesos son económicos y de fácil escalamiento a nivel industrial. Adicionalmente, si se realiza un fraccionamiento, puede asegurarse la selectividad del proceso obteniendo extractos de alta calidad libres de solventes.<sup>31-33</sup>

Con el interés de obtener compuestos naturales libres de contaminantes por parte del sector químico, alimentario y farmacéutico, se ha favorecido a la extracción supercrítica como uno de los métodos más innovadores para obtener compuestos naturales. Se conoce que entre los solventes supercríticos el más utilizado es el dióxido de carbono, pues su temperatura y presión crítica no son extremas (31.3°C; 72.9 atm), es fácil de encontrar, de manejo seguro, y tiene un precio accesible.<sup>32-34</sup>

#### **1.2.1.1. Fluido supercrítico.**

En un fluido supercrítico (FSC) no se distinguen sus fases, sus condiciones de presión y temperatura se encuentran sobre su punto crítico (PC) (Figura 5) y bajo este estado exhibe propiedades de gas y líquido simultáneamente, pudiendo adoptar la forma de su contenedor, mientras mantiene la densidad de un líquido, a lo que se atribuye su poder disolvente.<sup>34,35</sup>

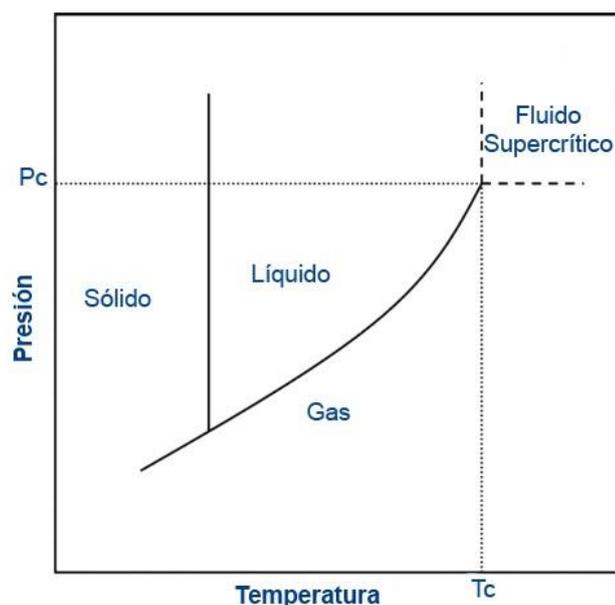


Figura 5. Diagrama de fases para un compuesto puro

En la tabla 5 se muestran algunas propiedades críticas de distintos solventes en estado crítico.

Tabla 5. Propiedades críticas de algunos solventes

Solvente	Propiedades críticas			
	Temperatura (°C)	Presión (atm)	Densidad (g/mL)	Parámetro de Solubilidad $\delta_{FSC}$ (cal <sup>-0,5</sup> cm <sup>-1,5</sup> )
Eteno	10.1	50.5	0.200	5.8
Agua	101.1	217.6	0.322	13.5
Metanol	-34.4	79.9	0.272	8.9
Dióxido de carbono	31.2	72.9	0.470	7.5
Etano	32.4	48.2	0.200	5.8
Óxido nitroso	36.7	71.7	0.460	7.2
Hexafluoruro de azufre	45.8	37.7	0.730	5.5
n-butano	-139.9	36.0	0.221	5.2
n-pentano	-76.5	33.3	0.237	5.1

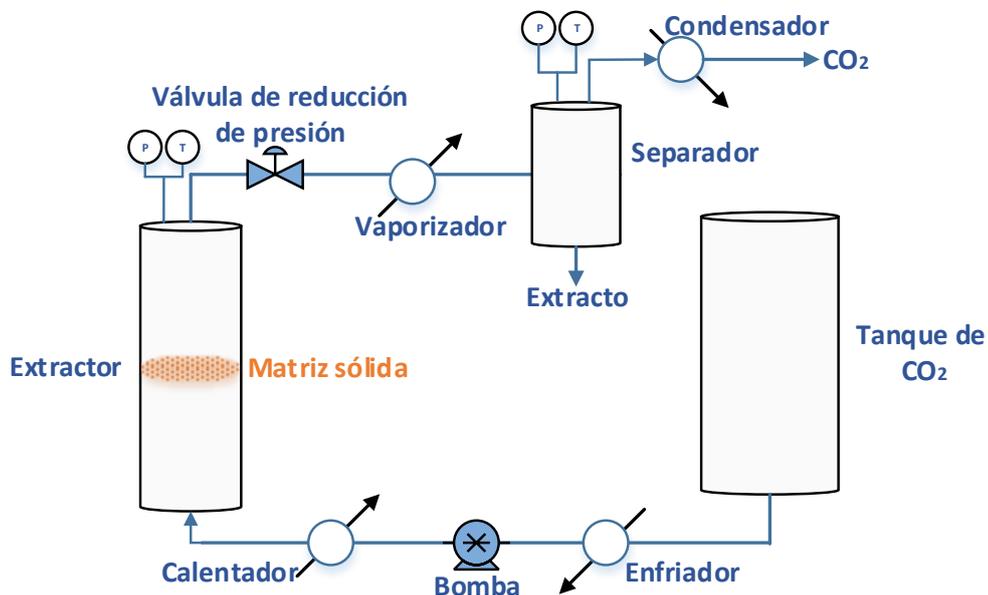
Fuente: Herrero, Cifuentes, & Ibañez.<sup>34</sup>

Las propiedades fisicoquímicas de los FSC les permiten poseer capacidades de transporte superiores a las de los líquidos, por lo que cuando se usan como solvente de extracción pueden difundirse eficientemente a través de matrices sólidas y así favorecer mayores rendimientos de extracción.<sup>34</sup>

### 1.2.1.2. Procesamiento de sólidos.

Es muy común estudiar la extracción o separación de uno o más compuestos de una matriz sólida. El proceso (Figura 6) inicia con la adecuación del fluido, para prevenir cavitación se disminuye su temperatura, asegurando su estado líquido a su paso por la bomba, luego se lleva el fluido a la temperatura de extracción (sobre PC), a continuación pasa por el extractor, que se encuentra a la misma temperatura y contiene en su interior la materia prima de la que serán extraídos los compuestos de interés. El FSC atraviesa la matriz sólida y extrae los compuestos, luego a su salida pasa por una válvula de despresurización hacia un separador, la baja presión permite que el FSC pase a estado gaseoso y que los extractos se separen de este; para asegurar esta separación se suele llevar al fluido sobre su temperatura de saturación a su fase gaseosa; el extracto se recolecta del separador, mientras el fluido supercrítico abandona el sistema como un gas, o puede recircularse.<sup>32,33</sup>

Para optimizar la extracción de compuestos bioactivos durante el proceso y reducir sus costos, se pueden implementar varios separadores. Adicionalmente si se los opera con diferentes parámetros de temperatura y presión, pueden fraccionarse los extractos y obtener diferentes compuestos de cada separador, según las diferencias de su solubilidad,<sup>32,33</sup>



**Figura 6.** Diagrama de flujo de la extracción supercrítica de una matriz sólida  
**Fuente:** Martínez.<sup>33</sup>  
**Elaboración:** La autora

Una de las ventajas de este método es la capacidad de modificar la densidad del FSC variando parámetros de temperatura y presión, que influyen directamente con su solubilidad; otros parámetros que influyen en la técnica se nombran en la Tabla 6.<sup>33,34</sup>

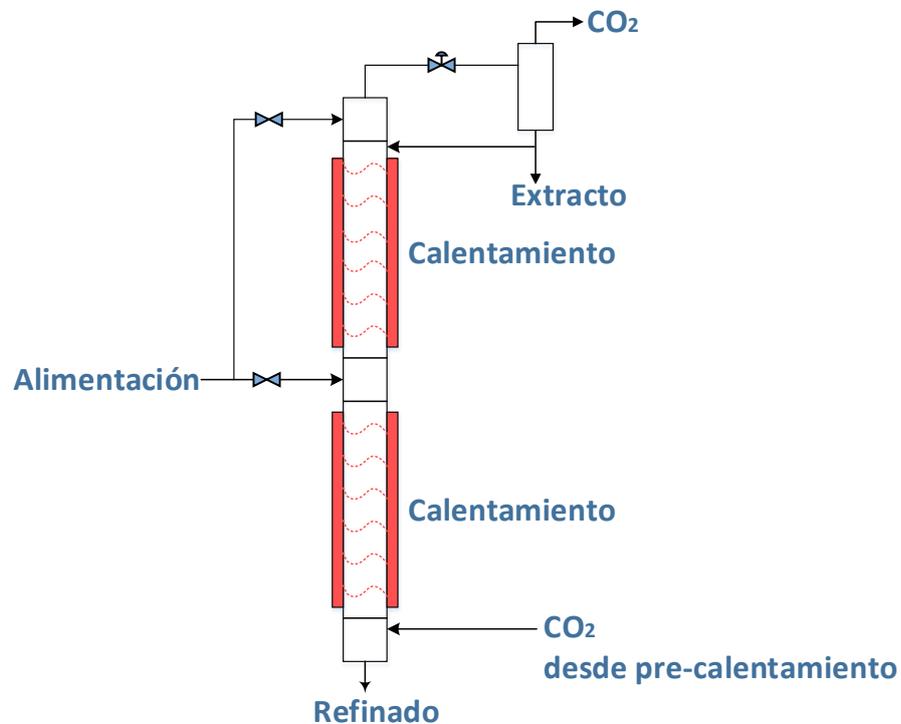
**Tabla 6.** Parámetros del proceso de extracción supercrítica a partir de sólidos

Materia Prima	Condiciones de Operación	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morfología y tamaño</li> <li>• Humedad</li> <li>• Reacciones químicas para liberar los compuestos del extracto</li> <li>• Destrucción celular</li> <li>• Peletización</li> </ul>	<p><b>Condiciones de extracción</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presión</li> <li>• Temperatura</li> <li>• Tiempo</li> <li>• Flujo del solvente</li> <li>• Razón de alimentación de disolvente</li> </ul>	<p><b>Condiciones de separación</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presión</li> <li>• Temperatura</li> </ul>
	<p><b>Ejecución de extracción</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extracción fraccionada</li> <li>• Condiciones constantes</li> </ul>	<p><b>Ejecución de separación</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Una sola fase</li> <li>• Separación fraccionada</li> </ul>

Fuente: Martínez.<sup>33</sup>

### 1.2.1.3. Procesamiento de matrices líquidas.

La extracción supercrítica de una matriz líquida generalmente se realiza mediante una columna en contracorriente, similar a la destilación (Figura 7) y su proceso ha demostrado ser más rentable que el realizado a matrices sólidas.<sup>33</sup>



**Figura 7.** Diagrama de flujo de la extracción supercrítica en matriz líquida

Fuente: Martínez.<sup>33</sup>

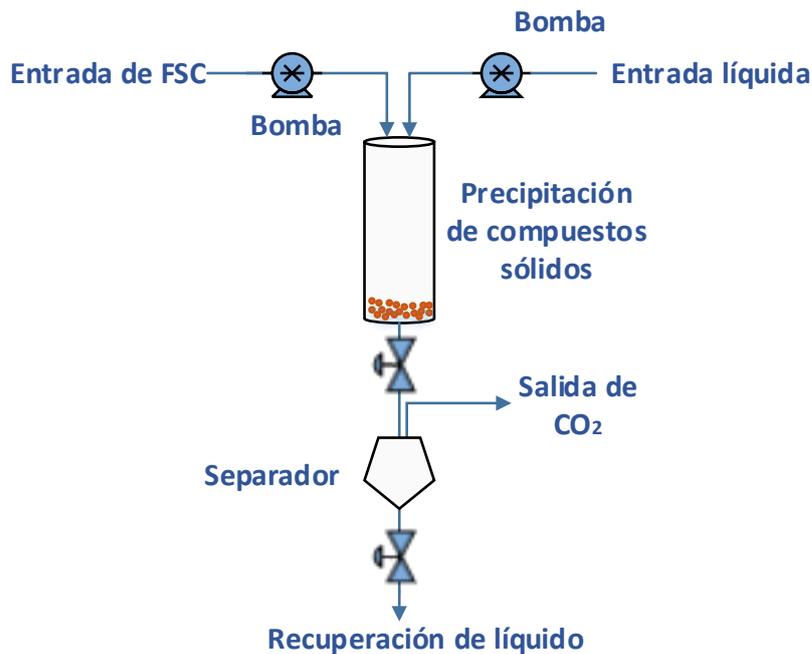
Elaboración: La autora

En el proceso, la solución líquida (matriz) ingresa a la columna por la parte superior o media, mientras el solvente (FSC) se introduce por la parte inferior, los dos fluidos entran en contacto mediante un material de empaque. La extracción ocurre generalmente a presión constante y la temperatura de la columna se ajusta para que permanezca constante o con un gradiente establecido; el material más denso abandona la columna por la parte inferior para ser colectado, mientras que por la parte superior se recupera el solvente y extracto. Existen parámetros a tomar en cuenta para que el proceso se realice correctamente como, controlar las densidades de los fluidos, de manera que la densidad de la matriz líquida sea siempre mayor a la del FSC, por otro lado, los parámetros de presión y temperatura deben ser controlados, pues la solubilidad de los compuestos de interés dentro de la matriz líquida dependen directamente de estos. Otro parámetro a tomarse en cuenta es la razón de entrada del líquido a la columna para prevenir una inundación en esta. Este proceso resulta muy beneficioso, pues cuenta con un reflujo de extracto, lo que favorece la selectividad en la extracción.<sup>32,33</sup>

#### **1.2.1.4. Extracción antisolvente.**

La extracción antisolvente ofrece una alternativa para separar compuestos solubilizados de una mezcla líquida a través de un FSC en casos en los que no pueden usarse los métodos anteriormente nombrados para separar los compuestos solubilizados de una matriz líquida, cuando se corre el riesgo de que el sólido precipite en los empaques de la torre de extracción o porque el tanque extractor no tolera un proceso que contenga mezclas líquidas. A través de esta técnica, la matriz líquida y el CO<sub>2</sub> supercrítico se alimentan simultáneamente hacia un tanque extractor presurizado, aquí el componente líquido se disuelve en CO<sub>2</sub> mientras que el componente precipita en forma de partícula sólida, el líquido disuelto es recuperado en un separador que opera a menor presión (Figura 8).<sup>32,33</sup> Para la efectividad de esta técnica de separación, como regla, debe cumplirse que el solvente sea soluble en CO<sub>2</sub> SC, mientras que el compuesto de interés, disuelto en el solvente líquido, no sea soluble en CO<sub>2</sub> SC.

Para que el proceso se ejecute de manera eficiente, al igual que en otras técnicas de ESC los conocimientos de termodinámica y transferencia de masa son claves en la prevención de agravantes al proceso, como la probabilidad de la aparición de una mezcla ternaria líquido-sólido-supercrítico por la modificación en la solubilidad de los sólidos en la matriz y se necesita cuidar de varios parámetros, como la presión y temperatura, que en este caso dirigen la solubilidad de la mezcla líquida respecto al FSC.<sup>32,33</sup>



**Figura 8.** Esquema de la extracción supercrítica antisolvente  
**Fuente:** Martínez.<sup>33</sup>  
 Elaboración: La autora

### 1.2.2. Extracción supercrítica de compuestos tocotrienoles de *Bixa orellana* L.

Entre las investigaciones respecto a los métodos de extracción de tocotrienoles a partir de las semillas de *Bixa orellana* L, destacan las de Albuquerque & Meireles<sup>36</sup>, quienes realizaron un estudio y evaluación comparativa entre el proceso de extracción supercrítica continua con CO<sub>2</sub> frente a una extracción clásica realizada en un equipo Soxhlet (Tabla 7). El primero se desarrolló mediante dos tanques que simulaban un estado continuo de operación que se desarrolló en cuatro períodos: presurización (2 min), extracción estática (4 min), despresurización del sistema (20 min) y uno estático de readecuación del sistema (10 min), todos estos realizados en 3 ciclos, con una relación solvente a alimentación (S/F) de 35. Mientras que, para la extracción soxhlet se usó (5.11± 0.01) g de semillas de achiote y 180 mL de éter de petróleo durante un período de 6 horas.<sup>36</sup>

**Tabla 7.** Tocotrienoles recuperados mediante extracción soxhlet y extracción con CO<sub>2</sub> SC

T3	R % Extracción soxhlet (g tocoles/g ext.)	R% Extracción supercrítica [T (K) – P (MPa)] (g tocoles/g ext.)					
		313 - 20	313 - 31	313 - 40	333 - 20	333 - 31	333 - 40
α-T3	2.14 ± 0.07	-	-	-	-	-	-
γ-T3	-	1.97 ± 0.04	1.57 ± 0.05	1.63 ± 0.07	1.6 ± 0.2	1.79 ± 0.06	1.68 ± 0.04
δ-T3	13.10 ± 0.05	14.6 ± 0.4	11.7 ± 0.2	12.3 ± 0.6	12 ± 1	12.9 ± 0.1	12.2 ± 0.2

**Fuente:** Albuquerque & Meireles.<sup>36</sup>  
 Elaboración: La autora

Los mayores rendimientos de  $\delta$ -T3 y  $\gamma$ -T3 en ESC se presentaron a 20 MPa y 313 K, que superan a los obtenidos por el método tradicional (Tabla 7).<sup>36</sup> Estos datos muestran una tendencia similar a la del estudio de Puah, Choo, Ma, & Chuah<sup>37</sup>, que establece como óptimas las condiciones a 22 MPa y 313 K para obtener compuestos tocotrienoles del aceite de palma. La presencia de  $\alpha$ -T3 en extractos soxhlet reportada en este estudio no es congruente con investigaciones realizadas a las semillas de *Bixa orellana* L., las que han demostrado que sus componentes tocoles corresponden a  $\delta$ -T3 y  $\gamma$ -T3, pudiendo presentarse además trazas de  $\beta$ -T3.<sup>4,19,30,31</sup>

Otro estudio significativo fue el realizado por Moraes, Zobot, & Meireles<sup>31</sup>, en el que se analizó un proceso semicontinuo de extracción supercrítica (Tabla 8) basándose en la investigación realizada por Albuquerque & Meireles<sup>36</sup>, a una temperatura de 313 K, una presión de 20 MPa y una relación (S/F) de 250g CO<sub>2</sub>/g de semillas de achiote, por el que se obtuvo un rendimiento máximo de extracción de 3.05 g de extracto/100 g de semilla.

**Tabla 8.** Tocotrienoles recuperados mediante extracción supercrítica en modo semicontinuo

Tiempo de extracción (min)	Rendimiento relativo de primera extracción (g/100 g extracto)			Rendimiento relativo de segunda extracción (g/100 g extracto)		
	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	Tocoles totales recuperados	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T3	Tocoles totales recuperados
0-10	0.8 ± 0.1	5.2 ± 0.2	6.1	0.7 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.7
10-20	1.3 ± 0.1	7.8 ± 0.1	9.0	1.2 ± 0.1	7.8 ± 0.5	9.0
20-40	1.9 ± 0.1	11.9 ± 0.4	13.8	1.7 ± 0.1	11.5 ± 0.1	13.2
40-60	2.1 ± 0.1	14.1 ± 0.3	16.2	2.2 ± 0.2	15 ± 2	17.6
60-120	3.0 ± 0.4	24.7 ± 0.7	27.8	3.2 ± 0.2	22 ± 1	25.3
120-180	3.3 ± 0.4	25 ± 3	27.8	3.7 ± 0.2	25 ± 1	28.9
180-240	3.1 ± 0.8	23 ± 7	25.6	3.3 ± 0.4	22 ± 1	25.3
240-300	0.7 ± 0.2	5 ± 1	5.8	2.9 ± 0.1	20.4 ± 0.5	23.3

**Fuente:** Moraes, Zobot, & Meireles.<sup>31</sup>  
Elaboración: La autora

En la tabla 8 pueden observarse los rendimientos relativos de extracción de tocotrienoles en modo Batch respecto a la posible máxima cantidad de tocotrienoles extraíbles 313 K, 20 MPa y una relación (S/F) de 250g CO<sub>2</sub>/g de semillas de achiote.

**CAPÍTULO 2.**  
**OBJETIVOS DEL PROYECTO**

### **2.1. Objetivo general**

Obtener extractos con compuestos tocotrienoles a partir de achiote (*Bixa orellana* L.) mediante tecnología de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Extraer compuestos tocotrienoles a partir de achiote (*Bixa orellana* L.) mediante tecnología de extracción con dióxido de carbono supercrítico.

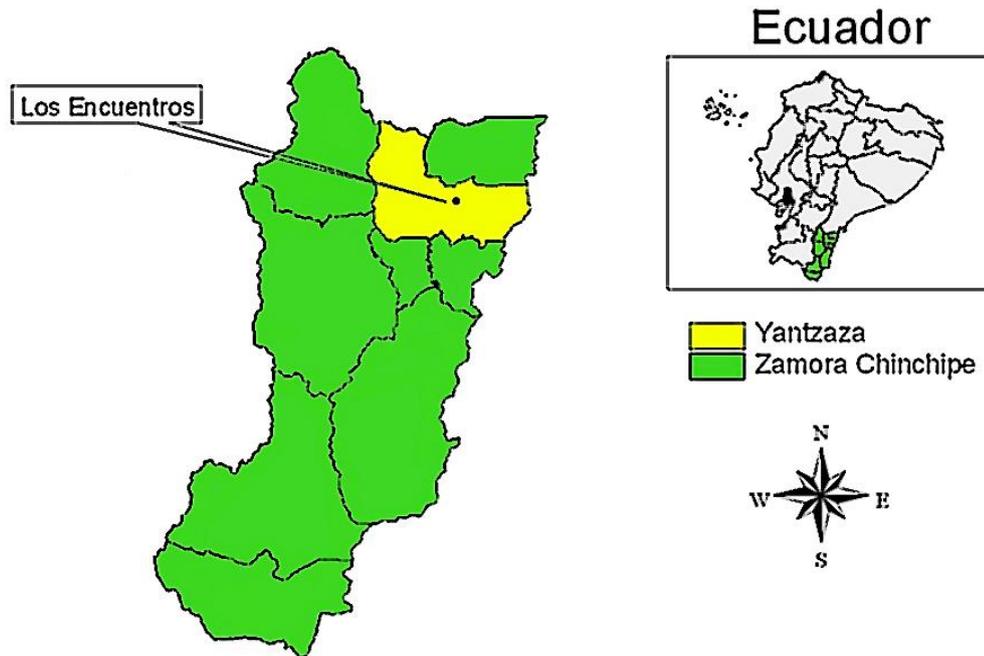
Cuantificar los compuestos tocotrienoles en extractos obtenidos de achiote (*Bixa orellana* L.).

**CAPÍTULO 3.**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Semillas de *Bixa orellana* L.

Para la presente investigación se utilizó como materia prima las semillas de *Bixa orellana* L. recolectadas en la parroquia Los Encuentros ( $3^{\circ}45'36.0''\text{S}$   $78^{\circ}36'21.6''\text{W}$ ) dentro del cantón Yantzaza en la provincia de Zamora Chinchipe perteneciente al Ecuador (Figura 9).



**Figura 9.** Mapa de la provincia de Zamora Chinchipe  
Elaboración: La autora

Los frutos de *Bixa orellana* L. fueron abiertos y llevados a la cámara de secado de los laboratorios del departamento de Ingeniería de procesos, donde permanecieron durante 3 días (temperatura:  $33^{\circ}\text{C}$  a  $35^{\circ}\text{C}$ ; humedad: 50% a 60%), las semillas recolectadas se presentaron de diversos tamaños y diferente grado de humedad como se observa en la Figura 10.



**Figura 10.** Fruto y semillas secas de Achiote (*Bixa orellana* L.)

**Fuente:** La experimentación.

Elaboración: La autora

Se obtuvieron 1255.6 g de semillas secas que fueron colocadas dentro de una bolsa de papel en el interior de una bolsa sellada al vacío para evitar su contaminación (Figura 11) y fueron llevadas a congelación previo a su uso. Las semillas no fueron sometidas a ningún tipo de pretratamiento (molienda), puesto que esto ocasionaría una disminución del rendimiento de extracción, como menciona Moraes et al.<sup>31</sup> en alusión a Silva, Gamarra, Oliveira, & Cabral<sup>38</sup>.



**Figura 11.** Semillas secas de Achiote (*Bixa orellana* L.)

**Fuente:** La experimentación.

Elaboración: La autora

### 3.1.2. Reactivos

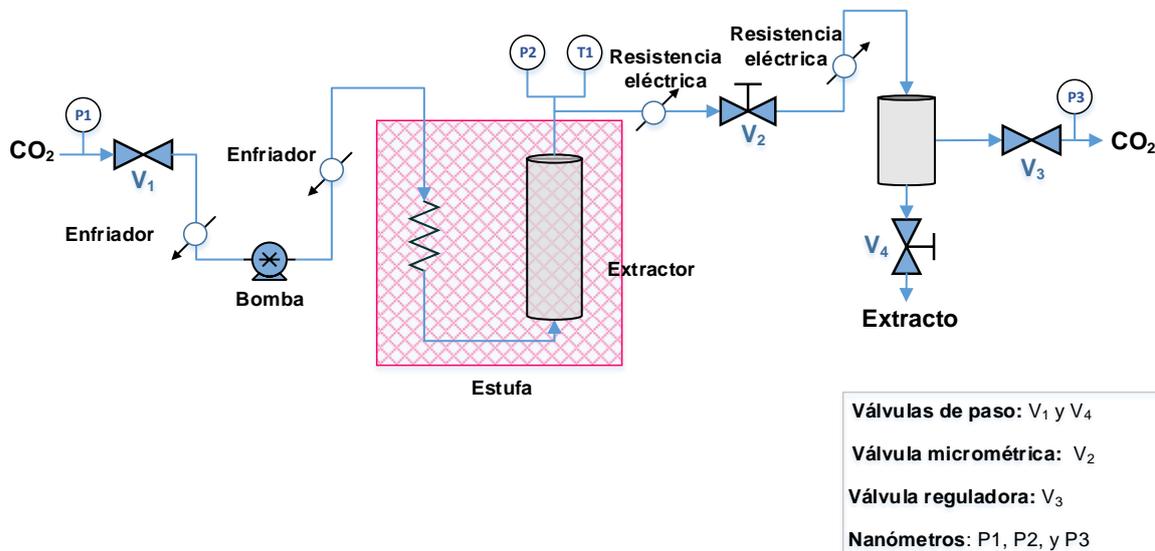
Dentro de la extracción, determinación de capacidad antioxidante DPPH y determinación de compuestos se utilizaron los siguientes reactivos:

- Extracción supercrítica: CO<sub>2</sub> grado alimenticio 99.9% de pureza (Indura); Etilenglicol (LAQUIN S.A.).
- Actividad antioxidante, método DPPH: 2, 2 difenil – 1 – pycrydrazyl (Sigma - Aldrich Chemistry), ácido – 6 - hidroxil – (2, 5, 7, 8 tetrametilcromano – 2 – carboxílico) Trolox (Sigma - Aldrich Chemistry), butilo- hidroxitolueno (BHT) (Sigma - Aldrich Chemistry), Metanol (Sigma - Aldrich Chemistry)
- Cuantificación de tocotrienoles mediante CG-MS: α-tocoferol, δ tocotrienol, γ tocotrienol (pureza > 99,6%) (UAMS), Etanol grado analítico (J.T. Baker), (N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide) Derivatizante MSTFA (RESTEK), Gas helio (INDURA), Diclorometano grado HPLC (Sigma - Aldrich Chemistry), Helio, 5% Fenil 95% dimetil arilen siloxano (Agilent Technologies).

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Recuperación de extractos mediante extracción supercrítica

Las pruebas de extracción con CO<sub>2</sub> SC se realizaron en la planta de extracción supercrítica del laboratorio de alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, cuyo esquema se muestra en la Figura 12. Se estudió el efecto de los parámetros más importantes de extracción supercrítica: temperatura, presión y flujo de CO<sub>2</sub> en condiciones ambientales.



**Figura 12.** Esquema de la planta de extracción supercrítica UTPL.  
Elaboración: La autora

Se realizaron ensayos con parámetros de presión de 100 - 200 bar; temperaturas de 35 - 45 °C y flujo de CO<sub>2</sub> de 20 – 50 L/min durante 3 horas. El procedimiento de extracción comprendió las siguientes etapas:

#### **ETAPA I**

Se colocaron 30 gramos de semillas de achiote (*Bixa orellana* L.) en el extractor del equipo.

#### **ETAPA II**

Comprendió la estabilización del sistema, se encendió la estufa, para que el extractor llegue a la temperatura de operación establecida, se permitió el paso del CO<sub>2</sub> a través del sistema cerrado, hasta alcanzar la presión de ensayo.

#### **ETAPA III**

La extracción inició mediante el flujo continuo de CO<sub>2</sub> durante un período de 3 horas, esto incluyó la recolección del extracto separado en períodos de tiempo continuos (cada 5 minutos) mediante la disminución de presión en el separador hasta 30 - 40 bar, para garantizar el estado gaseoso del CO<sub>2</sub>, evitando así que este arrastre consigo al extracto.

#### **ETAPA IV**

Comprendió la despresurización del sistema, manteniendo el flujo y temperatura de extracción; se recogieron los extractos del separador y fueron almacenados en congelación para sus posteriores análisis. Finalmente la muestra agotada fue retirada y almacenada de la misma manera en congelación.

### **3.2.2. Análisis experimental**

Durante la experimentación se examinó el efecto de la temperatura, presión y flujo de CO<sub>2</sub> como factores operacionales en la extracción supercrítica de los compuestos de *Bixa orellana* L., pues las diferentes combinaciones de estos generan un efecto en el rendimiento de los extractos obtenidos así como en la afinidad por ciertos compuestos.

Las pruebas de extracción supercrítica con dióxido de carbono se realizaron a partir de un diseño de optimización por superficie de respuesta de Box Behnken, tomando las siguientes condiciones

- Temperatura, °C: 35 - 60°C
- Presión, bar: 100 - 250
- Flujo de CO<sub>2</sub>, L/min: 20 – 50

El análisis del efecto de los factores se realizó a través de un análisis de varianza ANOVA con un nivel de confianza del 95% y los parámetros óptimos se determinaron mediante el software estadístico Statgraphics v.16 ®. El diseño experimental determinó las combinaciones reflejadas en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Parámetros de estudio estadístico del proceso

<b>Corrida</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Presión Bar</b>	<b>Flujo de CO<sub>2</sub> L/min</b>
1	60	175	20
2	60	100	35
3	35	175	20
4	35	100	35
5	47.5	100	20
6	47.5	250	20
7	35	250	35
8	35	175	50
9	60	175	50
10	47.5	250	50
11	60	250	35
12	60	175	20
13	47.5	100	50
14	60	100	35
15	35	175	20
16	47.5	175	35
17	35	100	35
18	47.5	100	20
19	47.5	250	20
20	47.5	175	35

**Fuente:** Software estadístico Statgraphics v.16 ®

Elaboración: La autora

### **3.2.3. Análisis de extractos**

#### **3.2.3.1. Rendimiento de extracción supercrítica**

El rendimiento de los extractos obtenidos mediante la extracción con CO<sub>2</sub> SC se evaluó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de extracción} = \frac{\text{Peso de extracto (g)}}{\text{Peso de muestra (g)}} * 100\%$$

### **3.2.3.2. Capacidad antioxidante DPPH**

Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de acuerdo a la técnica descrita por Brand-Williams et al.<sup>39</sup>, con algunas modificaciones descritas por Thaipong, K., Boonprakoba, U., Crosby, K., Cisneros, L., & Hawkins<sup>40</sup>.

Brevemente se preparó una solución patrón (SP) de DPPH, disolviendo 24 mg de DPPH en 100 mL de metanol, esta fue almacenada a -20°C hasta su uso. A partir de la solución patrón se preparó la solución de trabajo (ST), disolviendo 10 mL de SP en 45 mL de metanol, ajustando sus concentraciones hasta que se obtuvieron lecturas de absorbancias en el espectrofotómetro de  $1.1 \pm 0.02$  unidades a 515 nm. Las curvas estándar fueron preparadas mediante disoluciones con Trolox (50 – 1750  $\mu\text{M}$ ) y BHT (50 – 700  $\mu\text{M}$ ) en Metanol.

Los extractos se diluyeron a 1000 ppm (p/v) en Metanol, con ayuda del ultrasonido (Fisher Scientific Mod. FS 20D); se tomaron 150  $\mu\text{L}$  de esta dilución y se la mezcló con 2850  $\mu\text{L}$  de ST, la solución reaccionó durante 24 horas en la oscuridad, luego se registraron las lecturas a 515 nm en el espectrofotómetro; los estándares de referencia usados en el ensayo fueron dos antioxidantes sintéticos comercialmente conocidos: Trolox, compuesto análogo de la Vitamina E; y BHT, cuyo mecanismo de actividad antioxidante puede ser similar al de esta vitamina.<sup>41,42</sup>

Los resultados obtenidos se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco ( $\mu\text{Mol ET/g}$  extracto seco) y micromoles equivalentes de BHT por gramo de extracto seco ( $\mu\text{Mol EBHT/g}$  extracto seco). En el Anexo B puede encontrarse el flujograma del proceso.

### **3.2.4. Determinación de tocotrienoles mediante CG-MS**

#### **3.2.4.1. Preparación de los estándares**

Se prepararon estándares para  $\delta$ -Tocotrienol de concentraciones de 3, 7.5, 18.75, 46.88 y 117.19 ng/mL; así como para  $\gamma$ -Tocotrienol de: 0.55, 1.375, 3.438, 8.594 y 21.484 ng/mL. Se tomó una alícuota de cada una, estas fueron secadas, se les añadió 100  $\mu\text{L}$  de derivatizante y se dejó reaccionar durante 15 min para luego ser leídas por CG-MS.

#### **3.2.4.2. Preparación de los extractos**

Los extractos se diluyeron en Etanol hasta alcanzar concentraciones entre 340 y 600 ppm (p/v) Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de cada disolución y se le añadieron 25  $\mu\text{L}$  de estándar interno, la solución fue secada; a continuación se le adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de derivatizante y se dejó

reaccionar durante 15 min, para proceder con sus correspondientes inyecciones cromatográficas.

#### **3.2.4.3. *Corrida cromatográfica de los extractos***

Se empleó un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplado a un Espectrómetro de masas Agilent serie 5973 Inert, dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, que cuenta con un inyector automático Split/Splitless serie 7683, además de dos columnas capilares.

Se utilizó una modificación del método seguido por Pineda<sup>43</sup>. Este consistió en la inyección splitless de 1µL de la muestra a 220°C, que recorrió una columna capilar DB-5ms: 0.25 mm x 30 m y 0.25 µm de espesor de la película, modelo Agilent 122-5532 de 30 metros usando Helio como gas portador, esta se mantuvo inicialmente a 220°C por dos minutos, luego mediante un gradiente de 25°C/min llegó a 300°C, temperatura que mantuvo por 1 minuto. Las condiciones de MS fueron: impacto de electrones, temperatura de cuadrupolo de 150°C, temperatura de la fuente de 230°C, y tensión de ionización 70 eV.

**CAPÍTULO 4.**  
**RESULTADOS Y DISCUSIONES**

#### 4.1. Obtención de extractos mediante extracción supercrítica con dióxido de carbono de las semillas de *Bixa orellana* L.

Los extractos recolectados mediante la extracción supercrítica (Figura 13) presentaron coloración naranja, olor característico a achiote y su consistencia fue aceitosa y espesa.



**Figura 13.** Muestra de extracto de semillas de *Bixa orellana* L. de ESC.  
Elaboración: La autora

En la tabla 10 se observa el rendimiento de extracción (g extracto/g semilla); la actividad antioxidante correspondiente al método DPPH equivalente a Trolox ( $\mu\text{M ET/g extracto} - \mu\text{M ET/g semilla}$ ) BH, y equivalente a BHT ( $\mu\text{M EBHT/g extracto} - \mu\text{M EBHT/g semilla}$ ) BH. Además se refleja el contenido de  $\delta$ -T3 (mg  $\delta$ -T3/g extracto) y de  $\gamma$ -T3 (mg  $\gamma$ -T3/g extracto) correspondientes a los diferentes tratamientos experimentados.

**Tabla 10.** Resultados obtenidos mediante ESC

T	P	F CO <sub>2</sub>	R%	A. A DPPH: Trolox		A. A DPPH: BHT		δ-T3	Υ-T3	δ-T3	Υ-T3
(°C)	(Bar)	(L/min)	(g ext/g SE)	(μM ET/g ext)	(μM ET/g SE) BH	(μM EBHT/g ext)	(μM EBHT/g SE) BH	mg δ-T3/g ext.	mg Υ-T3/g ext.	R% (g δ-T3/ g SE)	R% (g Υ-T3/ g SE)
60	175	20	1.16	338.64	3.93	176.81	2.05	56.37	4.35	0.065	0.005
60	100	35	1.54	227.91	3.51	107.83	1.66	27.93	2.37	0.043	0.004
35	175	20	1.57	283.98	4.46	141.03	2.21	42.56	3.37	0.067	0.005
35	100	35	0.97	357.19	3.46	185.95	1.80	78.02	6.65	0.076	0.006
47.5	100	20	3.44	297.35	10.23	148.52	5.11	44.59	3.49	0.153	0.012
47.5	250	20	1.72	314.59	5.41	162.38	2.79	59.25	4.79	0.102	0.008
35	250	35	3.21	295.70	9.49	149.35	4.79	56.15	4.32	0.180	0.014
35	175	50	2.77	229.15	6.35	106.33	2.95	47.95	3.76	0.133	0.010
60	175	50	2.49	255.34	6.36	122.41	3.05	54.67	4.33	0.136	0.011
47.5	250	50	1.63	235.41	3.84	111.57	1.82	47.69	3.90	0.078	0.006
60	250	35	1.72	280.52	4.82	140.42	2.42	103.06	7.96	0.177	0.014
60	175	20	1.2	301.05	3.61	151.27	1.82	91.27	6.95	0.110	0.008
47.5	100	50	0.44	327.42	1.44	169.14	0.74	107.26	8.02	0.047	0.004
60	100	35	1.23	169.39	2.08	68.32	0.84	65.64	5.14	0.081	0.006
35	175	20	2	283.87	5.68	140.64	2.81	79.42	5.62	0.159	0.011
47.5	175	35	1.44	243.77	3.51	115.43	1.66	64.38	4.42	0.093	0.006
35	100	35	0.96	286.80	2.75	144.18	1.38	65.11	4.87	0.063	0.005
47.5	100	20	2.97	245.66	7.30	116.03	3.45	56.90	3.86	0.169	0.011
47.5	250	20	1.77	332.15	5.88	172.33	3.05	97.36	6.89	0.172	0.012
47.5	175	35	1.71	251.80	4.31	121.81	2.08	88.31	6.27	0.151	0.011

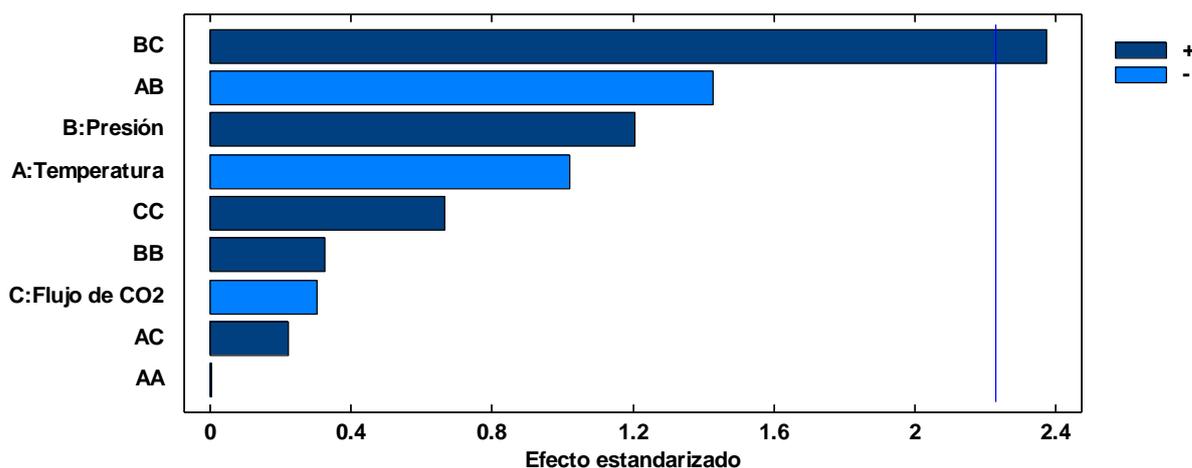
**Fuente:** La experimentación

Elaboración: La autora

El mayor rendimiento respecto a la extracción supercrítica fue 3.44%, correspondiente a las condiciones de 47.5 °C, 100 Bar y 20 L/min durante un período de 3 horas, que en comparación al rendimiento de 4.8% de una extracción soxhlet de 6 horas realizada por Costa et al.<sup>44</sup>, y de la extracción con hexano de 3.3% documentada por Pineda<sup>43</sup>, muestran la efectividad de este tipo de extracción en relación a otros métodos comunes con la ventaja de no usar solventes orgánicos. Por otro lado, la extracción mostró superioridad respecto a la experimentación de Moraes, Zobot, & Meireles<sup>31</sup>, que mediante un sistema semicontinuo de ESC a condiciones de 313 K, 20 MPa y una relación (S/F) de 250 g CO<sub>2</sub>/g de semillas de achiote, obtuvieron un máximo rendimiento de 3.05 g de extracto/100 g de semilla.

#### 4.2. Rendimiento de extracción.

La Figura 14 corresponde al diagrama de pareto respecto a la experimentación, este denota el efecto que tienen las diversas combinaciones de los factores de presión, temperatura y flujo de CO<sub>2</sub> sobre el rendimiento de extracción.

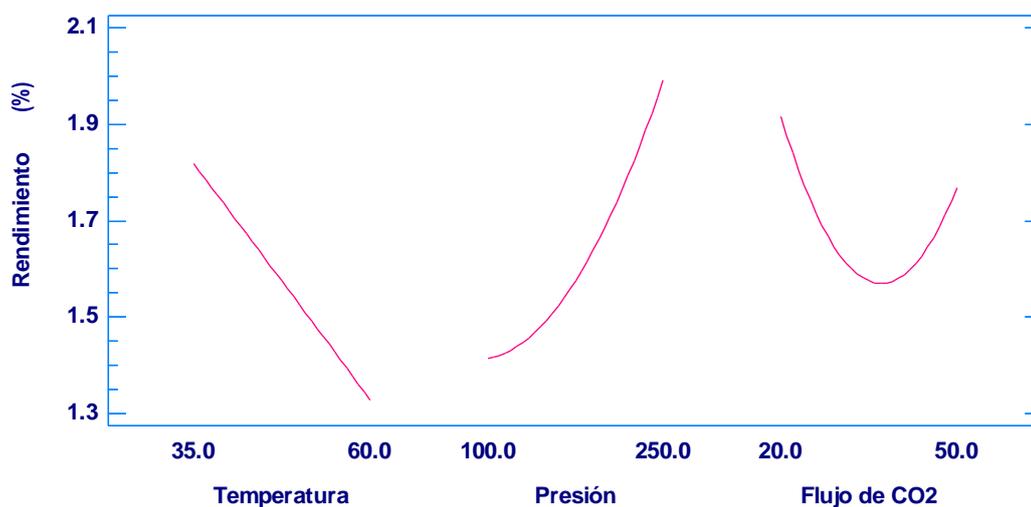


**Figura 14.** Diagrama de pareto estandarizado para rendimiento  
Elaboración: La autora

A través del diagrama de pareto puede observarse que únicamente la interacción correspondiente a presión y flujo de CO<sub>2</sub> (BC) es significativa; sin embargo el efecto individual de los factores presión y flujo de CO<sub>2</sub> no representan un valor significativo sobre el rendimiento de extracción.

La Figura 15 muestra el efecto principal de cada factor sobre el rendimiento, en ella puede observarse que la reducción de temperatura ocasionó un incremento en el rendimiento, por el aumento de la densidad del CO<sub>2</sub>, correspondiente a un aumento de la solubilidad de los compuestos de interés en este. Al aumentar la presión de extracción se observa que existe un aumento la densidad del CO<sub>2</sub>, como su capacidad de extracción, ocasionando un aumento

en el rendimiento.<sup>33</sup> Puede observarse además que el menor Flujo de CO<sub>2</sub> favoreció el mayor rendimiento, pues el incremento de este factor, puede ocasionar un crecimiento de la resistencia a la transferencia de masa de los pigmentos que se encuentran el pericardio de la semilla<sup>45</sup>; pese a esto este factor no presenta un efecto de comportamiento lineal respecto a la disminución o incremento del mismo dentro de la experimentación.



**Figura 15.** Gráfica de efectos principales para rendimiento  
Elaboración: La autora

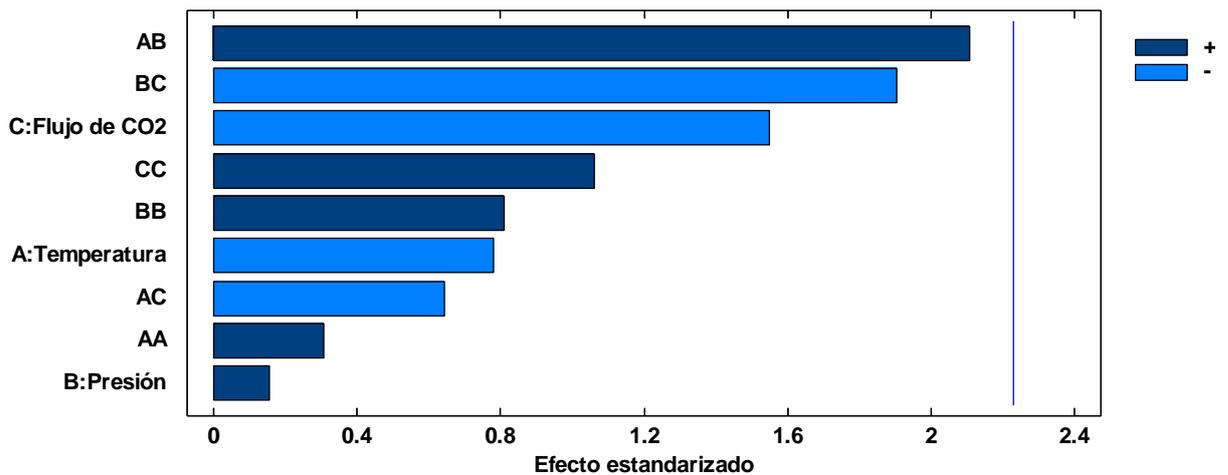
#### 4.3. Determinación de capacidad antioxidante mediante método DPPH.

##### 4.3.1. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

La mayor concentración de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos fue de 357.19  $\mu\text{M ET/g ext.}$  correspondiente a los parámetros de extracción de 35°C 100 Bar y 35 L/min, mientras que el menor valor fue 169.395  $\mu\text{M ET/g ext.}$  que corresponde a 60°C, 100 Bar y 35 L/min.

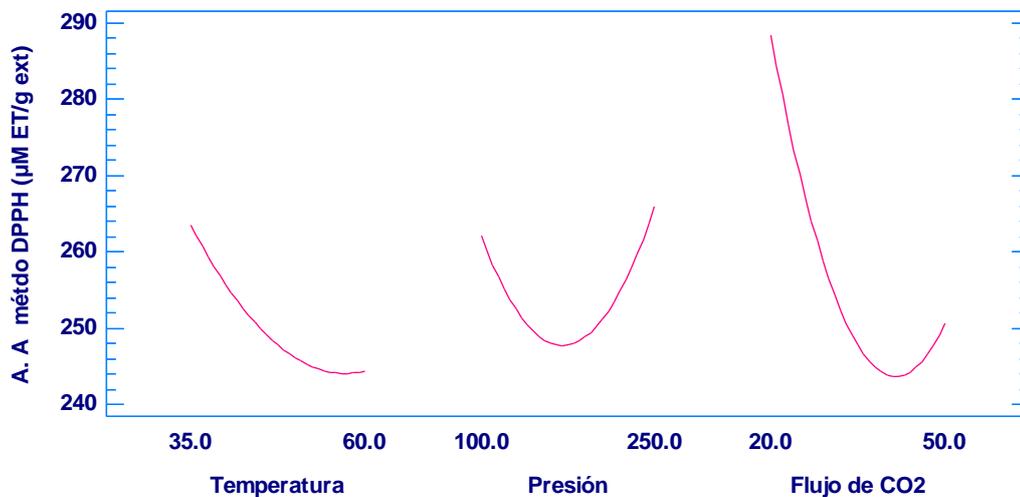
La concentración de la capacidad antioxidante en semillas BH fue dependiente del rendimiento de ESC. La más alta concentración expresada por gramo de semilla fue 10.23  $\mu\text{M ET/g SE BH}$  y correspondió a 47.5 °C, 100 Bar y 20 L/min como parámetros de extracción; mientras que la menor concentración fue 1.44  $\mu\text{M ET/g SE BH}$  bajo las condiciones de 47.5 °C, 100 Bar y 50 L/min.

La Figura 16 muestra el diagrama de Pareto correspondiente a la experimentación, en este caso puede observarse que no existe efecto significativo de los factores Presión, Temperatura o Flujo de CO<sub>2</sub>, ni de sus interacciones sobre la capacidad antioxidante.



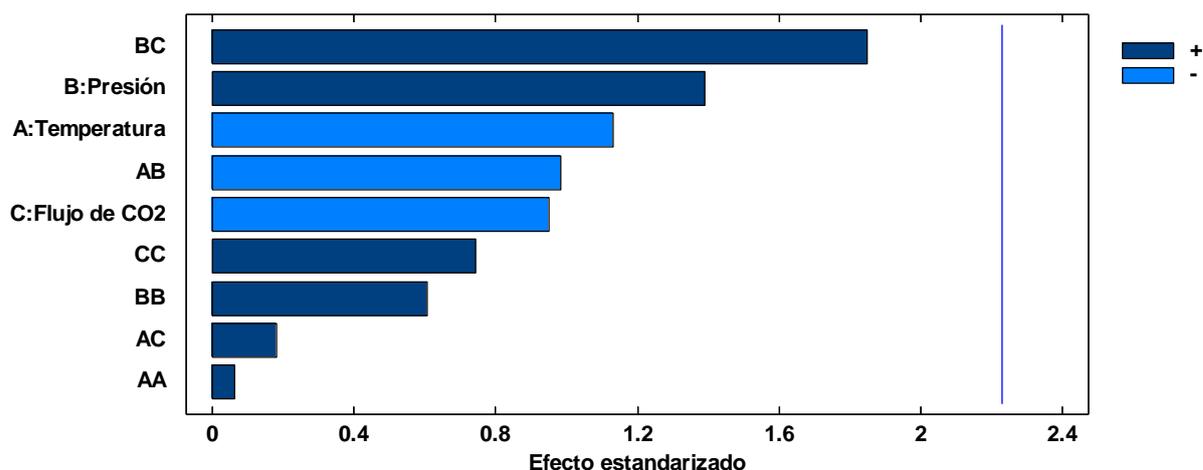
**Figura 16.** Diagrama de Pareto estandarizado para A. A. mediante método DPPH ( $\mu\text{M ET/g ext}$ )  
Elaboración: La autora

La Figura 17 muestra que la menor temperatura de extracción favoreció una mayor actividad antioxidante de los extractos. Los factores de presión y flujo de  $\text{CO}_2$  no presentaron efectos de comportamiento lineal, sin embargo es notable que la mejor capacidad antioxidante se obtuvo con el menor flujo.



**Figura 17.** Gráfica de efectos principales para A. A. mediante el método DPPH ( $\mu\text{M ET/g ext}$ ).  
Elaboración: La autora

El análisis de la Figura 18 muestra que no existe efecto individual o interacción significativa de factores que hayan representado un efecto de valor significativo sobre la actividad antioxidante en DPPH por gramo de semilla ( $\mu\text{M EBT/g SE}$ ) BH.



**Figura 18.** Diagrama de Pareto estandarizado para A. A. mediante método DPPH ( $\mu\text{M ET/g SE}$ ) BH  
Elaboración: La autora

La tendencia de efectos principales evidenció que la menor temperatura favoreció un incremento en la actividad antioxidante, este efecto se observó también con el aumento de presión. Además, pese a que el menor flujo de  $\text{CO}_2$  presentó la mayor capacidad antioxidante, no existe un efecto de comportamiento lineal respecto a la disminución o incremento de este factor.

#### 4.3.2. Capacidad antioxidante equivalente a BHT.

La mayor concentración de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos fue de  $185.951 \mu\text{M EBHT/g ext.}$  correspondiente a los parámetros de extracción de  $35^\circ\text{C}$  100 Bar y 35 L/min, mientras que la menor fue  $68.322 \mu\text{M EBHT/g ext.}$  correspondiente a  $60^\circ\text{C}$ , 100 Bar y 35 L/min.

El diagrama de Pareto correspondiente a la actividad antioxidante equivalente a BHT ( $\mu\text{M EBHT/g ext.}$ ) mantuvo una tendencia similar a la correspondiente a Trolox (Figura 16), mostrando que ningún efecto individual o interacción de los factores representó un valor significativo sobre los resultados. Además, de manera similar a la Figura 17, al reducir la temperatura y a un menor flujo de  $\text{CO}_2$  se observó una mayor concentración de capacidad antioxidante de los extractos, sin embargo los factores de presión y flujo no presentaron efectos de comportamiento lineal.

El diagrama de Pareto correspondiente a la actividad antioxidante en DPPH ( $\mu\text{M EBHT/g SE}$ ) BH reflejó una tendencia similar a la correspondiente a Trolox (Figura 18), pues no se observó efecto significativo correspondiente a los factores individuales o interacción. De la misma

forma, la menor temperatura, mayor presión y menor flujo de CO<sub>2</sub>, favorecieron el incremento de la actividad antioxidante de los extractos tendencia similar a la correspondiente a Trolox.

#### **4.3.3. Análisis de capacidad antioxidante.**

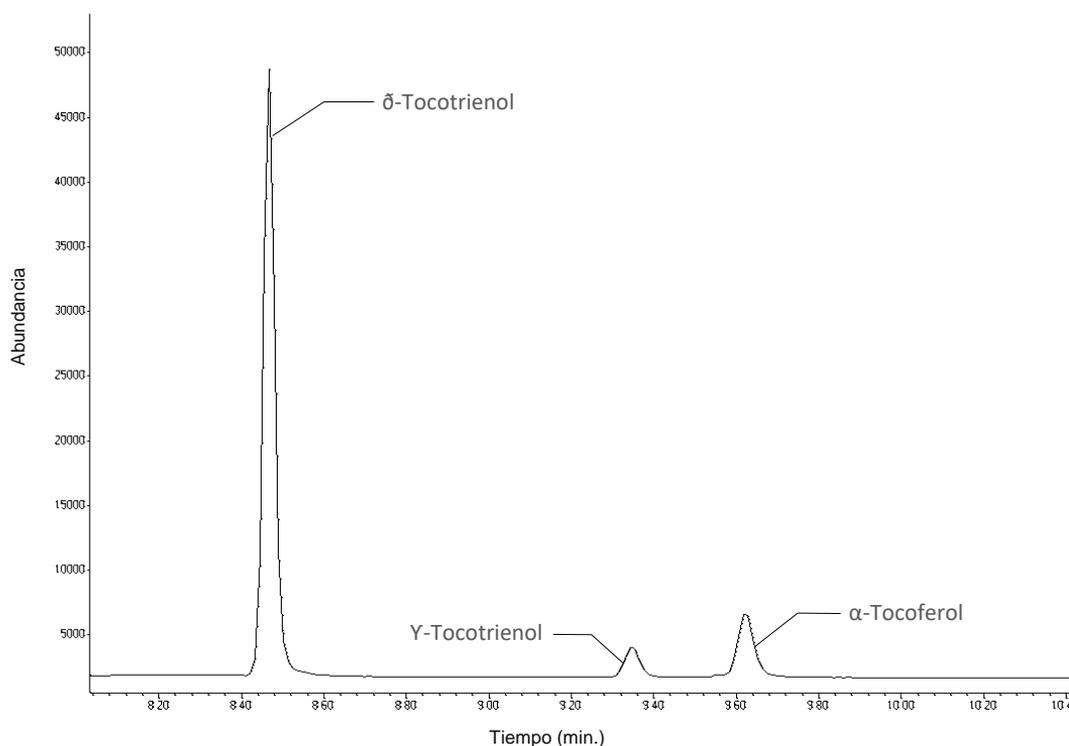
De acuerdo a Schaich, Tian, & Xie<sup>46</sup>, los ensayos ORAC pueden ser comparados con la transferencia de electrones en DPPH, por esto puede afirmarse que los valores mostrados en la Tabla 10, en comparación a los reportados por Floegel, Kim, Chung, Koo, & Chun<sup>47</sup>, tienen una actividad antioxidante eficiente, similar a la de la cebolla (1034 μmol TE/100 g), que puede atribuirse en gran parte a los compuestos tocotrienoles, pues de acuerdo a Müller, Fröhlich, & Böhm<sup>48</sup>, en este tipo de ensayo no existe reacción alguna del apocarotenoide bixina.

Existen algunos estudios respecto a la actividad antioxidante de los extractos de la semillas de *Bixa orellana* L. Un estudio realizado por Cardarelli et al.<sup>49</sup> analizó la actividad antioxidante mediante el método ABTS para extractos de semilla, en donde los mayores valores se reportaron con extractos polares (MeOH/H<sub>2</sub>O), y correspondieron a 9550 μMTEAC/g semilla seca, estos además presentaron los mayores contenidos de compuestos fenólicos (1.84 mg GAE/g semilla seca), adicionalmente evaluaron extractos no polares (Hexano), que presentaron una actividad (2040 μMTEAC/g semilla seca), la que atribuyeron a la mezcla de compuestos fenólicos y bixina en los extractos. En el caso de Viuda-Martos et al.<sup>50</sup>, se evaluó la capacidad antioxidante en extractos polares (EtOH) mediante el método DPPH, para el que se obtuvo una IC<sub>50</sub> de 15.40 g semilla/l. Otro aporte es el de Ganju & Ganju<sup>51</sup>, en el que se analizó la capacidad antioxidante en extractos de diferente polaridad a través del método DPPH, en este se observó la más alta actividad antioxidante en extractos de mayor polaridad (H<sub>2</sub>O), con un IC<sub>50</sub> de 20 μg/mL, a los que correspondieron la mayor cantidad de compuestos fenólicos (75.3 mg GAE/g extraíbles), reflejando una de tendencia similar de resultados a los expuestos por Viuda-Martos et al.<sup>50</sup>.

Basados en la información proporcionada anteriormente, puede afirmarse que, pese a la existencia de información documentada respecto a la actividad antioxidante de los extractos de las semillas de *Bixa orellana* L., cada investigación difiere en su metodología y sus resultados se encuentran referidos mayoritariamente a compuestos polares, lo que dificulta su comparación con los resultados obtenidos en el presente trabajo; sin embargo se reconoce que la actividad antioxidante en extractos de achiote es relevante, por lo que se incentiva su investigación para su posible aplicación en la industria alimenticia y cosmética.<sup>49,50,51</sup>

#### 4.4. Determinación de compuestos tocotrienoles en extractos mediante CG-MS.

Las corridas cromatográficas fueron similares para todos los extractos respecto a sus 3 picos y tiempos, como se observa en la Figura 22 el compuesto  $\delta$ -Tocotrienol se evidenció a los 8.47 min, siendo el compuesto mayoritario, a continuación se observa el  $\gamma$ -Tocotrienol a 9.35 min y finalmente el estándar interno  $\alpha$ -Tocoferol a 9.63 min.



**Figura 19.** Cromatograma de extracto obtenido mediante ESC (se incluye a estándar interno  $\alpha$ -Tocoferol).

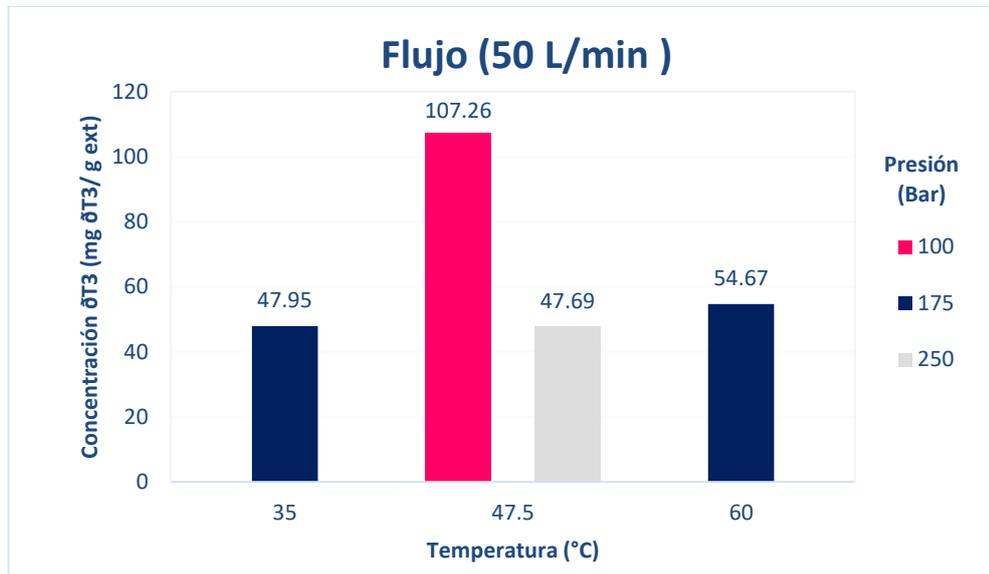
Elaboración: La autora

Como se observa en la Tabla 10, la mayor cantidad de compuestos delta y gamma tocotrienol se evidenciaron a condiciones de 47.5 °C, 100 Bar y 50 L/min de extracción SC, siendo estos 107.26 mg/ext. y 8.02 mg/ext. respectivamente. Además los mayores rendimientos obtenidos respecto a gramo de semilla BH fueron de 0.18% para  $\delta$ -T3 y 0.014% para  $\gamma$ -T3 bajo condiciones de 35°C, 250 Bar y 35 L/min de CO<sub>2</sub>.

##### 4.4.1. Contenido de $\delta$ -Tocotrienol.

En la Figura 23 se observa la combinación de factores para la mayor concentración de rendimiento de  $\delta$ -Tocotrienol en extractos, que al compararlos presentan valores ligeramente inferiores a los mayores rendimientos de la ESC en operación continua y superiores respecto a la extracción soxhlet, reportados en las experimentaciones de Albuquerque & Meireles<sup>36</sup>. Demostrando que una disminución de temperatura y aumento de presión de extracción

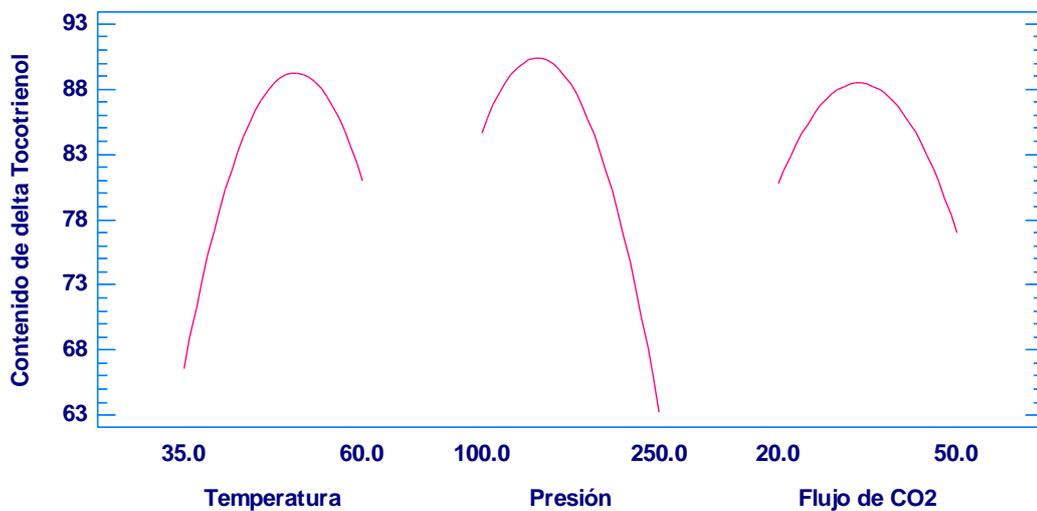
mediante un alto flujo de CO<sub>2</sub>, favorecen la obtención de una mayor concentración de este tipo de compuestos.



**Figura 20.** Gráfico comparativo de respuesta de contenido de δ-Tocotrienol en extractos  
Elaboración: La autora

El diagrama de Pareto correspondiente a la experimentación no mostró efecto significativo de los factores presión, temperatura o flujo de CO<sub>2</sub>, ni de sus interacciones sobre la cantidad de δ-Tocotrienol en los extractos.

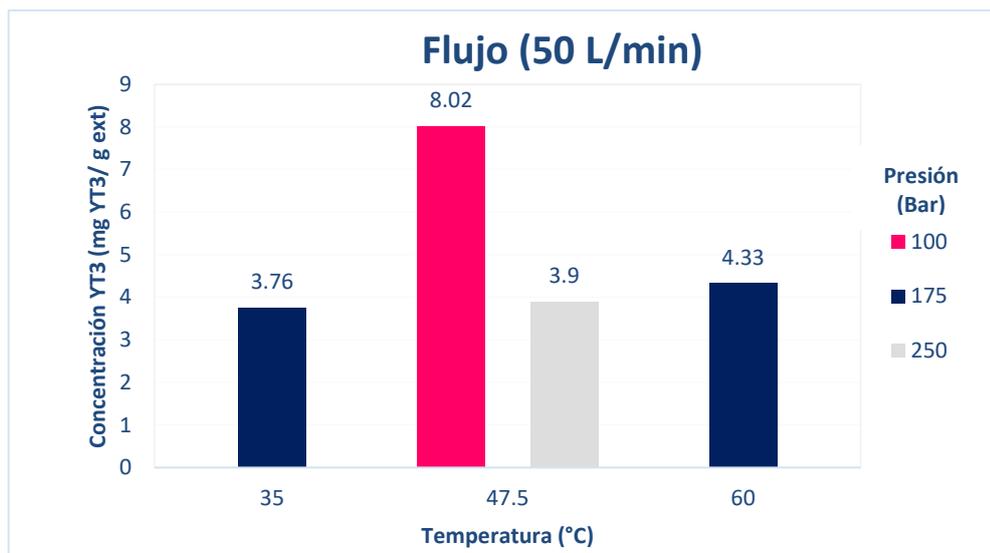
La gráfica de efectos principales (Figura 24) revela que se detectó una mayor cantidad de δ-Tocotrienol con la media de temperatura y presión, además existió una pequeña variación respecto a máximo y mínimo de flujo de CO<sub>2</sub>.



**Figura 21.** Gráfica de efectos principales para contenido de δ-Tocotrienol en extractos  
Elaboración: La autora

#### 4.4.2. Contenido de Y-Tocotrienol

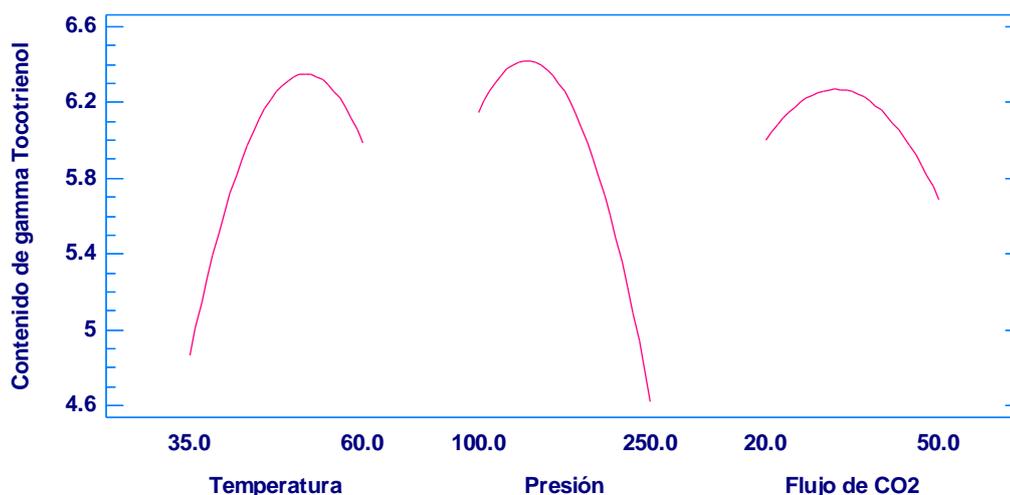
La Figura 25 muestra la combinación de factores para la mayor concentración de Y-Tocotrienol en extractos, denotando que una disminución de temperatura y un aumento de presión de extracción a través de un alto flujo de CO<sub>2</sub>, favorecen la obtención de una mayor concentración de este tipo de compuestos, llegando a ser esta superior a los valores obtenidos por Albuquerque & Meireles<sup>36</sup> en la extracción soxhlet.



**Figura 22.** Gráfico comparativo de respuesta de contenido de Y-Tocotrienol en extractos  
Elaboración: La autora

El diagrama de Pareto correspondiente a la experimentación mostró que no existe efecto significativo de los factores presión, temperatura o flujo de CO<sub>2</sub>, ni de sus interacciones sobre la cantidad de Y-Tocotrienol en los extractos.

La Figura 26 revela que se detectó una mayor cantidad de Y-Tocotrienol con la mayor temperatura, mayor presión y mayor flujo de CO<sub>2</sub>, sin embargo ninguno de estos factores presentó un efecto de comportamiento lineal sobre la cuantificación del compuesto.



**Figura 23.** Gráfica de efectos principales para contenido de Y-Tocotrienol en extractos  
Elaboración: La autora

#### 4.4.3. Análisis del contenido de compuestos tocotrienoles mediante extracción supercrítica con CO<sub>2</sub>

La cantidad de compuestos recuperados son ligeramente inferiores a  $\delta$ -Tocotrienol y representativos respecto a Y-Tocotrienol en relación a la extracción soxhlet, además la concentración de tocotrienoles se presenta inferior respecto a los valores obtenidos mediante extracción supercrítica por Albuquerque & Meireles<sup>36</sup>. El método pseudo-continuo de Moraes<sup>31</sup>, presenta valores de rendimiento mayores a los presentados (Anexo C), sin embargo los máximos valores obtenidos en la presente experimentación superan a sus análogos en tiempo de extracción, por lo que las condiciones aplicadas muestran ser eficientes.

El mayor rendimiento de extracción supercrítica en relación al contenido de  $\delta$ -T3 y Y-T3 en extracto se evidenció a condiciones de 47.5°C, 100 Bar y 50 L/min de CO<sub>2</sub>, este correspondió al 10.73% y 0.8% respectivamente.

Adicionalmente, los rendimientos respecto a los compuestos  $\delta$ -T3 y Y-T3 fueron comparados respecto a una extracción clásica con hexano realizada en semillas de achiote procedentes del mismo sector geográfico; estableciéndose que los rendimientos de  $\delta$ -T3 en ESC se presentaron superiores a los obtenidos por extracción clásica con hexano (0.33 - 0.88%). De la misma manera, para Y-T3 en extractos SC se obtuvieron rendimientos de 0.24 al 0.80% frente al 0.021 a 0.174% de extracción con hexano.

## CONCLUSIONES

- La tecnología de extracción con dióxido de carbono supercrítico permitió obtener extractos ricos en tocotrienoles a partir de las semillas de *Bixa orellana* L.
- Los compuestos tocotrienoles se cuantificaron mediante CG-MS, los mayores rendimientos respecto a extracto de semilla fueron 10.73% y 0.8%, correspondientes a  $\delta$ -T3 y  $\gamma$ -T3, respectivamente, bajo condiciones de 47.5°C, 100 Bar y 50 L/min de CO<sub>2</sub>.
- El mayor rendimiento de la extracción supercrítica fue 3.44% (g extracto/g semilla), bajo condiciones de 47.5 °C, 100 Bar y 20 L/min durante un período de 3 horas.
- La mayor capacidad antioxidante de los extractos evaluada mediante el método DPPH fue de 357.19  $\mu$ M ET/g ext. y 185.951  $\mu$ M EBHT/g ext., correspondientes a los parámetros de extracción de 35°C 100 Bar y 35 L/min.

## **RECOMENDACIONES**

- Realizar el estudio de la cinética de extracción supercrítica, a fin de establecer el tiempo óptimo para el mayor rendimiento de tocotrienoles.
- Realizar un análisis económico considerando el uso de los compuestos tocotrienoles y los procedimientos o etapas que comprende el refinamiento del extracto obtenido.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Fonnegra G., R.; Jimenez R., S. L. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*, 2da.; Cárdenas Mesa, É. A., Ed.; Universidad de Antioquia: Medellín, 2007.
- (2) Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. *Compendio de agronomía tropical, Volumen 2*; de la Torre de K., F., Cujo, P., Eds.; IICA: San José, 1989.
- (3) Preston, H. .; Rickard, M. . *Food Chem.* **1980**, 5 (1), 91–107.
- (4) Tan, B. Healthquestpodcast.com: United States 2015.
- (5) Forest & Kim Starr. Fruit at Makawao, Maui, Hawaii. <http://www.starrenvironmental.com/images/image/?q=24870971325> (accessed Jun 4, 2016).
- (6) León, J. *Botánica de los cultivos tropicales*, 3ra.; Agroamerica: San José, 2000.
- (7) Ebert, A. W.; Astorga, C.; Ebert, I. C. M.; Mora, A.; Umaña, C. *Asegurando Nuestro Futuro: Colecciones de Germoplasma del CATIE*; Sheck, R., Ed.; Bib. Orton IICA / CATIE: Turrialba, 2007.
- (8) Arce Portugués, J.; Royo, L. *Bibliografía sobre achiote: (Bixa orellana L.): parcialmente anotada*; Bib. Orton IICA / CATIE: Turrialba, 1984.
- (9) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. *Aspectos Sobre El Achiote Y Perspectivas Para Costa Rica*; Arce P., J., Ed.; Bib. Orton IICA / CATIE: Turrialba, 1983.
- (10) Barreto, T. C. *El cultivo del onoto*, 2da.; Il Acrive: Venezuela, 1974.
- (11) Crowder, N. *Culture Shock! Ecuador: A Survival Guide to Customs and Etiquette*, 3rd.; Marshall Cavendish International Asia Pte Ltd.: New York, 2009.
- (12) NIIR Board of Consultants & Engineers. *The Complete Book on Spices & Condiments (with Cultivation, Processing & Uses) 2nd Revised Edition: With Cultivation, Processing & Use*, 2nd.; Asia Pacific Business Press Inc.: Delhi, 2006.
- (13) Delgado Vargas, F.; Paredes Lopez, O. *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*; CRC Press: New York, 2002.

- (14) PRO Ecuador: Instituto de Promoción de exportaciones e inversiones. Boletín Mensual de Comercio Exterior <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2014/10/Boletin-oct-nov-final1.pdf> (accessed May 16, 2015).
- (15) Ministerio de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca. MAGAP entregó recursos para fortalecer cadena productiva de achiote y abrir planta de pollos y gallinas criollos <http://www.agricultura.gob.ec/magap-entrego-recursos-para-fortalecer-cadena-productiva-de-achiote-y-abrir-planta-de-pollos-y-gallinas-criollos/> (accessed May 16, 2016).
- (16) Corporación Naturaleza y Cultura Internacional. El achiote del Valle del Jambúe está de cosecha <http://www.naturalezaycultura.org/spanish/htm/news/2015-04-Achote.htm> (accessed May 16, 2016).
- (17) Ministerio del Ambiente del Ecuador. MAE firmó dos convenios de cooperación interinstitucional para restaurar la cuenca del río Jambúe <http://www.ambiente.gob.ec/mae-firmo-dos-convenios-de-cooperacion-interinstitucional-para-restaurar-la-cuenca-del-rio-jambue/> (accessed May 16, 2016).
- (18) Pierpaoli, E.; Viola, V.; Barucca, A.; Orlando, F.; Galli, F.; Provinciali, M. *Carcinogenesis* **2013**, *34* (6), 1352–1360.
- (19) Tan, B.; Amherst Ilobrera, B. Annatto extract compositions including tocotrienols and tocopherols and methods of use. US Patent 8,586,109 B2, 2013.
- (20) Tan, B.; Watson, R. R.; Preedy, V. R. *Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols*, 2nd.; CRC Press: New York, 2012.
- (21) Theriault, A.; Chao, J.-T.; Qi, W.; Abdul, G.; Khosrow, A. *Clin. Biochem.* **1999**, *5* (32), 309–319.
- (22) Watkins, T. R.; Bierenbaum, M. L. "Tocotrienols: Biological and Health Effects," in *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*"; Papas, A. M., Ed.; CRC Press: New Jersey, 1999.
- (23) Serbinova, E.; Kagan, V.; Han, D.; Packer, L. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *10* (5), 263–275.
- (24) Packer, L.; Weber, S. U.; Rimbach, G. *J. Nutr.* **2001**, *2* (131), 369–373.

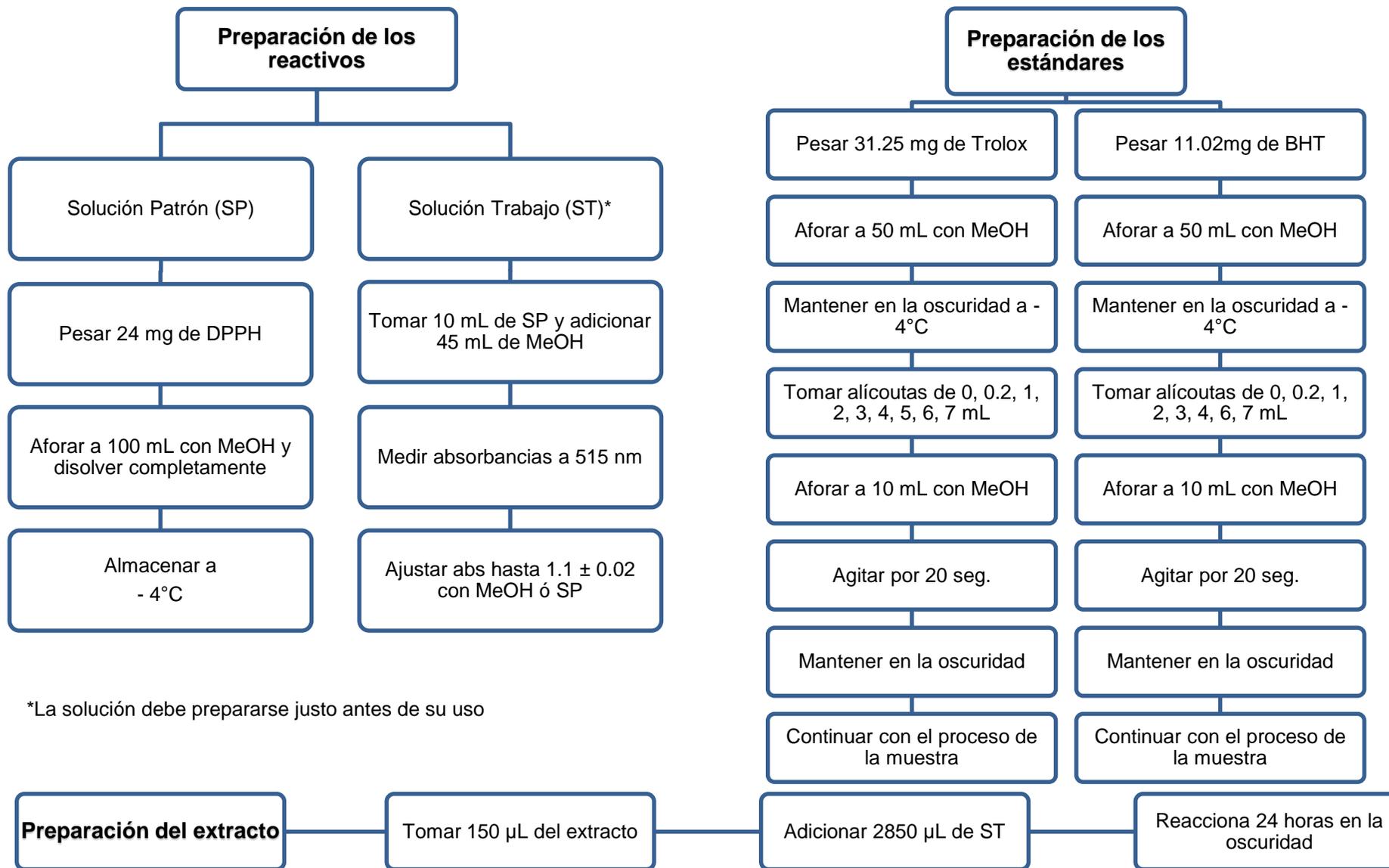
- (25) Saini, R. K.; Keum, Y. *Frin* **2016**, *82*, 59–70.
- (26) Jiang, Q. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *72* (765), 76–90.
- (27) Barrie Tan, A.; Sunderland, J. F. Tocotrienols and Geranylgeraniol from *Bixa orellana* byproducts. US Patent 350,453 B1, 2003.
- (28) Enrique, J.; Pineda, D.; Calderón, L. S. *Rev. Univ. EAFIT* **2003**, *39* (131), 8–22.
- (29) Scotter, M. . J.; Thorpe, S. . A.; Reynolds, S. L.; Wilson, L. A.; Strutt, P. R. *Food Addit. Contam.* **1993**, *11* (3), 301–315.
- (30) Frega, N.; Mozzon, M.; Bocci, F. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75* (12), 1723–1727.
- (31) Moraes, M. N.; Zobot, G. L.; Meireles, M. A. A. *J. Supercrit. Fluids* **2015**, *96*, 262–271.
- (32) Reverchon, E.; De Marco, I. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *38* (2), 146–166.
- (33) Martínez, J. L. *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*; Martínez, J. L., Ed.; CRC Press: New York, 2008.
- (34) Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibañez, E. *Food Chem.* **2006**, *98* (1), 136–148.
- (35) Luque de Castro, M. D.; Valcárcel, M.; Tena, M. T. *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*; Reverté: Barcelona, 1993.
- (36) Albuquerque, C. L. C.; Meireles, M. A. a. *J. Supercrit. Fluids* **2012**, *66*, 86–94.
- (37) Puah, C. W.; Choo, Y. M.; Ma, A. N.; Chuah, C. H. *J. Food Lipids* **2007**, *14* (4), 377–385.
- (38) Silva, G. F.; Gamarra, F. M. C.; Oliveira, A. L.; Cabral, F. A. *Brazilian J. Chem. Eng.* **2008**, *25* (2), 419–426.
- (39) Brand-Williams; Cuvelier, M. E.; Berset, C. *Food Sci. Technol.* **1995**, *28* (1), 25–30.
- (40) Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-zevallos, L.; Hawkins, D. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19* (6–7), 669–675.
- (41) Zulueta, A.; Esteve, M. J.; Frígola, A. *Food Chem.* **2009**, *114* (1), 310–316.
- (42) Hill, J. W.; Kolb, D. K. *Química Para El Nuevo Milenio*, 8th ed.; Martín-Lunas, R., Ed.;

Pearson Educación: México, 1999.

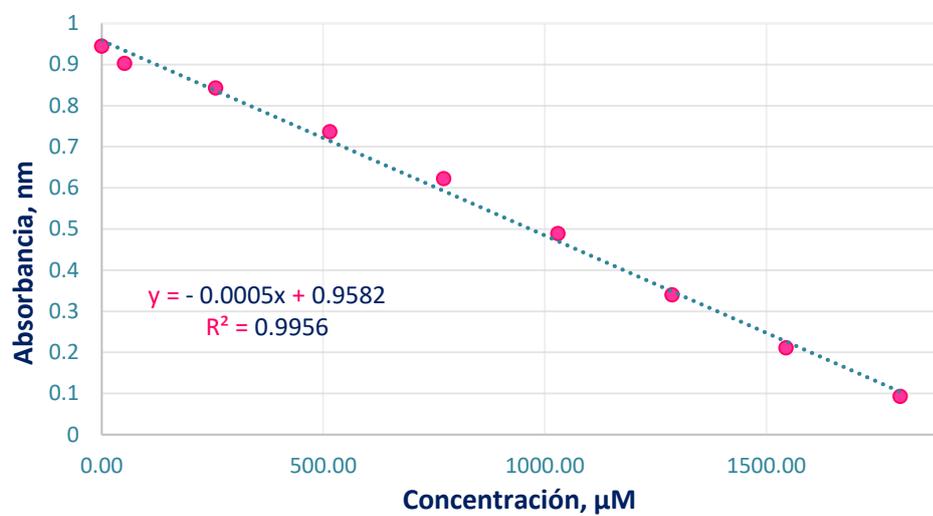
- (43) Pineda, E. N. Preparation and Radioprotective effects of a standardized Tocotrienol containing extract isolated from Annato seeds ( *Bixa orellana* L .), University of Arkansas at Little Rock, 2015.
- (44) Costa, C. K.; Silva, C. B.; Lordello, A. L. .; Zanin, S. M. .; Dias, J. F. .; Miguel, M. .; Miguel, O. . *Rev. Bras. Plantas Med.* **2013**, *15* (4), 508–512.
- (45) Nobre, B. P.; Mendes, R. L.; Queiroz, E. M.; Pessoa, F. L. P.; Coelho, J. P.; Palavra, a. F. *Brazilian J. Chem. Eng.* **2006**, *23* (2), 251–258.
- (46) Schaich, K. M.; Tian, X.; Xie, J. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 782–796.
- (47) Floegel, A.; Kim, D. O.; Chung, S. J.; Koo, S. I.; Chun, O. K. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24* (7), 1043–1048.
- (48) Müller, L.; Fröhlich, K.; Böhm, V. *Food Chem.* **2011**, *129* (1), 139–148.
- (49) Cardarelli, C. R.; Benassi, M. de T.; Mercadante, A. Z. *LWT - Food Sci. Technol.* **2008**, *41* (9), 1689–1693.
- (50) Viuda-Martos, M.; Ciro-Gómez, G. L.; Ruiz-Navajas, Y.; Zapata-Montoya, J. E.; Sendra, E.; Pérez-Álvarez, J. A.; Fernández-López, J. *J. Food Saf.* **2012**, *32* (4), 399–406.
- (51) Ganju, K.; Ganju, E. *J. Med. Pharm. Innov.* **2014**, *1* (3), 2–5.

## **ANEXOS**

**Anexo A.** Actividad antioxidante mediante método DPPH

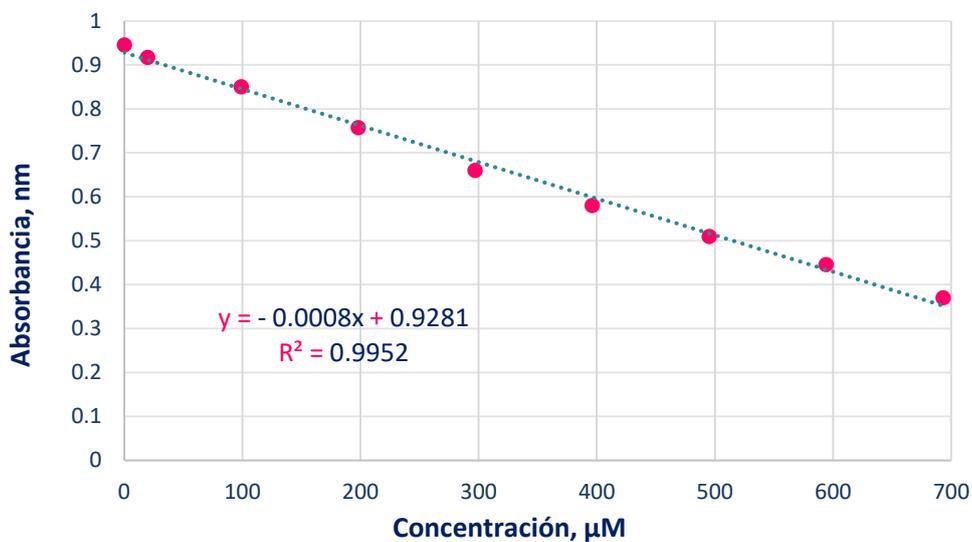


1. Curva de calibración  
 a. Trolox



Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (μM)	Absorbancia (nm)
0	10	0.00	0.945
0.2	10	51.49	0.903
1	10	257.43	0.843
2	10	514.87	0.737
3	10	772.30	0.623
4	10	1029.73	0.489
5	10	1287.17	0.34
6	10	1544.60	0.211
7	10	1802.03	0.093

**b. BHT**



Alicuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración (µM)	Absorbancia (nm)
0	10	0	0.945
0.2	10	19.804	0.917
1	10	99.022	0.850
2	10	198.045	0.757
3	10	297.067	0.660
4	10	396.090	0.580
5	10	495.112	0.509
6	10	594.135	0.445
7	10	693.157	0.370

2. Datos de cuantificación antioxidante mediante Trolox:

<b>Muestra</b>	<b>Xp,</b> μM ET/L	<b>xp,</b> μM ET/mg ext.	<b>xp,</b> μM ET/g ext.	<b>xp,</b> μM ET/g SE BH	<b>xp,</b> μM ET/g SE BS
<b>ESC1</b>	365.733	0.366	338.64 ± 0.873	3.93 ± 0.010	5.11 ± 0.013
<b>ESC2</b>	247.733	0.248	227.91 ± 1.735	3.51 ± 0.027	4.57 ± 0.035
<b>ESC3</b>	293.067	0.293	283.98 ± 0.914	4.46. ± 0.014	5.80 ± 0.019
<b>ESC4</b>	360.4	0.36	357.19 ± 1.618	3.46 ± 0.016	4.51 ± 0.020
<b>ESC5</b>	299.733	0.3	297.35 ± 0.935	10.22 ± 0.032	13.30 ± 0.042
<b>ESC6</b>	345.733	0.346	314.59 ± 1.716	5.41 ± 0.030	7.04 ± 0.038
<b>ESC7</b>	313.733	0.314	295.70 ± 0.889	9.49 ± 0.029	12.35 ± 0.037
<b>ESC8</b>	233.733	0.234	229.15 ± 1.849	6.35 ± 0.051	8.26 ± 0.067
<b>ESC9</b>	258.4	0.258	255.34 ± 1.614	6.36 ± 0.040	8.27 ± 0.052
<b>ESC10</b>	249.067	0.249	235.41 ± 0.891	3.84 ± 0.015	4.99 ± 0.019
<b>ESC11</b>	302.4	0.302	280.52 ± 1.515	4.83 ± 0.026	6.28 ± 0.034
<b>ESC12</b>	307.067	0.307	301.05 ± 0.924	3.61 ± 0.011	4.70 ± 0.014
<b>ESC13</b>	347.067	0.347	327.42 ± 1.779	1.44 ± 0.008	1.87 ± 0.010
<b>ESC14</b>	169.733	0.17	169.40 ± 1.882	2.08 ± 0.023	2.71 ± 0.030
<b>ESC15</b>	290.4	0.29	283.87 ± 0.000	5.68 ± 0.000	7.38 ± 0.000
<b>ESC16</b>	248.4	0.248	243.77 ± 1.603	3.51 ± 0.023	4.57 ± 0.030
<b>ESC17</b>	307.733	0.308	286.80 ± 1.757	2.75 ± 0.017	3.58 ± 0.022
<b>ESC18</b>	246.4	0.246	245.66 ± 1.628	7.30 ± 0.048	9.49 ± 0.063
<b>ESC19</b>	354.4	0.354	332.15 ± 1.530	5.88 ± 0.027	7.65 ± 0.035
<b>ESC20</b>	266.40	0.27	251.80 ± 1.543	4.31 ± 0.026	5.60 ± 0.034

### 3. Datos de cuantificación antioxidante mediante BHT

<b>Muestra</b>	<b>Xp,</b> μM EBHT/L	<b>xp,</b> μM EBHT/mg ext.	<b>xp,</b> μM EBHT/g ext	<b>xp,</b> μM EBHT/g SE BH	<b>xp,</b> μM EBHT/g SE BS
<b>ESC1</b>	190.958	0.191	176.81 ± 0.546	2.05 ± 0.006	26.68 ± 0.008
<b>ESC2</b>	117.208	0.117	107.83 ± 1.084	1.66 ± 0.017	21.60 ± 0.021
<b>ESC3</b>	145.542	0.146	141.03 ± 0.571	2.21 ± 0.009	28.80 ± 0.012
<b>ESC4</b>	187.625	0.188	185.95 ± 1.012	1.80 ± 0.010	23.46 ± 0.013
<b>ESC5</b>	149.708	0.15	148.52 ± 0.585	5.11 ± 0.020	66.45 ± 0.026
<b>ESC6</b>	178.458	0.178	162.38 ± 1.072	2.79 ± 0.018	36.32 ± 0.024
<b>ESC7</b>	158.458	0.158	149.35 ± 0.555	4.79 ± 0.018	62.35 ± 0.023
<b>ESC8</b>	108.458	0.108	106.33 ± 1.155	2.95 ± 0.032	38.31 ± 0.042
<b>ESC9</b>	123.875	0.124	122.41 ± 1.009	3.05 ± 0.025	39.64 ± 0.033
<b>ESC10</b>	118.042	0.118	111.57 ± 0.557	1.82 ± 0.009	23.65 ± 0.012
<b>ESC11</b>	151.375	0.151	140.42 ± 0.947	2.42 ± 0.016	31.41 ± 0.021
<b>ESC12</b>	154.292	0.154	151.27 ± 0.578	1.82 ± 0.007	23.61 ± 0.009
<b>ESC13</b>	179.292	0.179	169.14 ± 1.112	0.74 ± 0.005	9.68 ± 0.006
<b>ESC14</b>	68.458	0.068	68.32 ± 1.176	8.40 ± 0.014	1.09 ± 0.019
<b>ESC15</b>	143.875	0.144	140.64 ± 0.000	2.81 ± 0.000	3.66 ± 0.000
<b>ESC16</b>	117.625	0.118	115.43 ± 1.002	1.66 ± 0.014	2.16 ± 0.019
<b>ESC17</b>	154.708	0.155	144.18 ± 1.098	1.38 ± 0.011	1.80 ± 0.013
<b>ESC18</b>	116.375	0.116	116.03 ± 1.018	3.45 ± 0.030	4.48 ± 0.039
<b>ESC19</b>	183.875	0.184	172.33 ± 0.957	3.05 ± 0.017	3.97 ± 0.022
<b>ESC 20</b>	128.875	0.129	121.81 ± 0.965	2.08 ± 0.016	2.71 ± 0.022

## Anexo B. Análisis estadístico

### 1. ANOVA Rendimiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0.637004	1	0.637004	1.04	0.3314
B:Presión	0.88935	1	0.88935	1.45	0.2555
C:Flujo de CO2	0.0570375	1	0.0570375	0.09	0.7663
AA	1.3918E-05	1	1.3918E-05	0	0.9963
AB	1.24633	1	1.24633	2.04	0.1838
AC	0.0305414	1	0.0305414	0.05	0.8276
BB	0.0649871	1	0.0649871	0.11	0.7511
BC	3.44669	1	3.44669	5.64	0.0390
CC	0.272055	1	0.272055	0.45	0.5198
<b>Error total</b>	6.11239	10	0.611239		
<b>Total (corr.)</b>	12.1428	19			

### 2. ANOVA actividad antioxidante por DPPH

#### a. ( $\mu\text{M ET/g ext}$ )

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	973.209	1	973.209	0.61	0.4525
B:Presión	39.6808	1	39.6808	0.02	0.8777
C:Flujo de CO2	3816.54	1	3816.54	2.4	0.1526
AA	150.981	1	150.981	0.09	0.7645
AB	7077.08	1	7077.08	4.44	0.0612
AC	657.733	1	657.733	0.41	0.5349
BB	1047.59	1	1047.59	0.66	0.4362
BC	5775.51	1	5775.51	3.63	0.086
CC	1796.78	1	1796.78	1.13	0.3131
<b>Error total</b>	15923.9	10	1592.3		
<b>Total (corr.)</b>	39957.3	19			

b. ( $\mu\text{M ET/g SE}$ ) BH

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	6.55215	1	6.55215	1.28	0.284
B:Presión	9.85602	1	9.85602	1.93	0.1951
C:Flujo de CO2	4.61127	1	4.61127	0.9	0.3646
AA	0.020451	1	0.020451	0	0.9508
AB	4.95001	1	4.95001	0.97	0.3483
AC	0.170479	1	0.170479	0.03	0.8588
BB	1.88591	1	1.88591	0.37	0.5571
BC	17.5006	1	17.5006	3.42	0.094
CC	2.83789	1	2.83789	0.56	0.4734
<b>Error total</b>	51.1216.	10	5.11216		
<b>Total (corr.)</b>	96.0522.	19			

c. ( $\mu\text{M EBHT/g ext}$ )

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	362.471	1	362.471	0.57	0.4662
B:Presión	33.3233	1	33.3233	0.05	0.823
C:Flujo de CO2	1505.91	1	1505.91	2.38	0.1536
AA	59.1496	1	59.1496	0.09	0.7659
AB	2791.09	1	2791.09	4.42	0.0619
AC	276.558	1	276.558	0.44	0.5232
BB	459.935	1	459.935	0.73	0.4135
BC	2419.51	1	2419.51	3.83	0.0788
CC	672.764	1	672.764	1.06	0.3264
<b>Error total</b>	6317.6	10	631.76		
<b>Total (corr.)</b>	15984.7	19			

d. ( $\mu\text{M}$  EBHT/g SE) BH

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	1.6907	1	1.6907	1.3	0.2801
B: Presión	2.78802	1	2.78802	2.15	0.1732
C: Flujo de CO <sub>2</sub>	1.5862	1	1.5862	1.22	0.2946
AA	0.0106531	1	0.0106531	0.01	0.9296
AB	0.969638	1	0.969638	0.75	0.4074
AC	0.0322963	1	0.0322963	0.02	0.8777
BB	0.623544	1	0.623544	0.48	0.5038
BC	3.64808	1	3.64808	2.81	0.1244
CC	0.707079	1	0.707079	0.55	0.4772
<b>Error total</b>	12.9633	10	1.29633		
<b>Total (corr.)</b>	24.2339	19			

3. ANOVA cuantificación de compuestos tocotrienoles

a. Contenido de  $\delta$ -Tocotrienol

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	517.345	1	517.345	1.31	0.2816
B: Presión	1225.94	1	1225.94	3.11	0.1117
C: Flujo de CO <sub>2</sub>	34.6492	1	34.6492	0.09	0.7736
AA	807.914	1	807.914	2.05	0.1862
AB	452.678	1	452.678	1.15	0.3119
AC	1099.86	1	1099.86	2.79	0.1293
BB	786.854	1	786.854	2	0.1914
BC	42.1962	1	42.1962	0.11	0.7511
CC	334.033	1	334.033	0.85	0.3814
<b>Error total</b>	3549.58	9	394.398		
<b>Total (corr.)</b>	8586.95	18			

b. Contenido de Y-Tocotrienol

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A:Temperatura	3.14051	1	3.14051	1.38	0.271
B:Presión	6.1915	1	6.1915	2.71	0.134
C:Flujo de CO2	0.238494	1	0.238494	0.1	0.7539
AA	2.59782	1	2.59782	1.14	0.3139
AB	2.95133	1	2.95133	1.29	0.2849
AC	5.91476	1	5.91476	2.59	0.142
BB	2.8726	1	2.8726	1.26	0.291
BC	0.00010809	1	0.00010809	0	0.9947
CC	0.622974	1	0.622974	0.27	0.614
<b>Error total</b>	20.5474	9	2.28305		
<b>Total (corr.)</b>	46.0152	18			