



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

**Extracción supercrítica de compuestos bioactivos antioxidantes presentes
en la cáscara de chirimoya (*Annona cherimola*).**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Fierro Betancourth, Cristina Soledad

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

LOJA – ECUADOR

2016



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>

2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctor

Miguel Ángel Meneses Chamba

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “Extracción supercrítica de compuestos bioactivos antioxidantes presentes en la cáscara de chirimoya (*Annona cherimola*)”, realizado por Cristina Soledad Fierro Betancourth, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2016

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Cristina Soledad Fierro Betancourth declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Extracción supercrítica de compuestos bioactivos antioxidantes presentes en la cáscara de chirimoya (*Annona cherimola*)”, de la titulación de Ingeniería Química, siendo Dr. Miguel Ángel Meneses Chamba 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).....

Cristina Soledad Fierro Betancourth
C.I. 1105654907

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, especialmente a mi madre, Katya, quien ha sido mi ejemplo y mi guía, mi inspiración y admiración, sin su apoyo nada sería posible. A mis abuelitos, que con sus consejos me han impulsado a seguir adelante y nunca rendirme. A mi hermana, Anita, quien desde pequeñas, ha estado conmigo incondicionalmente. A mis tíos, tías, primas y primos, por todo su cariño y apoyo. Espero que siempre se sientan orgullosos de mí, todos están en mi corazón.

Cristina.

AGRADECIMIENTO

El agradecimiento eterno es para Dios, gracias por cada una de las bendiciones que me ha dado y por la gracia que ha puesto en mí para alcanzar esta meta.

A mi familia, en especial a mi madre y abuelita, gracias por siempre escucharme, por sus consejos, por todo el sacrificio que han hecho por mí, pero sobre todo gracias por su amor incondicional. No tengo las palabras suficientes para agradecerles, pero cada uno de mis logros es por ustedes, porque las admiro tanto que su ejemplo ha hecho de mí la mujer soy.

Al Doc. Miguel Meneses, gracias por enseñarme tanto, por alentarme y tenerme tanta paciencia durante este trayecto. Gracias por su confianza, sus consejos y por las largas conversaciones. Gracias también por el apoyo que me ha dado para culminar esta etapa de mi vida, siempre estuvo dispuesto a ayudarme y a compartir conmigo tantas experiencias y conocimientos que estoy segura me han hecho crecer como persona y profesional, mil gracias por todo.

A Mg. Sc. María del Cisne Guamán y al Doc. Eduardo Valarezo, quienes como miembros del tribunal, me brindaron su apoyo y ayuda.

Al Ing. Holger Jaramillo, porque sin él, el Laboratorio de Alimentos no sería lo mismo, gracias por las conversaciones, por toda su paciencia y el ánimo que siempre me dio.

A mis maestros quienes a lo largo de mi trayectoria estudiantil estuvieron presentes, educándome y dándome su ejemplo para superarme.

A mis amigos y amigas por ser mi salida del estrés y fuente de alegría y diversión, gracias por su compañía y los buenos momentos juntos.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, por ser mi centro de estudio y formación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	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
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Generalidades de la chirimoya.....	6
1.1.1. Origen.....	6
1.1.2. Descripción botánica.....	6
1.1.3. Composición química.....	7
1.2. Producción de chirimoya.....	7
1.2.1. Producción mundial.....	8
1.2.2. Producción en Ecuador.....	8
1.3. Subproductos de la industrialización de frutas.....	8
1.3.1. Investigaciones previas.....	9
1.4. Métodos de extracción de compuestos bioactivos.....	9
1.2.1. Extracción con fluidos supercríticos.....	10
1.2.1.1. Fluido supercrítico.....	11
1.2.1.2. Proceso de extracción supercrítica.....	13
1.2.1.3. Ejemplos de extracción supercrítica de compuestos bioactivos.....	14
1.5. Antioxidantes.....	15
1.5.1. Métodos de análisis de capacidad antioxidante.....	15
1.5.1.1. Determinación de fenoles totales.....	15
1.5.1.2. Determinación de capacidad antioxidante.....	15
1.5.1.2.1. Método ABTS.....	16
1.5.1.2.2. Método DPPH.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18

3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Materiales.....	20
3.1.1. Muestra.....	20
3.1.2. Reactivos.....	20
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Obtención de subproducto.....	21
3.2.2. Obtención de extractos mediante extracción clásica o tradicional.....	21
3.2.3. Obtención de extractos mediante extracción supercrítica.....	22
3.2.4. Determinación de fenoles totales.....	23
3.2.5. Determinación de capacidad antioxidante.....	24
3.2.5.1. Determinación con ABTS.....	24
3.2.5.2. Determinación con DPPH.....	24
3.2.6. Análisis estadístico.....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1. Obtención de subproducto.....	27
3.2. Obtención de extractos de cáscara de chirimoya.....	27
3.2.1. Rendimiento de extracción.....	28
3.2.2. Cuantificación de fenoles totales.....	31
3.2.3. Actividad antioxidante.....	32
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de <i>A. cherimola</i> , por cada 100 g de pulpa comestible.	7
Tabla 2. Técnicas de extracción de compuestos bioactivos.....	10
Tabla 3. Valores típicos de densidad, viscosidad y difusividad para gases, fluidos supercríticos y líquidos.	11
Tabla 4. Propiedades físicas de algunos disolventes comunes utilizados en condiciones supercríticas.	13
Tabla 5. Compuestos bioactivos de algunas especies.....	14
Tabla 6. Parámetros de estudio para pruebas de extracción supercrítica.....	25
Tabla 7. Rendimiento y contenido de humedad de la cáscara fresca y deshidratada.	27
Tabla 8. Concentración de fenoles totales.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de chirimoya	7
Figura 2. Subproductos de chirimoya. a. Cáscara; b. Semillas.	9
Figura 3. Diagrama de fases sólido/líquido/gas/fluido supercrítico	11
Figura 4. Variación de la densidad en función de presión y temperatura reducida en las cercanías del punto crítico.	12
Figura 5. Esquema típico de extracción con fluidos supercríticos.....	13
Figura 6. Mapa de la Provincia de Loja.	20
Figura 7. Procedimiento de extracción tradicional a. Maceración dinámica; b. Filtración a vacío; c. Evaporación.	22
Figura 8. Diagrama del equipo de extracción de fluidos supercríticos. P, Manómetros; V, válvulas.....	23
Figura 9. a. Fruto de chirimoya; b. Cáscara de chirimoya; c. Cáscara en polvo.....	27
Figura 10. Extractos de cáscara de chirimoya. a. Extracto en separador del equipo de FSC; b. Extracto en balón luego de evaporación con hexano.....	28
Figura 11. Rendimientos de extracción de cáscara de chirimoya.	29
Figura 12. Rendimientos de extracción frente a Temperatura y Presión.	30
Figura 13. Efecto de presión a temperatura constante frente a rendimiento.....	30
Figura 14. Concentración de fenoles totales en extracto de cáscara de chirimoya.....	31
Figura 15. Capacidad antioxidante por ABTS de extractos de cáscara de chirimoya	33
Figura 16. Capacidad antioxidante por DPPH de extractos de cáscara de chirimoya.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

EFSC	Extracción con Fluidos Supercríticos
FSC	Fluidos Supercríticos
CO₂	Dióxido de carbono
CO₂-SC	Dióxido de carbono supercrítico
P	Presión
T	Temperatura
PC	Punto crítico
P_c	Presión crítica
T_c	Temperatura crítica
°C	Grados centígrados
Pa	Pascales
ha	Hectáreas
CID	Número de identificación de compuesto según PubChem
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
CG	Cromatografía de gases
AA	Actividad antioxidante
IC₅₀	Concentración mínima inhibitoria del 50% de radicales libres
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
EAG	Equivalentes Ácido Gálico
ET	Equivalentes Trólox
ES	Extracto seco
MBH	Muestra base húmeda
mL	Mililitros
µL	Microlitros
µm	Micrometros
µM	Micromoles
mM	Milimoles
mg	Miligramos
N	Normal
ST	Solución trabajo
SP	Solución patrón
nm	Nanómetros
W	Peso
R	Rendimiento
p/v	Relación: peso/volumen
v/v	Relación: volumen/volumen
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
HCl	Ácido clorhídrico
MeOH	Metanol
H₂O	Agua

RESUMEN

Chirimoya (*Annona cherimola*) es una fruta tropical, caracterizada por su exquisito sabor; rica en antioxidantes. En el presente estudio se utilizó la cáscara de la chirimoya para extraer compuestos antioxidantes aplicando dióxido de carbono supercrítico. Los parámetros de temperatura y presión se variaron entre 35 a 45 °C y de 100 a 200 bares, respectivamente. Los extractos fueron analizados mediante cuantificación de fenoles totales y capacidad antioxidante. El rendimiento de extracción más alto fue de 1.91% (p/p) a 40 °C y 200 bares, el contenido de fenoles totales de 8.91 mg EAG/g ES a 40 °C y 100 bares, actividad antioxidante por ABTS de 188.5 µM ET/g ES a 35 °C y 100 bares y por DPPH de 42.47 µM ET/g ES a 35 °C y 200 bares. A las condiciones ensayadas, de presión y temperatura, la solubilidad de los compuestos extraídos no estuvo relacionada con la capacidad de extracción del CO₂-SC. Las propiedades antioxidantes del extracto obtenido impulsan a intensificar su estudio para aplicación en la industria alimentaria o farmacéutica como ingrediente natural con valor añadido y/o productos procesados.

Palabras claves: Extracción supercrítica, dióxido de carbono supercrítico, *Annona cherimola*, cáscara de chirimoya, capacidad antioxidante.

ABSTRACT

Cherimoya (*Annona cherimola*) is a tropical fruit, with high content of natural antioxidants. The aim of this research was to extract the antioxidant compounds from cherimoya peels using supercritical fluid extraction. The SC-CO₂ operational parameters, temperature and pressure were varied between 35 to 45 °C and 10 to 200 bar, respectively. The extracts were analyzed by quantification of total phenolics and antioxidant capacity. The highest extraction yield was 1.91% (w/w) at 40 °C and 200 bar, the total phenolics concentration was 8.91 mg GAE/g at 40 °C and 100 bar, antioxidant activity by ABTS was 188.5 µM TE/g ES at 35 °C and 100 bar and 42.47 µM DPPH TE/g at 35 °C and 200 bar. At the experimental conditions, pressure and temperature, the solubility of the extracted compounds was not related to the capacity of SC-CO₂ extraction. The results of antioxidant capacity would encourage to intensify the studies in the application in food or pharmaceutical industries such as value-added natural extracts.

Keywords: Supercritical Extraction, supercritical carbon dioxide, *Annona cherimola*, cherimoya peels, antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

Según datos históricos, la chirimoya es nativa de los Andes de América del Sur, principalmente del norte de Perú y sur de Ecuador, con gran diversidad en la provincia de Loja.¹ Estudios recientes han demostrado que una fuente de antioxidantes naturales son los subproductos de frutas y verduras, concentrados en la cáscara y semillas^{5,6}, resultando un potencial para ser usados como fuente de compuestos bioactivos naturales, como ingredientes en nutracéuticos y alimentos funcionales empleados en la dieta para mejorar la calidad de vida de las personas.

Tal es el caso de los subproductos del fruto de chirimoya (*Annona cherimola*), en particular, la cáscara contiene la mayor cantidad de compuestos bioactivos naturales⁷ como: ácido L-ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E), retinol (Vitamina A), β -caroteno, luteína y β -criptoxantina⁶, que contribuyen a la prevención de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, y otras relacionadas con el estrés oxidativo.⁸⁻¹⁰

A pesar de la presencia de compuestos bioactivos en los subproductos y de la disponibilidad de estos recursos, una de las limitaciones en la producción y aplicación de extractos vegetales es el uso de solventes orgánicos, generalmente tóxicos, que generan contaminación al medio ambiente y al extracto.^{11,12} La extracción tradicional (soxhlet, maceración, percolación entre otras) tiene algunas desventajas como el alto volumen y elevado costo del solvente, largos tiempos de operación y requerimiento de etapas posteriores para separar el extracto del solvente.^{12,13} La tecnología de extracción con fluidos supercríticos (EFSC) ha sido probada para reducir dichos problemas y limitantes, obteniendo un extracto de mejor calidad e inocuo, reduciendo tiempos de extracción y evitando la degradación de los compuestos causada por el tratamiento térmico.^{11,12,14}

La presente investigación consiste en estudiar una nueva fuente de antioxidantes naturales como es la cáscara de chirimoya (*A. cherimola*) y la aplicación de tecnología supercrítica para su extracción.

El presente trabajo de titulación consta de cuatro capítulos, el primero es una recopilación de información y situación actual, donde se describen los fundamentos para la investigación. En el segundo capítulo, se especifican los objetivos del proyecto; en el tercer capítulo, se detallan los materiales y métodos para la obtención de subproducto y extractos, así como los métodos de análisis de los mismos. Finalmente en el cuarto capítulo, se exhiben los resultados y discusiones, en cuanto al rendimiento de extracción, cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante de los extractos.

Este estudio permitirá aportar al desarrollo industrial en el sector alimentario, farmacéutico o cosmético a través del aprovechamiento de una nueva fuente de compuestos bioactivos, cáscara de chirimoya, mediante la técnica de extracción supercrítica de compuestos antioxidantes, que podrían ser aplicados como extractos naturales y brindar valor añadido a productos procesados.

El objetivo general y los objetivos específicos del presente estudio, fueron cumplidos, se aplicó la tecnología de extracción supercrítica con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) como medio de extracción y se obtuvieron extractos con capacidad antioxidante a partir de la cáscara de chirimoya. Así mismo, se determinó el rendimiento de extracción, contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos, evaluando el efecto de presión y temperatura del CO₂-SC sobre la extracción de compuestos antioxidantes de la cáscara de chirimoya.

Para llevar a cabo la investigación, se inició con la recolección de la materia prima para posteriormente pasar por un tratamiento de desinfección, secado y triturado. La extracción se realizó en el equipo de EFSC, los extractos obtenidos fueron evaluados a través del análisis de contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH.

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, la misma que cuenta con el equipo de EFSC, favoreciendo y facilitando su realización; así mismo, la materia prima se recolectó cerca de la ciudad de Loja. Una de las limitantes en el desarrollo de la investigación fue que la chirimoya es una fruta de temporada, donde su cosecha se realiza entre los meses de noviembre a enero en Ecuador, es decir, es necesario planificar adecuadamente el aprovisionamiento de la materia prima así como su conservación hasta el uso en la experimentación.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades de la chirimoya.

La chirimoya (*A. cherimola*) se caracteriza por su exquisito sabor, las hojas son utilizadas en medicina tradicional como agente antimicrobiano e insecticida, además como un tratamiento efectivo para trastornos digestivos como úlceras de estómago y de páncreas, y para enfermedades de la piel.¹⁵

La chirimoya es rica en antioxidantes como vitaminas A y C⁸, y su interés ha aumentado debido a su alta concentración de acetogéninas.¹⁶ El consumo regular de chirimoya puede contribuir al aumento de la capacidad antioxidante del organismo, previniendo el desarrollo y progresión de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.⁸⁻¹⁰

1.1.1. Origen.

Según datos antropológicos la chirimoya ha sido cultivada desde 1200 a. C. durante los tiempos del Imperio Inca y fue un ingrediente activo en su alimentación.^{8,17} El lugar de origen es aún indefinido, sin embargo diferentes autores conducen que el origen de la chirimoya es en Mesoamérica y en los Andes de América del Sur occidental, principalmente sur de Ecuador y norte de Perú.^{1,6,18-20} La provincia de Loja, en Ecuador, es el probable centro de biodiversidad de chirimoyas, aquí existen bosques silvestres de gran número de ecotipos con amplia diversidad genética.^{1,17}

1.1.2. Descripción botánica.

La chirimoya (Figura 1) es el fruto del árbol *Annona cherimola* perteneciente a la familia Annonaceae. Es un árbol pequeño de 5 a 8 m de altura, de tronco corto y copa amplia más o menos redondeada. Es caducifolio, en zonas con inviernos suaves se torna perennifolio facultativo, porque se mantiene siempre verde, a pesar de que sus hojas son renovadas cada año.¹⁹ La flor es hermafrodita, colgante y poco llamativa, compuesta por estambres y pistilos; mientras que el fruto es de color verde y está formado por la unión de los pistilos con el receptáculo, dando origen al sincarpio que es la parte comestible (pulpa blanquecina).^{19,20}



Figura 1. Fruto de chirimoya

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).²¹

1.1.3. Composición química.

La chirimoya es una fruta con niveles altos de agua, proteínas, minerales, vitaminas A y C, hidratos de carbono, aminoácidos y azúcares que proporcionan valor calórico elevado.^{15,18-20}

En la Tabla 1, se resume la composición química de la chirimoya por cada 100 g de pulpa.

Tabla 1. Composición nutricional de *A. cherimola*, por cada 100 g de pulpa comestible.

Componente	Contenido
Energía (Kcal)	90
Proteínas (g)	1
Lípidos totales (g)	2
Hidratos de carbono (g)	20
Fibra (g)	1.9
Agua (g)	76.9
Calcio (mg)	30
Hierro (mg)	0.6
Sodio (mg)	4
Potasio (mg)	382
Fósforo (mg)	21
Tiamina (mg)	0.08
Riboflavina (mg)	0.09
Equivalentes niacina (mg)	0.9
Vitamina C (mg)	18

Fuente: Tablas de composición de alimentos.²²
Elaboración: La autora.

1.2. Producción de chirimoya.

Debido a las propiedades benéficas que posee la chirimoya, su consumo ha incrementado y por ende su producción. A continuación, se detalla la producción mundial y nacional de la chirimoya.

1.2.1. Producción mundial.

A. cherimola es una especie de fruta que se encuentra en diferentes zonas subtropicales de todo el mundo. Actualmente, España es el primer productor mundial de chirimoya con 3 600 hectáreas (ha) cultivadas al sur del país, con una producción alrededor de 50 000 toneladas al año.^{2,20,23}

Sin embargo la producción varía según la región y la demanda del producto. Otros países con importante producción (aunque a menor escala) de chirimoya son: Perú, Chile, Bolivia, Ecuador, Australia, Estados Unidos, Colombia, Sudáfrica, Israel, Brasil y México.^{20,24}

1.2.2. Producción en Ecuador.

En Ecuador existen alrededor de 467 ha cultivadas de chirimoya, con una producción alrededor de 1 000 kg/ha. Hasta el año 2000, se reportaron producciones de 277, 270, 41 y 39 toneladas de chirimoya en las provincias de Pichincha, Loja, Azuay e Imbabura, respectivamente.²⁻⁴

A pesar de que la producción es baja frente a la demanda, se están implementando programas para potenciar su cultivo, debido a su reconocido beneficio.³

1.3. Subproductos de la industrialización de frutas.

Actualmente los subproductos de frutas, no tienen valor comercial importante y resultan un inconveniente por la disposición final y por la contaminación ambiental que generan, sin embargo, luego de experimentaciones se ha demostrado que existe gran concentración de antioxidantes en la cáscara y semillas de las frutas^{5,6}, que pueden conducir a nuevos productos con aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Los subproductos de *A. cherimola* tienen gran potencial antioxidante, en particular, la cáscara (Figura 2.a.) contiene la mayor cantidad de compuestos bioactivos⁷ como: ácido L-ascórbico (Vitamina C), retinol (Vitamina A), α -tocoferol (Vitamina E), luteína, β -criptoxantina y β -caroteno.⁶ Así mismo las semillas (Figura 2.b.), a más de contener compuestos antioxidantes^{6,8}, tienen un contenido de aceite significativo (hasta 30% en peso) que se puede utilizar para la producción de biodiesel.²⁵



Figura 2. Subproductos de chirimoya. **a.** Cáscara; **b.** Semillas.
Fuente: La experimentación.

1.3.1. Investigaciones previas.

Otros autores han realizado estudios para analizar la actividad antioxidante de la chirimoya, tanto del fruto como de los subproductos (semillas y cáscara). Por su parte, Gupta-Elera *et al.*⁸ analizó el contenido de antioxidantes del jugo, pulpa y cáscara de chirimoya mediante el ensayo de absorción de radicales de oxígeno (ORAC); mostrando que el jugo posee la actividad antioxidante más alta con 98 085 ET/100 g, seguido de la cáscara de chirimoya con 74 714 ET/100 g, mientras que la menor actividad se mostró en la pulpa con 6 004 ET/100 g.

Loizzo *et al.*⁷, evaluó el contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante de la cáscara y pulpa de chirimoya. Demostrando que el extracto de la cáscara tiene mejores resultados que la pulpa, con un contenido fenólico de 14.6 mg equivalentes de ácido clorogénico/100 g, y actividad de reducción de radicales libres expresada como la concentración mínima inhibitoria del 50% de radicales libres (IC₅₀) de 57.7 mg/mL.

Otro estudio realizado por Albuquerque *et al.*⁶, de la actividad antioxidante, composición nutricional y compuestos bioactivos de la pulpa, cáscara y semillas de cuatro cultivares de *A. cherimola* de la isla de Madeira, mostró que la cáscara contiene la mayor capacidad antioxidante con IC₅₀ de 0.97 mg/mL, y fenoles totales de 19.6 mg EAG/100 g. Ni la pulpa ni las semillas presentaron carotenoides, sin embargo, en la cáscara se cuantificaron tres carotenoides (luteína, β -criptoxantina y β -caroteno), la luteína fue el más abundante con valores entre 129 a la 232 μ g/100 g. Así mismo en la cáscara se encontró el contenido de ácido L-ascórbico más alto (4.41 mg/100 g).

1.4. Métodos de extracción de compuestos bioactivos.

Existen dos métodos para la extracción de compuestos a partir de una mezcla: extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido, estas técnicas dependen de las diferencias de

solubilidad de los componentes.²⁶ En la Tabla 2, se muestran listadas algunas técnicas de extracción.

Tabla 2. Técnicas de extracción de compuestos bioactivos.

Extracción	<i>Sólido – Líquido</i>	<i>Líquido - Líquido</i>
<i>Clásica</i> ²⁷	Soxhlet	Extractor centrífugo
	Percolación	Columnas
	Maceración	Columnas con agitación
<i>Emergente</i> ²⁶	Asistida por ultrasonido	
	Asistida con pulsos eléctricos	
	Asistida por microondas	Destilación molecular
	Asistida por altas presiones	
	Fluidos supercríticos	

Elaboración: La autora.

Las extracciones “tradicionales o clásicas”, poco a poco están siendo reemplazadas por las “emergentes”, debido a varias razones, como: el gran volumen, toxicidad y costo de disolventes orgánicos, contaminación, largos tiempos de operación, requerimiento de etapas posteriores para separar el extracto del solvente, entre otras^{11,13,14,28}, pero quizás la razón más importante son las estrictas regulaciones legislativas sobre el límite en el uso de solventes en productos para consumo humano.²⁹

1.2.1. Extracción con fluidos supercríticos.

La técnica de EFSC en principio es similar a una extracción “clásica”, con la diferencia de que se utiliza un fluido supercrítico como agente extractor en lugar de un solvente en estado líquido.²⁹ Para una extracción exitosa, no sólo se toma en cuenta la solubilidad de los compuestos, sino también la resistencia de transferencia de masa.¹²

Un fluido supercrítico puede ser un líquido o un gas llevado a condiciones de presión y temperatura por sobre sus valores críticos. Las propiedades del estado supercrítico conllevan a que el proceso se acerque más a una “extracción ideal”, es decir, rápida, simple, barata, no contaminante, selectiva, aplicable a analitos termolábiles y obtención de extractos finales listos para el análisis.³⁰ Sin embargo, el único inconveniente grave de EFSC son los costos de inversión en comparación con las técnicas clásicas de extracción, pero resulta relativamente barato y muy simple cuando es ampliado a escala industrial.²⁸

1.2.1.1. Fluido supercrítico.

Fluidos supercríticos (FSC) pueden ser disolventes convencionales y no convencionales, los cuales presentan propiedades intermedias entre líquidos y gases (Tabla 3) que pueden variar con cambios en presión y temperatura.³¹

Tabla 3. Valores típicos de densidad, viscosidad y difusividad para gases, fluidos supercríticos y líquidos.

Fluido	Densidad (g/mL)	Viscosidad (Pa.s)	Difusividad (cm ² /s)
Gases	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻¹
Fluidos supercríticos	0.2 – 0.9	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Líquidos	0.6 – 1.6	10 ⁻³	10 ⁻⁵

Fuente: Extracción con fluidos supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos.³⁰

Un diagrama de fases permite conocer el estado de agregación de una sustancia a cualquier valor de presión y temperatura, en la Figura 3 se muestra un diagrama de fases en donde se observan las curvas de fusión, sublimación y vaporización frente a la presión y temperatura donde se produce el cambio de estado correspondiente.



Figura 3. Diagrama de fases sólido/líquido/gas/fluido supercrítico

Fuente: Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico.³¹

La línea de vaporización desaparece en un punto del diagrama denominado punto crítico (PC) cuando se encuentran a presión y temperaturas “críticas” (P_c y T_c , respectivamente). Al PC se lo define como aquel por encima del cual no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar; es así que en esta zona del diagrama no se la considera a la sustancia ni como líquido ni como gas, y se dice que se encuentra en estado supercrítico.^{29,30,32} A partir de este punto la densidad aumenta si la presión aumenta a temperatura constante, o si la temperatura disminuye a presión constante; este efecto se puede observar en el diagrama de densidad reducida (ρ_R) frente a presión reducida (P_R) (Figura 4) donde se muestran los

cambios de densidad en las diferentes isotermas de temperatura reducida (T_R) y en las cercanías del PC con pequeñas variaciones de presión se dan grandes cambios de densidad³¹, esto le da ventaja a la extracción con fluidos supercríticos, pues se puede emplear un mismo solvente para la extracción de diferentes compuestos al modificar su poder de extracción.

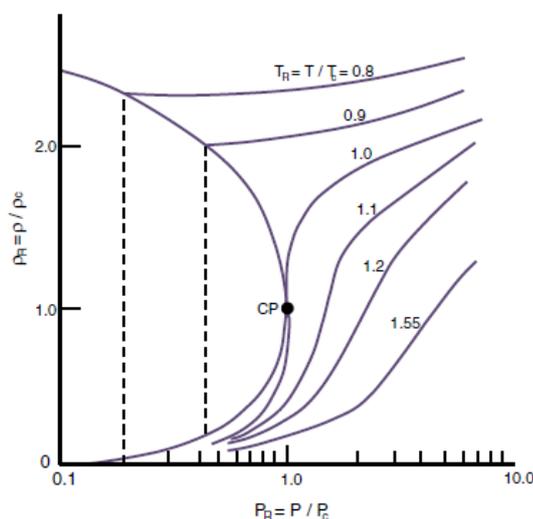


Figura 4. Variación de la densidad en función de presión y temperatura reducida en las cercanías del punto crítico.
Fuente: Fundamentals of Supercritical Fluid Extraction.³²

Además, un fluido supercrítico, presenta algunas ventajas como³¹:

- Propiedades hidrodinámicas muy favorables, debido a que la viscosidad de los FSC es mucho más baja que la de los líquidos.
- Alta penetrabilidad a través de sólidos porosos y lechos empacados, debido a la baja tensión superficial.
- La densidad de los FSC está estrechamente relacionada con la presión y en una menor medida con la temperatura.
- Transferencia de materia más favorable, debido a que la difusividad de los FSC es mayor que la de los líquidos.

Las condiciones de temperatura y presión críticas varían según el disolvente (Tabla 4). En la mayoría de técnicas de extracción supercrítica se utiliza dióxido de carbono (CO_2) porque es seguro, de fácil acceso, bajo costo, biocompatible y con parámetros críticos suaves respecto a compuestos termolábiles ($T_c = 31.08^\circ\text{C}$ y $P_c = 73.8 \text{ bar}$ ³²). Sin embargo la polaridad del CO_2 -SC es muy baja lo que dificulta la extracción de compuestos polares, por lo que existe la

alternativa de adicionar pequeñas cantidades de modificadores o sustancias polares como etanol o agua, mejorando la capacidad solvente.^{11,12,33,34}

Tabla 4. Propiedades físicas de algunos disolventes comunes utilizados en condiciones supercríticas.

Fluido	Punto de ebullición normal (° C)	Constantes críticas		
		Presión (bar)	Temperatura (° C)	Densidad (g/cm ³)
Dióxido de carbono	-78.5	73.8	31.1	0.468
Etano	-88.0	48.8	32.2	0.203
Etileno	-103.7	50.4	9.3	0.20
Óxido de nitrógeno	-89.0	71.0	36.5	0.457
Amonio	-33.4	112.8	132.5	0.240
Agua	100	220.5	374.2	0.272

Fuente: Natural extracts using supercritical carbon dioxide.³⁴

1.2.1.2. Proceso de extracción supercrítica.

El equipo de EFSC, principalmente consta de extractor (4), separadores (6), intercambiadores de calor (3), bombas (2), válvulas (5) y condensadores (7), en la Figura 5 se muestra un esquema del proceso típico de extracción. En la implantación de este proceso los materiales de construcción y accesorios deben soportar las condiciones de presión y temperatura a la que estén sometidos dependiendo del proceso.^{31,32}

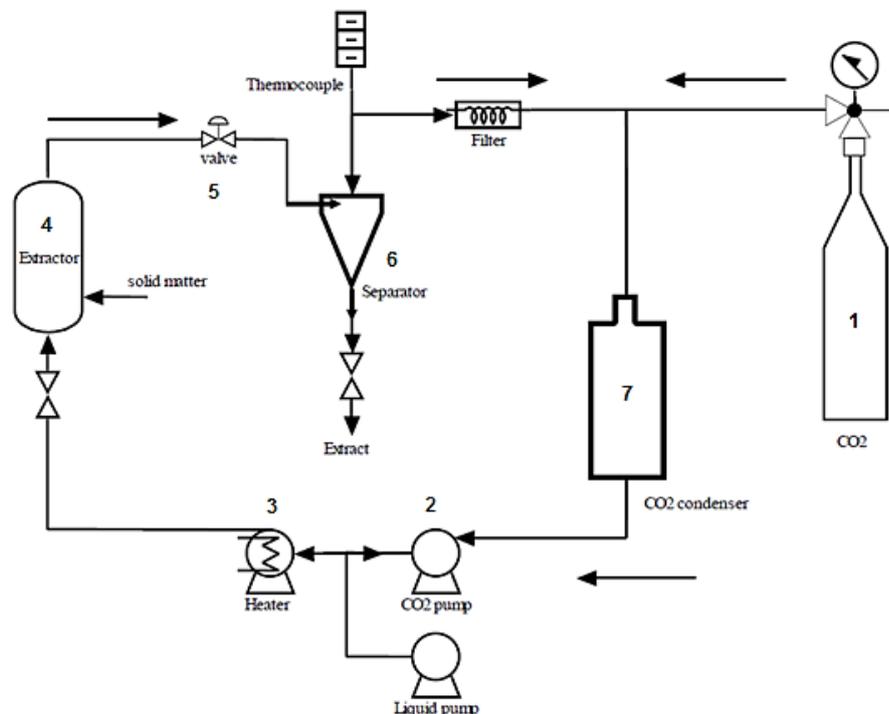


Figura 5. Esquema típico de extracción con fluidos supercríticos.

Fuente: Supercritical antisolvent extraction of bioactive compounds from agroindustrial wastes.³⁵

Generalmente, el proceso inicia con la impulsión del disolvente (CO₂) mediante una bomba de alta presión (2) hacia el extractor (4), donde se encuentra la muestra. La cámara de extracción debe estar termostatazada (3) para controlar que se encuentre en las condiciones de temperatura necesarias, así mismo, la presión debe controlarse con una válvula de control (5). Cuando el CO₂ llega al extractor (4) los componentes de la muestra son disueltos y arrastrados hasta un separador (6) en donde precipitan debido a la disminución del poder solvente del CO₂ al reducir la presión. Si en el proceso se adicionan modificadores, éstos se mezclan en un mezclador de lecho empacado en donde se alimenta continuamente el solvente líquido y el CO₂.³⁰⁻³²

1.2.1.3. Ejemplos de extracción supercrítica de compuestos bioactivos.

En los últimos años la extracción de compuestos bioactivos con FSC se ha desarrollado tanto a escala de laboratorio como industrial, esto se debe a la gran importancia que tienen los compuestos bioactivos para el consumo y/o servicio del ser humano. En la Tabla 5 se exhiben algunas especies estudiadas.

Tabla 5. Compuestos bioactivos de algunas especies.

Nombre Común	Nombre Científico	Parte usada	Compuesto bioactivo	Condiciones supercríticas*			Rendimiento (%)	Referencia
				Presión (MPa)	Temperatura (K)	Co-solvente		
Achiote	<i>Bixa orellana</i>	Semillas	Aceite volátil y oleorresina: bixina y norbixina	20 – 30	313–333	Etanol	1 - 45	36
Cacao	<i>Theobroma cacao</i>	Fruto	Cafeína, teobromina, ácidos grasos y metilxantinas	24.8	323	---	3 - 13	37
Cedrón	<i>Aloysia triphylla</i>	Hojas	Neral (o-Z citral) y geraniol (ORE-citral) y spathulenol	10 – 35	308 - 318	---	0.6 – 1.5	38
Mango	<i>Mangifera indica</i>	Hojas	Compuestos fenólicos	25	318	---	1	39
Maracuyá	<i>Passiflora edulis</i>	Semillas	Lípidos, ácidos grasos.	20 – 30	317 - 343	---	13.7 – 27.7	40

* Condiciones supercríticas de ensayo o estudio

Elaboración: La autora.

Los productos obtenidos mediante tecnología de extracción supercrítica, ha ayudado a aprovechar el potencial de diferentes matrices naturales, como en la extracción de aceites esenciales y oleorresinas de vegetales, extracción de pigmentos, fraccionamiento de grasas,

entre otros. ^{32,34} Además los productos están libres de residuos tóxicos y poseen mayor calidad que los obtenidos mediante técnicas tradicionales, por tanto, la EFSC es una tecnología económicamente viable y ecológicamente responsable. ⁴¹

1.5. Antioxidantes.

Los antioxidantes son compuestos que poseen la facultad de proteger a las células contra el daño oxidativo cuando la producción de especies reactivas de oxígeno excede la capacidad antioxidante ¹⁸ propia del organismo. El daño o estrés oxidativo es responsable de ciertas patologías incluyendo cáncer, aterosclerosis, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer, entre otras. ⁴²

La capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos ejercen efectos reguladores sobre la proliferación celular y la citotoxicidad. ⁴³ Al ser la *A. cherimola* rica en antioxidantes como vitamina C y A, puede ser considerada una fuente de ingredientes con beneficio para la salud.

1.5.1. Métodos de análisis de capacidad antioxidante.

A continuación se describen los métodos para la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante.

1.5.1.1. Determinación de fenoles totales.

Los fenoles totales, permiten conocer la cantidad de compuestos fenólicos del compuesto. El método comúnmente usado es Folin-Ciocalteu, consiste en aplicar un reactivo (solución de ácido fosfotungstácico y ácido fosfomolibdico) que oxida los compuestos polifenólicos a fenolatos en medio alcalino, formando un complejo de molibdeno – tungsteno de color azul. La coloración azul posee una absorción máxima de alrededor de 765 nm y es proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos. ⁴⁴ Este método es usado preliminarmente a la identificación individual de compuestos mediante Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o Cromatografía de gases (CG).

1.5.1.2. Determinación de capacidad antioxidante.

Los métodos para determinar la actividad antioxidante (AA) se basan en distintos sistemas generadores de radicales libres, así los radicales reaccionan con la muestra y en virtud de la capacidad antioxidante de ésta se inhibirá la generación de los mismos. ^{44,45} Para conseguir buenos resultados y definir la capacidad antioxidante de los compuestos, es necesario realizar varios métodos ya que los procesos de oxidación son complejos y se necesitan datos válidos para comparar e interpretar; los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. ⁴⁵

1.5.1.2.1. Método ABTS.

En este método, el radical $ABTS^{\bullet+}$ se genera a partir de su precursor el ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS).⁴⁶ El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm.^{44,47} La adición de antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS, de esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical $ABTS^{\bullet+}$ está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.⁴⁷

1.5.1.2.2. Método DPPH.

El método se basa en el descenso de absorbancia a 517 nm, asociado a la desaparición de la forma radical del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).⁴⁶ La capacidad de inhibición del radical DPPH se calcula a partir de una curva de calibrado por regresión lineal, así se mide la disminución de la absorbancia de una disolución estable del radical DPPH en presencia de sustancias antioxidantes con grupos OH activos donadores de hidrógeno, capaces de capturar radicales libres.⁴⁸

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

- Obtener extractos de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante a partir de cáscara de chirimoya aplicando la tecnología de extracción supercrítica.

2.2. Objetivos específicos.

- Obtener extractos antioxidantes de la cáscara de chirimoya utilizando dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) como medio de extracción.
- Determinar el rendimiento de extracción, el contenido de fenoles totales por método de Folin-Ciocalteu y capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH.
- Evaluar el efecto de presión y temperatura del CO₂-SC sobre la extracción de antioxidantes de la cáscara de chirimoya.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

A continuación se detalla la muestra y los reactivos utilizados en la presente investigación.

3.1.1. Muestra.

En el presente estudio, se utilizó frutas de chirimoya (*A. cherimola*), proveniente del cantón Olmedo en la provincia de Loja, región sur del Ecuador (Figura 6), recolectadas en el mes de abril de 2016.

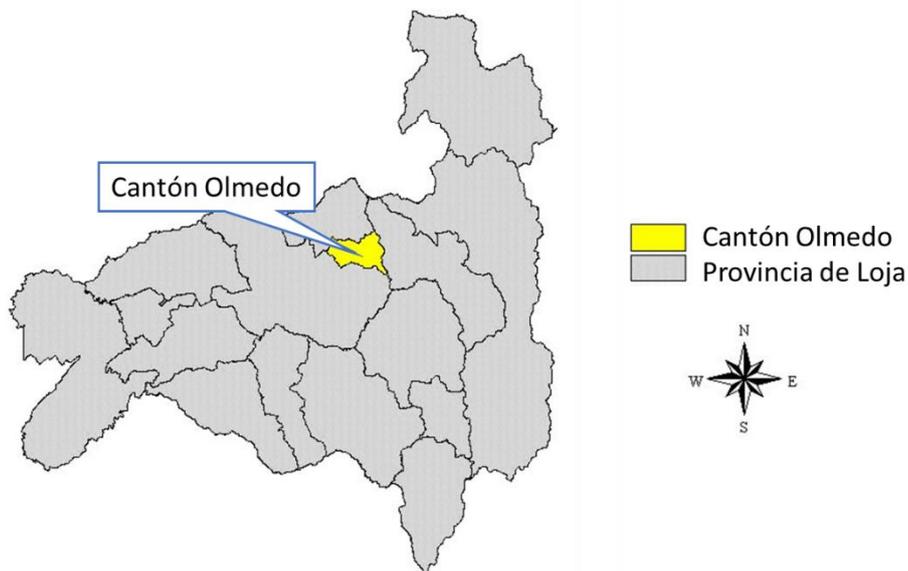


Figura 6. Mapa de la Provincia de Loja.
Elaboración: La autora.

3.1.2. Reactivos.

Los reactivos utilizados para la obtención de subproductos de chirimoya, extracción y, determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) fueron:

- Obtención de subproductos: Hipoclorito de sodio (CID: 23665760⁴⁹), Ácido Cítrico (CID: 311⁴⁹), Ácido Ascórbico (CID: 54670067⁴⁹).
- Extracción por maceración dinámica: Hexano (CID: 8058⁴⁹), proveniente de Merk.
- Extracción supercrítica: CO₂ grado alimenticio 99,9% de pureza (Indura), Etilenglicol (CID: 174⁴⁹) proveniente de LAQUIN S.A.

- Cuantificación de Fenoles totales: Folin-Ciocalteu 2N, Ácido Gálico (CID: 370⁴⁹) y Metanol (CID: 887⁴⁹) procedentes de Sigma-Aldrich, Carbonato de Sodio (CID: 10340⁴⁹) proveniente de Merk.
- Método ABTS: 2, 2-azinobis (3 – etilbenzotiazolina – 6 – ácido sulfónico) (CID: 9570474⁴⁹), Persulfato de potasio (CID: 24412⁴⁹), ácido – 6 - hidroxil – (2, 5, 7, 8 tetrametilcromano – 2 – carboxílico) (Trolox) (CID: 40634⁴⁹), y Metanol (CID: 887⁴⁹), procedentes de Sigma-Aldrich.
- Método DPPH: 2, 2 difenil – 1 – pycridrazil (CID: 2735032⁴⁹), ácido – 6 - hidroxil – (2, 5, 7, 8 tetrametilcromano – 2 – carboxílico) (Trolox) (CID: 40634⁴⁹), Metanol (CID: 887⁴⁹), provenientes de Sigma-Aldrich.

3.2. Métodos.

Para la realización de la presente investigación, se aplicaron los métodos que se describen a continuación.

3.2.1. Obtención de subproducto.

A las chirimoyas se las desinfectó con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0.1% durante cinco minutos, luego de separar la cáscara, se la sometió a un tratamiento con ácido cítrico (0.2%) y ácido ascórbico (0.2%) para disminuir la degradación o pardeamiento del subproducto. Además, para evitar el deterioro de la muestra debido a la proliferación de microorganismos, se deshidrató la cáscara de las chirimoyas en estufa de tiro forzado a 60 °C hasta alcanzar humedad inferior al 10%. Posteriormente, se trituró mediante un molino de discos y fue tamizada (tamices Analysensieb) hasta un tamaño de partícula inferior a 250 µm. Finalmente las muestras se almacenaron a -20 °C de temperatura hasta su posterior uso. En el Anexo A se presenta el procedimiento mencionado.

3.2.2. Obtención de extractos mediante extracción clásica o tradicional.

La metodología de extracción tradicional aplicada fue maceración dinámica. Se pesó por duplicado 10 gramos de muestra deshidratada y se añadió hexano en relación 1:10 (p/v), la maceración se realizó con agitación constante a temperatura ambiente durante 3 horas (Figura 7.a.). Posteriormente se separaron las fases mediante filtración al vacío (Figura 7.b.), éste proceso de extracción se repitió para aumentar la eficiencia. Finalmente la parte líquida que posee compuestos lipofílicos (solubles en hexano), se evaporaron en el rotaevaporador

a 40 °C a vacío (Figura 7.c.), el extracto final se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis. En el Anexo B se describe este procedimiento.



Figura 7. Procedimiento de extracción tradicional. **a.** Maceración dinámica; **b.** Filtración a vacío; **c.** Evaporación.
Fuente: La experimentación.

El rendimiento de extracción (Ecuación 1) se expresó como el porcentaje respecto al peso de la muestra deshidratada:

$$\text{Rendimiento extracción (\%)} = \frac{\text{peso extracto (g)}}{\text{peso muestra (g)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

3.2.3. Obtención de extractos mediante extracción supercrítica.

Se aplicó la técnica de extracción con fluidos supercríticos, empleando CO₂ como medio de extracción. Se trabajó a presiones entre 100 y 200 bares para asegurar su estado supercrítico, debido a que la presión supercrítica del CO₂ es 73.8 bares³⁴; las temperaturas de extracción fueron entre 35 y 45 °C, la temperatura máxima fue de 45 °C para evitar la degradación térmica de compuestos bioactivos causada por altas temperaturas y exposición a la luz^{50,51}; el tiempo de extracción fue de 2 horas con un flujo continuo de 25 000 mL CO₂/min (medidos a condiciones ambientales). El rendimiento de extracción se expresó como el porcentaje respecto al peso de muestra deshidratada (Ecuación 1).

En la Figura 8, se muestra el diagrama del equipo de EFSC. Para iniciar, en el extractor (5) se cargó la muestra, 40 gramos, y se procedió a establecer las condiciones de ensayo, temperatura y presión. La temperatura se elevó y mantuvo utilizando una estufa de convección forzada (4), dentro de la cual se encuentra dispuesto el extractor (5). Mientras que la presión se alcanzó con un sistema de bombeo de CO₂ (3), la presión se elevó manteniendo la válvula micrométrica (V3) en posición cerrada; una vez alcanzada la presión de operación, esta se mantuvo abriendo de forma controlada la válvula micrométrica (V3), supervisando en el

manómetro (P3) que se mantenga constante. Por otro lado, el flujo de CO₂-SC se reguló con la válvula dosificadora de la bomba (V2) y se supervisó en el medidor de flujo (7). Cuando las condiciones de temperatura, presión y flujo se estabilizaron se comenzó a contabilizar el tiempo de extracción. Los compuestos solubles en CO₂-SC continuamente fueron arrastrados a través de la tubería, pasando por la válvula micrométrica (V3), en donde ocurrió una caída de presión que provoca la expansión del CO₂, esta corriente de CO₂ y compuestos extraídos se condujo al separador (6) que operó a presión entre 30-40 bares, aquí el CO₂ se expande a fase de gas y los compuestos dejan de ser solubles. En el separador se recogieron periódicamente los extractos, mientras que el CO₂ gaseoso pasó por el medidor de flujo (7) y se eliminó a la atmósfera. El Anexo C presenta este proceso.

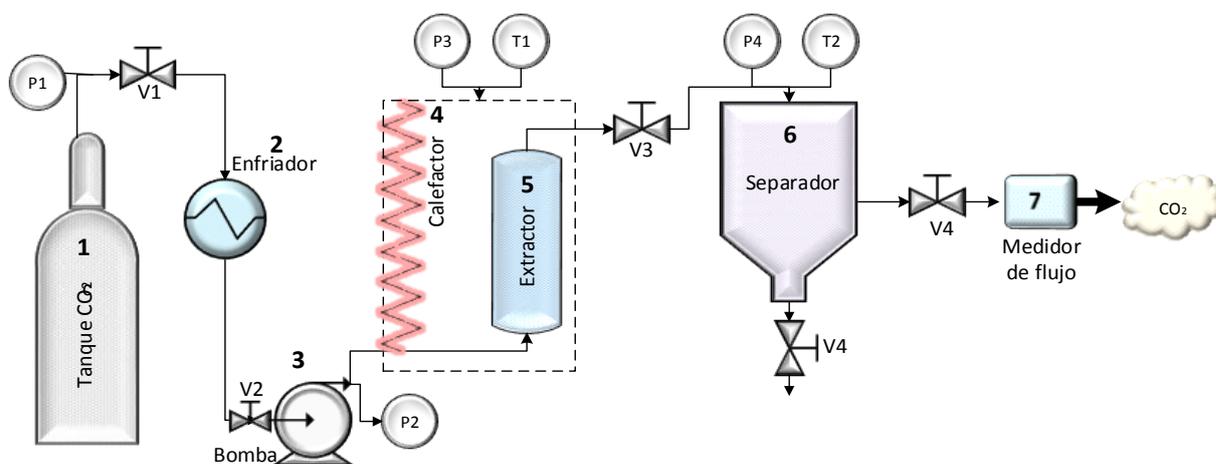


Figura 8. Diagrama del equipo de extracción de fluidos supercríticos. P, Manómetros; V, válvulas. Fuente: Basado en el equipo de FSC del Laboratorio de Alimentos de la UTPL. Elaboración: La autora.

3.2.4. Determinación de fenoles totales.

Para la determinación de fenoles totales se aplicó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Thaipong, K. *et al.*⁵², se midió la absorbancia mediante Espectrofotómetro UV-visible (Jenway®) y se empleó una curva de calibración de ácido gálico de 0 a 100 mg/L.

En un vial se mezclaron 150 µL de extracto diluido en metanol, 2400 µL de agua y 150 µL de Folin-Ciocalteu 0.25 N, se agitó durante 5 minutos en vortex y se dejó reposar en la oscuridad por 3 minutos para su reacción, luego se agregaron 300 µL de carbonato de sodio 1 N y durante 2 horas reposó en la oscuridad. Las absorbancias fueron leídas a 725 nm y los valores fueron reemplazados en la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración. Los

resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por cada gramo de extracto seco (mg EAG/g ES). En el Anexo D se muestra el proceso mencionado.

3.2.5. Determinación de capacidad antioxidante.

Los extractos se diluyeron en metanol hasta una concentración de 1 000 ppm (p/v) para determinación con ABTS, y 10 000 ppm (p/v) para determinación con DPPH; se sonicaron en el ultrasonido (Fisher Scientific Mod. FS 20D) hasta su completa disolución.

3.2.5.1. Determinación con ABTS.

Se siguió el método descrito por Arnao, M. *et al.*⁵³ con ajustes descritos por Thaipong, K. *et al.*⁵², se preparó una solución patrón (SP) que es la mezcla de 7.4 mM de ABTS y 2.6 mM de persulfato de potasio que reaccionan durante 12 horas. Después, se preparó la solución de trabajo (ST) que consiste en la mezcla de 1 mL de SP y 60 mL de metanol aproximadamente hasta obtener 1.1 ± 0.02 de absorbancia a longitud de onda de 734 nm. Para analizar los extractos, se mezclaron 150 μ L de la muestra diluida con 2850 μ L de ST, se dejó reposar por 2 horas y se leyó la absorbancia a longitud de onda de 734 nm. Los valores fueron reemplazados en la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración de 0 a 800 μ M de Trolox. Los resultados se expresaran en micromoles equivalentes de Trolox (ET) por gramo de extracto seco (μ M ET/g ES). En el Anexo E se presenta este procedimiento.

3.2.5.2. Determinación con DPPH.

La técnica se basó en la descrita por Brand-Williams *et al.*⁴⁸, con algunas modificaciones descritas por Thaipong, K. *et al.*⁵², se preparó la solución patrón (SP), disolviendo 12 mg de DPPH en 50 mL de metanol y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Luego, se preparó la solución de trabajo (ST) mezclando 10 mL de SP y 45 mL de metanol hasta obtener 1.1 ± 0.02 de absorbancia medidos a longitud de onda de 515 nm.

Para el análisis, se mezclaron 150 μ L de la muestra diluida con 2850 μ L de ST y se dejó reposar por 24 horas en la oscuridad, finalmente se leyó la absorbancia a longitud de onda de 515 nm. Los valores fueron reemplazados en la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración de 0 a 800 μ M de Trolox. Los resultados se expresaran en micromoles equivalentes de Trolox (ET) por gramo de extracto seco (μ M ET/g ES). En el Anexo F, se exhibe la metodología mencionada.

3.2.6. Análisis estadístico.

La experimentación se realizó siguiendo un diseño factorial multinivel de 3x3 con una repetición y dos puntos centrales, en total fueron 20 ensayos. Se evaluó el posible efecto de temperatura y presión del CO₂ sobre rendimiento de extracción, fenoles totales y capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS. Los parámetros de estudio se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de estudio para pruebas de extracción supercrítica.

Temperatura °C	Presión Bar	Densidad CO₂ g/cm³
35	100	0.7108
35	150	0.8153
35	200	0.8663
40	100	0.6226
40	150	0.7801
40	200	0.8402
45	100	0.4966
45	150	0.7412
45	200	0.8129

Fuente: La experimentación.

Elaboración: La autora.

La influencia de cada parámetro se evaluó mediante un análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia de 0.05. El análisis estadístico se realizó con el software estadístico Stathgraphics v.16®.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de subproducto.

El subproducto obtenido, cáscara de chirimoya, resultó de la separación del fruto. En la Figura 9.c. se muestra la cáscara de chirimoya en su forma final con tamaño de partícula inferior a 250 μm .

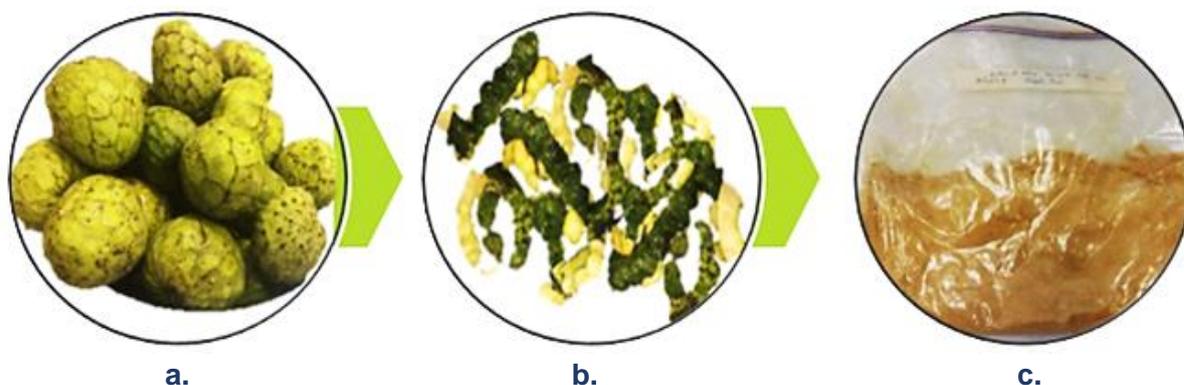


Figura 9. a. Fruto de chirimoya; b. Cáscara de chirimoya; c. Cáscara en polvo.

Fuente: La experimentación.

Elaboración: La autora.

En la Tabla 7 se presentan los rendimientos de la cáscara deshidratada mediante estufa. El 25.45% representa el rendimiento del subproducto fresco respecto al fruto fresco, el 6.5% corresponde al subproducto deshidratado respecto al fruto fresco, el contenido de humedad del subproducto fresco fue de 74.47%; y luego de la deshidratación, la humedad final fue 6.5%.

Tabla 7. Rendimiento y contenido de humedad de la cáscara fresca y deshidratada.

Descripción	Cantidad (%)
Cáscara fresca	25.45
Cáscara deshidratad	6.499
Humedad en fresco	74.47
Humedad en seco	6.50

Fuente: La experimentación.

Elaboración: La autora.

3.2. Obtención de extractos de cáscara de chirimoya.

Los extractos obtenidos mediante la técnica de EFSC presentaron una coloración amarillenta, olor cítrico característico de la chirimoya y consistencia grumosa y pegajosa debido a que los componentes extraíbles con $\text{CO}_2\text{-SC}$ son principalmente lipofílicos⁶, en la Figura 10.a. se

muestra el extracto recogido en el separador. Por otro lado, los extractos obtenidos mediante la técnica de maceración dinámica, se presentaron de color amarillento, olor a solvente orgánico (Hexano) y de consistencia sólida, en la Figura 10.b. se observa el extracto luego de la evaporación. Cabe indicar, que los extractos supercríticos están visiblemente libres de solventes, a diferencia de los extractos por maceración que poseen trazas de solvente y necesitarían una etapa posterior para su eliminación, además el extracto supercrítico posee antioxidantes naturales que no alteran el aroma, sabor o color de los productos alimenticios⁵⁴, haciéndolo de interés para la industria.

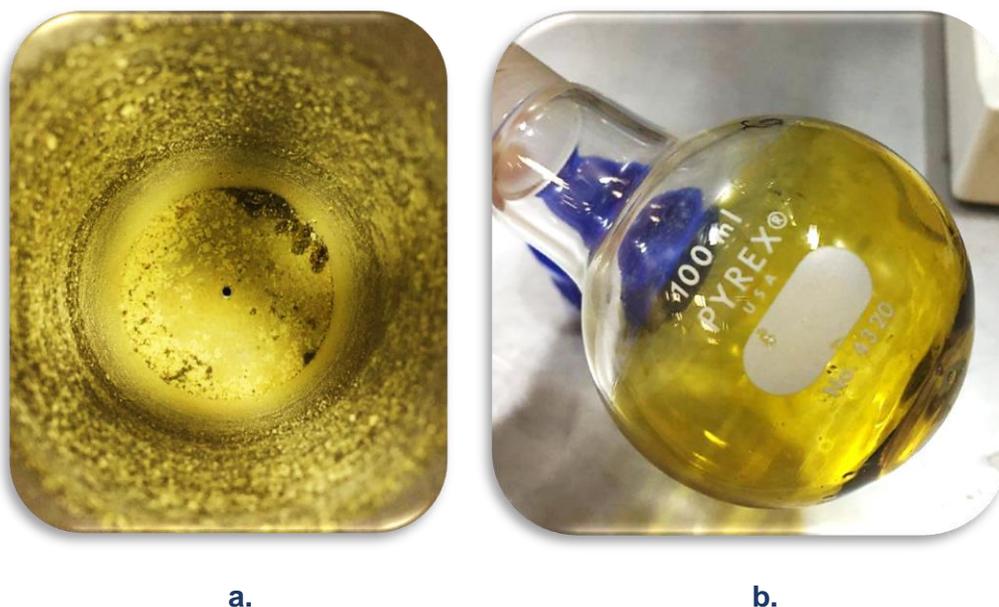


Figura 10. Extractos de cáscara de chirimoya. **a.** Extracto en separador del equipo de FSC; **b.** Extracto en balón luego de evaporación con hexano.
Fuente: La experimentación.
Elaboración: La autora.

3.2.1. Rendimiento de extracción.

Los valores de rendimiento de extracción supercrítica estuvieron comprendidos entre 0.78% a 1.91%, y el rendimiento de extracción por maceración dinámica fue de 2.32% como se muestra en la Figura 11. La extracción tradicional, obtuvo rendimiento similar a la EFSC, sin embargo, la extracción supercrítica fue de corta duración y el extracto obtenido está libre de solventes, ventajas de ésta extracción.⁵⁴

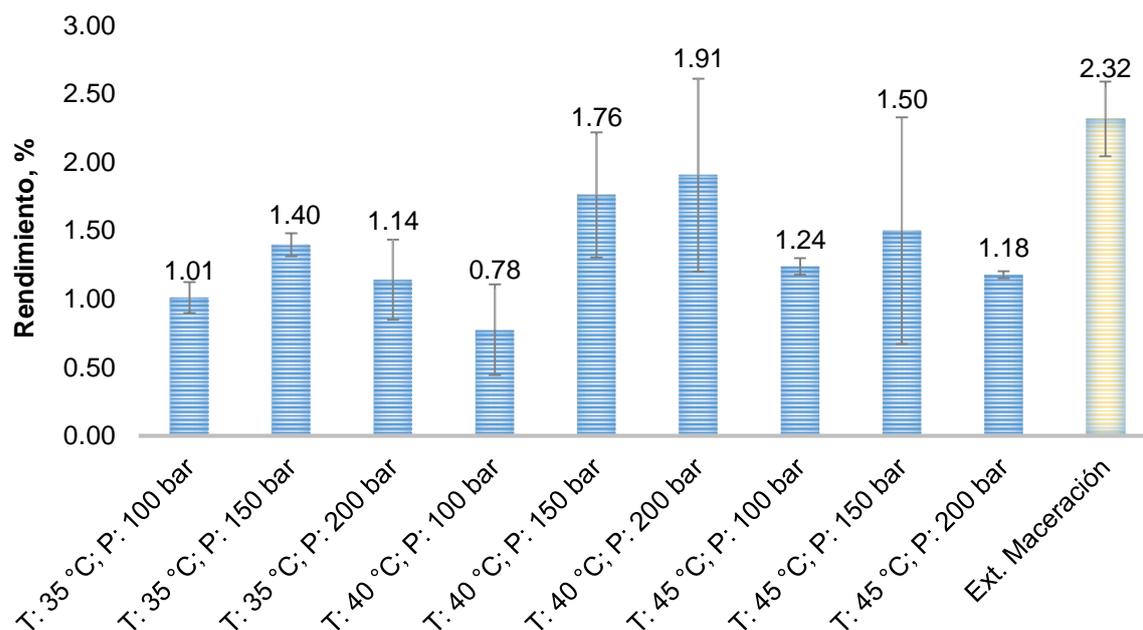


Figura 11. Rendimientos de extracción de cáscara de chirimoya.

Fuente: La experimentación.

Elaboración: La autora.

El ANOVA (Anexo G) mostró que ninguno de los factores estudiados en las condiciones probadas tuvo efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el rendimiento de extracción. Sin embargo, en la Figura 12, se observa que en las curvas de rendimiento en función de temperatura para cada presión existe un punto de quiebre a temperatura de 40 °C, aquí se evidencia que a temperaturas inferiores (35 °C) y superiores (45 °C) cambia la solubilidad de los compuestos, a 35-40 °C el aumento de presión disminuye el rendimiento, luego a 40-45 °C la disminución de presión aumenta el rendimiento. La razón de dicho efecto, posiblemente se debe a que no se trata de un solo compuesto extraído, sino de una mezcla de compuestos solubles en $\text{CO}_2\text{-SC}$.⁵⁴ El poder disolvente del $\text{CO}_2\text{-SC}$, está influenciado por sus propiedades de transporte como viscosidad y difusión⁵⁵, las mismas que están ligadas con la influencia de la temperatura y presión. Por lo cual, según la naturaleza del compuesto, la solubilidad aumenta o disminuye, según las condiciones de operación y se alteran en presencia de mezclas complejas de compuestos, como es el caso de extractos naturales.

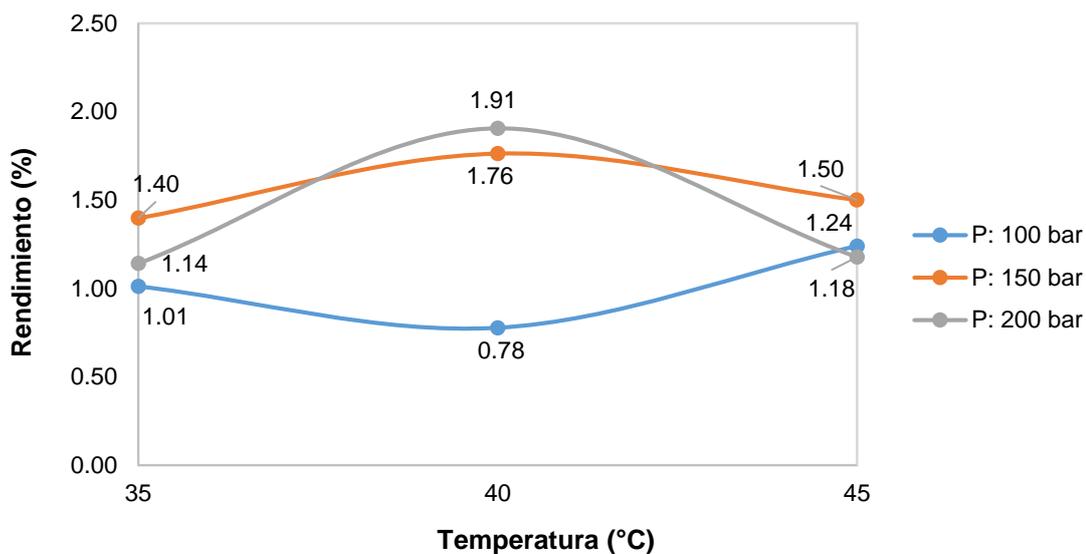


Figura 12. Rendimientos de extracción frente a Temperatura y Presión.
 Fuente: La experimentación.
 Elaboración: La autora.

Si de la figura anterior se extraen los puntos a 40 °C y diferentes presiones (Figura 13), se observa el efecto de presión a temperatura constante (40 °C), donde el incremento de presión significa un aumento en el rendimiento, debido a que si la presión aumenta a temperatura constante, aumenta la densidad y se mejora la capacidad de extracción con CO₂-SC.⁵⁴⁻⁵⁷ Además, en la Figura 13 se observa que la curva tiende a ser constante a los 200 bares, por lo cual, un incremento de presión no va a variar significativamente el rendimiento

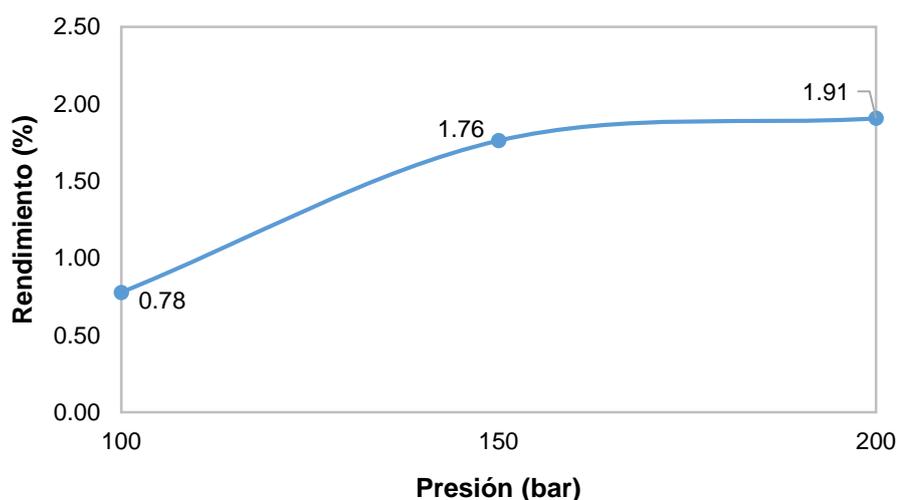


Figura 13. Efecto de presión a temperatura constante frente a rendimiento.
 Fuente: La experimentación.
 Elaboración: La autora.

3.2.2. Cuantificación de fenoles totales.

La concentración de fenoles totales en la cáscara de *A. cherimola*, se presenta en la Figura 14. El contenido de fenoles totales se encontró en un rango de 2.86 a 8.91 mg EAG/g ES. El ANOVA (Anexo G) mostró que los factores de estudio no poseen efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la concentración de fenoles, sin embargo, la extracción supercrítica a condiciones de 40 °C de temperatura y 100 bares de presión, dio un valor estadísticamente iguales al obtenido con la extracción tradicional de 7.47 mg EAG/g ES.

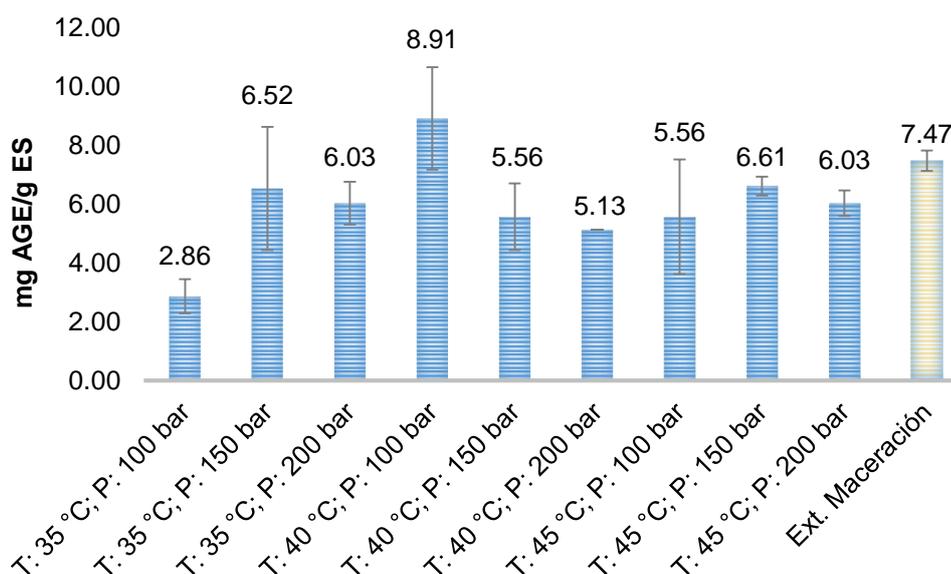


Figura 14. Concentración de fenoles totales en extracto de cáscara de chirimoya.

Fuente: La experimentación. Anexo D.

Elaboración: La autora.

Debido a que no se han reportado estudios de extracción supercrítica de compuestos de subproductos de chirimoya, se realizó la comparación con resultados de extracciones tradicionales. En la Tabla 8, se exhiben las concentraciones de fenoles totales obtenidos en mg EAG/100 g MBH, las mismas que son inferiores a las reportadas por Albuquerque *et al.* (entre 17.0 ± 0.12 a 19.6 ± 0.15 mg EAG/100 g M)⁶, y Loizzo *et al.* (14.6 ± 1.1 mg EAC/100 g M)⁷; ésta diferencia se debe a que los autores realizaron sus estudios con la fracción hidrofílica, mientras que en el presente trabajo se analizó la lipofílica debido a que el CO₂-SC extrae compuestos apolares.⁵⁴ Cabe indicar que en el presente estudio, es evaluado el extracto final para su posible aplicación en la industria, razón por la cual la concentración de fenoles se expresa por la cantidad de extracto seco.

Tabla 8. Concentración de fenoles totales.

Experimento	mg EAG/g ES	mg EAG/100g MBH
T: 35 °C; P: 100 bar	2.86	0.7026
T: 35 °C; P: 150 bar	6.52	2.2134
T: 35 °C; P: 200 bar	6.03	1.6705
T: 40 °C; P: 100 bar	8.91	1.6802
T: 40 °C; P: 150 bar	5.56	2.3808
T: 40 °C; P: 200 bar	5.13	2.3739
T: 45 °C; P: 100 bar	5.56	1.6748
T: 45 °C; P: 150 bar	6.61	2.4084
T: 45 °C; P: 200 bar	4.95	1.4173

Fuente: La experimentación.
Elaboración: La autora.

Los extractos obtenidos poseen un contenido fenólico importante, pese a las posibles interferencias en la extracción. No se puede elegir la mejor condición de extracción, sin embargo el valor promedio más alto fue a 40 °C de temperatura y a 100 bares de presión, con una concentración fenólica de 8.91 mg EAG/g ES. A estas condiciones, la densidad es baja por lo cual disminuye la solubilidad^{56,57}, sin embargo, la alta solubilidad no está relacionada con la calidad del extracto, ya que al ser mayor también se extraen otros compuestos contenidos en la cáscara de chirimoya solubles en CO₂-SC.^{6,54}

3.2.3. Actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante por el método ABTS de los extractos supercríticos se encuentran en el rango de 74.02 a 188.5 µM ET/g ES; mientras que el extracto por maceración dinámica resultó inferior y estadísticamente diferente con un valor de 78.8 µM ET/g ES, como se muestra en la Figura 15.

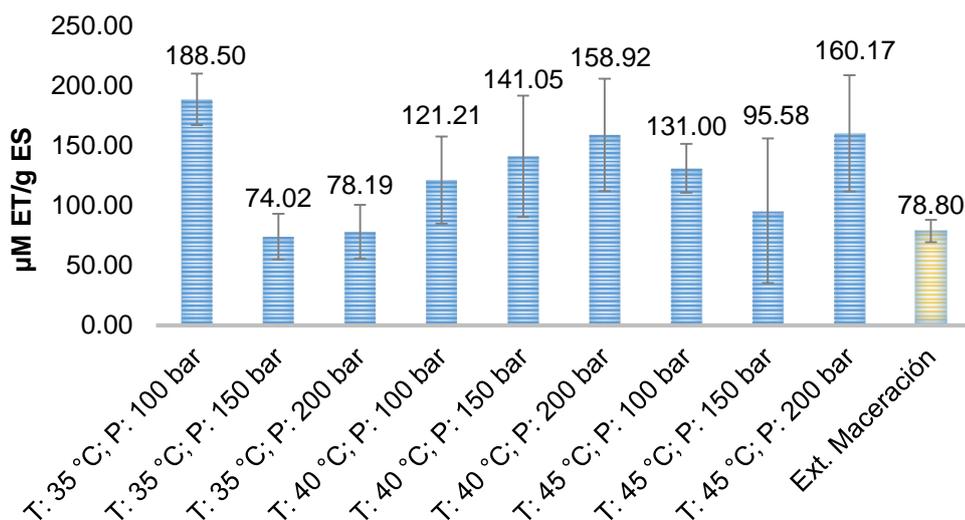


Figura 15. Capacidad antioxidante por ABTS de extractos de cáscara de chirimoya
Fuente: La experimentación. Anexo E.
Elaboración: La autora.

La concentración de actividad antioxidante por el método de DPPH de los extractos supercríticos está en el rango de 4.17 a 42.47 µM ET/g ES; mientras que la concentración del extracto por maceración dinámica posee 47.49 µM ET/g ES, como se muestra en la Figura 16. En el Anexo F se presentan los valores obtenidos.

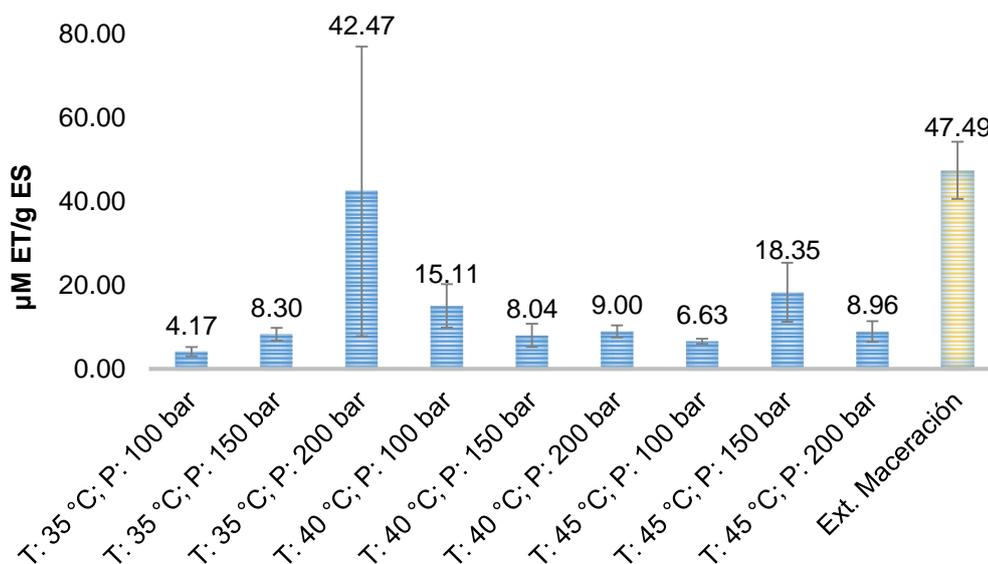


Figura 16. Capacidad antioxidante por DPPH de extractos de cáscara de chirimoya.
Fuente: La experimentación. Anexo F.
Elaboración: La autora.

Debido a que los valores medios de concentración de actividad antioxidante presentaron coeficientes de variación importantes, no se puede definir la mejor condición de extracción, además, el ANOVA mostró que los factores estudiados no tuvieron efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la capacidad antioxidante. Sin embargo, se establece que los valores obtenidos de extractos por maceración dinámica son inferiores o muy cercanos a los extractos supercríticos, por lo cual la EFSC mejora la selectividad para extraer compuestos de interés.

Los resultados de capacidad antioxidante, exhiben que la temperatura óptima de extracción es a 35 °C, mientras que la presión para ABTS y DPPH es a 100 y 200 bares, respectivamente. Esto se debe a que la solubilidad de los compuestos está en función a las condiciones de operación^{57,58}; sería necesario realizar un análisis químico para conocer el tipo de compuestos presentes y así, posiblemente, efectuar una separación fraccionada con incremento de presión, ya que sería un proceso de precipitación selectiva de diferentes familias de compuestos¹² y los extractos supercríticos poseerán mayor actividad antioxidante.

CONCLUSIONES

- Fue posible aplicar tecnología de extracción con fluidos supercríticos para obtener extractos con capacidad antioxidante a partir de la cáscara de chirimoya, utilizando CO₂-SC como medio de extracción.
- El rendimiento de extracción más alto fue 1.91% (peso extracto/peso de cáscara) a condiciones del CO₂-SC de 40 °C de temperatura y 200 bares de presión.
- El contenido de fenoles totales más alto fue 8.91 mg EAG/g ES a 40 °C de temperatura y 100 bares de presión.
- Las medidas de actividad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH fueron 188.5 μM ET/g ES y 42.47 μM ET/g ES, respectivamente. La mejor temperatura de extracción fue a 35 °C en ambos casos, mientras que el efecto de presión fue diferente, a 100 bares alta capacidad antioxidante por ABTS y a 200 bares alta actividad antioxidante por DPPH.
- La solubilidad de los compuestos en CO₂-SC se modificó al variar los parámetros de presión y temperatura ya que la densidad del solvente cambia. No hubo relación en el efecto de los parámetros de estudio con la solubilidad de los compuestos.

RECOMENDACIONES

- Realizar análisis cromatográfico HPLC para conocer la composición y pureza de los extractos.
- Establecer un buen sistema de aprovisionamiento de materias primas y de su conservación.
- Prolongar el estudio de chirimoya para la incorporación de compuestos bioactivos en la industria.
- Identificar productos a los cuales se pueda agregar el extracto, como ingrediente bioactivo, para generar valor añadido.
- Realizar un análisis económico del proceso de extracción supercrítica para evaluar la factibilidad a mayor escala.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Morales, Á.; Cueva, B.; Aquino, P. *J. Ecol. Appl.* **2004**, 7 (2), 159–170.
- (2) Guerrero, M. I. Estudio de factibilidad para la producción, y comercialización de chirimoya (*Annona cherimola*, Mill), Ecotipo T61Tumbaco - Pichincha, Universidad San Francisco de Quito, 2012.
- (3) MAGAP. III Censo agropecuario 2000, Ministerio Agricultura y Ganadería (MAG) www.magap.gob.ec (accessed Jul 6, 2015).
- (4) Andino, F. Determinación de la eficiencia de cuatro niveles de flores polinizadas, utilizando dos métodos de polinización manual, en chirimoya (*Annona cherimola* Mill), Guachapala-Azuay-Ecuador, Universidad de Cuenca, 2014.
- (5) Melo, E. D. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G. De; Nascimento, R. J. Do. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **2008**, 44 (2), 193–201.
- (6) Albuquerque, T. G.; Santos, F.; Sanches-Silva, A.; Beatriz Oliveira, M.; Bento, A. C.; Costa, H. S. *Food Chem.* **2014**, 193, 187–195.
- (7) Loizzo, M. R.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Menichini, F.; Mastellone, V.; Avallone, L.; Menichini, F. *J. Food Compos. Anal.* **2012**, 25 (2), 179–184.
- (8) Gupta-Elera, G.; Garrett, A. R.; Martinez, A.; Robison, R. A.; O'Neill, K. L. *Food Res. Int.* **2011**, 44 (7), 2205–2209.
- (9) Niki, E.; Yoshida, Y.; Saito, Y.; Noguchi, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338 (1), 668–676.
- (10) Vasconcelos, S.; Silva, M.; Goulart, M. *Nutr. Rev. da Soc. Bras. Aliment. e Nutr.* **2006**, 31 (3), 95–118.
- (11) Meneses, M. A.; Caputo, G.; Scognamiglio, M.; Reverchon, E.; Adami, R. *J. Food Eng.* **2015**, 163, 45–53.
- (12) Reverchon, E.; De Marco, I. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, 38 (2), 146–166.
- (13) González, M.; González, V. *Anal. Methods* **2010**, 2 (12), 1842–1866.
- (14) Martínez, J. L. *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*; CRC Press, 2008.
- (15) Amoo, I. A.; Emenike, A. E.; Akpambang, V. O. E. *Acad. Journals Inc.* **2008**, 3(2), 216–220.
- (16) Chen, C. Y.; Chang, F. R.; Chiu, H. F.; Wu, M. J.; Wu, Y. C. *Phytochemistry* **1999**, 51 (3), 429–433.

- (17) Bonavia, D.; Ochoa, C. M.; Tovar, Ó.; Palomino, R. C. *Econ. Bot.* **2004**, *58* (4), 509–522.
- (18) Barreca, D.; Laganà, G.; Ficarra, S.; Tellone, E.; Leuzzi, U.; Galtieri, A.; Bellocco, E. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2302–2310.
- (19) Castro, J. *Cultivo de la anona (Annona cherimola, Mill)*; San José, 2007; p 42.
- (20) Vega, E. M. *Cultiv. Trop.* **2013**, *34*, 52–63.
- (21) INIAP. INIAP entregará a productores nueva variedad de chirimoya <http://www.agricultura.gob.ec/iniap-entregara-a-productores-nueva-variedad-de-chirimoya/>.
- (22) Moreiras, O.; Carbajal, Á.; Cabrera, L.; Cuadrado, C. *Tablas de composición de alimentos*, 16° ed.; Pirámide, E., Ed.; España, 2013.
- (23) Sanewski, G. *Queensl. Dep. Prim. Ind.* **1991**, *62*, 103.
- (24) Van Damme, P.; Scheldeman, X. *Unasyva* **1999**, *50*, 43–47.
- (25) Branco, P. C.; Dionísio, a. M.; Torrado, I.; Carvalheiro, F.; Castilho, P. C.; Duarte, L. C. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *104*, 2–9.
- (26) Conde, E. Revalorización de residuos Agroindustriales y forestales para la Obtención de antioxidantes naturales Con aplicaciones en la industria Alimentaria, cosmética y/o farmacéutica, Universidad de Vigo, 2009.
- (27) Richardson, J. F.; Harker, J. H.; Backhurst, J. . *Chem. Eng. Sci.* **1991**, *2*, 1183.
- (28) Reverchon, E.; De Marco, I. *Chem. Eng. J.* **2011**, *169* (1-3), 358–370.
- (29) Mendiola, J. A. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos, Universidad Autónoma de Madrid, 2008.
- (30) Valverde, A. *J. AOAC* **2002**, *78*, 141–154.
- (31) Luque de Castro, M.; Valcárcel, M.; Tena, M. *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*, 1st ed.; Editorial Reverté SA., Ed.; Barcelona, 1993.
- (32) Cavalcanti, R. N.; Meireles, M. A. A. In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*; Elsevier, 2012; Vol. 2, pp 117–133.
- (33) De Melo, M. M. R.; Silvestre, A. J. D.; Silva, C. M. *J. Supercrit. Fluids*, *92*, 115-176. **2014**, *92*, 115–176.
- (34) Mukhopadhyay, M. *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*, CRC press.; 2000.
- (35) Meneses, M. Supercritical Antisolvent Extraction of Bioactive Compounds from Mango by-Products, Universita Degli Studi di Salerno, 2014.

- (36) 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 (02), 251–258.
- (37) Saldaña, M. D. A.; Mohamed, R. S.; Mazzafera, P. *Fluid Phase Equilib.* **2002**, 194-197, 885–894.
- (38) Pereira, C. G.; Meireles, M. A. A. *J. Food Process Eng.* **2007**, 30, 150–173.
- (39) Pereira, C. G. Obtenção de extratos de leiteira de dois irmãos (Tabernaemontana catharinensis A. DC.), cidrão (Aloysia triphylla L'Herit. Britton) e manga (Mangifera indica L.) por extração supercrítica: Estudo dos parâmetros de processo, caracterização e atividade antio, State University of Campinas, 2005.
- (40) Corrêa, N. C. F.; Meireles, M. A. A.; França, L. F.; Araújo, M. E. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **1994**, 14, 29–37.
- (41) Meireles, A. In *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*; 2008; pp 243–274.
- (42) Rodríguez, J. M.; Menéndez, J. R.; López, Y. T. *Rev. Cuba. Med. Mil.* **2001**, 30 (1), 36–44.
- (43) García-Aguirre, K. K.; Zepeda-Vallejo, L. G.; Ramón-Gallegos, E.; Álvarez-González, I.; Madrigal-Bujaidar, E. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, 31 (12), 2346–2349.
- (44) Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **2005**, 25 (4), 726–732.
- (45) Montoya, B.; Lemeshko, V.; López, J.; Pareja, A.; Urrego, R.; Torres, R. *Vitae* **2003**, 10 (2), 72–79.
- (46) Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (10), 4290–4302.
- (47) Tovar del Rio, J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera, Universidad Tecnológica de Pereira, 2013, p 150.
- (48) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. *LWT-Food Sci. Technol.* **1995**, 28 (1), 25–30.
- (49) National Center for Biotechnology Information. PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>.
- (50) Cabral de Oliveira, A., Barros Valentim, I., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Paes de Barros M., et al. *Food Chem.* **2009**, 2 (115), 469–475.
- (51) Díaz-Reinoso, B.; Moure, A.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. In *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*; 2008; pp 275–304.
- (52) Thaipong, K., Boonprakoba, U., Crosby, K., Cisneros, L., & Hawkins, D. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, 19 (6), 669–675.

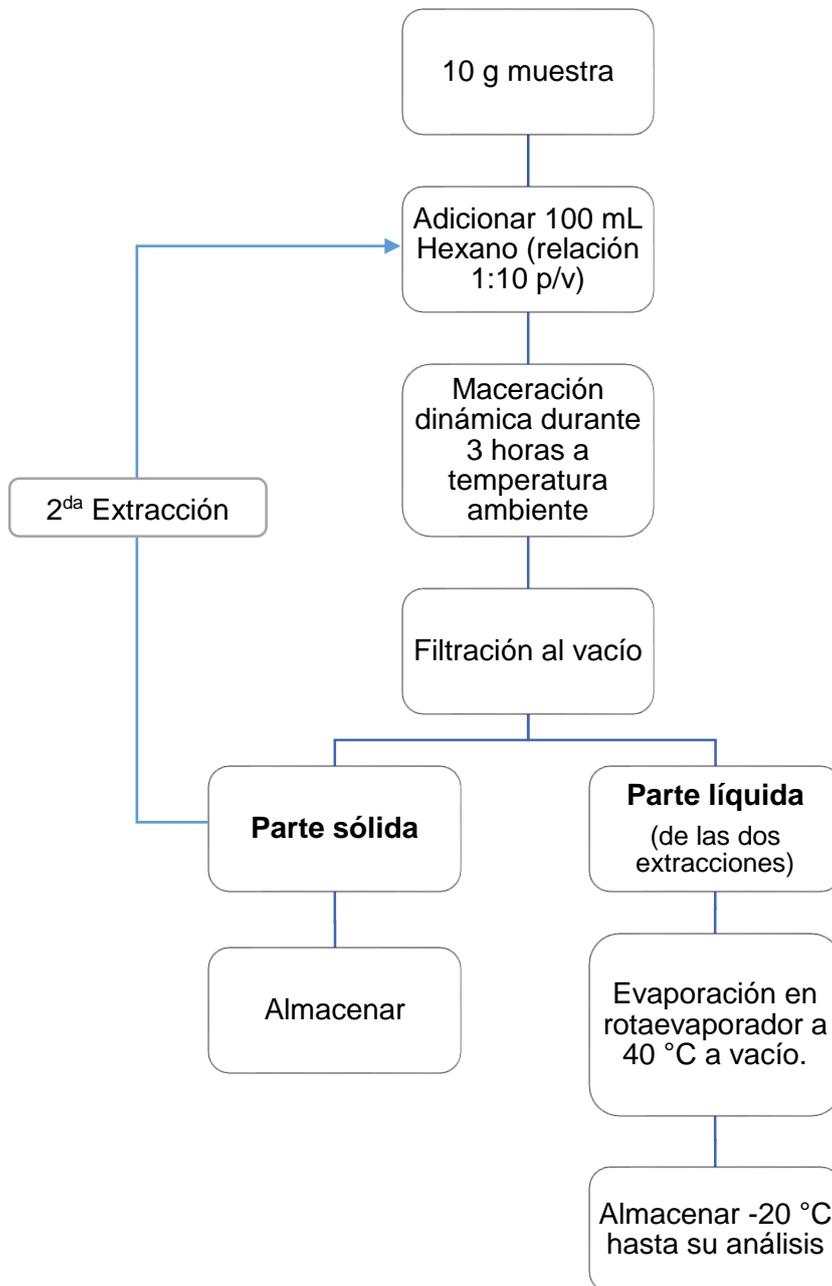
- (53) Arnao, M., Cano, A., & Acosta, M. *Food Chem.* **2001**, 73 (2), 239–244.
- (54) Raventos, M.; Duarte, S.; Alarcon, R. *Food Sci. Technol. Int.* **2002**, 8, 269–284.
- (55) Mendes, R. L.; Nobre, B. P.; Cardoso, M. T.; Pereira, A. P.; Palavra, A. F. *Inorganica Chim. Acta* **2003**, 356, 328–334.
- (56) Del Valle, J. M.; Aguilera, J. M. *Food Sci. Technol. Int.* **1999**, 5, 1–24.
- (57) Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibañez, E. *Food Chem.* **2006**, 98, 136–148.
- (58) Cadoni, E.; Rita De Giorgi, M.; Medda, E.; Poma, G. *Dye. Pigment.* **2000**, 44, 27–32.

ANEXOS

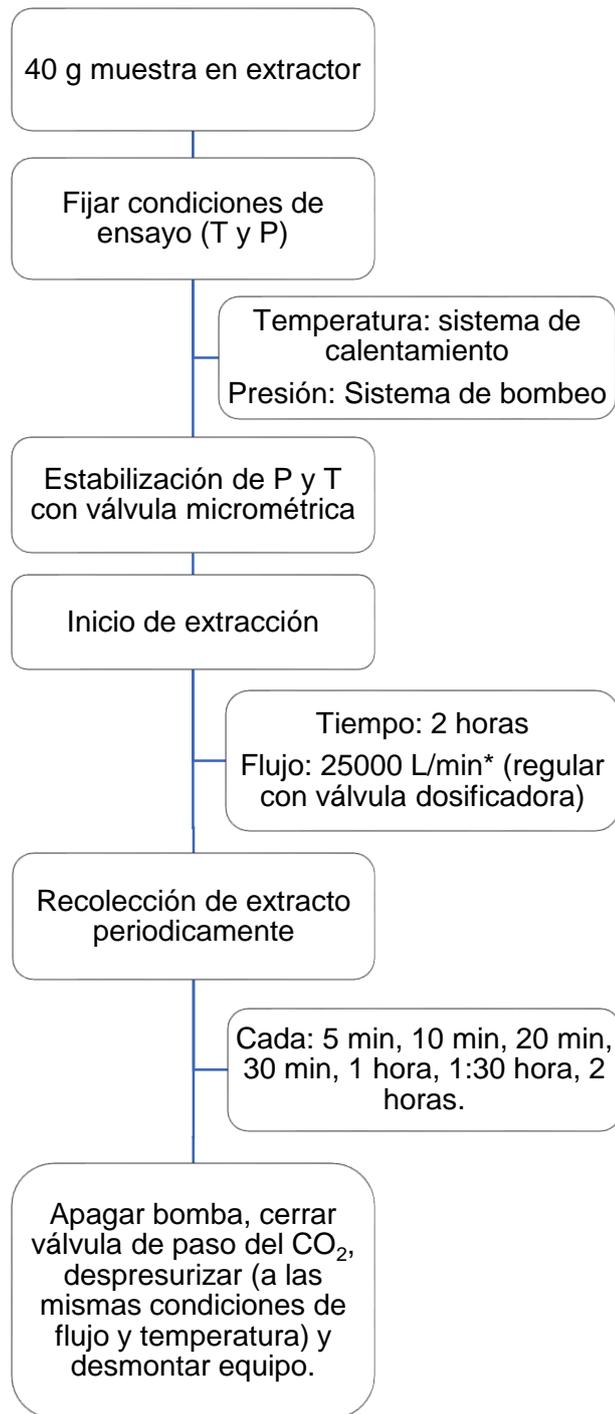
Anexo A. Obtención de subproducto de chirimoya



Anexo B. Esquema de extracción mediante maceración dinámica



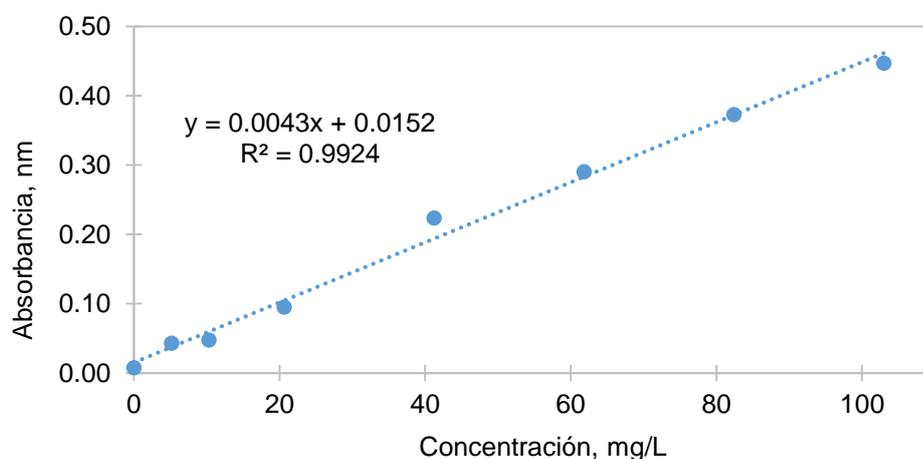
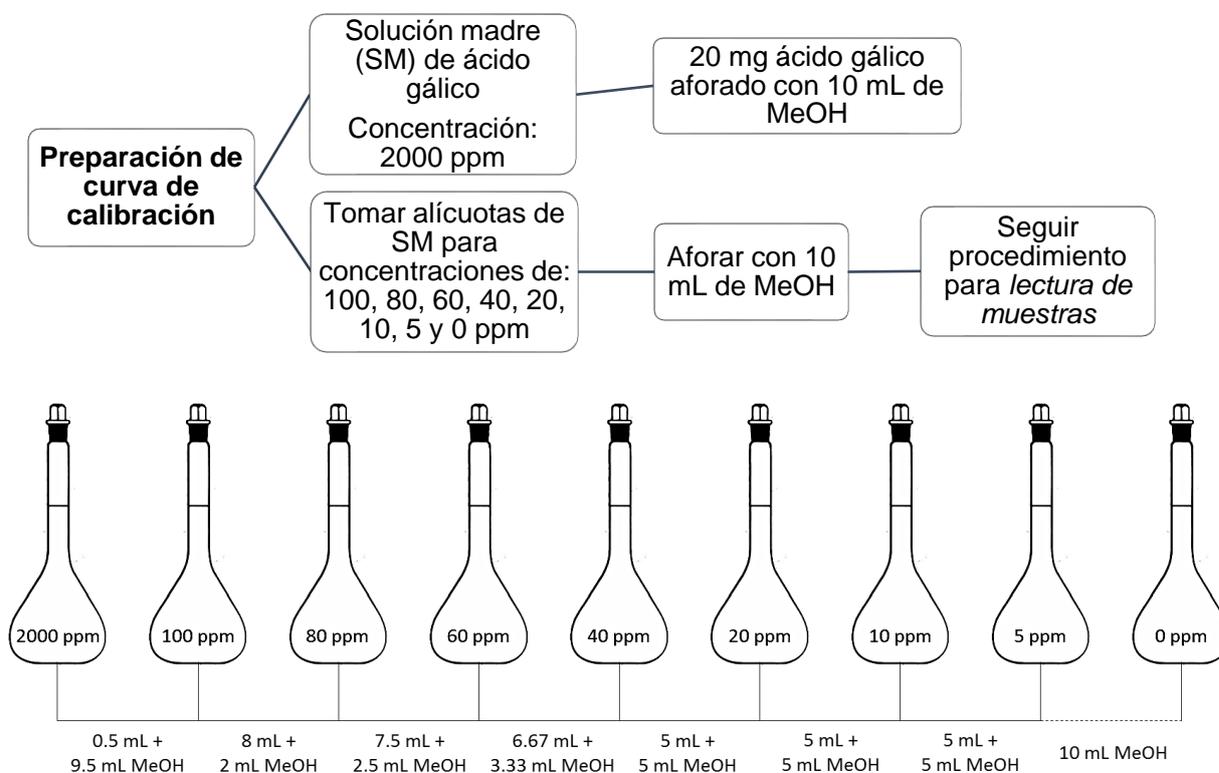
Anexo C. Esquema de extracción mediante FSC.



* Condiciones ambientales.

Anexo D. Cuantificación de fenoles totales. Método Folin-Ciocalteu.

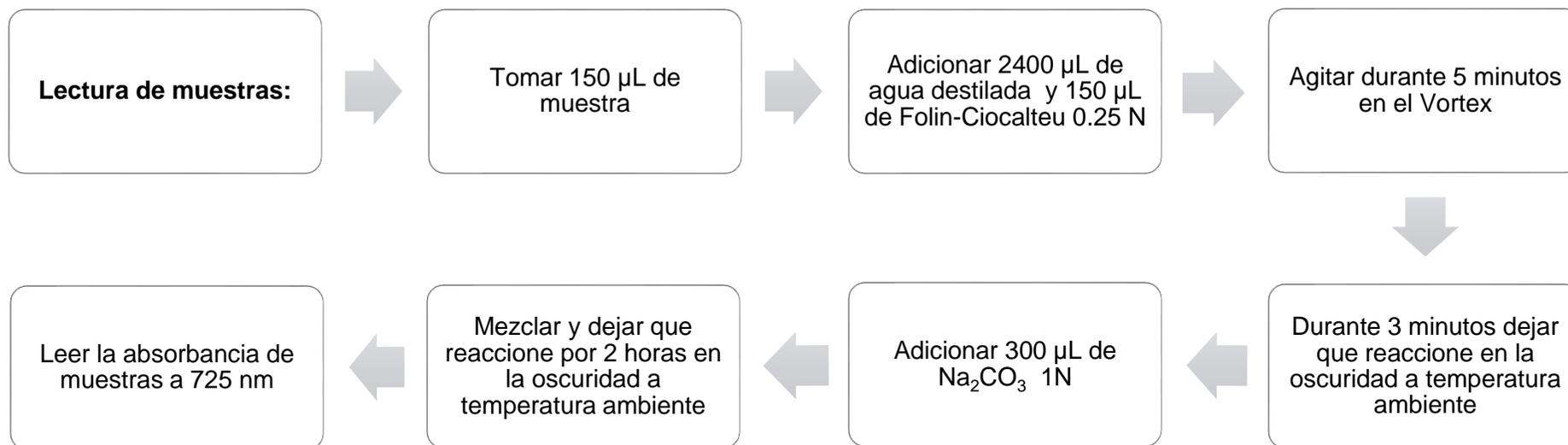
1. Preparación de curva de calibración



Concentración, ppm	Abs. 1, nm	Abs. 2, nm	Abs. 3, nm	Abs prom, nm
103	0.447	0.447	0.447	0.447
82	0.373	0.373	0.373	0.373
62	0.291	0.290	0.291	0.291
41	0.223	0.224	0.224	0.224
21	0.094	0.096	0.095	0.095
10	0.048	0.047	0.048	0.048
5	0.042	0.044	0.043	0.043
0	0.007	0.008	0.008	0.008

Pendiente= 0.0043
 Intersección= 0.0152
 $R^2 = 0.9924$

2. Lectura de muestras



Nota: Las absorbancias obtenidas se reemplazan en la ecuación de regresión lineal resultante de la curva de calibración para determinar la concentración.

3. Datos de cuantificación de fenoles totales.

3.1. Extractos por maceración dinámica con hexano

Muestra	Abs. 1, nm	Abs. 2, nm	Abs. 3, nm	Abs prom, nm	X, mg EAG/L	C, L/g ES	x, mg EAG/g ES	x prom, mg EAG/g ES
M1	0.346	0.345	0.344	0.345	76.698	0.092	7.075	7.470 ± 0.343
	0.347	0.349	0.347	0.348	77.318		7.133	
M1.1	0.177	0.179	0.180	0.179	38.016	0.185	7.014	
	0.184	0.185	0.186	0.185	39.488		7.286	
M2	0.328	0.326	0.326	0.327	72.434	0.110	7.969	
	0.311	0.311	0.312	0.311	68.868		7.576	
M2.1	0.167	0.170	0.170	0.169	35.767	0.220	7.870	
	0.168	0.168	0.169	0.168	35.612		7.836	

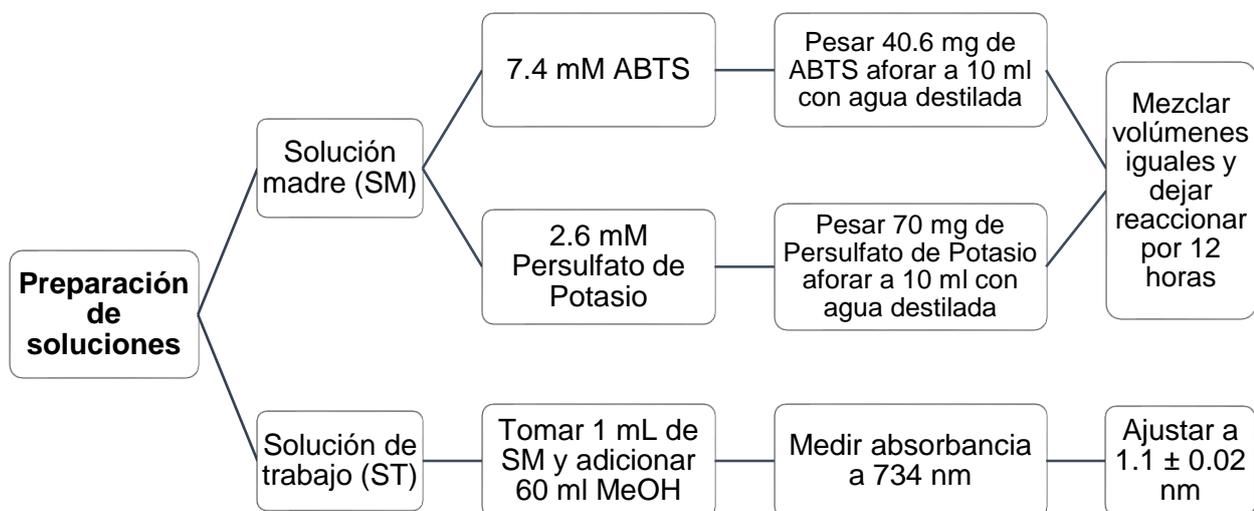
3.2. Extractos supercríticos

Extractos		Abs. 1, nm	Abs. 2, nm	Abs prom, nm	X, mg EAG/L	x, mg EAG/mg ES	x, mg EAG/g ES	x prom, mg EAG/g ES		
FC1	P: 150 bar	0.047	0.045	0.0460	7.163	0.007	7.163	8.616	±	1.45
	T: 35 °C	0.059	0.058	0.0585	10.070	0.010	10.070			
FC2	P: 150 bar	0.047	0.048	0.0475	7.512	0.008	7.512	6.930	±	0.58
	T: 45 °C	0.042	0.043	0.0425	6.349	0.006	6.349			
FC3	P: 100 bar	0.061	0.061	0.0610	10.651	0.011	10.651	10.651	±	0.00
	T: 40 °C	0.061	0.061	0.0610	10.651	0.011	10.651			
FC4	P: 100 bar	0.046	0.049	0.0475	7.512	0.008	7.512	7.512	±	0.00
	T: 45 °C	0.047	0.048	0.0475	7.512	0.008	7.512			
FC5	P: 200 bar	0.051	0.049	0.0500	8.093	0.008	8.093	6.756	±	1.34
	T: 35 °C	0.038	0.039	0.0385	5.419	0.005	5.419			
FC6	P: 150 bar	0.044	0.043	0.0435	6.581	0.007	6.581	6.930	±	0.35
	T: 40 °C	0.046	0.047	0.0465	7.279	0.007	7.279			
FC7	P: 200 bar	0.038	0.039	0.0385	5.419	0.005	5.419	5.128	±	0.29
	T: 40 °C	0.038	0.034	0.0360	4.837	0.005	4.837			
FC8	P: 150 bar	0.039	0.038	0.0385	5.419	0.005	5.419	6.465	±	1.05
	T: 40 °C	0.047	0.048	0.0475	7.512	0.008	7.512			
FC9	P: 200 bar	0.038	0.038	0.0380	5.302	0.005	5.302	5.593	±	0.291
	T: 45 °C	0.040	0.041	0.0405	5.884	0.006	5.884			
FC10	P: 100 bar	0.025	0.024	0.0245	2.163	0.002	2.163	3.442	±	1.279
	T: 35 °C	0.037	0.034	0.0355	4.721	0.005	4.721			
FC11	P: 150 bar	0.036	0.034	0.0350	4.605	0.005	4.605	4.430	±	0.174
	T: 35 °C	0.031	0.036	0.0335	4.256	0.004	4.256			
FC12	P: 150 bar	0.043	0.045	0.0440	6.698	0.007	6.698	6.291	±	0.407
	T: 45 °C	0.041	0.040	0.0405	5.884	0.006	5.884			
FC13	P: 100 bar	0.047	0.045	0.0460	7.163	0.007	7.163	7.163	±	0.000
	T: 40 °C	0.046	0.046	0.0460	7.163	0.007	7.163			

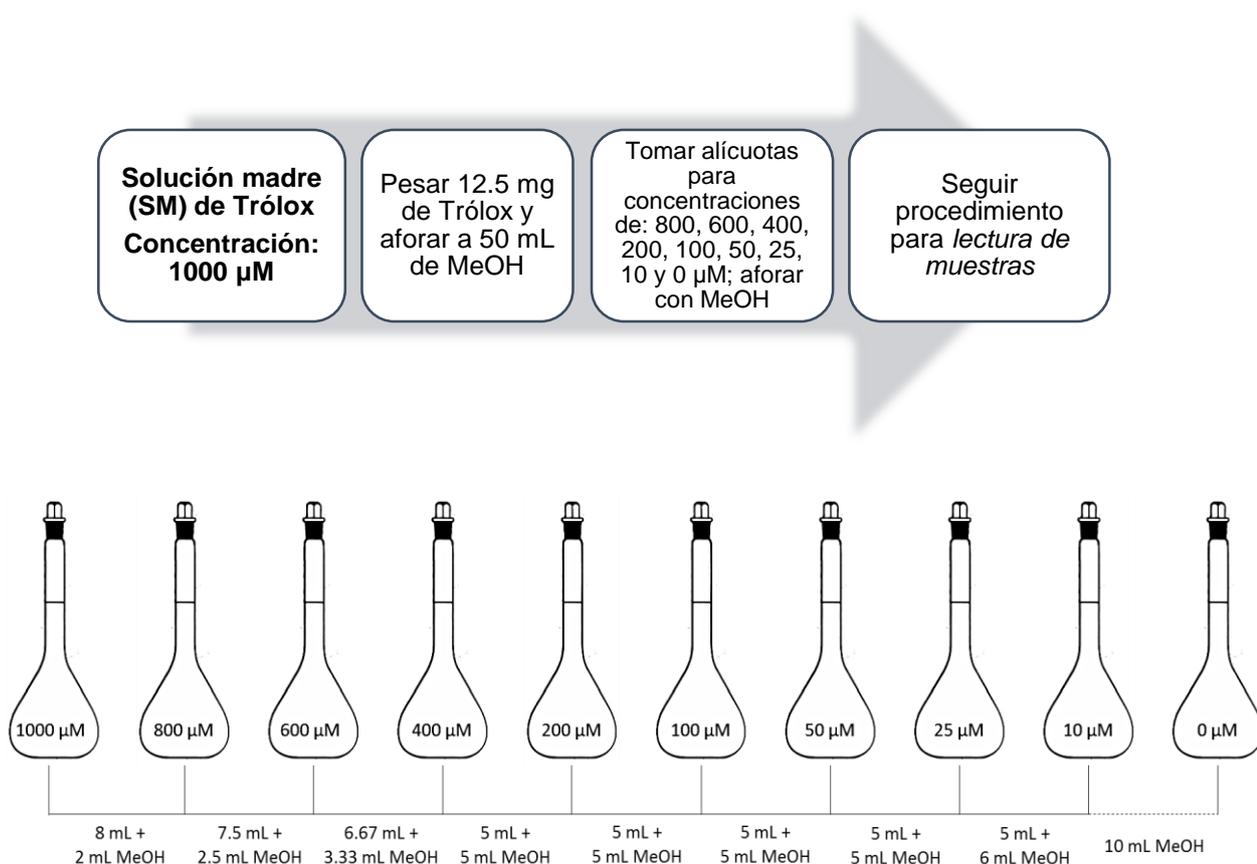
FC14	P: 100 bar	0.026	0.024	0.0250	2.279	0.002	2.279	3.616	±	1.337
	T: 45 °C	0.037	0.036	0.0365	4.953	0.005	4.953			
FC15	P: 200 bar	0.035	0.036	0.0355	4.721	0.005	4.721	5.302	±	0.581
	T: 35 °C	0.042	0.039	0.0405	5.884	0.006	5.884			
FC16	P: 150 bar	0.036	0.036	0.0360	4.837	0.005	4.837	4.721	±	0.116
	T: 40 °C	0.034	0.036	0.0350	4.605	0.005	4.605			
FC17	P: 200 bar	0.032	0.031	0.0315	3.791	0.004	3.791	5.128	±	1.337
	T: 40 °C	0.043	0.043	0.0430	6.465	0.006	6.465			
FC18	P: 150 bar	0.036	0.034	0.0350	4.605	0.005	4.605	4.140	±	0.465
	T: 40 °C	0.031	0.031	0.0310	3.674	0.004	3.674			
FC19	P: 200 bar	0.043	0.043	0.0430	6.465	0.006	6.465	6.465	±	0.000
	T: 45 °C	0.044	0.042	0.0430	6.465	0.006	6.465			
FC20	P: 100 bar	0.021	0.022	0.0215	1.465	0.001	1.465	2.279	±	0.814
	T: 35 °C	0.027	0.03	0.0285	3.093	0.003	3.093			

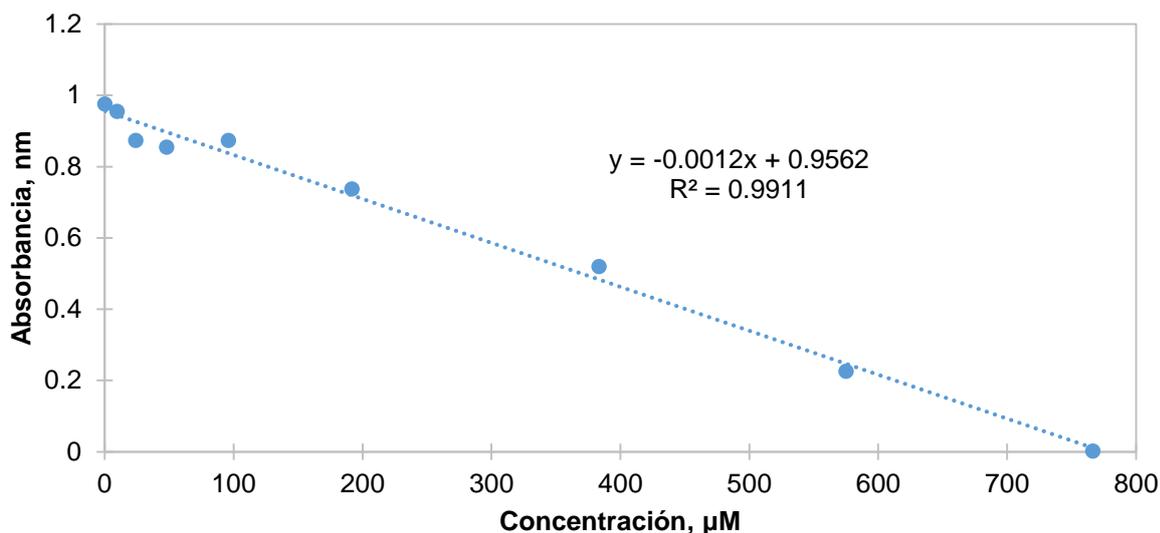
Anexo E. Cuantificación de actividad antioxidante. Método ABTS.

1. Preparación de solución madre y de trabajo



2. Preparación de curva de calibración

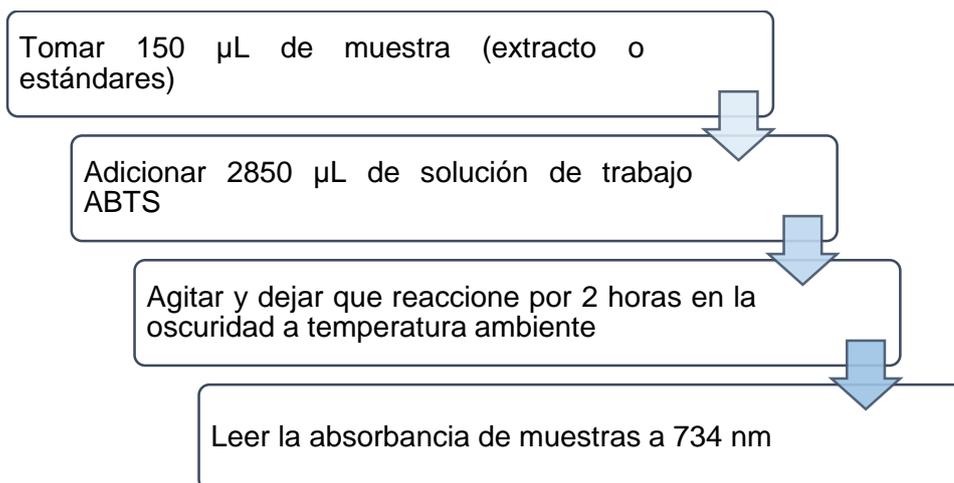




Concentración, μM	Abs. 1, nm	Abs. 2, nm	Abs prom, nm
766	0.002	0.003	0.0025
575	0.226	0.226	0.226
383	0.52	0.521	0.5205
192	0.737	0.739	0.738
96	0.875	0.873	0.874
48	0.856	0.855	0.8555
24	0.874	0.874	0.874
10	0.956	0.956	0.956
0	0.976	0.976	0.976

Pendiente = -0.0012
 Intersección = 0.9562
 $R^2 = 0.9911$

3. Lectura de muestras



Nota: Las absorbancias obtenidas se reemplazan en la ecuación de regresión lineal resultante de la curva de calibración para determinar la concentración.

4. Datos de cuantificación de AA.

4.1. Extractos por maceración dinámica con hexano.

Muestra	Abs. 1, nm	Abs. 2, nm	Abs. 3, nm	Abs prom, nm	X, $\mu\text{M ET/L}$	C, L/g ES	x, $\mu\text{M ET/g ES}$	x prom, $\mu\text{M ET/g ES}$		
M1	0.099	0.099	0.100	0.099	714.056	0.092	65.872	78.805 \pm 9.283		
	0.104	0.103	0.104	0.104	710.444		65.539			
M1.1	0.435	0.435	0.437	0.436	433.778	0.185	80.033			
	0.456	0.456	0.455	0.456	417.111		76.958			
M2	0.140	0.141	0.140	0.140	679.889	0.110	74.797			
	0.151	0.152	0.153	0.152	670.167		73.727			
M2.1	0.421	0.421	0.422	0.421	445.722	0.220	98.071			
	0.434	0.436	0.437	0.436	433.778		95.443			

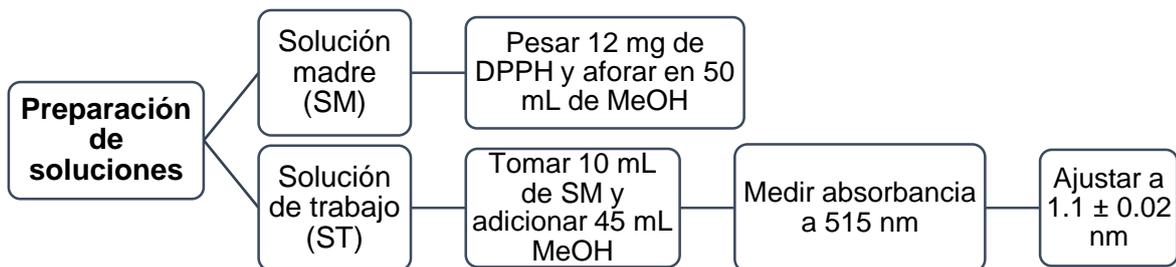
4.2. Extractos supercríticos.

Extractos	Abs. 1, nm	Abs. 2, nm	Abs prom, nm	X, $\mu\text{M ET/L}$	x, $\mu\text{M ET/mg ES}$	x, $\mu\text{M ET/g ES}$	x prom, $\mu\text{M ET/g ES}$						
FC1	P: 150 bar	0.793	0.792	0.793	136.417	0.136	136.417	93.083 \pm 43.333					
	T: 35 °C	0.898	0.895	0.897	49.750	0.050	49.750						
FC2	P: 150 bar	0.777	0.777	0.777	149.333	0.149	149.333				155.792 \pm 6.458		
	T: 45 °C	0.761	0.762	0.762	162.250	0.162	162.250						
FC3	P: 100 bar	0.803	0.804	0.804	127.250	0.127	127.250				157.458 \pm 30.208		
	T: 40 °C	0.730	0.732	0.731	187.667	0.188	187.667						
FC4	P: 100 bar	0.782	0.784	0.783	144.333	0.144	144.333				151.417 \pm 7.083		
	T: 45 °C	0.767	0.765	0.766	158.500	0.159	158.500						
FC5	P: 200 bar	0.872	0.874	0.873	69.333	0.069	69.333				55.792 \pm 13.542		
	T: 35 °C	0.906	0.905	0.906	42.250	0.042	42.250						
FC6	P: 150 bar	0.821	0.821	0.821	112.667	0.113	112.667				87.875 \pm 24.792		
	T: 40 °C	0.881	0.880	0.881	63.083	0.063	63.083						
FC7	P: 200 bar	0.816	0.817	0.817	116.417	0.116	116.417				112.042 \pm 4.375		
	T: 40 °C	0.829	0.825	0.827	107.667	0.108	107.667						

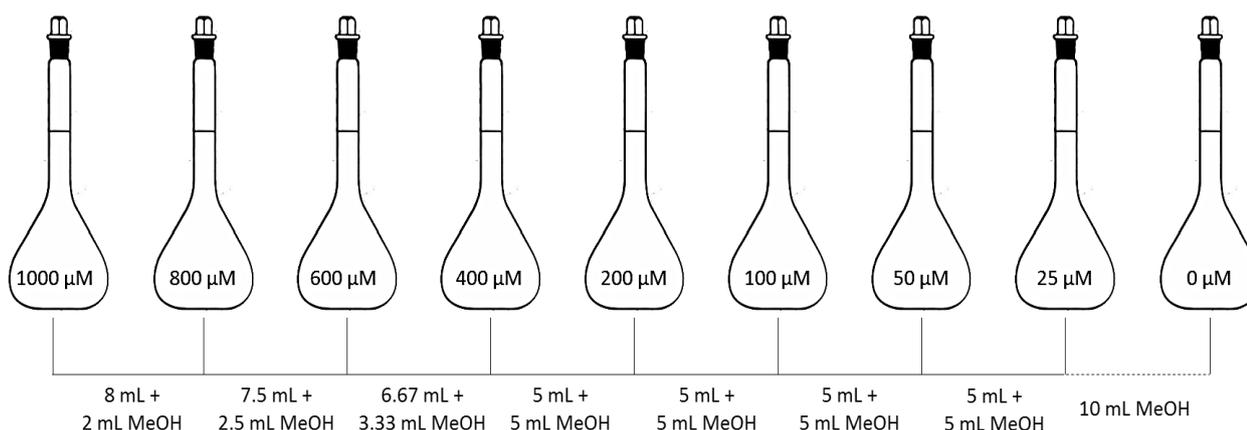
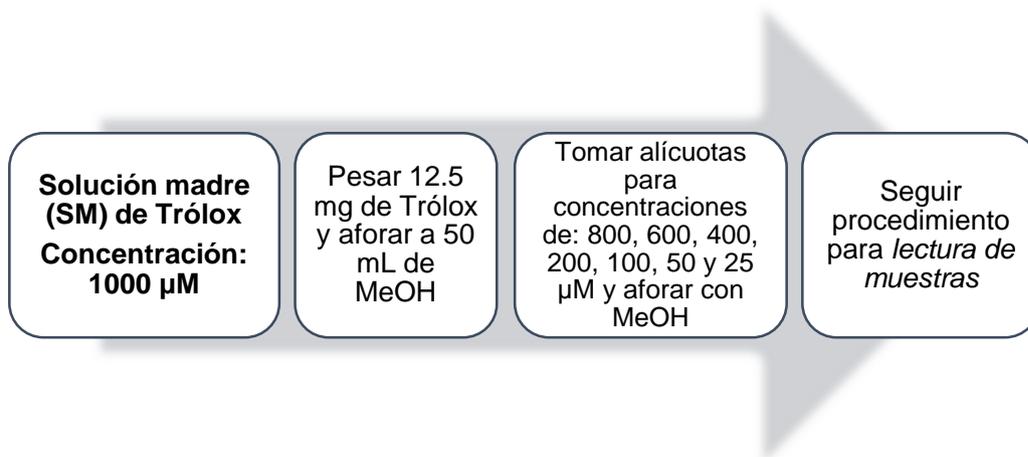
FC8	P: 150 bar	0.794	0.794	0.794	135.167	0.135	135.167	178.917 ±	43.750
	T: 40 °C	0.689	0.689	0.689	222.667	0.223	222.667		
FC9	P: 200 bar	0.785	0.784	0.785	143.083	0.143	143.083	111.833 ±	31.250
	T: 45 °C	0.860	0.859	0.860	80.583	0.081	80.583		
FC10	P: 100 bar	0.802	0.806	0.804	126.833	0.127	126.833	167.042 ±	40.208
	T: 35 °C	0.709	0.706	0.708	207.250	0.207	207.250		
FC11	P: 150 bar	0.932	0.930	0.931	21.000	0.021	21.000	54.958 ±	33.958
	T: 35 °C	0.850	0.849	0.850	88.917	0.089	88.917		
FC12	P: 150 bar	0.956	0.955	0.956	0.583	0.001	0.583	35.375 ±	34.792
	T: 45 °C	0.872	0.872	0.872	70.167	0.070	70.167		
FC13	P: 100 bar	0.797	0.797	0.797	132.667	0.133	132.667	84.958 ±	47.708
	T: 40 °C	0.912	0.911	0.912	37.250	0.037	37.250		
FC14	P: 100 bar	0.796	0.795	0.796	133.917	0.134	133.917	110.583 ±	23.333
	T: 45 °C	0.852	0.851	0.852	87.250	0.087	87.250		
FC15	P: 200 bar	0.791	0.788	0.790	138.917	0.139	138.917	100.583 ±	38.333
	T: 35 °C	0.882	0.881	0.882	62.250	0.062	62.250		
FC16	P: 150 bar	0.685	0.683	0.684	226.833	0.227	226.833	204.125 ±	22.708
	T: 40 °C	0.739	0.738	0.739	181.417	0.181	181.417		
FC17	P: 200 bar	0.704	0.704	0.704	210.167	0.210	210.167	205.792 ±	4.375
	T: 40 °C	0.715	0.714	0.715	201.417	0.201	201.417		
FC18	P: 150 bar	0.812	0.812	0.812	120.167	0.120	120.167	93.292 ±	26.875
	T: 40 °C	0.877	0.876	0.877	66.417	0.066	66.417		
FC19	P: 200 bar	0.702	0.701	0.702	212.250	0.212	212.250	208.500 ±	3.750
	T: 45 °C	0.711	0.710	0.711	204.750	0.205	204.750		
FC20	P: 100 bar	0.700	0.699	0.700	213.917	0.214	213.917	209.958 ±	3.958
	T: 35 °C	0.710	0.708	0.709	206.000	0.206	206.000		

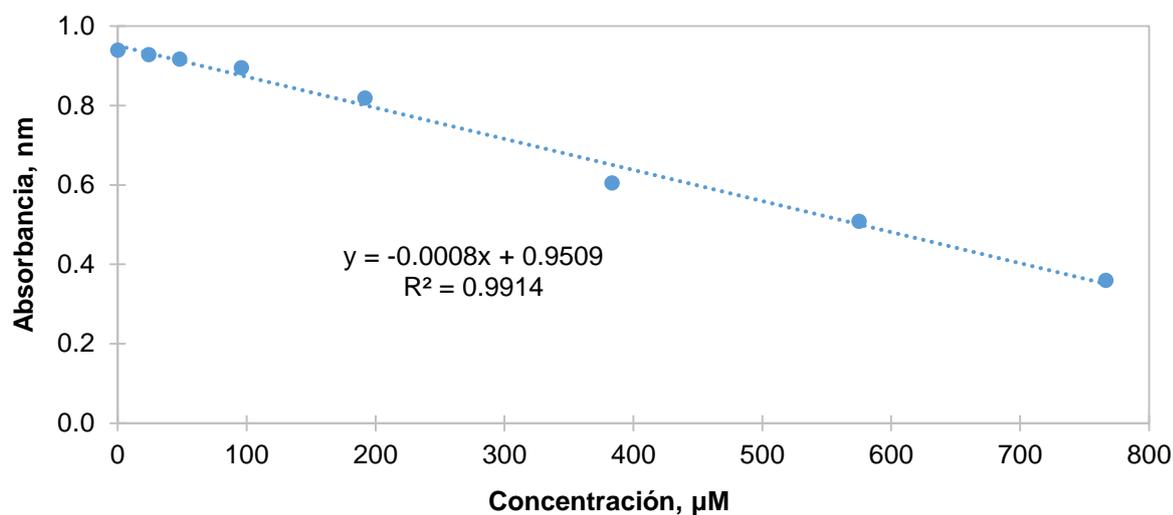
Anexo F. Cuantificación de actividad antioxidante. Método DPPH.

1. Preparación de solución madre y de trabajo



2. Preparación de curva de calibración

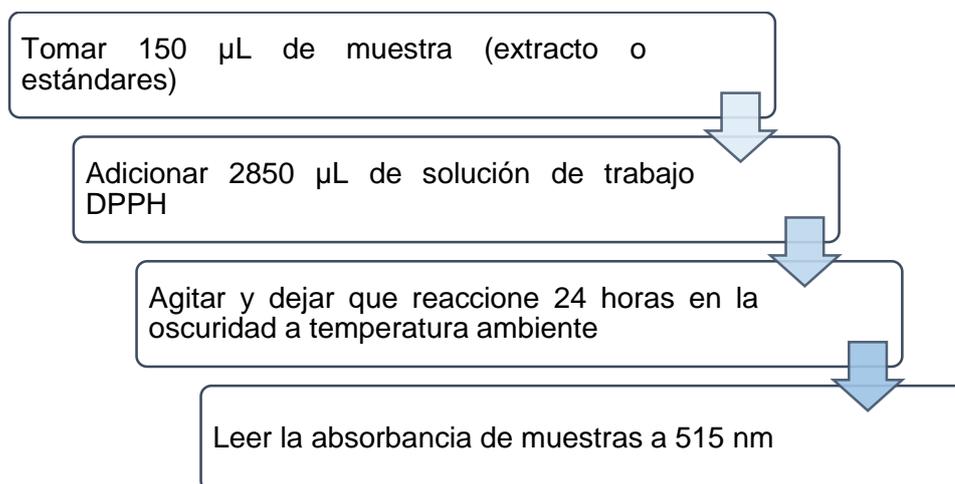




Concentración, µM	Abs. 1, nm	Abs. 2, nm	Abs prom, nm
766.420	0.361	0.359	0.360
574.815	0.508	0.509	0.509
383.401	0.606	0.605	0.606
191.701	0.818	0.820	0.819
95.850	0.895	0.896	0.896
47.925	0.918	0.917	0.918
23.963	0.929	0.928	0.929
0.000	0.939	0.941	0.940

Pendiente = -0.0008
 Intersección = 0.9509
 $R^2 = 0.9914$

3. Lectura de muestras



Nota: Las absorbancias obtenidas se reemplazan en la ecuación de regresión lineal resultante de la curva de calibración para determinar la concentración.

4. Datos de cuantificación de AA.

4.1. Extractos por maceración dinámica con hexano.

Muestra	Abs. 1, nm	Abs. 2, nm	Abs. 3, nm	Abs prom, nm	X, mg ET/L	C, L/g ES	x, mg ET/g ES	x prom, mg ET/g ES		
M1	0.590	0.590	0.589	0.590	451.542	0.092	41.655	47.486 ± 6.836		
	0.630	0.629	0.630	0.630	401.542		37.043			
M1.1	0.792	0.792	0.790	0.791	199.458	0.185	36.800			
	0.747	0.746	0.747	0.747	255.292		47.102			
M2	0.564	0.565	0.564	0.564	483.208	0.110	53.159			
	0.562	0.561	0.564	0.562	485.708		53.434			
M2.1	0.766	0.766	0.767	0.766	230.708	0.220	50.762			
	0.733	0.733	0.733	0.733	272.375		59.930			

4.2. Extractos supercríticos.

Extractos	Abs. 1, nm	Abs. 2, nm	Abs prom, nm	X, µM ET/L	x, µM ET/mg ES	x, µM ET/g ES	x prom, µM ET/g ES		
FC1 P: 150 bar T: 35 °C	0.889	0.889	0.889	77.375	0.008	7.737	6.769 ± 0.969		
	0.905	0.904	0.905	58.000	0.006	5.800			
FC2 P: 150 bar T: 45 °C	0.768	0.768	0.768	228.625	0.023	22.863			
	0.727	0.728	0.728	279.250	0.028	27.925			
FC3 P: 100 bar T: 40 °C	0.799	0.798	0.799	190.500	0.019	19.050			
	0.779	0.778	0.779	215.500	0.022	21.550			
FC4 P: 100 bar T: 45 °C	0.906	0.904	0.905	57.375	0.006	5.737			
	0.901	0.900	0.901	63.000	0.006	6.300			
FC5 P: 200 bar T: 35 °C	0.889	0.888	0.889	78.000	0.008	7.800			
	0.888	0.887	0.888	79.250	0.008	7.925			
FC6 P: 150 bar T: 40 °C	0.846	0.845	0.846	131.750	0.013	13.175			
	0.852	0.853	0.853	123.000	0.012	12.300			

FC7	P: 200 bar	0.886	0.886	0.886	81.125	0.008	8.113	7.581	±	0.531
	T: 40 °C	0.895	0.894	0.895	70.500	0.007	7.050			
FC8	P: 150 bar	0.916	0.914	0.915	44.875	0.004	4.487	5.675	±	1.188
	T: 40 °C	0.897	0.895	0.896	68.625	0.007	6.862			
FC9	P: 200 bar	0.911	0.911	0.911	49.875	0.005	4.987	6.487	±	1.500
	T: 45 °C	0.887	0.887	0.887	79.875	0.008	7.987			
FC10	P: 100 bar	0.912	0.913	0.913	47.700	0.005	4.770	5.254	±	0.484
	T: 35 °C	0.899	0.911	0.905	57.375	0.006	5.737			
FC11	P: 150 bar	0.876	0.877	0.877	93.000	0.009	9.300	9.831	±	0.531
	T: 35 °C	0.869	0.867	0.868	103.625	0.010	10.363			
FC12	P: 150 bar	0.865	0.864	0.865	108.000	0.011	10.800	11.300	±	0.500
	T: 45 °C	0.857	0.856	0.857	118.000	0.012	11.800			
FC13	P: 100 bar	0.880	0.880	0.880	88.625	0.009	8.863	9.925	±	1.063
	T: 40 °C	0.863	0.863	0.863	109.875	0.011	10.988			
FC14	P: 100 bar	0.892	0.891	0.892	74.250	0.007	7.425	7.237	±	0.188
	T: 45 °C	0.894	0.895	0.895	70.500	0.007	7.050			
FC15	P: 200 bar	0.339	0.339	0.339	764.875	0.076	76.488	77.081	±	0.594
	T: 35 °C	0.329	0.330	0.330	776.750	0.078	77.675			
FC16	P: 150 bar	0.931	0.929	0.930	26.125	0.003	2.612	4.831	±	2.219
	T: 40 °C	0.895	0.894	0.895	70.500	0.007	7.050			
FC17	P: 200 bar	0.862	0.862	0.862	111.125	0.011	11.113	10.425	±	0.688
	T: 40 °C	0.873	0.873	0.873	97.375	0.010	9.738			
FC18	P: 150 bar	0.872	0.873	0.873	98.000	0.010	9.800	8.925	±	0.875
	T: 40 °C	0.886	0.887	0.887	80.500	0.008	8.050			
FC19	P: 200 bar	0.865	0.864	0.865	108.000	0.011	10.800	11.425	±	0.625
	T: 45 °C	0.855	0.854	0.855	120.500	0.012	12.050			
FC20	P: 100 bar	0.920	0.918	0.919	39.875	0.004	3.987	3.081	±	0.906
	T: 35 °C	0.934	0.933	0.934	21.750	0.002	2.175			

Anexo G. Análisis estadístico.

1. ANOVA rendimiento.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	0.0444083	1	0.0444083	0.16	0.6933
B:Presión	0.472033	1	0.472033	1.73	0.2114
AA	0.286688	1	0.286688	1.05	0.3243
AB	0.01805	1	0.01805	0.07	0.8011
BB	0.589301	1	0.589301	2.16	0.1657
bloques	1.24002	1	1.24002	4.54	0.0528
Error total	3.55077	13	0.273136		
Total (corr.)	6.36722	19			

2. ANOVA fenoles totales.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	2.59656	1	2.59656	0.76	0.4002
B:Presión	0.00705675	1	0.00705675	0.00	0.9645
AA	1.9971	1	1.9971	0.58	0.4592
AB	3.65446	1	3.65446	1.06	0.3210
BB	0.193122	1	0.193122	0.06	0.8162
bloques	17.0903	1	17.0903	4.98	0.0439
Error total	44.6268	13	3.43283		
Total (corr.)	70.4409	19			

3. ANOVA actividad antioxidante por ABTS.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	706.622	1	706.622	0.23	0.6421
B:Presión	628.924	1	628.924	0.20	0.6609
AA	2789.64	1	2789.64	0.89	0.3616
AB	9727.2	1	9727.2	3.12	0.1009
BB	4430.14	1	4430.14	1.42	0.2547
bloques	67.9809	1	67.9809	0.02	0.8849
Error total	40565.1	13	3120.39		
Total (corr.)	57916.6	19			

4. ANOVA actividad antioxidante por DPPH.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	147.11	1	147.11	0.56	0.4661
B:Presión	397.271	1	397.271	1.52	0.2391
AA	84.7776	1	84.7776	0.32	0.5784
AB	647.141	1	647.141	2.48	0.1393
BB	41.9016	1	41.9016	0.16	0.6951
bloques	124.911	1	124.911	0.48	0.5012
Error total	3391.85	13	260.911		
Total (corr.)	4859.01	19			