



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Obtención de Antioxidantes a partir de Residuos Frutícolas empleando Extracción con Fluidos Supercríticos-EFS**

**Henry Isaac Castro Vargas**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia  
2013



# **Obtención de Antioxidantes a partir de Residuos Frutícolas empleando Extracción con Fluidos Supercríticos-EFS**

**Henry Isaac Castro Vargas**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctor en Ciencias Química**

Director:

Químico, Doctor en Ciencias Química. Fabián Parada Alfonso

Línea de Investigación:

Química Agroalimentaria

Grupo de Investigación:

Estudio de los Cambios Químicos y Bioquímicos de los Alimentos Frescos y Procesados

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2013





**A mis padres**

*Por toda su ayuda, compañía y paciencia  
por la educación y valores que siempre me han entregado  
por su confianza en mí y en lo que hago  
por darme su entusiasmo y energía en los momentos que los necesité  
a mi viejo por sus consejos y palabras sabias  
a mi vieja por su cariño especial  
porque sin ustedes nunca hubiera alcanzado mis sueños*

**A Mile**

*Por su todo su amor, entrega, apoyo, paciencia y compañía  
por todos los momentos que he vivido a su lado  
porque me ha enseñado a ser mejor persona  
por compartir conmigo sus sueños y hacer parte de los míos*

**A mis hermosos sobrinos Valery y Jorgito**

*Su presencia alegra nuestras vidas  
y nos hace recordar que también fuimos niños*

***¡Muchas gracias, esto es para ustedes!***



## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, por acogerme en sus aulas durante los últimos siete años y proporcionarme las herramientas para mi formación académica y personal.

A la Universidad Federal de Santa Catarina, Departamento de Ingeniería Química e Ingeniería de Alimentos (Florianópolis SC-Brasil), por permitirme ser parte de esa institución durante mi pasantía doctoral y acogerme como uno más de sus estudiantes.

A la Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, por su apoyo logístico en el desarrollo de algunos de los análisis del presente trabajo y por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta institución como docente.

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede-Bogotá por su apoyo económico a los proyectos “Obtención de antioxidantes a partir de residuos frutícolas empleando extracción con fluidos supercríticos” y “Residuos frutícolas como fuente de extractos con actividad antioxidante, citotóxica y larvicida.”, los cuales aportaron de manera significativa al desarrollo del presente trabajo.

Al Sistema Nacional de Becas de la Universidad Nacional de Colombia por permitirme ser parte de la Beca Estudiante Sobresaliente de Posgrado.

Al profesor Fabián Parada Alfonso por sus enseñanzas, apoyo, interés, colaboración y paciencia, los cuales ayudaron a crear y ejecutar esta tesis doctoral. Por su amistad, confianza y consejos, por mostrarme que todo puede ser diferente a lo convencional y obligarme a salir de mi “cuadrícula”.

À professora Sandra Regina Salvador Ferreira; prezada Sandra eu consegui aprender muito junto você, não só como seu aluno, também como pessoa. Você é uma brilhante pesquisadora e pessoa, agradecer á vida por ter oportunidade de conhecer e trabalhar com você e seu ótimo grupo de pesquisa, ¡¡Obrigado!!

Al profesor Wolfram Baumann por su valioso aporte al desarrollo del presente trabajo y por su total disposición a nuestras inquietudes y necesidades.

A la profesora Luz Patricia Restrepo Sánchez, por acogerme en su grupo de investigación, por sus continuos aportes al trabajo, por su permanente preocupación por cómo, cuándo y dónde alcanzaremos nuestros objetivos académicos. Porque su presencia como líder de nuestro grupo hace agradable, amable y gratificante nuestro desarrollo como estudiantes de posgrado.

Al profesor Ignacio Rodríguez por su disposición y ayuda continua a nuestro grupo de trabajo.

A todos los profesores del Departamento de Química con quienes tuve la oportunidad de compartir espacios académicos como estudiante y docente en formación; Luis Enrique Cuca Suarez, Jairo Arturo Guerrero Dallos, Luz Patricia Restrepo Sánchez, Fabián Parada Alfonso, Diana Cristina Sinuco León, María José Martínez Cordón y Pedro Hernández.

A mis compañeros del Laboratorio de Alta Presión; Alejandro Nivia, Armando Reyes, Ángela González, Carlos Gutiérrez, Alejandro Bourdon, Alfonso Acero, Paola Ortega y Diego Ballesteros, por permitirme trabajar junto a ellos, por su paciencia y por todos los momentos compartidos.

A todos los integrantes del grupo de investigación “Estudio de los Cambios Químicos y Bioquímicos de los Alimentos Frescos y Procesados” por sus continuos aportes al presente trabajo, los cuales ayudaron a enriquecer el mismo.

k

A meus colegas do LATESC na Universidade Federal de Santa Catarina; Sandra, Patrícia, Daniela, Natália, Ana, Simone, Sara, Glaucia, Katia, Vladimir, Marcelo, Jossa e Helmut, vocês fizeram meu estagio muito legal, eu nunca vou esquecer os momentos agradáveis passados no LATESC e em Floripa, ¡¡Orbigado gente!!.

A Luis Fernando Mejía Caro y Edwin Guevara de la Universidad de los Andes por su apoyo en el desarrollo de los análisis cromatográficos.

A la familia Acosta Prieto por recibirme como un integrante más de la familia y tratarme de la misma manera.

A todos aquellos que de una u otra forma hicieron parte de esta etapa de mi vida.

## Resumen

En el presente trabajo se exploró la posibilidad de obtener extractos con actividad antioxidante (AA) en alimentos a partir de residuos frutícolas (semillas y epicarpios) empleando extracción con fluidos supercríticos (*EFS*). Un total de veintidós residuos fueron sometidos al estudio comparativo inicial, el cual consistió en: (i) obtener cada uno de los respectivos extractos (empleando extracción Soxhlet a presión reducida con metanol) y (ii) evaluación de la AA (en aceite de palma comestible-AP y carne de res cocida-CRC). Mediante análisis de componentes principales (ACP) y análisis de clusters (AC) fue posible determinar que los extractos de las semillas de papaya (SPy) y del epicarpio de tomate de árbol (ETA) presentaron la mayor AA en AP y CRC, respectivamente. Las SPy y el ETA, de forma independiente, fueron sometidos a *EFS* con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y CO<sub>2</sub> adicionado con etanol (EtOH) como cosolvente (CO<sub>2</sub>/EtOH), determinando el efecto de la presión, temperatura y adición de cosolvente sobre el rendimiento y la AA de los extractos. El extracto obtenido a partir de SPy empleando CO<sub>2</sub> a 50 °C/20 MPa presentó una buena AA en AP, sin embargo, ésta fue inferior a la observada para el extracto Soxhlet. Por su parte, el extracto obtenido a partir de ETA empleando CO<sub>2</sub>/EtOH a 50 °C/30 MPa con 2% de EtOH presentó la mayor AA en CRC. Finalmente, los extractos con mayor AA en AP y CRC fueron sometidos a fraccionamiento e identificación de algunos compuestos, logrando identificar en el extracto Soxhlet de SPy compuestos como el ácido gálico, el galato de epigallocatequina, el ácido rosmarínico y el bencilglucosinolato, mientras que en el extracto supercrítico de ETA se identificaron las catequinas epigallocatequina, epicatequina, galato de epigallocatequina y el ácido rosmarínico, dichos compuestos están asociados a la AA observada en los respectivos extractos.

**Palabras clave:** Residuos frutícolas, extracción con fluidos supercríticos, extracción Soxhlet, actividad antioxidante, oxidación lipídica, aceite de palma comestible, carne de res cocida, semillas de papaya, *Carica papaya*, epicarpio de tomate de árbol, *Solanum betaceum*.

## Abstract

In this work we explored the possibility of obtaining extracts from waste fruit (seeds and epicarp) with antioxidant activity (AA) in food using supercritical fluid extraction (*SFE*). Twenty-two residues were subjected to initial comparative study, which consisted of: (i) extracts obtaining from each residue (using reduced pressure Soxhlet extraction with methanol as solvent) and (ii) assessing the AA (in palm oil edible-PO and cooked beef meat-CBM). Using principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) was possible to determine that the papaya seeds (PyS) and tree tomato epicarp (TTE) extracts had the highest AA in PO and CBM, respectively. PyS and TTE were submitted to *SFE* using carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and CO<sub>2</sub> added with ethanol (EtOH) as cosolvent (CO<sub>2</sub>/EtOH), evaluating the pressure, temperature and co-solvent addition effect on extraction yield and AA. The extract obtained from PyS using CO<sub>2</sub> at 50 °C/20 MPa showed good AA in PO, however it was less than that observed for the Soxhlet extract. Meanwhile, the extract obtained from TTE using CO<sub>2</sub>/EtOH 50 °C/30 MPa with 2% EtOH showed the highest AA in CBM. Finally, the extracts with highest AA in PO and CBM were fractionated and some compounds were identifying; in Soxhlet extract of PyS were identified the gallic acid, epigallocatechin gallate, rosmarinic acid and benzilglucosinolate, while in TTE supercritical extract were identified the catechins epigallocatechin, epicatechin, epigallocatechin gallate and rosmarinic acid, these compounds are associated with the AA observed in extracts.

**Key words:** Fruits residues, supercritical fluid extraction, Soxhlet extraction, antioxidant activity, lipid oxidation, edible palm oil, cooked beef meat, papaya seeds, *Carica papaya*, tree tomato epicarp, *Solanun betaceum*.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Marco Teórico</b> .....	<b>3</b>
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Bases teóricas .....	9
1.2.1 Extracción con fluidos supercríticos .....	9
1.2.2 Antioxidantes y actividad antioxidante.....	27
<b>2. Metodología</b> .....	<b>61</b>
2.1 Obtención de extractos Soxhlet .....	62
2.1.1 Muestras y preparación.....	62
2.1.2 Obtención de extractos .....	63
2.2 Estudio comparativo y selección de residuos con el mayor potencial como fuentes de antioxidantes.....	64
2.2.1 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos .....	64
2.2.2 Diseño experimental y análisis estadístico .....	67
2.3 Obtención de antioxidantes empleando extracción con fluidos supercríticos .	68
2.3.1 Preparación de muestras .....	68
2.3.2 Obtención de extractos .....	68
2.3.3 Diseño experimental y análisis estadístico .....	70
2.4 Identificación de los compuestos con actividad antioxidante en aceite de palma y carne de res cocida.....	70
2.4.1 Fraccionamiento de extractos .....	70
2.4.2 Análisis por CLAE-EM.....	71
2.4.3 Análisis de compuestos fenólicos por CLAE-DAD.....	72
2.4.4 Análisis por resonancia magnética nuclear .....	73
<b>3. Resultados y Discusión</b> .....	<b>74</b>
3.1 Obtención de antioxidantes a partir de residuos frutícolas y evaluación de su actividad antioxidante en aceite de palma comestible .....	76
3.1.1 Estudio comparativo y selección del residuo con el mayor potencial como fuente de antioxidantes.....	76

---

3.1.2	Obtención de antioxidantes empleando extracción con fluidos supercríticos .....	89
3.1.3	Identificación de compuestos con actividad antioxidante en aceite de palma 96	
3.2	Obtención de antioxidantes a partir de residuos frutícolas y evaluación de su actividad antioxidante en carne de res cocida.....	116
3.2.1	Estudio comparativo y selección del residuo con el mayor potencial como fuente de antioxidantes .....	116
3.2.2	Obtención de antioxidantes empleando extracción con fluidos supercríticos .....	122
3.2.3	Identificación de compuestos con actividad antioxidante en carne de res cocida .....	128
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>137</b>
4.1	Conclusiones.....	137
4.2	Recomendaciones.....	138
	<b>A. Anexo: Rendimientos obtenidos en la extracción Soxhlet de los residuos frutícolas estudiados.....</b>	<b>141</b>
	<b>B. Anexo: Datos obtenidos en curva de extracción de SPy .....</b>	<b>143</b>
	<b>C. Anexo:Cromatograma y tiempos de retención obtenidos en el análisis por CLAE-DAD de la disolución patrón de ácidos fenólicos.....</b>	<b>145</b>
	<b>D. Anexo:Comparación de los espectros UV-Vis de los patrones de compuestos fenólicos y los compuestos detectados en la F4 de SPy.....</b>	<b>146</b>
	<b>E. Anexo: Datos obtenidos en curva de extracción de ETA.....</b>	<b>147</b>
	<b>F. Anexo:Comparación de los espectros UV-Vis de los patrones de compuestos fenólicos y los compuestos detectados en la F4 de ETA .....</b>	<b>149</b>
	<b>G. Anexo: Productividad académica.....</b>	<b>151</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>157</b>



## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Diagrama de fases de una sustancia pura.....	11
<b>Figura 2.</b> Isotermas de densidad-presión reducida para el CO <sub>2</sub> supercrítico.....	12
<b>Figura 3.</b> Isotermas de solubilidad de antraceno en CO <sub>2</sub> supercrítico.....	13
<b>Figura 4.</b> Variación de difusividad en CO <sub>2</sub> en función de la temperatura.....	14
<b>Figura 5.</b> Variación de viscosidad de CO <sub>2</sub> en función de la presión.....	15
<b>Figura 6.</b> Variación de la constante dieléctrica del CO <sub>2</sub> supercrítico en función de la densidad.....	16
<b>Figura 7.</b> Esquema general de un sistema de EFS.....	20
<b>Figura 8.</b> Esquema del sistema de EFS acoplado a cromatografía de gases.....	21
<b>Figura 9.</b> Esquema del acople EFS-CLAE.....	22
<b>Figura 10.</b> Curva genérica de extracción.....	25
<b>Figura 11.</b> Estructura de antioxidantes sintéticos.....	29
<b>Figura 12.</b> Estructuras de algunos antioxidantes naturales.....	30
<b>Figura 13.</b> Esquema general de la biosíntesis de compuestos fenólicos a partir de la fenilalanina.....	31
<b>Figura 14.</b> Estructura de fenoles simples.....	33
<b>Figura 15.</b> Estructura de los derivados del ácido cinámico.....	34
<b>Figura 16.</b> Estructura de cumarinas.....	34
<b>Figura 17.</b> Estructura general de flavonoides.....	35
<b>Figura 18.</b> Estructura general de chalconas, dihidrochalconas y auronas.....	36
<b>Figura 19.</b> Estructura de flavanonas y flavanones.....	36
<b>Figura 20.</b> Estructura de leucoantocianidinas y catequinas.....	37
<b>Figura 21.</b> Estructura de antocianidinas y deoxiantocianidinas.....	38
<b>Figura 22.</b> Estructura de la antocianina.....	38
<b>Figura 23.</b> Estructura de las flavonas.....	39
<b>Figura 24.</b> Estructura de biflavonilo.....	39

---

<b>Figura 25.</b> Estructura de estilbenos y quinonas.....	40
<b>Figura 26.</b> Estructura de la betacianina.....	41
<b>Figura 27.</b> Estructura de lignanos.....	42
<b>Figura 28.</b> Mecanismo general de la autoxidación de lípidos.....	43
<b>Figura 29.</b> Esquema de la formación de productos secundarios y finales a partir de hidroperóxidos.....	44
<b>Figura 30.</b> Mecanismo general de foto-oxidación tipo I.....	46
<b>Figura 31.</b> Esquema general de la oxidación de lípidos catalizada por lipoxigenasas....	48
<b>Figura 32.</b> Mecanismos de acción de los antioxidantes primarios.....	49
<b>Figura 33.</b> Descomposición de hidroperóxidos por compuestos azufrados. ....	50
<b>Figura 34.</b> Reacción entre TBA y MDA.....	58
<b>Figura 35.</b> Esquema general de la metodología desarrollada.....	62
<b>Figura 36.</b> Unidad de extracción supercrítica empleada.....	69
<b>Figura 37.</b> Rendimientos obtenidos en la extracción Soxhlet de los residuos frutícolas estudiados.....	75
<b>Figura 38.</b> Gráfico de scores del ACP para la actividad antioxidante en AP.....	82
<b>Figura 39.</b> Dendograma del análisis de clusters para la actividad antioxidante en AP....	83
<b>Figura 40.</b> Concentración de hidroperóxidos en el AP adicionado con los extractos con mayor actividad antioxidante.....	84
<b>Figura 41.</b> Contenido de hexanal en el AP adicionado con los extractos con mayor actividad antioxidante.....	85
<b>Figura 42.</b> Contenido de nonanal en el AP adicionado con los extractos con mayor actividad antioxidante.....	85
<b>Figura 43.</b> Concentración de TBARS en el AP adicionado con los extractos con mayor actividad antioxidante.....	86
<b>Figura 44.</b> Curva de la EFS con CO <sub>2</sub> a partir de SPy.....	90
<b>Figura 45.</b> Isotermas de rendimiento (40, 50 y 60 °C) de la EF S de SPy.....	92
<b>Figura 46.</b> Actividad antioxidante de los extractos de SPy obtenidos por EFS y extracción Soxhlet.....	95
<b>Figura 47.</b> Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir de SPy.....	98
<b>Figura 48.</b> Cromatograma del análisis por CLAE-ESI-EM de la F1 del extracto Soxhlet de SPy.....	100
<b>Figura 49.</b> Espectros de masas obtenidos en el análisis por CLAE-ESI-EM de la F1...	101
<b>Figura 50.</b> Estructura general de los glucosinolatos.....	103

---

<b>Figura 51.</b> Estructura de algunos glucosinolatos cuya actividad antioxidante ha sido reportada en la literatura.....	105
<b>Figura 52.</b> Estructura de bencilglucosinato. ....	106
<b>Figura 53.</b> Espectro de RMN de F1 (experimento HSQC).....	108
<b>Figura 54.</b> Espectro RMN de F1 (experimento HMBC). ....	109
<b>Figura 55.</b> Cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAE-DAD de F4. ....	112
<b>Figura 56.</b> Gráfico de Scores para el ACP para la actividad antioxidante en la CRC....	119
<b>Figura 57.</b> Dendograma del análisis de clusters para la actividad antioxidante en la CRC.....	120
<b>Figura 58.</b> Concentración de hidroperóxidos en la CRC adicionada con los extractos con mayor actividad antioxidante.....	121
<b>Figura 59.</b> Concentración de TBARS en la CRC adicionada con los extractos con mayor actividad antioxidante.....	122
<b>Figura 60.</b> Curva de la EFS con CO <sub>2</sub> a partir de ETA. ....	123
<b>Figura 61.</b> Isotermas de rendimiento (40 y 50 °C) de la EFS de ETA. ....	125
<b>Figura 62.</b> Actividad antioxidante de los extractos de ETA obtenidos por EFS y extracción Soxhlet.....	129
<b>Figura 63.</b> Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir de ETA. ....	130
<b>Figura 64.</b> Cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAE-DAD de F4. ....	133

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Presión y temperatura críticas de sustancias empleadas en EFS. ....	18
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los compuestos fenólicos. ....	32
<b>Tabla 3.</b> Productos secundarios y finales de la autooxidación de aceite de soya. ....	45
<b>Tabla 4.</b> Principales productos formados a partir de hidroperóxidos de los ácidos linoléico y oleico. ....	46
<b>Tabla 5.</b> Residuos frutícolas empleados en el estudio comparativo de actividad antioxidante. ....	63
<b>Tabla 6.</b> Gradiente de elución empleado en los análisis por CLAE-DAD. ....	73
<b>Tabla 7.</b> Hidroperóxidos formados durante la oxidación de AP adicionado con los extractos y antioxidantes. ....	77
<b>Tabla 8.</b> Hexanal y nonanal formados durante la oxidación de AP adicionado con los extractos y antioxidantes. ....	78
<b>Tabla 9.</b> TBARS formadas durante la oxidación de AP adicionado con los extractos y antioxidantes. ....	79
<b>Tabla 10.</b> Loadings, valores propios, porcentaje de varianza y varianza acumulada para los dos primeros componente principales del ACP. ....	80
<b>Tabla 11.</b> Rendimientos obtenidos en la EFS de SPy. ....	91
<b>Tabla 12.</b> Actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de SPy empleando EFS. ....	94
<b>Tabla 13.</b> Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir del extracto Soxhlet de SPy. ....	97
<b>Tabla 14.</b> Actividad antioxidante en aceites comestibles reportada en la literatura para algunos extractos y compuestos de origen natural. ....	99
<b>Tabla 15.</b> Datos del espectro de masas del compuesto eluido a 1.553 min. ....	101
<b>Tabla 16.</b> Datos del espectro de masas obtenido en el experimento de iones hijo a partir del ion m/z 408.0451. ....	102

---

<b>Tabla 17.</b> Datos espectroscópicos obtenidos para F1.....	110
<b>Tabla 18.</b> Datos espectroscópicos obtenidos para F1 y reportados en la literatura para el BGSL.....	111
<b>Tabla 19.</b> Actividad antioxidante en matrices lipídicas reportada para el ácido gálico, el galato de epigallocatequina y el ácido rosmarínico.....	114
<b>Tabla 20.</b> Hidroperóxidos y TBARS formados durante el almacenamiento de CRC adicionada con los extractos y antioxidantes.....	117
<b>Tabla 21.</b> Loadings, valores propios, porcentaje de varianza y varianza acumulada para los dos primeros componentes principales del ACP.....	118
<b>Tabla 22.</b> Rendimientos obtenidos en la EFS de ETA.....	124
<b>Tabla 23.</b> Actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de ETA empleando EFS.....	127
<b>Tabla 24.</b> Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir del extracto supercrítico de ETA.....	129
<b>Tabla 25.</b> Actividad antioxidante en carnes cocidas reportadas en la literatura para algunos extractos y compuestos de origen natural.....	132

## Lista de abreviaturas

### Abreviatura: Término

**<sup>1</sup>H-RMN:** resonancia magnética nuclear de protón

**<sup>13</sup>C-RMN:** resonancia magnética nuclear de carbono 13

**AA:** Actividad antioxidante

**ABAP:** 2,2-Azobis(2-amidinopropano)

**ABC:** Área bajo la curva

**ABTS<sup>•+</sup>:** Radical 2,2' -azino- bis-(3-etil benzotiazolin) -6- sulfonato

**AC:** Análisis de clusters

**ACP:** Análisis de componentes principales

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AG:** Ácido gálico

**ANOVA:** Análisis de varianzas

**AP:** Aceite de palma comestible

**AR:** Ácido rosmarínico

**BGSL:** Bencilglucosinolato

**BHA:** Butil-hidroxianisol

**BHT:** Butil-hidroxitolueno

**CD<sub>3</sub>OD:** metanol deuterado

**CE:** Curva de extracción

**CER:** Etapa de tasa constante de extracción (Constant extraction rate)

**CG:** Cromatografía de gases

**CLAE:** Cromatografía líquida de alta eficiencia

**CLAE-DAD:** Cromatografía líquida de alta eficiencia - arreglo de diodos

**CLAE-EM:** Cromatografía líquida de alta eficiencia - espectrometría de masas

**CLAE-ESI-EM:** Cromatografía líquida de alta eficiencia - electrospray-espectrometría de masas

**CLAE-ESI-EM/EM:** Cromatografía líquida de alta eficiencia - electrospray-espectrometría de masas/espectrometría de masas

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**CO<sub>2</sub> SC:** Dióxido de carbono supercrítico

**CR:** Carne de res

**CRC:** Carne de res cocida

**CSMa:** Cubierta de la semilla de mango de azúcar

**CSMt:** Cubierta de la semilla de mango tommy

**CU:** Cáliz de uchuva

**DANE:** Departamento administrativo nacional de estadística

**DC:** Dieno conjugado

**DCP:** Etapa difusional o de extracción nula (Diffusion-controlled period)

**DE:** Desviación estándar

**DEPT 135:** distorsión por incremento de polarización a 135 ° (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer)

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

**DVB/CAR/PDMS:** Divinilbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane

**ε:** Constante dieléctrica

**ECf:** Epicarpio de café

**EFS:** Extracción con fluidos supercríticos

**EG:** Epicarpio de guanábana

**EGC:** Epigalocatequina

**EL:** Epicarpio de lulo

**EM:** Espectrometría de masas

**EMa:** Epicarpio de mango de azúcar

**EMc:** Epicarpio de maracuyá

**EMt:** Epicarpio de mango tommy

**EN:** Epicarpio de naranja

**EP:** Epicarpio de piña

**EPy:** Epicarpio de papaya

**ETA:** Epicarpio de tomate de árbol

**EtOH:** Etanol

**FER:** Etapa de tasa extracción decreciente (Falling extraction rate)

**FID:** Detector de ionización a la llama

**FRAP:** Potencial antioxidante en la reducción del ion férrico (Ferric reduction antioxidant potential)

**FS:** Fluidos supercríticos

**GEC:** Galato de epicatequina

**GEGC:** Galato de epigalocatequina

**GSL:** Glucosinolato

**GSLs:** Glucosinolatos

**GTL:** Glucotropaeolina

**HEX:** Aldehídos hexanal

**HMBC:** Correlaciones multienlace heteronucleares (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

**HPL:** Hidroperóxidos del ácido linoléico

**HSQC:** Correlación simple heteronuclear (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

**HPO:** Hidroperóxidos del ácido oleico

**ITC:** Isotiocianato

**KSMa:** Kernel de la semilla de mango de azúcar

**KSMt:** Kernel de la semilla de mango tommy

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad

**Malonil-CoA:** Malonil coenzima A

**MDA:** Malondialdehído

**MEFS:** Microextracción en fase sólida

**MeOH:** Metanol

**MPa:** Megapascuales

**NON:** Nonanal

**ODS:** Octadecilsilano

**P<sub>C</sub>:** Presión crítica

**PC:** Punto crítico

**p-cumaroil-CoA:** p-cumaroil coenzima A

**P<sub>R</sub>:** Presión reducida

**RMN:** resonancia magnética nuclear

**SC:** Semillas de curuba  
**SG:** Semillas de guanábana  
**SGy:** Semillas de guayaba  
**SL:** Semillas de lulo  
**SM:** Semillas de mora  
**SMc:** Semillas de maracuyá  
**SPy:** Semillas de papaya  
**TBA:** Ácido tiobarbitúrico  
**TBARS:** Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico  
**TBHQ:** Terbutil-Hidroxiquinona  
**T<sub>C</sub>:** Temperatura crítica  
**T<sub>R</sub>:** Temperatura reducida  
**UV-Vis:** Ultravioleta-visible  
**VP:** Valor de peróxido



# Introducción

La vocación agrícola de nuestro país ha permitido el abastecimiento interno de la mayoría de productos, sin embargo, gran parte de nuestra producción frutícola es desaprovechada, por un inadecuado manejo postcosecha o por su depreciación en el mercado local, direccionándose en gran medida hacia el consumo en fresco. Así mismo, la industrialización de frutas, principalmente con el propósito de obtención de pulpas, genera un volumen considerable de residuos (semillas, albedo, epicarpio y algunas porciones de pulpa) los cuales en la mayoría de los casos son desaprovechados.

Por otra parte, dentro de las metodologías de extracción que se han desarrollado en las últimas décadas, la extracción con fluidos supercríticos (*EFS*) es una técnica que ha ganado cada vez más aceptación, desarrollándose un sinnúmero de aplicaciones a nivel analítico e industrial. Dicha técnica posee gran variedad de ventajas dado que aprovecha las propiedades de los fluidos supercríticos (*FS*), siendo el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) el solvente comúnmente empleado. La *EFS* ha sido empleada en la obtención de diferentes productos a partir de múltiples materiales vegetales. Algunas aplicaciones importantes son: la producción de café descafeinado, la extracción de la fracción volátil de distintas frutas o especias, la obtención de colorantes naturales, la extracción aceites y de antioxidantes, entre otras. En el caso particular de Colombia, se han adelantado algunos trabajos empleando la *EFS* con el fin de obtener extractos a partir de diferentes biomásas, las cuales poseen distintas propiedades entre las que se encuentra la actividad antioxidante (*AA*). Dichos trabajos han proporcionado aportes al fortalecimiento de la investigación relacionada con el aprovechamiento de nuestros productos naturales y sus residuos, la cual busca, entre otros objetivos, darle un valor agregado a estos materiales.

Teniendo en cuenta el panorama anterior, el presente trabajo se centró en la determinación del potencial de los residuos de diferentes frutas como fuente de antioxidantes. Para tal fin, en primer término, se realizó un estudio comparativo sobre la

eficiencia para retardar la oxidación lipídica en alimentos (aceite vegetal y carne de res cocida) de extractos obtenidos por técnicas clásicas a partir de residuos de frutas procesadas por la industria nacional (café, curuba, guanábana, guayaba, lulo, mango, maracuyá, mora, naranja, papaya, piña, tomate de árbol y uchuva). Posteriormente, aquellos residuos cuyos extractos presentaron la mayor AA, fueron sometidos a *EFS*, con el propósito de mejorar la obtención de los antioxidantes presentes en los mismos. Luego los extractos más promisorios se sometieron a fraccionamiento con el fin de obtener fracciones con mayor AA. Finalmente, se identificaron algunos compuestos responsables de la AA observada en aquellas fracciones con la mayor capacidad para retardar la oxidación lipídica en los alimentos señalados anteriormente.

# 1. Marco Teórico

## 1.1 Antecedentes

Colombia es un país con un alto potencial en recursos naturales (agua, flora, fauna, combustibles, entre otros), una parte importante de estos recursos son nuestros frutos, los cuales presentan particular interés en muchas áreas (alimentos, medicina, cosmética, industria, investigación, entre otros) gracias a sus múltiples propiedades y usos. Actualmente es de conocimiento general que dichos frutos son una excelente fuente de antioxidantes (fenoles, ácido ascórbico, carotenoides, tocoferoles y tocotrienoles), compuestos cuya importancia trasciende del campo alimenticio hacia otros campos como la medicina y la cosmética. Sin embargo, la obtención de extractos, fracciones o compuestos puros a partir de dichas fuentes naturales, con el fin de emplearlos como aditivos o suplementos, es limitado y poco viable, más aun cuando compuestos sintéticos con alto potencial antioxidante como terbutil-hidroquinona (TBHQ), butil- hidroxitolueno (BHT) o el butil-hidroxianisol (BHA) son más económicos que los naturales.

Los residuos generados por consumo directo de frutos o por el procesamiento de los mismos, poseen en la actualidad poco uso y una baja demanda comercial (p.e. como base en la elaboración de alimentos concentrados para animales), convirtiéndose en muchos casos en fuentes de contaminación o como precursores de problemas ambientales (polución de aguas, daño en vegetación y emisión de gases, Zamorano *et al.*, 2007). Estos residuos podrían ser mejor aprovechados como fuente de extractos, fracciones o compuestos con algún tipo de actividad biológica o aplicación industrial, por ejemplo la actividad antioxidante (AA) en alimentos y/o en organismos vivos, ésto propiciaría el desarrollo de nuevos productos naturales, además de proporcionar un valor agregado a sus frutos, fortaleciendo así sus cadenas productivas.

En las últimas décadas se han reportado en la literatura diferentes propiedades asociadas a extractos, fracciones y compuestos obtenidos a partir de residuos frutícolas. Las investigaciones han estado centradas principalmente en el aprovechamiento de éstos en la medicina, la farmacéutica y la industria de los alimentos. Como antecedente del potencial de dichos residuos, es de resaltar algunos estudios particulares: los extractos acuosos de las semillas de durazno blanco (*Prunus persica* L.) son útiles en el tratamiento de desordenes degenerativos como la hipermenorrea y la dismenorrea (Kim et al., 2003), extractos etanólicos de las semillas de feijoa (*Feijoa sellowiana*) poseen actividad antibacterial sobre bacterias Gram. positivas y Gram. negativas (Basile et al., 1997), extractos metanólicos y acuosos obtenidos de las semillas de mango (*Mangifera indica*) poseen actividad antidiarreica probada en diferentes animales (Sairam et al., 2003; Tona et al., 1998); extractos acuosos de las semillas de papaya (*Carica papaya*) poseen actividad frente a amebas (Tona et al., 1998). Se ha evidenciado que extractos acuosos de la cubierta de las semillas de tamarindo (*Tamarindus indica*) poseen un efecto reductor en los niveles de glucosa en ratones con diabetes (Maiti et al., 2004). Por otra parte, alquifuranos presentes en las semillas de aguacate (*Persea americana* Mill.) han presentado actividad insecticida (Rodriguez-Saona et al., 2000), las semillas de anón (*Annona squamosa*) tienen asociada actividad citotóxica sobre líneas celulares de próstata humana, al parecer dicha actividad es debida a la presencia de acetogeninas en sus extractos etanólicos (Hopp et al., 1996), éstos también han mostrado inhibición de la agregación plaquetaria, consecuencia de la presencia de diterpenos (Yang et al., 2002), la chirimoya (*Annona cherimola*) posee un heptapeptido cíclico con una fuerte actividad citotóxica (Wéle et al., 2004). Por su parte, el ácido caprílico se encuentra en cantidades considerables en las semillas de borraja (*Borago officinalis* L.), lo que hace a éstas una fuente potencial de dicho compuesto (Dauksas et al., 2002), la presencia de acetogeninas y monotetrahidrofuranos en las semillas de guanábana (*Annona muricata*) está asociada a la actividad antitumoral de sus extractos (Liaw et al., 2002), las semillas de limón (*Citrus limon*) posee cumarinas que han sido relacionadas con la inhibición de la producción *in Vitro* de superóxidos y óxido nítrico (Miyake et al., 1999), las semillas del mamey (*Mammea americana*) poseen una amplia actividad biológica, la cual se ha relacionado con la presencia de mammeacumarinas, entre las actividades estudiadas se tiene insecticida, anticancer, antioxidante, anti-VIH, antimicrobial, antibiótico, antibacterial (Yang et al., 2006).

En párrafos anteriores se hizo referencia al potencial de los residuos frutícolas como fuente de antioxidantes, al respecto, diferentes investigaciones han sido desarrolladas con el fin de conocer dicho potencial, éstas han sido enfocadas hacia la extracción, aislamiento y/o identificación de antioxidantes presentes en dichos residuos, a continuación se presentan algunos de los resultados más representativos obtenidos en estos trabajos: Uno de los residuos investigados ha sido las semillas de aguacate (*P. americana* Mill), al respecto se ha evidenciado que sus extractos metanólicos poseen capacidad reductora del ion  $Fe^{+3}$  (FRAP, por sus siglas en inglés *ferric reduction antioxidant potential*) y de neutralización del radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonato (ABTS<sup>•+</sup>), dicha actividad resultó ser superior a la observada para el mismo tipo de extracto obtenido a partir de la pulpa del fruto (Soong y Barlow, 2004). Las mammeacumarinas de las semillas de mamey han mostrado poseer una considerable capacidad de neutralización del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), particularmente cuando poseen grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7 (Yang *et al.*, 2005). Extractos metanólicos obtenidos a partir de las semillas de mamoncillo (*Dimocarpus longan* Lour) han mostrado poseer AA (FRAP y neutralización de DPPH) y un alto contenido total de fenoles, entre los que resaltan los ácidos gálico y elágico, varios galotaninos y elagitaninos (Zheng *et al.*, 2009; Soong y Barlow, 2006, 2005).

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los productos frutícolas más común en los países tropicales, cuyo consumo está asociado a diferentes propiedades alimenticias, medicinales y biológicas. Sus residuos (semillas y epicarpio) han sido objeto de estudio en el área de los antioxidantes; las semillas han demostrado ser una muy buena fuente de compuestos con capacidad reductora del  $Fe^{+3}$  y de neutralización de los radicales ABTS<sup>•+</sup> y DPPH, entre estos compuestos resaltan los ácidos tánico, gálico y elágico (Maisuthisakul y Gordon, 2009; Soong y Barlow, 2004, 2006). Por su parte el epicarpio de mango es fuente de diferentes flavonoides entre los cuales resaltan la quercetina, el kaemferol y la mangifera, este último presente también en pulpa y semillas. Estos compuestos, al igual que otros fenoles presentes en los extractos metanólicos de epicarpio de mango, han exhibido un buen potencial antioxidante evaluado frente al DPPH, comparable al observado para el antioxidante sintético BHA (Barreto *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008). El marañón (*Anacardium occidentale* L.) se caracteriza por poseer un fruto (nuez) y un seudofruto (manzana), los cuales son fuente de lípidos altamente

astringentes, gracias a su alto contenido de compuestos fenólicos. Si bien la nuez de marañón es aprovechada como fuente de diferentes productos industriales, la manzana es a menudo considerada un residuo (cuya producción mundial anual puede llegar a los 30 millones de toneladas), sin embargo, recientemente se ha encontrado que el epicarpio de éste posee un alto contenido de flavonoides y ácidos fenólicos (Michodjehoun-Mestres et al., 2009) con un potencial antioxidante (neutralización de ABTS<sup>+</sup> e inhibición de la degradación del  $\beta$ -caroteno) equivalente al observado para el BHA y el BHT (Kamath y Rajini, 2007). La nuez es fuente de los denominados ácidos anacárdicos los cuales han mostrado poseer un potente efecto inhibitor de la enzima xantina oxidasa, y por tanto de la formación de anión superóxido. Sin embargo, dichos ácidos han mostrado baja actividad frente a radicales como el DPPH (Kubo et al., 2006). Fracciones obtenidas a partir de la nuez han sido empleadas como antioxidantes en un aceite comestible sometido a oxidación acelerada (Gaitán et al., 2005).

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es uno de los frutos más consumidos en nuestro país, el procesamiento de su pulpa es fuente de un amplio número de productos alimenticios con alta demanda nacional y un potencial mercado internacional. Uno de los residuos de estos procesos son las semillas, en relación a éstas recientemente se ha demostrado que son una buena fuente de antioxidantes (activos frente al DPPH e inhibición de la degradación del  $\beta$ -caroteno), obteniéndose extractos empleando solventes orgánicos y dióxido de carbono supercrítico adicionado con cosolventes, esta última técnica mostró ser más selectiva y eficiente (Castro-Vargas et al., 2010, 2008). Fracciones de los antioxidantes de semillas de guayaba obtenidos empleando extracción supercrítica, han sido probadas en un aceite comestible sometido a oxidación acelerada, observándose un efecto protector superior al evidenciado para el BHT y el extracto crudo (Hernández-Acosta et al., 2011).

El maracuyá (*Passiflora edulis*), la piña (*Ananas comosus*) y la acerola (*Malpighia emarginata*) son frutos comúnmente empleados en la producción de conservas, jugos y mermeladas, los residuos de su procesamiento incluyen epicarpio, semillas y porciones de pulpa no solubles en agua. Un grupo de investigadores brasileros sometió estos residuos a extracción, con el fin de obtener antioxidantes a partir de los mismos. Esta investigación mostró que los residuos de acerola eran una buena fuente de extractos

activos frente DPPH y la inhibición de la peroxidación de lípidos, mientras que los correspondientes al maracuyá y piña presentaban una baja actividad (De Oliveira et al., 2009). Las diferentes partes del melón (*Cucumis melo* L.), hoja, tronco, fruto (pulpa, epicarpio y semillas) han sido sometidas a extracción con metanol, con el fin de obtener antioxidantes a partir de las mismas. En relación a los residuos generados por el consumo del fruto, se ha observado que sus extractos son una fuente minoritaria de compuestos fenólicos (en comparación a las otras partes como hojas, tronco y pulpa) con baja capacidad para neutralizar los radicales DPPH, hidroxilo y peroxilo (Ismail et al., 2009).

La bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) es un fruto originario del sureste de Asia, el cual posee una considerable similitud física y organoléptica a las diferentes especies de mora (*Rubus spp*) cultivadas en nuestro país. Recientemente se ha reportado un considerable incremento en su cultivo en Corea del Sur (de 70 a 913 ha entre los años 2001 a 2005), el cual ha sido estimulado en parte por las múltiples propiedades medicinales, asociadas al consumo del fruto y sus derivados. Uno de los productos derivados es el vino de bokbunja cuya producción genera un considerable volumen de residuos (semillas y pulpa, en promedio 14 y 6% del fruto fresco, respectivamente); investigadores coreanos exploraron la extracción de antioxidantes a partir de las semillas desechadas por industrias coreanas de vino, encontrando un potencial promisorio frente a radicales libres (DPPH, peróxido y superóxido) y protección de lípidos, dicha actividad fue comparada contra algunos antioxidantes naturales, como los ácidos tánico y cafeico y los flavonoides (+)-catequina y quercetina, observando un eficiencia similar (Ku y Mun, 2008).

Uno de los productos comerciales más consumido en el mundo es el jugo de naranja (*Citrus sinensis* L.), su industria procesa anualmente alrededor de 24 millones de toneladas de fruto, de las cuales un considerable porcentaje se convierte en residuos que incluyen epicarpio, semillas y albedo. En busca del aprovechamiento de estos residuos se han empleado diferentes metodologías de extracción (ultrasonido, soxhlet y maceración) con el fin de obtener compuestos fenólicos con potencial antioxidante a partir de dichos residuos. De los diferentes extractos obtenidos se ha observado que las fracciones más polares son eficientes como antioxidantes en particular por su alto

contenido de flavonoides y ácidos fenólicos (Khan et al., 2010; Guimarães et al., 2010; Anagnostopoulou et al., 2006).

Otro de los residuos frutícolas explorado como fuente de antioxidantes son las semillas de tamarindo (*Tamarindus indica* L.), específicamente la cubierta de dichas semillas. Estudios iniciales mostraron un alto contenido de flavanoles en extractos obtenidos empleando dióxido de carbono supercrítico adicionado con etanol, estos compuestos fueron asociados al efecto protector de la peroxidación de lípidos evidenciado para dichos extractos (Tsuda et al., 1995). Partiendo de este resultado, diferentes investigaciones han sido realizadas, las cuales han estado enfocadas hacia el aislamiento y elucidación estructural de los antioxidantes de tamarindo (Sudjaroen et al., 2005), optimización de su extracción supercrítica (Luengthanaphol et al., 2004), y evaluación de su AA por múltiples métodos (Siddhuraju, 2007). Las semillas de uva (*Vitis vinifera*) son uno de los residuos frutícolas más promisorios en la obtención de antioxidantes con fines prácticos (aditivos o suplementos alimenticios, medicinales y farmacéuticos), esto ha sido estimulado por un amplio número de investigaciones enfocadas hacia la extracción, caracterización y aplicación de los fenoles presentes en las mismas (De Rezende et al., 2009; Ghafoor et al., 2009; Karvela et al., 2009; Maier et al., 2009; Poudel et al., 2008; Rodríguez et al., 2006; Yilmaz y Toledo, 2006). Entre estos trabajos resaltan aquellos en los que se ha empleado como solvente de extracción dióxido de carbono supercrítico adicionado con cosolventes, gracias a la buena actividad de los extractos y selectividad del método (De Campos et al., 2008; Murga et al., 2002, 2000; Palma y Taylor, 1999). Como resultado de estos estudios, los extractos y fracciones de las semillas de uva son en la actualidad aplicados y comercializados como conservantes y suplementos alimenticios.

Muchos otros residuos frutícolas han sido sometidos a investigación como fuente de antioxidantes, en el caso particular de los residuos frutícolas generados en nuestro país, Contreras y colaboradores (2011) llevaron a cabo una investigación acerca del potencial como fuente de antioxidantes de 24 frutos exóticos colombianos (caimo, aguaje, algarrobo, corozo, arazá, arrayana, curuba criolla y quiteña, borojo, guayaba criolla y manzana, marañón, cajúa, zapote costeño, copoasú, badea, macadamia, babaco, lulo, cocona, pera, chontaduro, umarí y ubos). La capacidad para reducir el ion  $Fe^{+3}$  y



neutralizar el radical ABTS<sup>•+</sup> de extractos metanólicos obtenidos a partir de dichos residuos fue evaluada, observándose los mejores resultados para las semillas de marañón, algarrobo y arazá, y el epicarpio de zapote costeño y algarrobo.

Estos antecedentes proporcionan un panorama relativamente amplio acerca del potencial de los residuos frutícolas como fuente de compuestos con actividad biológica, particularmente AA. Adicionalmente proporciona perspectivas sobre el aprovechamiento de nuestros residuos y su posible impacto sobre sus cadenas productivas, al proporcionarles un valor agregado. Sin embargo, sugieren el desarrollo de investigaciones más profundas acerca del potencial de dichos residuos, sus extractos, fracciones o compuestos en sistemas de mayor complejidad, tales como aceites comestibles, emulsiones, productos cárnicos, células, organismos vivos, entre otros, a fin de conocer la viabilidad de su aplicación en los mismos.

## 1.2 Bases teóricas

En los últimos años se han empleado fluidos supercríticos (FS) en la obtención de extractos a partir de diferentes matrices, muchas de estas extracciones han sido enfocadas a la obtención de extractos con potencial biológico o con propiedades aprovechables en el campo de los alimentos. Por tal razón las bases teóricas de este proyecto están enfocadas a la extracción con fluidos supercríticos (EFS), los antioxidantes y su actividad. Estas bases son fundamentadas en la experiencia adquirida por nuestro grupo de investigación, "*Estudio de los Cambio Químicos y Bioquímicos de los Alimentos Frescos y Procesados*", en la aplicación de la extracción con fluidos supercríticos a diferentes materiales vegetales.

### 1.2.1 Extracción con fluidos supercríticos

La capacidad de los fluidos supercríticos (FS) para solubilizar sustancias químicas fue reportada por primera vez en 1879 en una reunión de la Royal Society of Chemistry de Londres, Hannay y Hogarth indicaron que algunas sales inorgánicas ( $\text{CoCl}_2$ , KCl y KBr) se disolvían en etanol a altas temperaturas, superiores a su temperatura crítica (234 °C). Adicional a esto, observaron que el aumento o disminución de la presión causaba variaciones en la solubilidad de los compuestos (Hannay, 1880; Hannay y Hogarth, 1879). Los resultados presentados por Hannay y Hogarth fueron cuestionados y

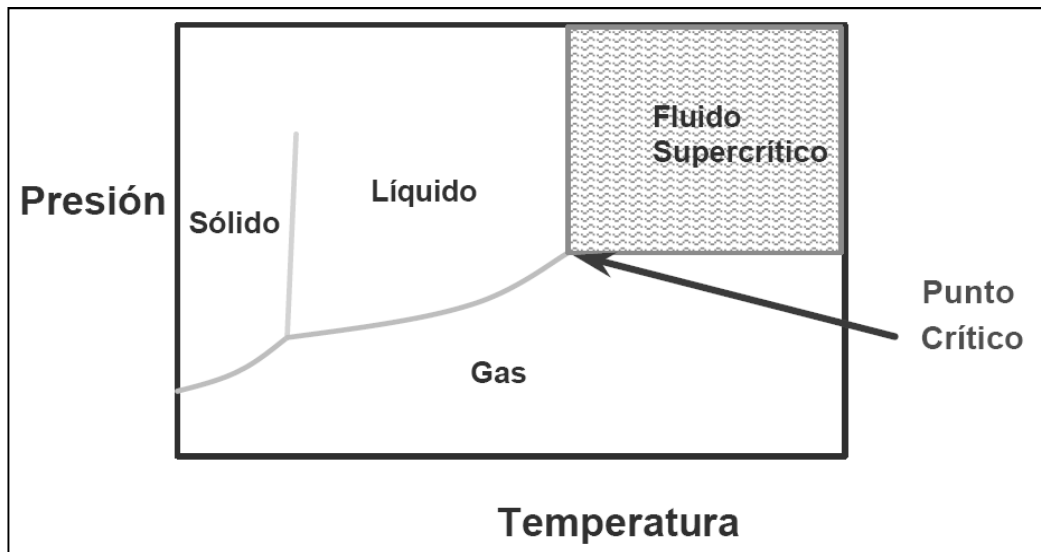
comprobados por varios investigadores de la época (Ramsay, 1880), ésto estimulo el interés en el estudio de las sustancias químicas a altas temperaturas y presiones, al igual que su uso como solventes, reportándose diferentes estudios de solubilidad de compuestos orgánicos en metano, etileno, CO<sub>2</sub> y óxido nitroso supercríticos (Villard, 1888).

La etapa siguiente en el estudio de las propiedades de los *FS* como solventes, consistió en observar el efecto sobre la solubilidad, de variables como la temperatura y presión, esto se llevó a cabo con sistemas binarios como naftaleno-etileno, naftaleno-etano y naftaleno-CO<sub>2</sub> (Prins, 1915; Büchner, 1906). Posteriormente, Scheffer y sus colaboradores de la "Technical University of Delft", abordaron el estudio del comportamiento de fases del sistema naftaleno-etileno, estos trabajos abrieron paso a un amplio número de publicaciones enfocadas hacia la solubilidad del naftaleno en diferentes solventes supercríticos (Diepen y Scheffer, 1948), las cuales continuaron hasta finales de 1980 (McHugh y Paulaitis, 1988; McHugh et al., 1988). Estos y otros estudios, permitieron a los investigadores obtener datos concretos acerca de la solubilidad de diferentes compuestos en solventes supercríticos, particularmente CO<sub>2</sub> supercrítico (CO<sub>2</sub> SC), facilitando la construcción de isotermas de solubilidad en función de la presión (Modell et al., 1979).

A pesar de tener un considerable referente acerca de la capacidad de los *FS* como solventes, su aplicación en la preparación de muestras y/o obtención de extractos solo se inicio hasta 1960; en 1969 investigadores del Max Planck Institute de Kohlemforschung mostraban las potenciales aplicaciones industriales de la *EFS*, de forma tal que en 1970 el CO<sub>2</sub> SC era empleado en el aislamiento de productos naturales, aunque en pequeña escala (Grandison y Lewis, 1996). Para la década de los 80 el interés en reducir el efecto del uso de solventes orgánicos sobre el medio ambiente (Ramsey et al., 2009), el desarrollo de sistemas de extracción más eficientes (Brunner, 2005) y el considerable aumento de aplicaciones a escala analítica e industrial (particularmente en la década de 1990) estimuló el uso de la extracción con CO<sub>2</sub> SC, lo cual se ve reflejado en la gran cantidad de publicaciones existentes actualmente, haciendo de la *EFS* una técnica de extracción ampliamente aceptada y usada en muchas áreas.

### ▪ *Definición y propiedades de un fluido supercrítico*

Al observar el diagrama de fases de una sustancia pura (figura 1) se evidencian tres diferentes curvas, las cuales representan los estados de equilibrio de distintas fases, sólido-líquido, sólido-gas y líquido-gas, al igual que el punto de coexistencia de las tres fases (punto triple). Un examen más detallado de la curva de equilibrio líquido-gas, muestra que ésta finaliza en un punto denominado “punto crítico” (PC), a condiciones de temperatura y presión críticas ( $T_c$  y  $P_c$ ), por encima de este punto se considera que la sustancia se encuentra en estado supercrítico. Una sustancia química en el estado supercrítico, o *FS*, se caracteriza por ser altamente comprensible y comportarse como un gas denso (llena y toma la forma de su contenedor). No obstante, la densidad de los *FS* es distinta a la de un gas y relativamente cercana a la de un líquido, por tanto, posee poder disolvente. En términos generales un *FS* podría considerarse como un gas denso con poder disolvente o una condición de estado en la que la forma líquida y gaseosa son indistinguibles (Brunner, 1994; Luque de Castro et al., 1993).

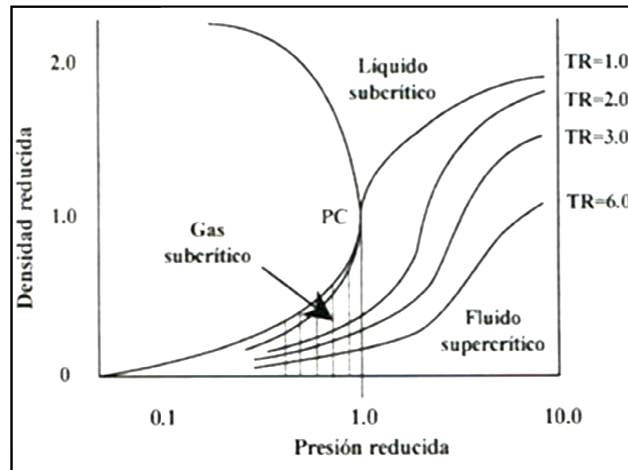


**Figura 1. Diagrama de fases de una sustancia pura.**

La región supercrítica se caracteriza por diferentes razones: una de éstas es el que sin importar cual grandes sean los aumentos de presión o de temperatura que se ejerzan sobre el *FS*, no será posible obtener su licuefacción o evaporación, según sea el caso, es decir no será posible obtener dos fases distinguibles. Otra característica importante involucra la posibilidad de modificar las propiedades físicas del *FS* en función de la

presión y la temperatura, lo cual es de gran utilidad particularmente en la EFS. Al respecto vale la pena resaltar algunas de las propiedades más importantes de los FS, su influencia en la EFS, y su modificación en función de la presión y temperatura.

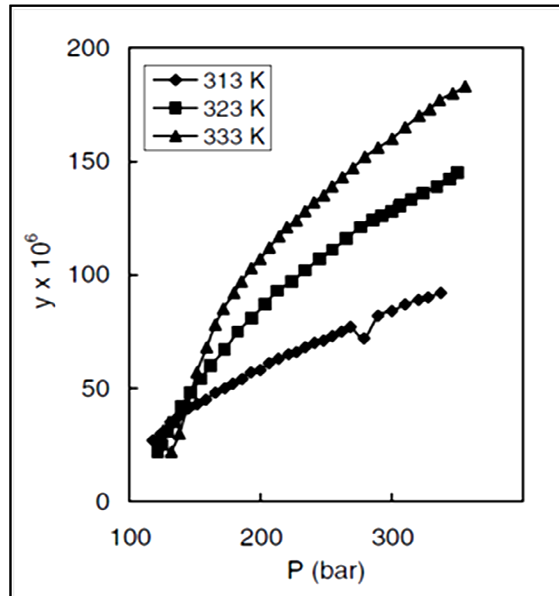
Una de las propiedades de los FS de particular importancia en la EFS es su densidad, ésta posee valores intermedios entre la de un líquido y la de un gas (0.1-0.8 g/mL), y está asociada a su poder disolvente. La densidad de un FS presenta gran dependencia respecto a la presión y temperatura; como se puede observar en la figura 2 para el CO<sub>2</sub> SC, un aumento en la presión (expresada como presión reducida  $P_R=P/P_c$ ), a temperatura constante, conduce a un incremento continuo no lineal en su densidad. Por su parte un incremento en la temperatura (temperatura reducida  $T_R = T/T_c$ ), a presión constante, genera una disminución en dicha propiedad. Un aspecto a resaltar es que el cambio en la densidad del FS a presiones y temperaturas cercanas o iguales a  $P_c$  y  $T_c$ , es considerablemente pronunciado, por tanto su efecto sobre la solubilidad de los solutos será en una magnitud similar. Este efecto es producto de la alta compresibilidad del FS en las cercanías al PC, la cual tiende a infinito en  $P_c$  y  $T_c$  (Mukhopadhyay, 2000; Luque de Castro *et al.*,1993).



**Figura 2. Isotermas de densidad-presión reducida para el CO<sub>2</sub> supercrítico.**

El poder disolvente de un FS depende en gran medida de su densidad, debido a que las interacciones soluto-solvente son considerablemente influenciadas por dicha propiedad, aunque el conocimiento actual sobre las interacciones soluto-solvente para un solvente

supercrítico es limitado. La variación de la densidad de un *FS* en función de la presión, la temperatura, o ambas conduce a una variación en la solubilidad de los solutos en el *FS*. En la figura 3 se presentan las isotermas de solubilidad para antraceno en  $\text{CO}_2$  SC (Gupta y Shim, 2007; Anitescu y Tavlarides, 1997), en estas se observa que a mayor presión mayor solubilidad del antraceno, mientras que el incremento de la temperatura, a presiones inferiores de 150 bar, disminuye la solubilidad. Sin embargo, para presiones mayores a 150 bar el incremento de la temperatura favorece la solubilidad del soluto, lo que genera un entrecruzamiento de las isotermas. Este efecto es debido al incremento en la presión de vapor de los solutos al aumentar la temperatura y es conocido como fenómeno de entrecruzamiento (Brunner, 1994; Mukhopadhyay, 2000; Luque de Castro *et al.*,1993).



**Figura 3. Isotermas de solubilidad de antraceno en  $\text{CO}_2$  supercrítico.**

Por otra parte, la difusividad de un soluto en un *FS* es muy cercana a la que éstos poseen en un gas y considerablemente mayor a la observada en un líquido (figura 4), esto es importante en la *EFS* ya que favorece los diferentes procesos de transferencia de masa en y hacia el *FS*. Esta propiedad es afectada por los cambios de presión y temperatura ejercidos sobre el *FS*, un incremento en la presión disminuye la difusividad, mientras que el aumento de temperatura la incrementa. Al igual que la densidad, la difusividad de un soluto en un *FS* presenta cambios drásticos al modificar la presión y/o temperatura en cercanías al PC, consecuencia de la alta compresibilidad del *FS*.

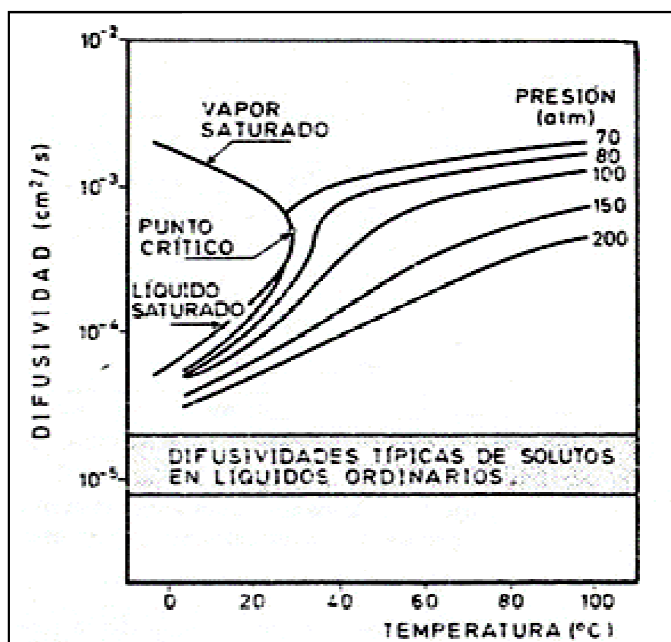
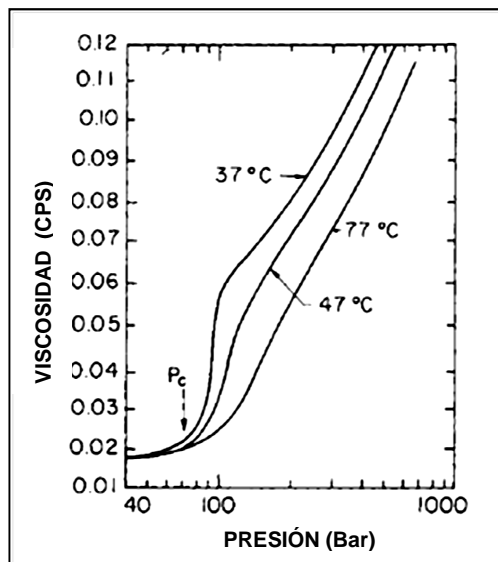


Figura 4. Variación de difusividad en CO<sub>2</sub> en función de la temperatura.

La viscosidad de un fluido supercrítico (Figura 5), se ve afectada por los cambios de presión y temperatura de forma similar como se describió para la densidad; el incremento en la presión conduce a un incremento en la viscosidad, mientras que el aumento en la temperatura la disminuye. La viscosidad de un *FS* está relacionada inversamente con la difusividad, por tanto, es de esperarse que el incremento en la viscosidad genere una disminución en la transferencia de masa desde la matriz sólida. Esto es de particular importancia en la *EFS*, especialmente cuando los solutos de interés presentan baja disponibilidad, ya sea porque están en los poros de la matriz sólida y/o dentro de las estructuras celulares. Al igual que la densidad y la difusividad, los cambios en la viscosidad de un *FS* son altamente sensibles a pequeñas variaciones en presión y temperatura en cercanías al PC.



**Figura 5. Variación de viscosidad de CO<sub>2</sub> en función de la presión.**

Una de las propiedades más importantes para predecir la solubilidad de un soluto en un disolvente es la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ), en el caso de los *FS* esto no es una excepción. Al igual que las propiedades antes descritas, la  $\epsilon$  de un *FS* varía en función de la presión y temperatura; en el caso del CO<sub>2</sub> SC (figura 6) el incremento en la presión (densidad), a temperatura constante, aumenta ligeramente  $\epsilon$ , lo que permite la extracción de compuestos ligeramente polares (Luque de Castro y Tena, 1996). Sin embargo, a pesar del incremento que pueda tener la  $\epsilon$  de este *FS*, dicho aumento no es suficiente para permitirle extraer compuestos polares. Un caso particular es el observado para el agua, a condiciones ambientales este disolvente posee una alta  $\epsilon$  y es adecuado para extraer compuestos polares, sin embargo, en condiciones cercanas al PC su  $\epsilon$  disminuye considerablemente, a tal punto de permitirle solubilizar compuestos orgánicos de baja polaridad. Esta reducción en la  $\epsilon$  del agua es debida principalmente a la disminución del grado de polarización que este solvente presenta a altas temperaturas, similares a las requeridas para alcanzar su PC (Shaw et al., 1991).

La *EFS* es una técnica que recurre a las diferentes propiedades de los *FS* con el fin de darles uso como disolventes; aunque cualquier *FS* puede emplearse en la *EFS* solo algunos poseen las características más idóneas para su uso como solventes, particularmente en la extracción de solutos con actividad biológica o con aplicación en alimentos. Teniendo en cuenta esto, a continuación se describen algunos *FS* empleados en la *EFS*, haciendo énfasis en aquellos más usados y algunas aplicaciones específicas.

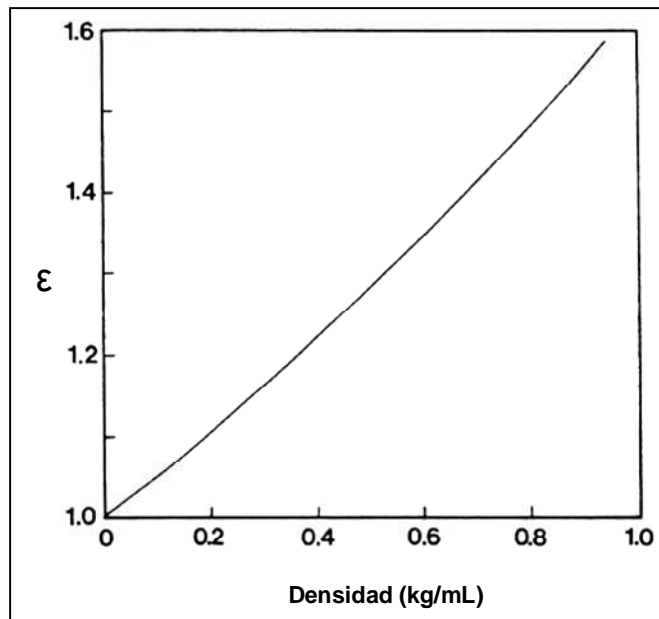


Figura 6. Variación de la constante dieléctrica del CO<sub>2</sub> supercrítico en función de la densidad.

#### ▪ Fluidos supercríticos usados en la EFS

En principio cualquier sustancia química puede ser usada como solvente en EFS, sin embargo, la elección del FS generalmente involucra algunas características consideradas ideales o adecuadas para obtener el mejor comportamiento como disolvente durante el proceso de extracción, entre estas características se tiene:

- ✓ Capacidad solvente alta
- ✓ Selectividad ajustable
- ✓ Químicamente inerte
- ✓ No inflamable
- ✓ No tóxico
- ✓ No corrosivo
- ✓ Condiciones críticas moderadas y asequibles
- ✓ Bajo precio y de fácil consecución
- ✓ Alta pureza
- ✓ Fácil remoción del extracto
- ✓ Compatibilidad con métodos acoplados



Es evidente que las diferentes sustancias químicas disponibles como *FS* no poseen todas estas características, por tal motivo la elección del fluido debe llevarse a cabo buscando aquel que posea la mayoría de estas propiedades, este hecho reduce el número de sustancias con potencial aplicación como solventes en *EFS*. En la tabla 1 se indican algunas de las sustancias químicas que han sido empleadas en la *EFS*, con sus respectivas  $T_c$  y  $P_c$ ; el metanol supercrítico ha llegado a ser muy eficiente en la extracción de plaguicidas (Capriel et al., 1986), al igual que el monóxido de dinitrógeno y el Freon-22 (Ashraf-Khorassani et al., 1997; Hawthorne et al., 1992), este último también empleado en la extracción de metabolitos presentes en cortezas de plantas (Sánchez y Bursey, 2002). Sin embargo, la toxicidad y los efectos que generan sobre el medio ambiente son considerables, lo cual limita su uso a casos particulares. El amoníaco ha sido empleado en la extracción de metabolitos radiomarcados presentes en tejidos de ratones sometidos a pruebas médicas (Jacobson et al., 1997), aunque su uso es muy limitado debido a su alta reactividad. El etano ha tenido un mayor espectro de aplicación como solvente en *EFS*, sus condiciones supercríticas moderadas han permitido emplearlo en la extracción de aditivos alimenticios minimizando su degradación térmica y oxidativa (Espinosa et al., 2008), algunos de estos aditivos incluyen aceite de cascara de naranja (*Citrus sinensis*) (Raeissi et al., 2008), grasa de granos de cacao (*Theobroma cacao*) (Saldaña et al., 2002; Mohamed et al., 2002) y semillas de copoazu (*Theobroma grandiflorum*) (Azevedo et al., 2003), extracción de colesterol en grasas animales (Mohamed et al., 2000) y fraccionamiento de bitumen (Rose et al., 2001; 2000). No obstante, el etano es altamente inflamable, lo cual limita su uso a condiciones libre comburentes. El agua supercrítica es uno de los *FS* más empleados en procesos que involucran reacciones químicas, sin embargo, su aplicación a la *EFS* está restringida por la estabilidad térmica de los analitos a extraer. A pesar de esto, dicho *FS* posee actualmente importantes aplicaciones en la obtención de productos con actividad biológica y aplicación en alimentos. Al respecto, Herrero y colaboradores (2006) presentaron una amplia revisión sobre la obtención de ingredientes funcionales a partir de diferentes fuentes naturales empleando como solvente agua supercrítica. Adicional a esto, dicho *FS* ha sido empleado en la extracción de compuestos bioactivos como ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 (Herrero et al., 2013). Otras aplicaciones han sido la extracción de compuestos con actividad biológica a partir de hojas de girasol (*Helianthus annuus* L.) (Casas et al., 2008) y aceite de matrices vegetales (Meng et al., 2006; Hu et al., 1999; Harfi et al., 1999).

**Tabla 1. Presión y temperatura críticas de sustancias empleadas en EFS.**

Sustancia	T <sub>c</sub> (°C)	P <sub>c</sub> (atm)
Xenón	16.6	57.6
Triclorometano	25,9	46.9
Clorotrifluorometano	28.8	38.7
Dióxido de carbono	31.1	72.9
Monóxido de dinitrogeno	36.5	71.7
Clorodifluorometano	96.4	48.5
Etano	32.3	47.6
Propano	96.8	42.4
Amoniaco	132.4	111.3
Triclorofluorometano	196.6	43.5
Agua	374.2	217.7

El CO<sub>2</sub> es el solvente más usado en EFS debido a que éste no es inflamable, tóxico o corrosivo, sus condiciones supercríticas son moderadas (P<sub>c</sub>=73.9 atm y T<sub>c</sub>=31.1°C), es relativamente económico y fácil de adquirir, no produce contaminación ambiental (particularmente cuando es recirculado), es un gas a condiciones ambientales (lo que permite obtener extractos libres de solvente), se puede acoplar a métodos de separación e identificación y puede llegar a ser un solvente muy selectivo.

Una de las desventajas del CO<sub>2</sub> es su baja polaridad, la cual limita su uso a la extracción de solutos de baja polaridad y no polares, afortunadamente esta falencia puede ser solucionada de varias formas (Luque de Castro y Tena, 1996). Una de éstas, es el uso de un cosolvente o modificador, el cual ayuda a solubilizar aquellos solutos de polaridad media que son poco solubles o insolubles en CO<sub>2</sub> SC. El cosolvente es un solvente orgánico de volatilidad intermedia entre el soluto y el CO<sub>2</sub>, que adicionado en pequeñas concentraciones favorece las interacciones polares (puentes de hidrogeno e interacciones dipolo-dipolo), lo cual permite remover los solutos polares de los sitios activos en la matriz de la muestra (Mukhopadhyay, 2000). La elección del modificador depende del tipo de compuestos a extraer, de la matriz en análisis y el objetivo de la extracción. En la extracción de plaguicidas es común usar como cosolvente metanol, acetona, acetato de etilo, tolueno, entre otros (Hercegová et al., 2007; Yang et al., 1995), mientras que el etanol es el cosolvente más usado en la obtención de antioxidantes (Lee et al., 2010; Fu et al., 2009; Vatai et al., 2009; Castro-Vargas et al., 2010, 2008; Braga et

al., 2008; Sarmiento et al., 2008; Good et al., 2007), carotenos (Macías-Sánchez et al., 2009; Vaughn et al., 2008; Şanal et al., 2005), aceites (Hamdan et al., 2008; Salgın et al., 2007), y compuestos con actividad biológica (Tzeng et al., 2007; Liu et al., 2006). El propanol y acetato de etilo son empleados en menor proporción como cosolventes, particularmente en la obtención de antioxidantes y otros compuestos con actividad biológica (Castro-Vargas et al., 2010; Chen et al., 2009; Yang et al., 2007)

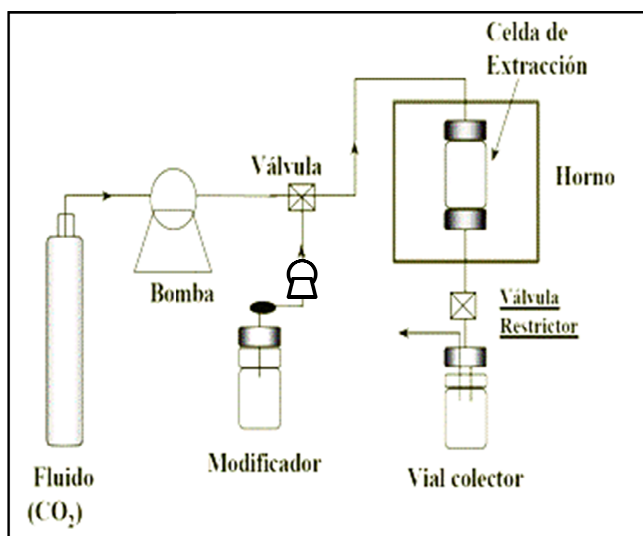
Otra estrategia empleada en la extracción de compuestos polares o iónicos con CO<sub>2</sub> SC consiste en la formación de pares iónicos. En ésta se emplean contraiones de baja polaridad tales como alquilsulfonatos, bencenosulfonatos, sales de alquilamonio cuaternarias, entre otros, los cuales se enlazan a los solutos iónicos o polares favoreciendo su extracción con CO<sub>2</sub> SC. El uso de pares iónicos ha tenido una amplia aplicación en áreas como la farmacéutica (Eckard y Taylor, 1997; Suto et al., 1997), en la recuperación de metales pesados (Wang et al., 1994; Gawenis et al., 2001) y el análisis de detergentes (Field et al., 1992). Otra opción para la extracción de compuestos iónicos empleando CO<sub>2</sub> SC, consiste en la formación de complejos con ligandos de baja polaridad (Wang y Marshall, 1994; Laint y Wai, 1992).

### ▪ *Instrumentación empleada en la EFS*

Un sistema de *EFS* consta de algunos componentes básicos (figura 7): Un reservorio del fluido, un sistema de presurización-impulsión del *FS* (compresor o bomba), una columna o celda de extracción (extractor), sistemas de calentamiento y/o enfriamiento, un mecanismo de separación *FS*-solutos (separador, restrictor o válvula) y un sistema de recolección de muestra. Opcionalmente, cuando el uso de cosolvente o modificador sea necesario se requerirá una bomba adicional y una válvula o punto de mezclado con *FS*. A continuación se realiza una breve descripción de los componentes básicos de un sistema *EFS* y sus posibles modificaciones.

El sistema de presurización-impulsión puede ser un compresor de gases o bomba impulsora de líquidos, éstos deben proporcionarle al fluido la presión deseada (crítica o superior), además de un flujo constante y libre de pulsos. Los sistemas más comunes son compresores de membrana, bombas neumáticas y bombas empleadas en cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Por su parte, la celda de extracción debe

ser un recipiente de dimensiones adecuadas, resistente a las altas presiones y químicamente inerte. Ésta deberá estar termostataada con el fin de mantener la temperatura de extracción constante.



**Figura 7. Esquema general de un sistema de EFS.**

En relación a la separación del *FS*-solutos, este proceso se puede llevar a cabo empleando diferentes mecanismos. El más sencillo de éstos implica el uso de restrictores, los cuales son tubos largos de diámetro reducido, a través de los cuales se desplaza la mezcla *FS*-solutos. Éstos pueden presentar diferentes diámetros, longitudes y formas, las cuales dependen de las características del extracto, temperatura de trabajo, flujo y tipo de fluido (Vejrosta et al., 1999; Burford et al., 1996; Yang et al., 1995). Generalmente los restrictores son calentados durante su operación, lo que favorece la separación del *FS*-solutos y minimiza su taponamiento. Muchos sistemas *EFS* usan en la separación del *FS*-solutos recipientes denominados separadores, en los que el *FS* puede adquirir condiciones de presión y temperatura diferentes a las que posee en la celda de extracción, permitiendo que la totalidad o parte de los solutos del extracto sean separados. Esta modalidad permite realizar el fraccionamiento de los extractos obtenidos al emplear dos o más separadores en los que el *FS* presenta diferente densidad. Otro mecanismo empleado en la separación del *FS*-solutos está asociado con el uso de válvulas micrométricas, las cuales permiten el flujo continuo de *FS* a través de la celda de extracción con caídas de presión bajas (inferior a 0.1 MPa). Los mecanismo de

separación citados hasta el momento se basan en la variación de la densidad del *FS*, sin embargo, otros mecanismos pueden ayudar en este proceso sin generar alteraciones considerables en dicha propiedad. Ese es el caso de los agentes separadores de masa, tales como adsorbentes, absorbentes y membranas, los cuales pueden retener los solutos separándolos del *FS* con cambios mínimos en su densidad, esto permite que el solvente sea recirculado nuevamente (Brunner, 1994).

Los avances en el diseño y construcción de sistemas de *EFS* (particularmente a escala de laboratorio) ha permitido su acople con técnicas de análisis. Equipos de *EFS* han sido acoplados a cromatógrafos de gases por medio de trampas térmicas ubicadas en la cabeza de la columna, en las que los solutos son atrapados por reducción en la temperatura (figura 8). Una vez retenidos se procede a calentar y permitir el paso de los mismos al interior de la columna (Fuoco et al., 1997; Wright et al., 1987).

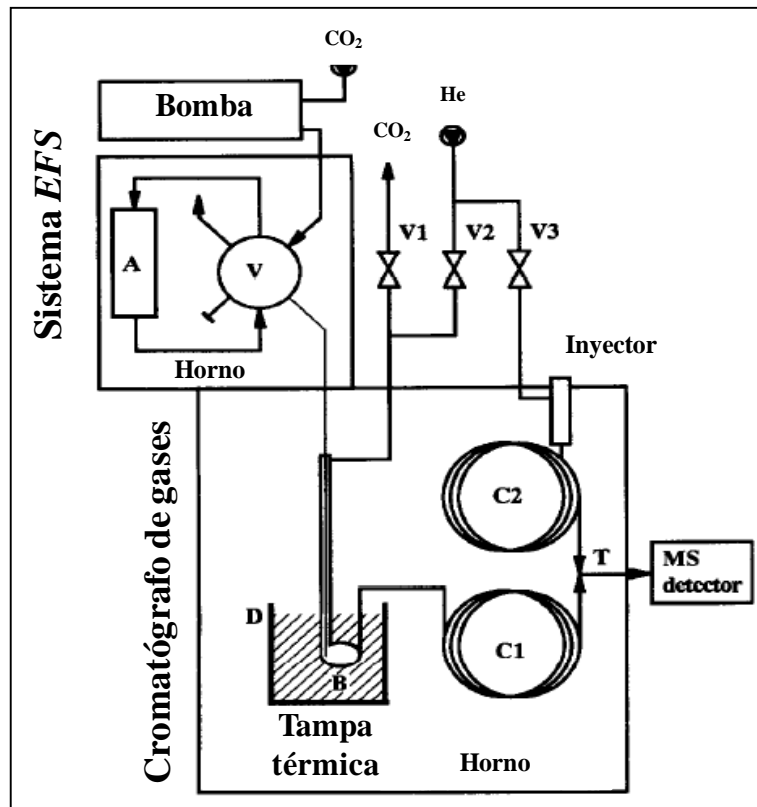


Figura 8. Esquema del sistema de *EFS* acoplado a cromatografía de gases.

Los sistemas *EFS* también han sido acoplados a equipos de CLAE, uno de los tipos de interface empleados han sido válvulas de tres posiciones y seis vías (el numero de

posiciones y vías puede variar dependiendo de la complejidad en la configuración del sistema), las cuales se configuran para conectar en línea del sistema *EFS* a una trampa de fase sólida en la cual los analitos son retenidos (modo carga en la figura 9). Posteriormente, se cambia de posición la válvula permitiendo el paso de la fase móvil a través de la trampa, llevando los analitos hacia la columna del cromatógrafo (modo inyección en la figura 9). Otro tipo de interface emplea fibras de microextracción en fase sólida éstas son conectadas a las válvulas de múltiples posiciones y vías (Salleh et al., 2001), una vez atrapados los analitos se realiza una desorción térmica de los mismos.

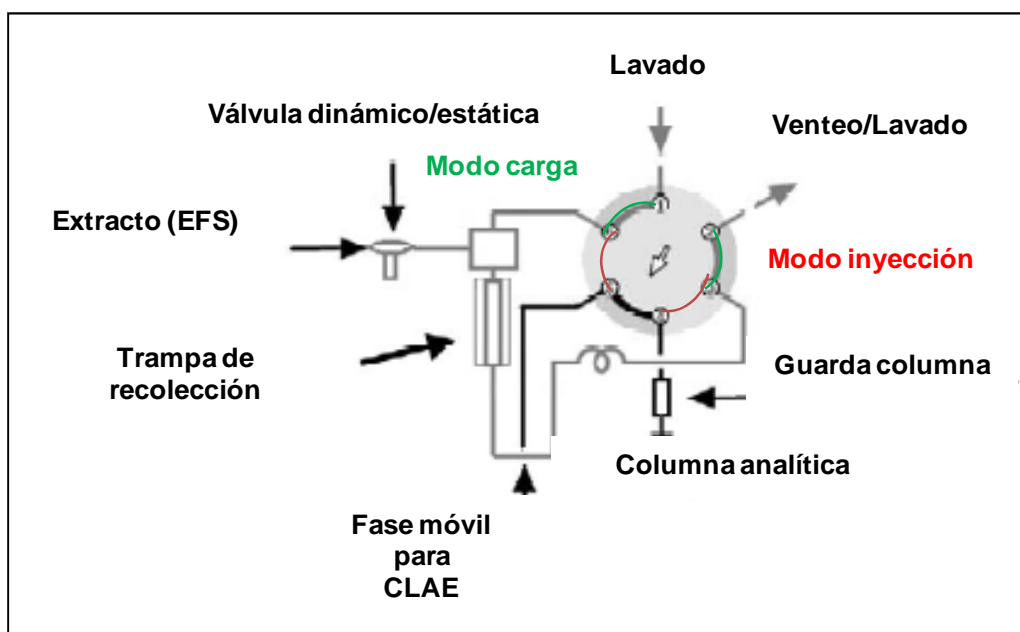


Figura 9. Esquema del acople *EFS-CLAE*.

Para determinar la finalización del proceso de extracción es la detección han desarrollado acoples de la *EFS* con técnicas de detección como espectroscopia de infrarojo con transformada de Fourier (Ziémons et al., 2007; Kirschner y Taylor, 1993) y resonancia magnética nuclear (Albert, 1995). En estos acoples se realiza seguimiento a una o algunas señales específicas y representativas de los compuestos de interés, la variación en la intensidad de dicha señal respecto al tiempo permite determinar el final de proceso de extracción.

### ▪ *Principios de EFS*

El proceso *EFS* a partir de una matriz sólida ocurre en dos etapas principales; solubilización del soluto (o solutos) y separación de la mezcla *FS*-solutos. En la primera parte el *FS* pasa a través de la celda de extracción, la cual contiene un lecho fijo de partículas sólidas, llevando a cabo la solubilización de los solutos. El agotamiento de éstos ocurre en la dirección del flujo, al igual que el incremento de su concentración en el *FS*. La mezcla sale de la celda de extracción dando lugar a la separación *FS*-solutos por algunos de los mecanismos indicados en la anterior sección, el extracto es entonces recuperado (Brunner, 1994, Reverchon y De Marco, 2006).

Como se indicó previamente, la *EFS* hace uso de las propiedades de los *FS* con el fin de solubilizar y transportar los solutos. Los principales factores que afectan la *EFS* son el poder solvatante, la selectividad, la distribución de los solutos en la matriz sólida y su difusión. La resistencia a la transferencia de masa desde el interior de las partículas sólidas es, en la mayoría de los casos, dominante en la *EFS*. Para reducir la resistencia y mejorar el rendimiento de extracción, el tamaño de partícula puede ser reducido, esto disminuye la distancia a recorrer por los solutos a través de la partícula, favorece la exposición de los solutos e incrementa el área superficial (la interfase *FS*-sólido) (Brunner 1994). No obstante, la reducción del tamaño de partícula no puede ser indefinida, debido a que tamaños de partícula muy pequeños puede formar aglomerados e interrumpir el paso del *FS*, induciendo caminos preferenciales de extracción.

Brunner (1994) describe el proceso de *EFS* a partir de un material vegetal sólido en cinco etapas paralelas y consecutivas:

1. La matriz adsorbe el *FS* y otros fluidos adicionados para influenciar el proceso de extracción. Las estructuras celulares se hinchan, las membranas y canales celulares se dilatan, lo cual disminuye la resistencia a la transferencia de masa.
2. En paralelo, los solutos del extracto son disueltos por el *FS*.
3. Los solutos disueltos son transportados a la superficie del sólido. En esta etapa el proceso difusivo es dominante.
4. Los solutos alcanzan la superficie externa de la partícula.

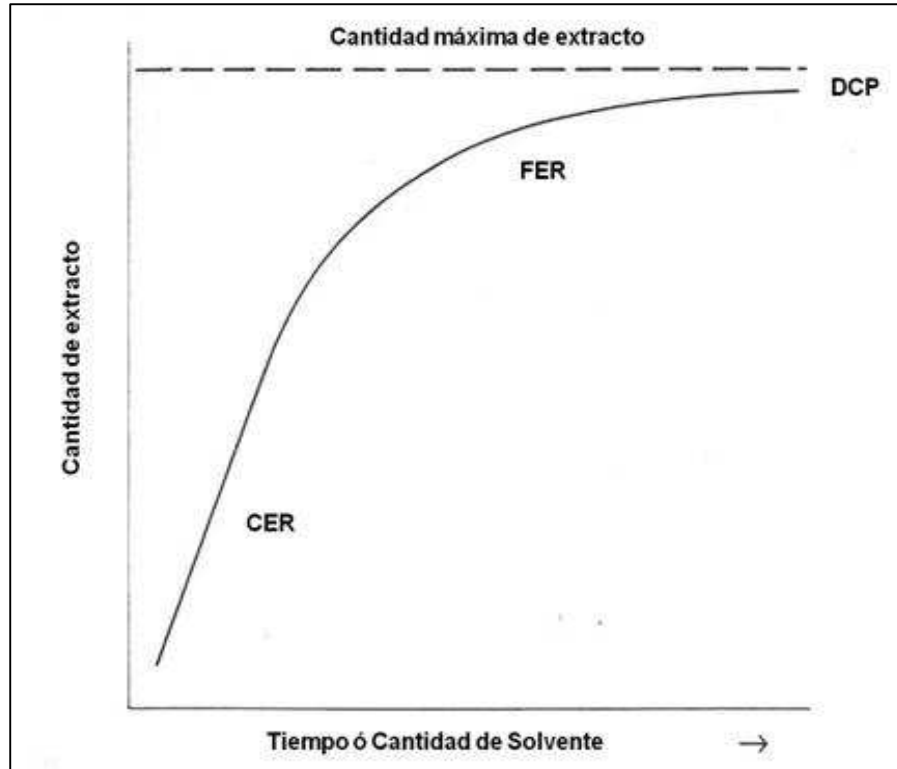
5. Los solutos son transportados de la superficie externa de la partícula hacia el *FS* y subsecuentemente removidos del material sólido.

Cuando el lecho fijo de partículas está en contacto con un flujo de *FS*, los mecanismos de transporte de masa involucran la difusión y adsorción del *FS*, seguido por la desorción de los solutos, difusión por el sólido y transporte convectivo a través del lecho de partículas. El principal factor es la distribución inicial de los solutos en la matriz sólida; estos pueden estar adsorbidos sobre las partículas, en el interior de los poros o en el interior de las células, cada una de estas ubicaciones influencia el curso de la *EFS* (Brunner, 1994). El proceso de difusión de los solutos a través del sólido es el más prolongado, mientras que la transferencia de masa desde la superficie de las partículas es rápida y depende de la solubilidad del soluto en el *FS*.

El desarrollo de la *EFS* se puede seguir por medio de las curvas de extracción (figura 10), éstas ayudan a definir parámetros importantes del proceso, tales como el volumen de la celda de extracción, flujo de *FS* y tiempo de extracción. Esto es posible, gracias al conocimiento termodinámico (solubilidad y selectividad) y cinético (transferencia de masa) del proceso. Las curvas de extracción pueden ser obtenidas al representar gráficamente la cantidad de extracto obtenida en función del tiempo o cantidad de *FS*, en general se considera que las curvas de extracción están divididas en tres partes (Brunner, 1994; Ferreira y Meireles, 2002):

1. Etapa de tasa constante de extracción (CER – Constant Extraction Rate), donde la superficie de las partículas están cubiertas de solutos y predomina la transferencia de masa por convección en la fase fluida.
2. Etapa de tasa de extracción decreciente (FER – Falling extraction rate), donde la velocidad del proceso es determinado por los procesos convectivos en la fase fluida y difusivos en la fase sólida.
3. Etapa difusional o de extracción nula (DCP – Diffusion-controlled period), donde la transferencia de masa es controlada principalmente por los procesos difusivos en el sólido.





**Figura 10. Curva genérica de extracción.**

La transición entre el periodo CER y el FER está influenciada por el tamaño de partícula, contenido inicial de solutos y la estructura celular del material vegetal. Partículas grandes generan un aumento de la etapa FER, mientras que partículas pequeñas disminuyen el tiempo del periodo CER. Cuando el material posee un alto contenido de solutos, el proceso se desarrolla principalmente a tasa constante, siendo el proceso controlado por la solubilidad de los solutos en el FS. Teniendo en cuenta esto, se evidencia que la cinética de transferencia de masa depende de cuánto, donde y como se encuentran los solutos en la matriz sólida, el mecanismo de separación y transporte, al igual que otros parámetros como presión, temperatura y flujo.

### ▪ *Aplicaciones de la EFS*

En las últimas décadas las aplicaciones de la EFS se han incrementado considerablemente, en la actualidad existe un amplio número de reportes de diferentes aplicaciones en campos como las ciencias farmacéuticas (Herrero et al., 2009; Martínez, 2008; Reverchon y De Marco, 2006; Bertucco y Vetter, 2001; Dean y Khundker, 1997; Karlsson et al., 1997), la industria alimenticia (Herrero et al., 2009, 2006; Martínez, 2008;

Velasco et al., 2007; Brunner, 2005;), la industria de cosméticos (Chester et al., 1996), los productos naturales (Herrero et al., 2009), investigaciones forenses y criminalística (Chester et al., 1996), plaguicidas (Sunarso y Ismadji, 2009; Hercegová et al., 2007; Anitescu y Tavlarides, 2006; Kreuzig et al., 2000; Janda et al., 1996), obtención de fragancias (Velasco et al., 2007; Chester et al., 1996), polímeros (Edward et al., 2009; Goodship y Ogur, 2004; Clifford et al., 1997), vitaminas (Luque-García y Luque de Castro, 2001; Turner et al., 2001), aceites (Reverchon y De Marco 2006; Mendes et al., 2005; Reverchon, 1997), y remoción de metales (Erkey, 2000; McHardy y Sawan, 1998), entre muchos otros.

La aplicación de la *EFS* a productos naturales ha contribuido al estudio diferentes plantas, al respecto, Castioni y colaboradores (1995) realizaron una amplia descripción de la aplicación de la *EFS* a la obtención de extractos y fracciones a partir de productos naturales, al igual que sus respectivas actividades. Otros investigadores como Queckenberg y Frahm (1994) se han dedicado al diseño y construcción de sistemas de *EFS* dirigidos a la obtención de fracciones a partir de plantas. La obtención de aceites esenciales y fracciones pesadas ha sido otro campo de investigación de la *EFS* en productos naturales (Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007; Reverchon, 1997; Simoes et al., 1995; Bicchi et al., 1993; Ahmad et al., 1994; Terauchi et al., 1993). Los productos naturales marinos también han sido explorados, empleando *EFS*; se han obtenido diferentes subproductos a partir de microalgas empleando CO<sub>2</sub> SC (Mendes et al., 2003). La lista de aplicaciones de la *EFS* a los productos naturales es larga, al igual que el número de investigadores que han hecho uso de la misma, en general la *EFS* ha sido empleada en la obtención de productos actividades como antioxidante, citotóxica, antitumoral, antimicrobial, anti-VIH, insecticida, antifungica, antiinflamatoria, tratamiento de la diabetes, entre muchas otras.

En relación a la aplicación de la *EFS* en la obtención de antioxidantes a partir de productos naturales se ha reportado estudios en matrices como germen de lotus (*Nelumbo nucifera*) (Li et al., 2009), hojas de guandul o frijol de palo (*Cajanus cajan*) (Kong et al., 2009), corteza de pino marítimo (*Pinus pinaster*) (Braga et al., 2008), diferentes tipos de algas y microalgas (Jaime et al., 2007; Hu et al., 2007; Herrero et al., 2006), hongos como el shiitake (*Lentinula edodes*) (Good et al., 2007), hojas de orégano

(*Origanum vulgare* L.) (Cavero et al., 2006), hojas de uchuva (*Physalis peruviana*) (Wu et al., 2006), semillas de sésamo negro (*Sesamum indicum* L.) (Hu et al., 2004), rizomas de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) (Braga et al., 2003; Leal et al., 2003), hojas y semillas de almendro (*Terminalia catappa*) (Ko et al., 2002), rizomas de jengibre (*Zingiber officinale*) (Leal et al., 2003; Zancan et al., 2002), hojas de cilantro (*Coriandrum sativum*) (Yepez et al., 2002). Dentro de este grupo de matrices naturales, también están los frutos y sus residuos, particularmente los de origen tropical tales como el marañón (*A. occidentale*) (Setianto et al., 2009), higos (*Opuntia dillenii* Haw) (Liu et al., 2009), cacao (*Theobroma cacao*) (Arlorio et al., 2005), albaricoque (*Prunus armeniaca*) (Döker et al., 2004) y los residuos frutícolas previamente citados, semillas de guayaba (Castro-Vargas et al., 2010, 2008; Hernández-Acosta et al., 2011), tamarindo (Luengthanaphol et al., 2004) y uva (De Campos et al., 2008; Murga et al., 2002, 2000; Palma y Taylor, 1999).

### 1.2.2 Antioxidantes y actividad antioxidante

Los procesos de oxidación son de vital importancia en los sistemas vivos y alimentos; en el primer caso son esenciales para el desarrollo y supervivencia de las células, en los alimentos hacen parte de sus procesos de evolución y degradación. Estos procesos son particularmente dependientes de la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, cuyo incremento y/o desbalance puede conducir al desarrollo de daños o cambios por oxidación. Cuando se produce un exceso *in vivo* de especies reactivas de oxígeno, éstas pueden saturar los sistemas enzimáticos encargados de regular sus niveles (como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa), causando daños y efectos letales sobre las células debido a la oxidación de biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN, entre otras). Al respecto es bien conocido que el daño sobre estos sustratos puede conducir al desarrollo de enfermedades tales como cáncer (Paz-Elizur et al., 2008), artritis (Colak, 2008), aterosclerosis (Naito et al., 2006), Parkinson (Heinecke, 1997), enfermedades coronarias (Arts et al., 2003; Błaszczuk et al., 2000; Heinecke, 1997), entre otras. En el caso de los alimentos, la oxidación puede conducir a cambios en su color, sabor, aroma y textura (Choe y Min, 2006; Colbert y Decker, 1991), propiciando su rancidez y pérdida de calidad nutricional, haciéndose inseguros para el consumidor (Shahidi et al., 1992).

Los mecanismos de defensa frente al daño de los agentes oxidantes, involucra la participación de sustancias químicas denominadas antioxidantes. Un antioxidante es una sustancia que estando presente en pequeñas concentraciones, en comparación al sustrato oxidable, previene o retrasa la oxidación del mismo (Halliwell y Gutteridge, 1995). La importancia de los antioxidantes radica en su uso para prevenir sus efectos sobre los sistemas biológicos o el hecho de emplearlos en la conservación de un sistema expuesto a procesos de oxidación (alimentos, fármacos, cosméticos, etc).

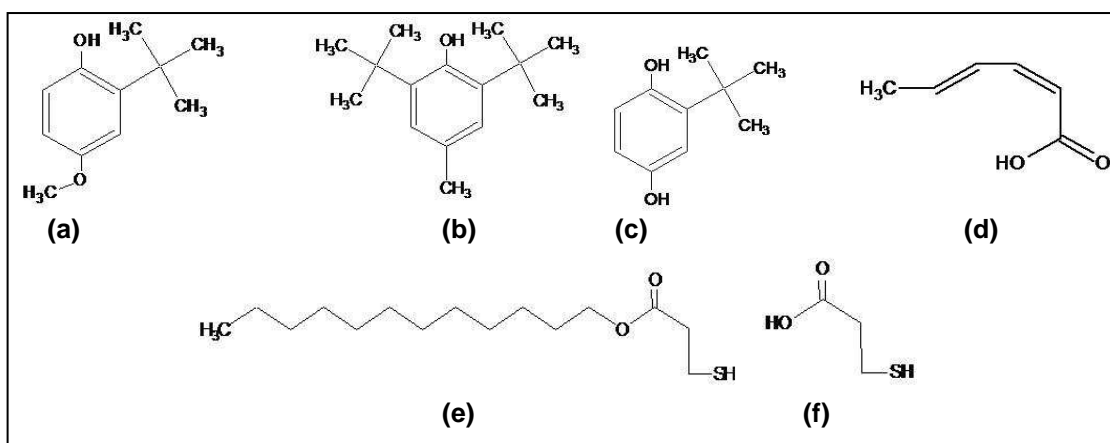
Al hacer referencia a los antioxidantes es ineludible discutir acerca de su actividad, entendida como su eficiencia o capacidad para prevenir, retardar o inhibir el desarrollo de procesos de oxidación y sus efectos. El comportamiento de un antioxidante frente a los procesos de oxidación determina su actividad, este comportamiento comúnmente es abordado desde una de dos grandes categorías, actividad en alimentos o bioactividad en organismos vivos (Antolovich et al., 2002). En el caso de los alimentos, el enfoque es hacia la eficiencia de los antioxidantes para protegerlos del daño oxidativo (Lindley, 1998), en el caso de la bioactividad, se hace referencia a la acción de los antioxidantes para retardar o inhibir el desarrollo del estrés oxidativo. Por otra parte, la AA de una determinada sustancia química se ve afectada por diferentes factores y es relativa al sistema en el que se esté desarrollando el proceso de oxidación. Por tanto, al hacer referencia a la AA, se debe tener en cuenta los procedimientos empíricos empleados para obtener información sobre esta propiedad y su extrapolación a sistemas que involucren alimentos u organismos vivos (Antolovich et al., 2002). Teniendo en cuenta lo antes indicado, a continuación se realiza una breve descripción sobre antioxidantes y su actividad, haciendo énfasis en los principales tipos de antioxidantes conocidos, sus mecanismos de acción y las metodologías para evaluar su AA.

#### ▪ *Antioxidantes sintéticos y de origen natural*

Los antioxidantes pueden ser divididos en dos grandes grupos según su origen, sintéticos y naturales; el primer grupo hace referencia a aquellos compuestos diseñados y obtenidos en el laboratorio, cuya estructura y reactividad proporciona la mayor AA posible al emplearlos en la conservación de sistemas susceptibles a la oxidación. Por su parte, los antioxidantes de origen natural están presentes en las fuentes naturales,

particularmente en frutas y vegetales, éstos comprenden un amplio grupo de compuestos químicos, entre los que se encuentran fenoles, carotenoides, tioles, y algunas vitaminas. Su presencia en dichas fuentes está relacionada con los mecanismos de defensa propios de la planta, el desarrollo de color y aroma, la biosíntesis de metabolitos secundarios, intermediación en procesos de oxidación, entre otras funciones propias de cada organismo.

Los antioxidantes sintéticos más usados en la conservación de alimentos son el 3-terbutil-4-hidroxianisol (BHA), el 3,5-di-terbutil-4-hidroxitolueno (BHT), el TBHQ (terbutilhidroquinona) y ácido sórbico. Otros antioxidantes sintéticos son el bisulfito de sodio, metasulfito de sodio, el tiopropanoato de laurilo y ácido tiopropanoico, los cuales son usados en productos cárnicos (figura 11).



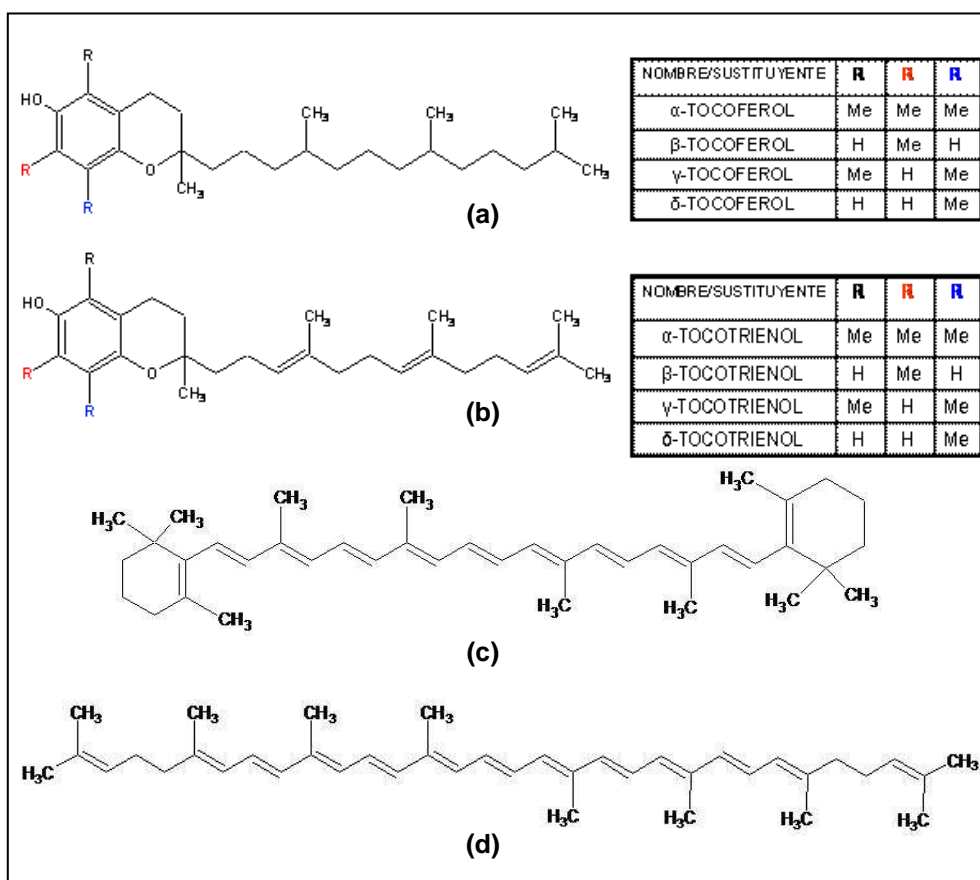
**Figura 11. Estructura de antioxidantes sintéticos.**

**(a) BHA, (b) BHT, (c) BHQ, (d) ácido sórbico, (e) tiopropanoato de laurilo, (f) ácido tiopropanoico.**

Los carotenoides son uno de los grupos de antioxidantes naturales más ampliamente distribuidos. Entre éstos, los tocoferoles y tocotrienoles (figura 12a y b) son más abundantes en la naturaleza, éstos se encuentran presentes principalmente en frutos coloreados, haciendo parte de su mesocarpio y epicarpio. La vitamina A (retinol) y la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) hacen parte de este grupo de compuestos y son conocidos por su alto potencial antioxidante y sus funciones biológicas. Su aprovechamiento implica su consumo directo, uso en suplementos alimenticios y aplicación en alimentos como conservantes (Shahidi, 1992). Otros carotenoides importantes son el  $\beta$ -caroteno y el

licopeno (figura 12c y d), éstos son reconocidos por ser precursores de otros carotenoides, por su AA y su aplicación como pigmentos de origen natural.

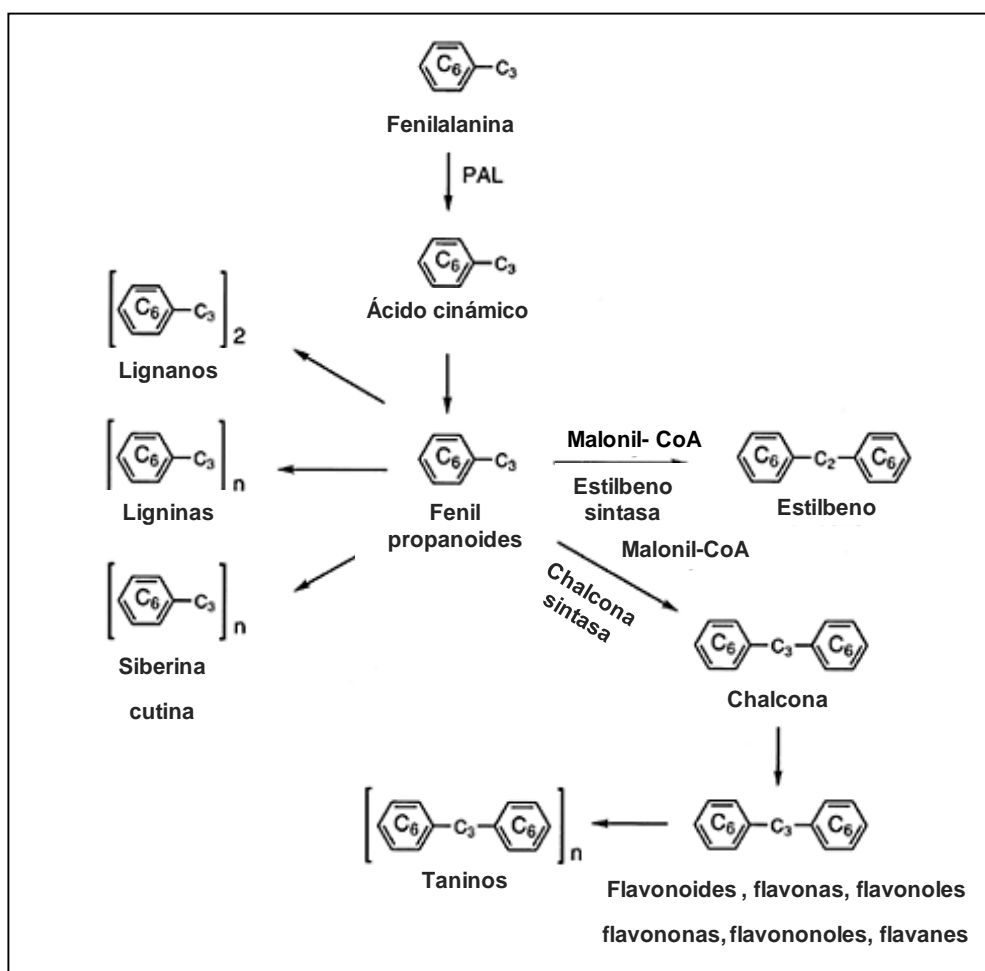
Algunas vitaminas como el ácido ascórbico (vitamina C) son reconocidas por su capacidad antioxidante, la importancia de este compuesto radica en su abundancia y presencia en muchos productos de origen vegetal, además de ser esencial para el desarrollo de varios procesos a nivel biológico (Wang et al., 1996). La vitamina C se caracteriza por su capacidad para donar electrones e hidrógenos adquiriendo un estado final muy estable (dienona vecinal).



**Figura 12. Estructuras de algunos antioxidantes naturales.**  
**(a) tocoferoles, (b) tocotrienoles, (c) β-caroteno, (d) licopeno.**

El grupo más grande y variado de antioxidantes de origen natural son los fenoles, cuya presencia predomina en los productos naturales. La definición de compuesto fenólico

hace referencia a un compuesto aromático que posee como sustituyente(s) uno o más grupos hidroxilo (Vermerris y Nicholson, 2006). Los fenoles son originados a partir de metabolitos secundarios, presentes en las plantas, los cuales son derivados de la fenilalanina, y en menor proporción de la tirosina (figura 13), por mediación de la enzima fenilalanina liasa (FAL o PAL por sus siglas en inglés) (Van Sumere, 1989; Shahidi, 2000). Entre estos metabolitos el ácido cinámico y los fenilpropanoides son precursores principales de otros fenoles como los lignanos, ligninas, chalconas, estilbenos, flavonoides y taninos presentes en muchas plantas (Shahidi y Naczki, 2004).



**Figura 13. Esquema general de la biosíntesis de compuestos fenólicos a partir de la fenilalanina.**

Debido a la amplia variedad de compuestos fenólicos que existen, éstos pueden ser clasificados de muchas formas, una de éstas localiza a los compuestos en grupos que

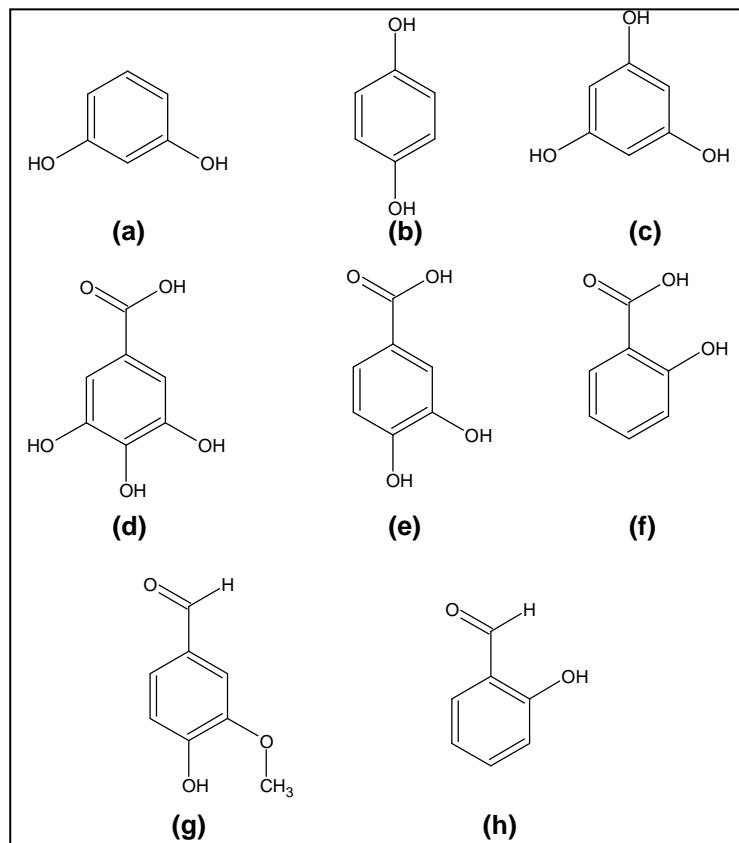
dependen del número de átomos de carbono presentes en su estructura (tabla 2), esto da como resultado 20 grupos de compuestos, que van desde los fenoles simples, con seis átomos de carbono, hasta los fenoles poliméricos, con  $n$  átomos de carbono (Harborne y Simmonds, 1964). Una forma alternativa de clasificar los fenoles, aunque no muy usada, es en función de su disponibilidad o presencia en el reino vegetal (Swain y Bate-Smith, 1962), en este caso los compuestos son ubicados en algunas de las siguientes clases: ampliamente distribuidos (presentes en todas las plantas), ligeramente distribuidos (presentes en algunas plantas) y presentes como polímeros.

Los fenoles simples (tabla 2) incluyen compuestos con uno o más grupos hidroxilo sobre un anillo aromático, ejemplo de éstos son el resorcinol, la hidroquinona y el floroglucinol (figura 14). Los ácidos y aldehídos fenólicos se caracterizan por poseer un grupo carboxilo o carbonilo como sustituyente en el anillo aromático, adicional a los grupos hidroxilo propios del compuesto fenólico, algunos de éstos son los ácidos gálico, protocatecuico, salicílico y aldehídos como la vanillina y el salicilaldehído (figura 14).

**Tabla 2. Clasificación de los compuestos fenólicos.**

Estructura	Clase
$C_6$	Fenoles simples
$C_6C_1$	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados
$C_6C_2$	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
$C_6C_3$	Ácidos cinámicos, cinamaldehído y alcohol cinámico
$C_6C_3$	Cumarinas, isocumarinas y cromonas
$C_{15}$	Chalconas, auronas y dihidrochalconas
$C_{15}$	Flavonas
$C_{15}$	Flavanonas
$C_{15}$	Flavanonoles
$C_{15}$	Antocianidinas
$C_{15}$	Antocianinas
$C_{30}$	Biflavonilos
$C_6C_1C_6$ , $C_6C_1C_6$	Bensofenonas, xantonas y estilbenos
$C_6$ , $C_{10}$ , $C_{14}$	Quinonas
$C_{18}$	Betacianinas
<b>Lignanós</b>	Dímeros o oligómeros
<b>Neolignanós</b>	Dímeros o oligómeros
<b>Ligninas</b>	Polímeros
<b>Taninos</b>	Oligómeros o polímeros
<b>Flobafenos</b>	Polímeros





**Figura 14. Estructura de fenoles simples.**

**(a) resorcinol, (b) hidroquinona, (c) floroglucinol, (d) ácido gálico, (e) ácido protocatecuico, (f) ácido salicílico, (g) vanillina, (h) salicilaldehído.**

Los ácidos cinámicos son los fenoles de un anillo aromático ( $C_6C_3$ ) más comunes, estos compuestos se caracterizan por ser intermediarios importantes en las rutas biosintéticas de fenoles más complejos. Éstos se encuentran comúnmente formando ésteres con ácido quínico, azúcares y ácidos inorgánicos. Algunos ejemplos son los ácidos cimámico, p-cumárico, cafeico, ferúlico, 5-hidroxiferúlico y sinápico (figura 15), algunos de sus ésteres son el ácido clorogénico, el malato sinapólico y la sinapoil colina (Ruegger y Chappe, 2001). Los ácidos cinámicos son reconocidos por su buena AA, particularmente los esteres de ácido quínico. Por su parte, el ácido caféico está asociado a las propiedades antioxidantes del café (*C. arabica* y *C. robusta*), aunque este no es el único compuesto fenólico presente en dicho fruto.

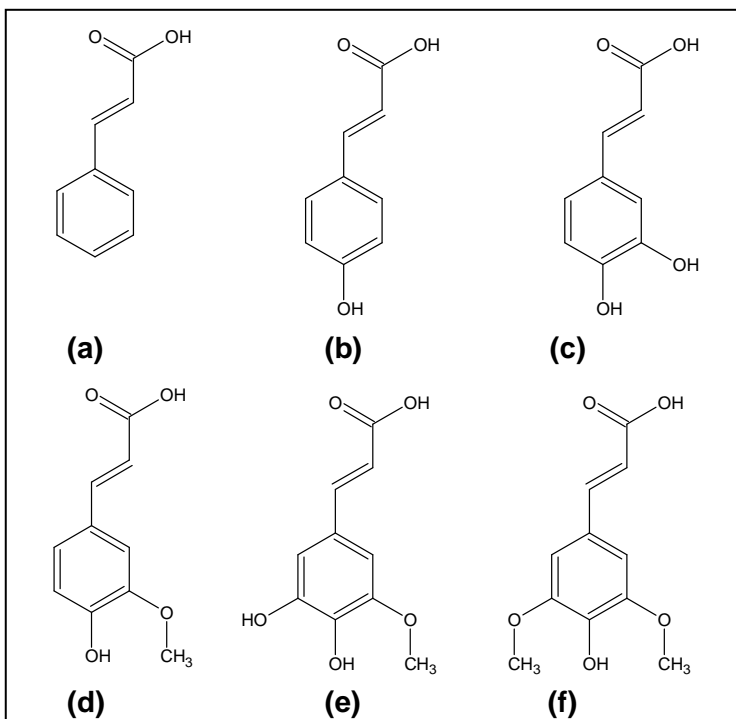


Figura 15. Estructura de los derivados del ácido cinámico.

(a) ácido cinámico, (b) ácido *p*-cumárico, (c) ácido cafeico, (d) ácido ferúlico, (e) ácido 5-hidroxiferúlico, (f) ácido sinápico.

Las cumarinas e isocumarinas son otro tipo de fenoles  $C_6C_3$  los cuales se caracterizan por poseer un átomo de oxígeno como parte de su estructura. Estos compuestos juegan un rol importante en la defensa frente a enfermedades y plagas en las plantas (Jacks y Kircher, 1967), ejemplos de éstas, son la umbeliferona y la bergenia (figura 16).

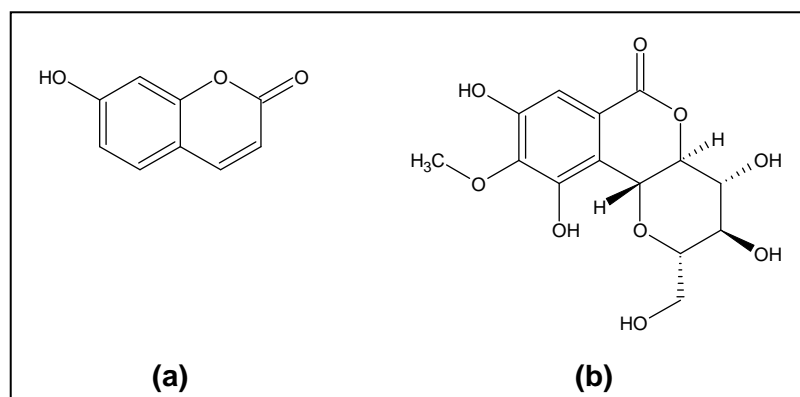
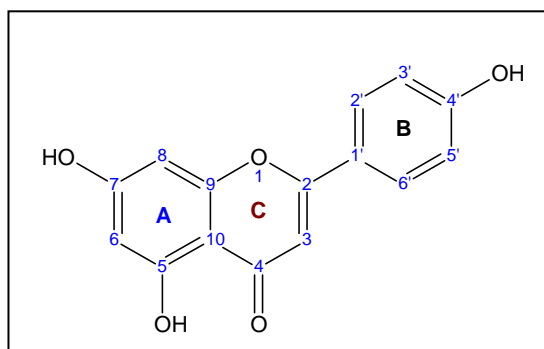


Figura 16. Estructura de cumarinas.

(a) umbeliferona, (b) bergenia.

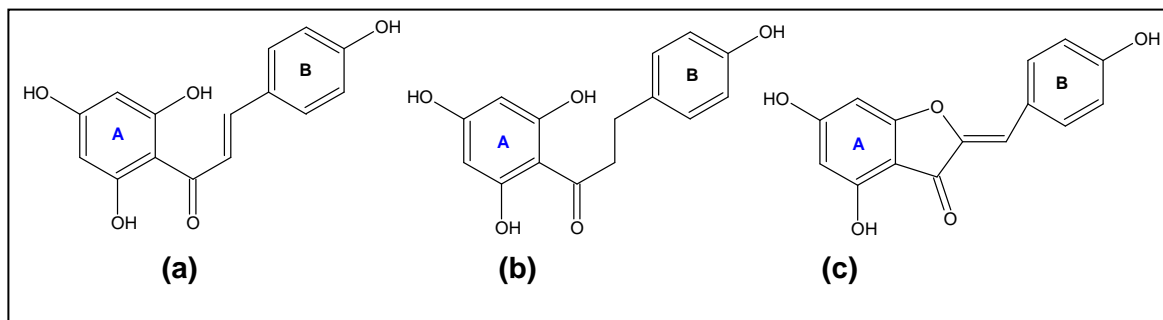
Los flavonoides son un grupo de compuestos tipo  $C_{15}$  caracterizados por poseer estructura  $C_6C_3C_6$ , este es el grupo de compuestos fenólicos más grande que existe y en general se pueden clasificar en grupos basados en su estructura, en cada caso los dos anillos aromáticos (A y B) se unen al grupo  $C_3$ , el cual determina el grupo al que pertenece el flavonoide (Vermerris y Nicholson, 2006).

Los flavonoides típicos se caracterizan por poseer tres anillos en su estructura, A, B y C, donde el C es un heterociclo de seis miembros cuyo heteroátomo es oxígeno. El anillo A es originado por condensación de tres unidades de malonil-CoA, mientras que el B proviene de unidades de p-cumaroil-CoA, este origen explica la ubicación común de los grupos hidroxilo (meta-dihidroxilado o meta-trihidroxilado) en los flavonoides (figura 17).



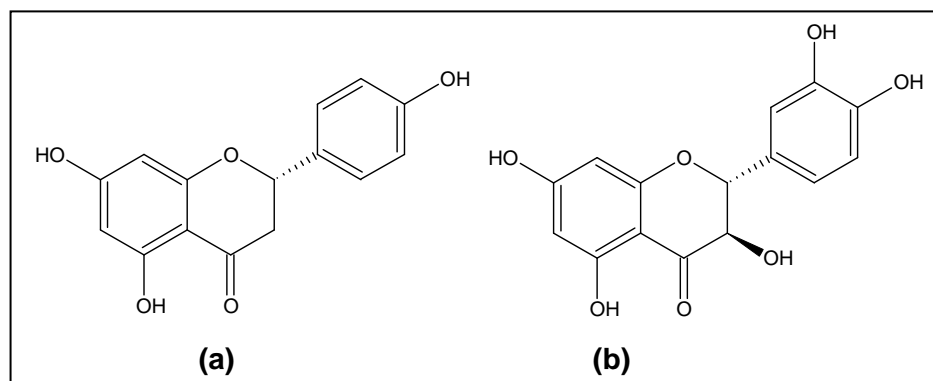
**Figura 17. Estructura general de flavonoides.**

Uno de los grupo de flavonoides son las chalconas y dihidrochalconas, éstas se caracterizan por poseer un grupo  $C_3$  lineal, dicho grupo posee una  $\alpha$ - $\beta$ -insaturación en las chalconas (figura 18a), mientras que para las dihidrochalconas éste es totalmente saturado (figura 18b). Por su parte, las auronas son fenoles producidos por la ciclación de las chalconas al reaccionar el hidroxilo meta (del anillo A) con el carbono  $\alpha$  de la cadena  $C_3$  (figura 18c), esta reacción da lugar a la formación de un ciclo de cinco miembros unido al anillo A, al igual que las chalconas las auronas son pigmentos presentes en flores.



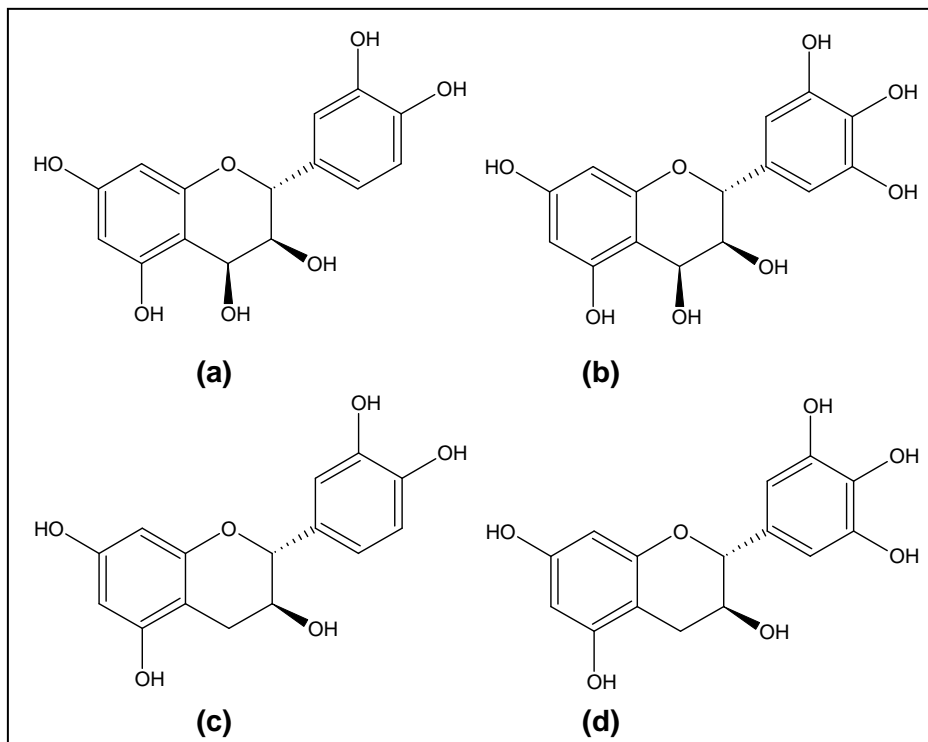
**Figura 18. Estructura general de chalconas, dihidrochalconas y auronas.**

Las flavanonas y los flavanonoles también pertenecen a los flavonoides, estos se caracterizan por la ausencia de la insaturación entre los carbono 2 y 3 del anillo C (figura 17), la naringenina (figura 19a) y taxifolina (figura 19b) son ejemplos de estos compuestos (Vermerris y Nicholson, 2006).



**Figura 19. Estructura de flavanonas y flavanonoles.**

Una reducción parcial del grupo carbonilo de los flavanonoles, da lugar a las leucoantocianidinas, estos compuestos están presentes en la madera de diferentes plantas y juegan un papel importante en la formación de taninos, ejemplos de éstas son leucocianidina y leucodelfinidina (figura 20a y b). La reducción total del carbonilo da lugar a las flavanas como la catequina y galocatequina (figura 20c y d), estos compuestos también se pueden encontrar formando ésteres con ácidos como el gálico (Vermerris y Nicholson, 2006). Las catequinas son los principales compuestos fenólicos del té (*Camellia sinensis* L. y *Thea sinensis*) y son ampliamente conocidas por su alto potencial antioxidante.



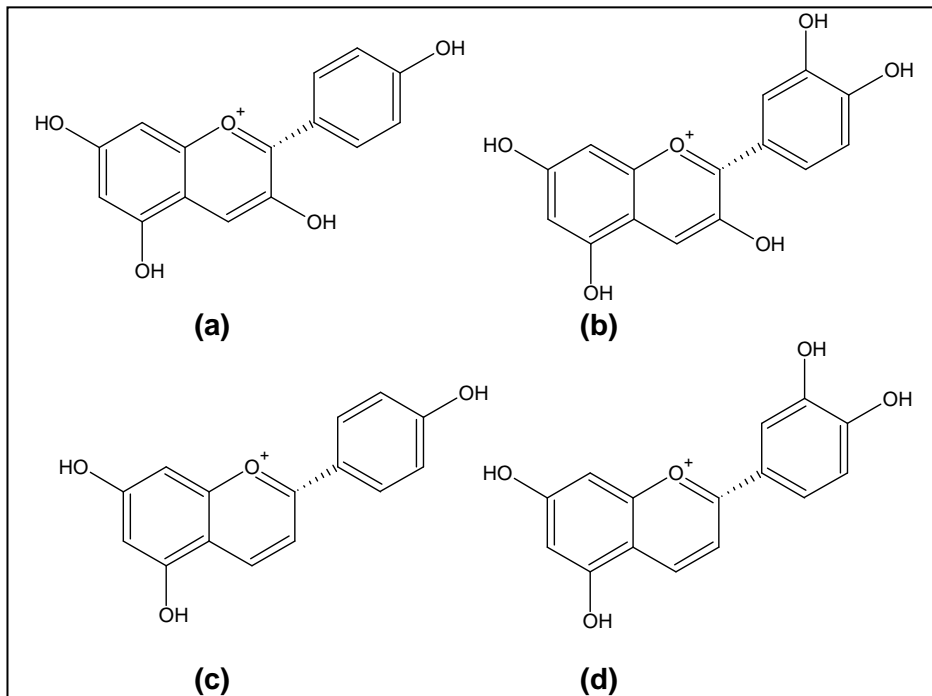
**Figura 20. Estructura de leucoantocianidinas y catequinas.**

**(a) leucocianidina, (b) leucodelphinidina (c) catequina, (d) galocatequina.**

La presencia del catión oxonio o flavilio en el heterociclo de los flavonoides caracteriza a las antocianidinas. Éstos son flavonoides no glicosidados, sin embargo, en la naturaleza difícilmente se encuentran en forma de aglicona libre, a excepción de algunos compuestos como la pelargonidina y cianidina (figura 21 a y b), ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Dewick, 2001). Por otra parte, la eliminación del hidroxilo en el carbono 3 (anillo C) en las antocianidinas da lugar a las deoxiantocianidinas, las más comunes de éstas son la apigeninidina y la luteolinidina (figura 21 c y d).

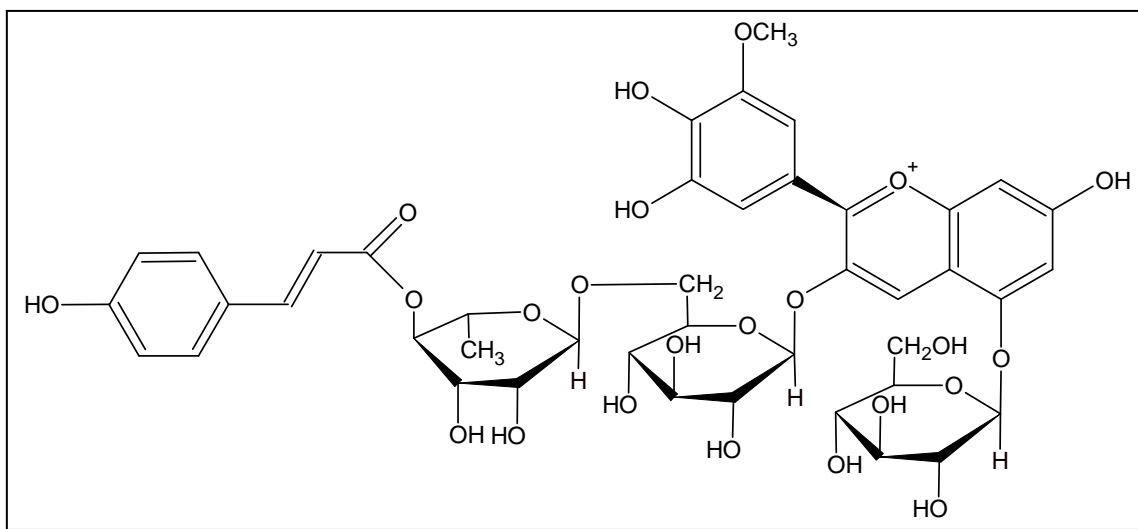
La glicosilación de la antocianidinas da lugar a las antocianinas. El glicósido más común es el 3-glicósido, la adición de una segunda molécula de azúcar comúnmente se realiza sobre el hidroxilo de la posición 5 (generalmente glucosa). Las antocianinas también pueden estar aciladas, ácidos orgánicos como p-cumárico, caféico y ferúlico se unen a las unidades de glicosidos por medio de enlaces tipo ester. Las antocianinas están asociadas al color de muchos frutos, las diferentes coloraciones que pueden tomar éstos, está muy asociada a las variaciones en la estructura de dichos compuestos. Otra de las propiedades importantes de las antocianinas es su AA, cuyos beneficios pueden ser

obtenidos por uso o consumo de frutos. Ejemplo de este tipo de compuestos es la petanina (figura 22) encontrada comúnmente en la familia *Solanaceae* (Vermerris y Nicholson, 2006).



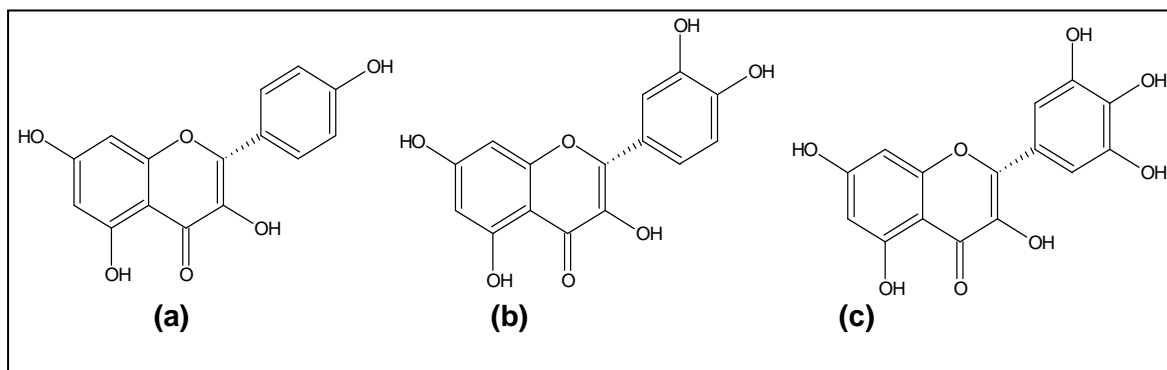
**Figura 21. Estructura de antocianidinas y deoxiantocianidinas.**

(a) pelargonidina, (b) cianidina, (c) apigeninidina, (d) luteolinidina.



**Figura 22. Estructura de antocianina.**

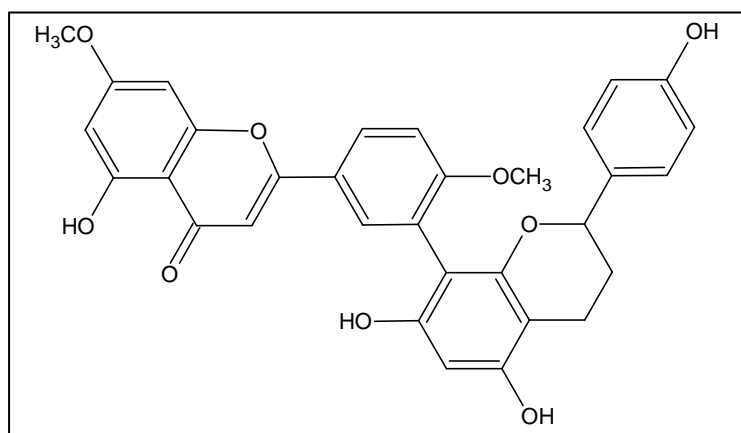
Las flavonas se caracterizan por poseer en su estructura una insaturación entre los carbonos 2 y 3, y el grupo carbonilo del anillo C, estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en las angiospermas, siendo las más comunes el kamferol, la quercetina y la miricetina (figura 23). La AA de estos tres compuestos ha sido evaluada empleando diferentes metodologías, empleándolos en muchos casos como antioxidantes de referencia.



**Figura 23. Estructura de flavonas.**

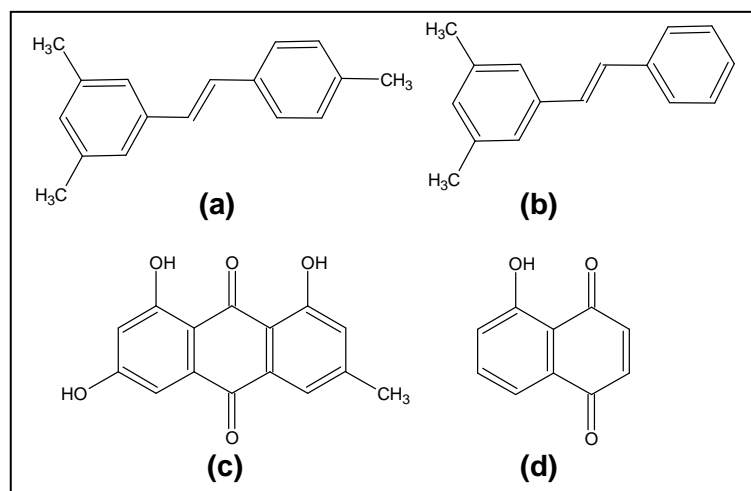
**(a) kamferol, (b) quercetina, (c) miricetina.**

Los biflavonilos son fenoles con un esqueleto de treinta átomos de carbono, éstos son dímeros de flavonas como la apigenina o sus derivados metilados. Son pocos los biflavonilos conocidos, el más común es la ginkgetina presente en el *Ginkgo biloba* (figura 24) (Dewick, 2001).



**Figura 24. Estructura de biflavonilo.**

Las xantonas y los estilbenos son compuestos con esqueleto  $C_6C_1C_6$  y  $C_6C_2C_6$  respectivamente. Las xantonas son reconocidas como los pigmentos amarillos presentes en flores, mientras que los estilbenos se encuentran normalmente en el tronco de los árboles. Algunos estilbenos conocidos son el pinosilvino y resveratrol (figura 25 a y b), este último muy conocido por sus propiedades *in vivo*, entre las que resalta su AA. En el grupo de las quinonas las más comunes son las bensoquinonas, antraquinonas y naftaquinonas, éstas pueden ser encontradas en plantas y hongos (particularmente las antraquinonas), la emodina y la juglona (figura 25c y d) son ejemplos de antraquinona y naftaquinona, respectivamente.

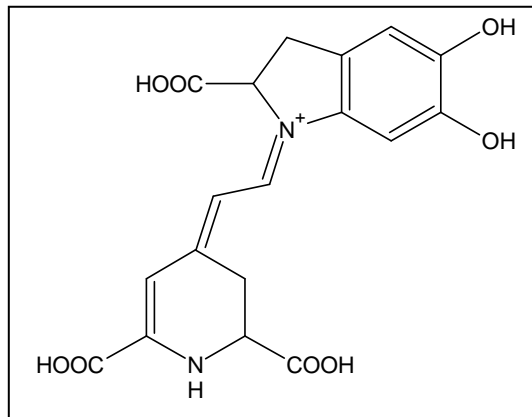


**Figura 25. Estructura de estilbenos y quinonas.**

**(a) resveratrol, (b) pinosilvino, (c) antraquinona, (d) naftaquinona.**

Como se ha indicado antes, muchos de los compuestos fenólicos son responsables o están asociados a la coloración de algunos tejidos en plantas. Las betacianinas se caracterizan por poseer una coloración roja, la cual es observada en la remolacha (*Beta vulgaris*) rica en estos fenoles. A diferencia de otros compuestos fenólicos, las betacianinas se caracterizan por poseer en su estructura heterociclos con nitrógeno como heteroátomo, un ejemplo de éstas es la betanidina (figura 26) (Vermerris y Nicholson, 2006).





**Figura 26. Estructura de la betacianina.**

Algunos compuestos fenólicos como los alcoholes p-cumárilico, coniférlico y sináplico, pueden acoplarse entre ellos para dar lugar a otros fenóles dimericos u oligoméricos, denominados lignanos. Estos compuestos están presentes en helechos, gimnospermas y angiospermas, particularmente en su madera y semillas. La biosíntesis de los lignanos es iniciada por una oxidación monoelectrónica, mediada por enzimas de tipo peroxidasa, seguida por una deslocalización electrónica y finalizada por un acoplamiento entre los carbonos 8-8' ( $\beta$ - $\beta'$ ) de las unidades de alcohol. Algunos ejemplos son (+)-pinoresinol y el ácido (-)-plicático (figura 27).

El último grupo de fenoles son los poliméricos, entre éstos se encuentran las ligninas, los taninos y los flobafenos, éstos están asociados con el soporte estructural de las plantas y mecanismo de defensa frente a plagas, sus estructuras son complejas y variadas, lo cual les proporciona múltiples funciones. Estos polímeros se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, los taninos en particular están presentes en hojas, tronco y frutos de un amplio número de plantas. Éstos son el subgrupo más grande dentro de los polímeros, a tal punto de poseer una clasificación propia; taninos condensados, complejos o hidrolizables, este último grupo incluye los galotaninos y elagitaninos (caracterizados por poseer en su estructura ácido gálico y elágico).

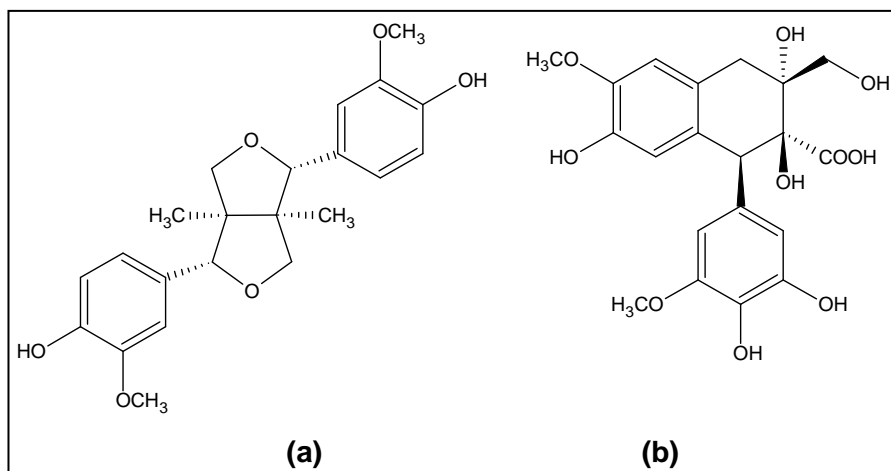


Figura 27. Estructura de lignanos.

(a) (+)-pinoresinol, (b) ácido (-)-plicatico.

### ▪ *Mecanismos de acción de los antioxidantes*

Los procesos de oxidación pueden ser iniciados por muchos fenómenos físicos y/o químicos, siempre y cuando haya presencia de un sustrato susceptible a la oxidación y un agente oxidante. Las moléculas susceptibles a oxidación pueden ser de muchos tipos, ácidos grasos mono o poliinsaturados, fosfolípidos, colesterol, proteínas, ADN, entre otras. La oxidación de lípidos es quizás uno de los casos de mayor relevancia, debido a su intervención en el deterioro de alimentos y el desarrollo de algunas patologías a nivel biológico. Al respecto, en la actualidad se posee algún conocimiento acerca de los procesos involucrados en la oxidación de lípidos, al igual que los posibles mecanismos de intervención de los antioxidantes. Teniendo en cuenta lo anterior, a continuación se realizará una breve descripción del proceso de oxidación de lípidos y los mecanismos de acción de los antioxidantes.

### ▪ *Oxidación de lípidos*

La oxidación de lípidos puede desarrollarse por medio de tres vías posibles: (1) oxidación no enzimática mediada por radicales libres (autooxidación), (2) foto-oxidación no enzimática y no mediada por radicales libres y (3) oxidación enzimática (Antolovich et al., 2002). La primera vía involucra radicales formados por procesos alternos en los que pueden intervenir radiación ionizante, energía térmica y metales como cobre o hierro. En

la segunda, el oxígeno se adiciona a dobles enlaces, presentes en ácidos grasos insaturados, conduciendo a la formación de hidroperóxidos. Por su parte, en la tercera vía, enzimas de tipo lipoxigenasas son las encargadas de realizar el proceso de oxidación.

La autoxidación es la vía más común para la oxidación de lípidos, esta se lleva a cabo en tres etapas generales, iniciación, propagación y finalización (figura 28). En la iniciación se forma un radical ( $R\cdot$ ) a partir de una molécula de lípido ( $RH$ ), este proceso involucra la sustracción de un hidrogeno a partir de  $RH$  por parte de un radical libre o especie reactiva de oxígeno  $X\cdot$  (p.e. radicales alquilo, hidroxilo, alcoxilo o peroxilo). Estos últimos son formados por degradación térmica o catalizada por metales (p.e. cobre o hierro) de hidroperóxidos y por actividad enzimática (actividad de lipoxigenasas). En la segunda etapa, los radicales formados reaccionan con oxígeno molecular generando radicales peróxido ( $ROO\cdot$ ), los cuales a su vez reaccionan con otras moléculas de lípidos formando hidroperóxidos ( $ROOH$ ) y radicales alquilo ( $R'\cdot$ ). Las reacciones de propagación poseen una baja entalpia, lo cual hace que se presenten en forma espontanea y muy rápida. La última etapa involucra las reacciones de finalización, en éstas los radicales previamente formados reaccionan entre sí para formar especies moleculares como peróxidos, lípidos de cadena larga y oxígeno. Las reacciones de la etapa de finalización se pueden ver limitadas por la concentración de radicales y la orientación de las colisiones entre los mismos (Beninger y Hosfield, 2003; Pokorny et al., 2001, Shahidi et al., 1992).

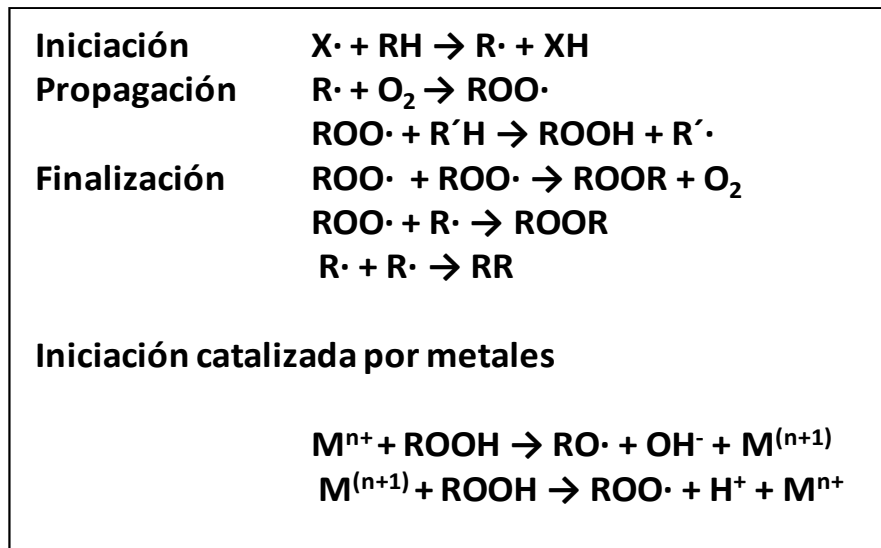


Figura 28. Mecanismo general de la autoxidación de lípidos.

Los hidroperóxidos son los productos iniciales de la oxidación lipídica, sin embargo, éstos pueden transformarse en otros productos secundarios y finales. Una  $\beta$ -escisión sobre los hidroperóxidos conduce a la formación de radicales alcoxilo, los cuales dan lugar a la formación de muchos productos secundarios y finales de oxidación, entre los que se encuentran hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y cetonas, ver figura 29 (Pokorny et al., 2001). Por otra parte, reacciones adicionales de oxidación puede conducir a la formación de di o trihidroperóxidos, endoperóxidos, peróxidos cíclicos, entre otros. Éstos son precursores de productos finales de oxidación como el malondialdehído (Guillén-Sans y Guzmán-Chozas, 1998), glioxal, metilglioxal (Kazutoshi y Takayuki, 2004), 4-hidroxi-2-nonenal (Koji, 2003) entre otros. En la tabla 3 se indican los diferentes productos de oxidación formados a partir de aceite de soya, resaltando los más abundantes y las posibles variaciones que pueden presentar (Guillen y Goicoechea, 2008).

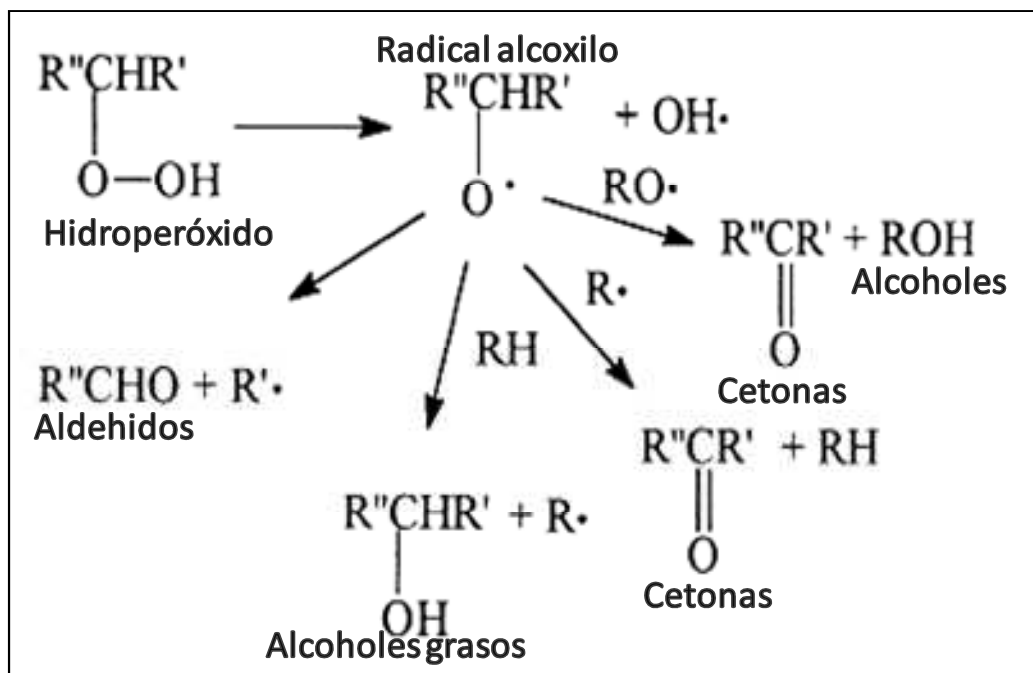


Figura 29. Esquema de la formación de productos secundarios y finales a partir de hidroperóxidos.

**Tabla 3. Productos secundarios y finales de la autoxidación de aceite de soya.**

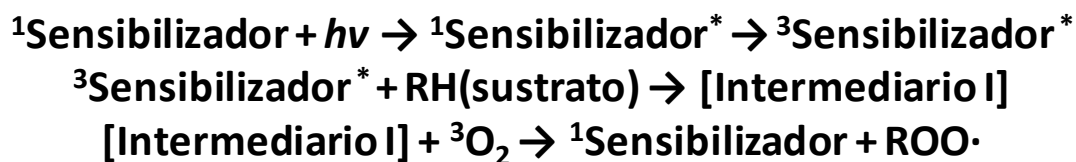
Tipo de compuesto	Número de carbonos	Abundante	Observaciones
Ácidos	1-10	Hexanoico	
Alcoholes	4-9	1-octen-3-ol	Alta ramificación
Esteres	4-8	acetato de etilo	Alta isomerización
Hidrocarburos saturados	4-15	pentano	Ramificación e isomerización
Hidrocarburos monoinsaturados	6-16	1-hepteno	Diferentes isómeros de octeno
Hidrocarburos diinsaturados	8-11	nonadieno	Alta Isomerización
Hidrocarburos cíclicos	6-10	ciclohexano	Ciclohexano ramificado
Hidrocarburos monoaromáticos	6-14	tolueno	Bencenos sustituidos
Hidrocarburos poliaromáticos	10-14	naftaleno	Metilnaftalenos
Cetonas lineales saturadas	4-12	2-heptanona	
Cetonas lineales insaturadas	7-9	3-octen-2-ona	
Aldehídos saturados	4-10	hexanal	
Aldehídos monoinsaturados	3-11	2-octenal	Isómeros octenal y heptenal
Aldehídos diinsaturados	7-11	2,4-decadienal	Isómeros C <sub>8</sub> , C <sub>9</sub> , C <sub>10</sub>
Aldehídos oxigenados	6-10	4-hidroxi-2-nonenal	Oxo y epoxi-aldehidos
Otros		Lactonas, furanos fenoles y terpenos	

Los aldehídos e hidrocarburos son los principales productos secundarios y finales en el proceso de autoxidación. En la tabla 4 se presentan los principales aldehídos e hidrocarburos formados por descomposición de los diferentes hidroperóxidos del ácido linoléico y oleico. El hexanal y nonanal se forman en mayor proporción respecto a los demás aldehídos, esto se debe particularmente a que sus precursores, 13-hidroperóxido y 10-hidroperóxido respectivamente, son los principales productos de iniciación de la autoxidación del ácido oleico y linoléico (Mahungu *et al.*, 1998; Pokorny *et al.*, 2001). Éstos poseen particular importancia debido a que están asociados al desarrollo de rancidez en productos alimenticios (Neff *et al.*, 2000), su identificación y cuantificación son usadas comúnmente durante el seguimiento de la oxidación lipídica (Jiménez-Álvarez *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2003; Huang y Frankel, 1997).

**Tabla 4. Principales productos formados a partir de hidroperóxidos de los ácidos linoléico y oleico.**

Ácido linoléico			Ácido oleico		
Hidroperóxido	Aldehído	Hidrocarburo	Hidroperóxido	Aldehído	Hidrocarburo
8	2,5-undecadienal	4-deceno	8	2-undecenal	Decano
9	2,4-decadienal	3-noneno	9	2-decenal	Nonano
10	3-decenal	2-octeno	10	Nonanal	Octano
11	2-octenal	Heptano	11	Octanal	Heptano
12	2-heptenal	Hexano			
13	Hexanal	Pentano			
14	Pentanal	Butano			

La foto-oxidación es otra de las vías de oxidación de lípidos, en este caso la oxidación se desarrolla por excitación de los lípidos (foto-oxidación tipo I) o del oxígeno (foto-oxidación tipo II) en presencia de luz y un sensibilizador. La foto-oxidación tipo I (figura 30) se desarrolla en presencia de sensibilizadores (p.e. la riboflavina) y se caracteriza por la transferencia de un hidrógeno o un electrón entre un estado excitado del sensibilizador y un sustrato (p.e. un lípido). Este proceso produce radicales libres neutros o iónicos (intermediario I), los cuales reaccionan con el oxígeno molecular formando radicales peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ). Una vez producidos los radicales  $\text{ROO}\cdot$ , éstos pueden participar en las etapas de autooxidación (Pokorny *et al.*, 2001). Por otra parte, en la foto-oxidación tipo II el oxígeno triplete ( $^3\text{O}_2$ ) es excitado a oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) por intervención de la luz y un sensibilizador (p.e. la clorofila), el  $^1\text{O}_2$  formado puede entonces reaccionar con las moléculas de lípidos (insaturados) de forma muy rápida y formando peróxidos.

**Figura 30. Mecanismo general de foto-oxidación tipo I.**

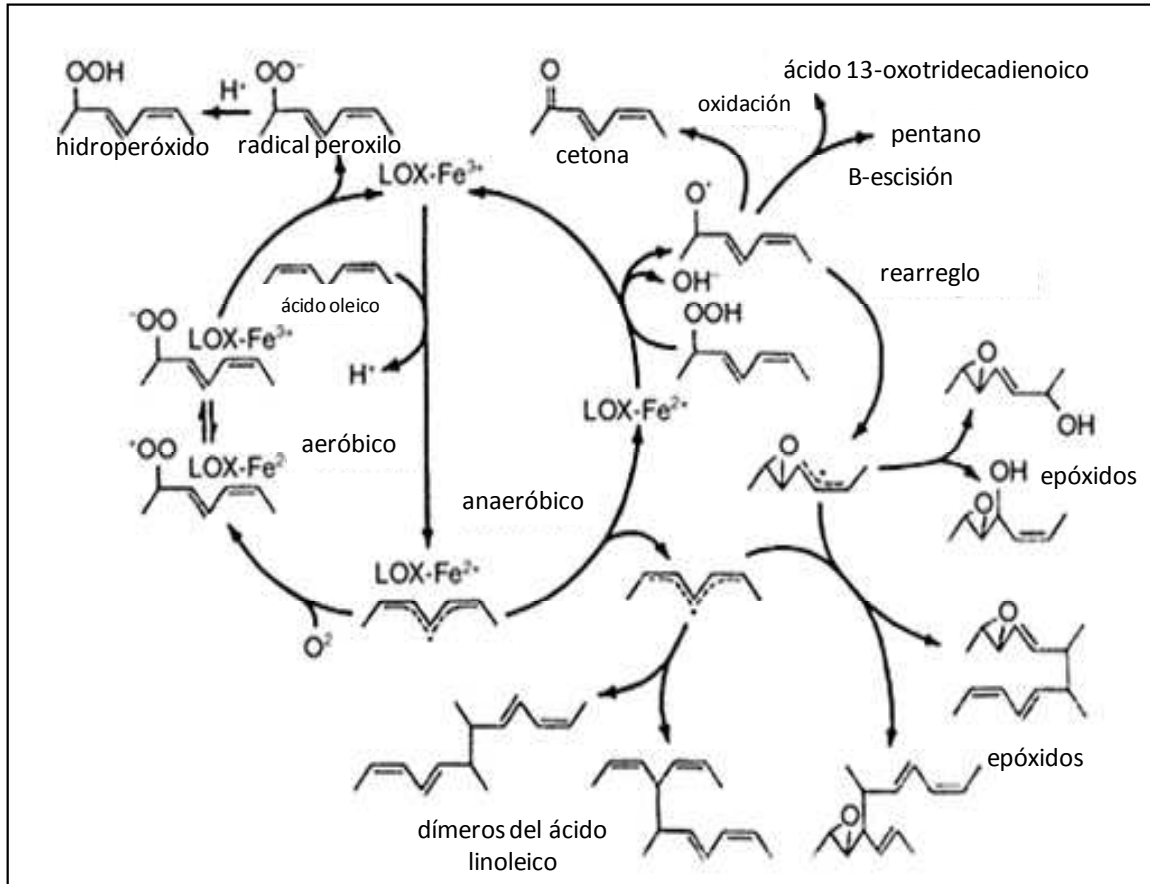
La oxidación de lípidos también puede ser desarrollada por enzimas como las lipoxigenasas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos vegetal y animal. La actividad de dichas enzimas es específica hacia ácidos grasos poliinsaturados

(el ácido linoléico es un sustrato más común) y varía en función del pH. Por ejemplo, de la soya se han aislado cuatro isozimas de lipoxigenasa; la isozima 1 tiene un pH óptimo de 9.0 que es específica para ácidos grasos poliinsaturados y forma 9 y 13-hidroperóxidos, la isozima 2 actúa a pH 6.8 sobre triglicéridos y ácidos grasos poliinsaturados libres formando 9 y 13-hidroperóxidos. Por su parte, la isozima 3 actúa de la misma forma que la isozima 2, aunque es inhibida por  $\text{Ca}^{+2}$ , mientras que la isozima 4 actúa igual a la 3, sin embargo, ésta se diferencia porque se puede aislar por cromatografía y electroforesis. Las lipoxigenasas poseen en su estructura un ion  $\text{Fe}^{+2}$  el cual se encuentra con un spin alto, éste es oxidado a  $\text{Fe}^{+3}$  por parte de los hidroperóxidos, formados a partir de los lípidos. En condiciones aeróbicas, la enzima realiza una sustracción de un hidrógeno perteneciente a un grupo metileno vecinal a las insaturaciones de un lípido poliinsaturados, esta remoción es acompañada de la reducción del  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ , luego ingresa oxígeno, el cual reacciona con el radical alquilo formado previamente, esta reacción genera un catión peroxilo que es posteriormente reducido a anión peroxilo, gracias a la oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$ , finalmente este anión peroxilo es protonado y se disocia de la enzima, formándose el hidroperóxido, ver figura 31. Bajo condiciones anaeróbicas el radical alquilo se disocia de la enzima para formar diferentes productos que incluyen dímeros, cetonas y epóxidos (Pokorny et al., 2001; Gardner, 1988).

### ▪ *Mecanismos de inhibición de la oxidación lipídica*

Los antioxidantes pueden ser clasificados en dos grandes grupos según su mecanismo de acción; primarios o antioxidantes que rompen la cadena de reacción y secundarios o antioxidantes que previenen la oxidación (preventivos). Sin embargo una clasificación más específica puede ubicar un antioxidante en alguno(s) de los siguientes cinco grupos (Jadhav et al., 1996; Denisov y Afanas'ev, 2005):

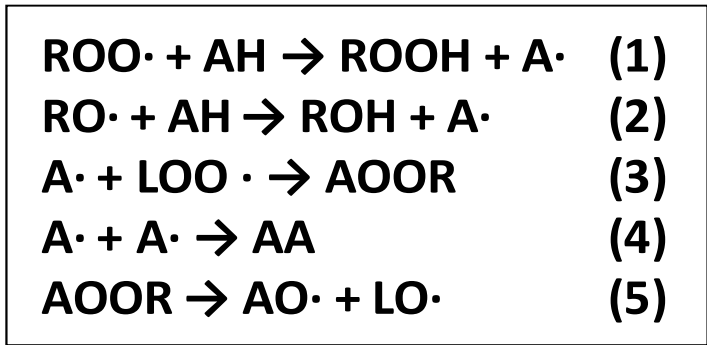
1. Antioxidantes que rompen la cadena por reacción con radicales peroxilo.
2. Antioxidantes que rompen la cadena por reacción con radicales alquilo.
3. Antioxidantes que descomponen hidroperóxidos.
4. Antioxidantes que desactivan metales.
5. Antioxidantes involucrados en sinergismo.



**Figura 31. Esquema general de la oxidación de lípidos catalizada por lipoxigenasas.**

Los antioxidantes primarios son los más empleados en alimentos, éstos son capaces de competir con los sustratos oxidables, por los radicales que hacen parte de la cadena de reacción. Su eficiencia depende de la capacidad que posean para bloquear los radicales de acuerdo a las reacciones 1, 2 y 3 de la figura 32. Una característica de este tipo de antioxidantes es la presencia de un periodo de latencia o inducción en su acción, durante este periodo aproximadamente el 90% del antioxidante se destruye, disminuyendo la tasa de oxidación, sin embargo, una vez finalizado dicho periodo la oxidación continua a una tasa igual o mayor. Es de resaltar que la duración del periodo de inducción es proporcional a la concentración del antioxidante.





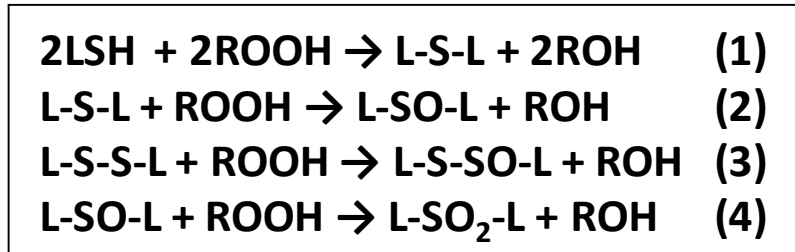
**Figura 32. Mecanismos de acción de los antioxidantes primarios.**

Los compuestos fenólicos son considerados como antioxidantes primarios. Por ejemplo, aquellos que presentan sustitución que activen el anillo en orto o para, respecto al grupo hidroxilo, poseen una mayor capacidad para bloquear radicales, en comparación a aquellos con sustitución en meta. Esto se debe al aumento en la densidad electrónica en el grupo hidroxilo y por tanto la disminución de la energía de enlace hidrógeno-oxígeno. Sin embargo, la concentración mínima de estos compuestos para observar una actividad satisfactoria debe ser 0.003% (Pokorny, 1987). Se ha observado que para fenoles con impedimento estérico, las reacciones 3 y 4 de la figura 32 se producen en mayor proporción, resultando en un rompimiento de la cadena e inhibición de la oxidación (Chimi et al., 1991).

La participación de los antioxidantes primarios durante las etapas de iniciación o propagación, reacciones 1 y 2 de la figura 32, puede disminuir considerablemente su eficiencia, particularmente si sus productos de oxidación son inestables o radicales ( $\text{A}\cdot$ ). En este caso, si  $\text{A}\cdot$  participa en las reacciones 3 o 4 (figura 32) formaría un producto no radical relativamente estable. Sin embargo, si las condiciones de oxidación (temperatura o incidencia de radiación ultravioleta) son persistentes, este producto puede degradarse por la reacción 5 y formar dos nuevos radicales, los cuales aportarían a la cadena de autoxidación.

Por otra parte, los antioxidantes preventivos actúan inhibiendo la iniciación de la autoxidación o descomponiendo los hidroperóxidos (por reducción o transferencia de un hidrógeno) a productos más estables (p.e. alcoholes o compuestos no radicalarios). El azufre, los tioles, sulfuros y disulfuros son antioxidantes preventivos (figura 33); los tioles, como la cisteína y el glutatión, son oxidados a sulfuros (reacción 1). Por su parte, los

sulfuros, como la metionina, son oxidados a sulfoxidos (reacción 2), mientras que los disulfuros pueden ser oxidados a sulfoxidos (reacción 3), estos últimos puede reaccionar con los hidroperóxidos para formar sulfonas (reacción 4).



**Figura 33. Descomposición de hidroperóxidos por compuestos azufrados.**

Los fosfolípidos también se comportan como antioxidantes preventivos, éstos tienen la capacidad de descomponer los hidroperóxidos dando productos no radicalarios. Los fosfolípidos ejercen un efecto positivo sobre la acción de los antioxidantes que rompen la cadena, debido a que estos eliminan los potenciales iniciadores de la autoxidación (Pokorny et al., 1990, 1981) y retrasan el proceso (Nassner, 1985).

Los metales pueden ejercer una acción pro-oxidante en lípidos y biomoléculas. En el primer caso, estimulan la homólisis de los hidroperóxidos y favorecen la formación de iniciadores de la autoxidación. Los antioxidantes preventivos pueden bloquear la acción de los metales por formación de quelatos con éstos. Entre estos antioxidantes los más comunes son ácidos polivalentes (fosfórico, cítrico, tartárico, málico y ascórbico), fosfolípidos, oxalatos, aminoácidos y péptidos.

Algunos carotenoides ( $\beta$ -caroteno, licopeno, zeaxantina, y luteína) inhiben el desarrollo de la foto-oxidación tipo II, por medio de un enfriamiento físico del  $^1O_2$ . En este proceso hay una transferencia de energía de excitación desde el  $^1O_2$  hacia el carotenoide, el cual adquiere un estado de triplete excitado, mientras el  $^1O_2$  pasa a  $^3O_2$ . La energía adquirida por el carotenoide puede ser disipada por interacciones rotacionales y vibracionales intermoleculares (Stahl y Sies, 1993). En promedio una molécula de  $\beta$ -caroteno puede enfriar mil moléculas de  $^1O_2$  (Foote et al., 1970). Los tocoferoles y flavonoides también poseen un efecto inhibitorio de la foto-oxidación, al respecto, se ha reportado que su

eficiencia puede llegar a ser varias órdenes de magnitud mayor, en comparación a su intervención por medio de reacciones de oxidación-reducción (Criado et al., 1995).

La combinación de antioxidantes pertenecientes a diferentes grupos, puede dar como resultado un reforzamiento de su actividad (sinergismo), esto es observado generalmente cuando los antioxidantes que rompen cadenas y los preventivos son usados conjuntamente. Los fosfolípidos incrementan la actividad observada para los tocoferoles como la vitamina E (Lambelet et al., 1994). Dicho efecto involucra la descomposición de hidroperóxidos (Pokorny et al., 1981), regeneración de la vitamina E (Lambelet et al., 1994) y quelación de iones metálicos (Min y Stasinopoulos, 1983). Durante el proceso se presenta la reducción de la  $\alpha$ -tocoferil quinona (vitamina E oxidada) a vitamina E (Weng y Gordon, 1993), sin embargo estos mecanismos aun son tema de debate.

Algunos ácidos polivalentes como cítrico, tartárico, málico, glucónico, oxálico, succínico y hidroxiglutarico presentan efecto sinérgico en la inhibición de la oxidación de lípidos, esta propiedad es atribuida a su capacidad para quelar metales (Pokorny y Janícek, 1965). El ácido ascórbico actúa como sinérgico de los tocoferoles al regenerar o restaurar sus propiedades antioxidantes (Niki, 1987), mientras que el palmitato de ascorbilo ha mostrado efecto sinérgico con la vitamina E (Marinova et al., 1992). La mezcla de carotenoides y fenoles presenta sinérgico en la inhibición de la oxidación de lípidos, en este caso se considera que la descomposición de los hidroperóxidos por parte de los carotenoides, es claramente importante en el incremento de la actividad.

A pesar del conocimiento acerca de los mecanismos de acción de los antioxidantes, determinar la actividad de un compuesto o mezcla de compuestos es un proceso netamente empírico. Al respecto, en la actualidad existe un amplio número de metodologías para evaluar la AA, dichos métodos permiten encontrar datos cualitativos y cuantitativos de gran utilidad. En la siguiente sección se realizará una breve descripción de algunas de las metodologías empleadas en la evaluación de la AA.

### ▪ *Evaluación de la actividad antioxidante*

Un factor importante en la investigación sobre antioxidantes es la evaluación de su actividad, al respecto desde hace más de cuatro décadas se han venido desarrollando diferentes metodologías enfocadas hacia este objetivo (Cemeli et al., 2009; Balk et al.,

2009; Moon y Shibamoto, 2009; Antolovich et al., 2002; Cintra y Mancini-filho, 2001; Frankel y Meyer, 2000; Robards et al., 1999). Estas metodologías buscan principalmente obtener información acerca de la actividad de un antioxidante en un sistema vivo o un alimento. No obstante, dada la complejidad de dichos sistemas, se hace difícil el desarrollo de una metodología simple que proporcione datos totalmente correlacionables, en el mejor de los casos los métodos para evaluar la AA son aproximaciones a un sistema real.

Actualmente existen diferentes ensayos para evaluar la AA, algunos están asociados con la peroxidación de lípidos, donde se evalúa como variable la respuesta de la formación de diferentes productos de oxidación (peróxidos, dienos conjugados, productos volátiles, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, entre otras), cuya concentración variará dependiendo de la actividad del antioxidante (Moon y Shibamoto, 2009; Antolovich et al., 2002). Otros por su parte, evalúan el bloqueo, reducción o neutralización de radicales libres tales como DPPH, ABTS<sup>+</sup>, 2,2-Azobis(2-amidinopropano) (ABAP), hidroxilo, superóxido, al igual que iones metálicos como Fe<sup>+3</sup> o Cu<sup>+2</sup>. Algunos ensayos son más específicos, en éstos se evalúa la eficiencia de los antioxidantes para inhibir la oxidación o degradación de una sustancia en particular como el β-caroteno (Ghiselli et al., 1997; Kennedy y Liebler, 1991), ácido α-ceto-γ-metiolbutírico (Winston et al., 1998), β y R-ficoeritrina entre otras.

La mayoría de estos métodos son realizados de forma *in vitro* y la información que proporcionan respecto a la actividad *in vivo* es muy limitada. Al respecto, recientemente se han desarrollado algunos ensayos para evaluar la AA en sistemas celulares (Intra y Kuo, 2007; Wolfe y Liu, 2007), e *in vivo* (Bakirel et al., 2008). Éstos tienen en cuenta aspectos importantes, tal como la biodisponibilidad del antioxidante, los sustratos a proteger, el comportamiento interfacial, entre otros, al mismo tiempo que proporcionan información sobre la relación estructura-actividad de los antioxidantes (Wolfe y Liu, 2008).

A pesar de los avances alcanzados en la evaluación de la AA, en muchas ocasiones la mejor opción es evaluar ésta, en un sistema que se aproxime lo más posible a la realidad. En el caso de un alimento, la opción más adecuada es determinar su AA en el

mismo o en un sistema similar. A continuación se da una breve descripción de algunos métodos empleados en la evaluación de la AA en un alimento.

### ▪ *Actividad antioxidante en alimentos*

En general, la evaluación de la AA en alimentos se realiza empleando sistemas con alto contenido de lípidos (emulsiones o productos cárnicos) o en el mejor de los casos un aceite comestible, dado que la oxidación lipídica es el principal proceso oxidativo asociado al deterioro éstos. El antioxidante es adicionado al alimento, el cual es sometido a oxidación bajo condiciones controladas, posteriormente se realizan diferentes ensayos con el fin de evaluar los cambios sufridos durante la oxidación y establecer la efectividad del antioxidante. A continuación se describen algunos de los análisis usados en evaluación de AA en alimentos.

### ▪ *Análisis sensorial*

El uso de análisis sensorial en la industria de alimentos, es importante a la hora de conocer sobre el estado de los mismos, el desarrollo de texturas, sabores y olores desagradables, o impropios del alimento (off-flavours), son indicador del desarrollo de oxidación lipídica (Neff et al., 2000; Hamilton, 1994). Teniendo en cuenta esto, la evaluación de la actividad de un antioxidante por análisis sensorial estará dada principalmente, por el tiempo requerido para que se detecte dichos off-flavours. La habilidad del ser humano para detectar y describir un olor puede conducir a detectar el desarrollo de la oxidación lipídica, incluso en aquellos casos en los que los métodos químicos e instrumentales no son lo suficientemente sensibles. Sin embargo, el análisis sensorial está limitado a los individuos en particular y por tanto a su sensibilidad para detectar los off-flavours. La eficacia y eficiencia del método dependerá de muchos factores tales como, edad, estado de salud, condiciones ambientales, entre otros. A pesar de contar con panelistas entrenados, la reproducibilidad del análisis sensorial es muy pobre, lo cual hace necesario el uso de otros métodos, ya sea con el fin de complementar dicho análisis o simplemente como una medida independiente del desarrollo de la oxidación.

### ▪ *Análisis de peróxidos lipídicos.*

Como se citó previamente, los hidroperóxidos son los productos iniciales de la oxidación lipídica, al respecto, actualmente existen algunas metodologías para evaluar el contenido de hidroperóxidos en alimentos sometidos a oxidación. Estos métodos son de gran utilidad, ya que proporcionan información acerca de la tasa inicial de oxidación y la formación de precursores de productos secundarios y finales. En la evaluación de la AA, la determinación del contenido de hidroperóxidos permite conocer la eficiencia del antioxidante en las etapas iniciales del proceso. El valor de peróxido (VP), es un método usualmente empleado para el seguimiento de la formación de peróxidos. El análisis involucra la titulación por retroceso de una mezcla del alimento (normalmente un aceite comestible), yoduro de potasio, cloroformo y ácido acético. Los hidroperóxidos reaccionan con el ion yoduro oxidándolo a yodo molecular, el cual es cuantificado por titulación con tiosulfato de sodio. El uso del VP es común cuando la oxidación de los lípidos se desarrolla a bajas temperaturas, esto debido a la alta descomposición térmica que pueden presentar los hidroperóxidos a temperaturas superiores a los 80 °C. Esto restringe el método a la evaluación de la oxidación en condiciones de almacenamiento. Sin embargo, su combinación con otros métodos, puede ampliar su espectro de uso y la información sobre el proceso oxidativo.

La formación de hidroperóxidos, a partir de ácidos grasos poliinsaturados conduce a un sistema conjugado pentadienoico (dieno conjugado, DC), el cual presenta absorción de radiación ultravioleta a 233-234 nm. Esta característica es usada como método de evaluación del contenido de hidroperóxidos (Sánchez-Moreno et al., 2000; Huang y Frankel, 1997; Frankel et al., 1996). El método de los DC proporciona una alternativa fácil y rápida para el seguimiento de la oxidación lipídica y por tanto de la actividad de un antioxidante. Sin embargo, en algunos casos la absorbancia de la muestra no es solo debida a los dienos conjugados, otras sustancias puede absorber a dicha longitud de onda (aldehídos insaturados, fenoles oxidados y productos de descomposición de hidroperóxidos), lo cual reduce la especificidad del método. El método de los DC es comúnmente usado en la evaluación de la AA en aceites comestibles y emulsiones, generalmente es complementado con la determinación de productos volátiles y las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por su siglas en inglés), en conjunto

estos métodos proporcionan un panorama más completo de la actividad de un antioxidante (Jiménez-Álvarez et al., 2008; Almajano et al., 2007; Chang et al., 2003; Lee et al., 2007; Huang y Frankel, 1997).

### ▪ *Análisis de productos volátiles de oxidación*

La oxidación lipídica puede conducir a la formación de un amplio número de productos secundarios y finales, muchos de éstos son compuestos volátiles tales como, aldehídos, cetonas, ácidos, esteres, eteres, hidrocarburos, entre otros (ver tablas 3 y 4). Aunque solo se presenten en pequeñas concentraciones, los volátiles están asociados al deterioro y off-flavours de los alimentos. Teniendo en cuenta esto, el uso de metodologías que permitan detectar e identificar dichos compuestos es una herramienta importante en el seguimiento de la oxidación lipídica y la actividad de un antioxidante. Los métodos más usados implican el análisis de los compuestos presentes en la fase de vapor sobre el alimento o espacio de cabeza (headspace). En el análisis por headspace, el alimento (o su fracción lipídica) es ubicado en un vial y los componentes volátiles son desplazados hacia la fase de vapor, posteriormente estos son extraídos del headspace y analizados (comúnmente por CG). La masa de cada uno de los componentes en el headspace dependerá de factores como su presión de vapor, concentración y temperatura.

Dos tipos de headspace son usados, estáticos y dinámicos; en el estático el vial con la muestra es sellado con una septa de teflón o caucho y asegurado con una tapa de aluminio, impidiendo la salida de los volátiles. El paso de los volátiles hacia el headspace se desarrolla durante un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio de partición (10 a 30 min), muchas veces éste es acelerado por adición de salmuera (salting-out), agitación o incremento de la temperatura. Una vez se ha alcanzado el equilibrio, se realiza un muestreo del headspace, el cual es analizado. Aunque es posible muestrear el headspace directamente desde el vial con una jeringa e inyectar en la columna del cromatógrafo, se pueden presentar inconvenientes como adsorción de trazas, condensación de volátiles en la jeringa y pérdida de compuestos durante la transferencia. Una alternativa, es el uso de autoinyector, en este caso el vial es ubicado en el automuestreador, la aguja penetra la tapa de caucho y el vial es presurizado, de forma tal que la presión en el vial sea cercana a la presión en la cabeza de la columna.

Posteriormente se bloquea el flujo de gas de arrastre, la presión en la cabeza de la columna baja y los compuestos del headspace pasan hacia la columna. Pasado el tiempo de inyección (5 segundos aproximadamente), se desbloquea el flujo de gas de arrastre e inicia el análisis (Pokorny et al., 2001).

La microextracción en fase sólida (MEFS) es una técnica alternativa para el análisis por headspace estático de los volátiles formados en la oxidación lipídica (Jiménez-Álvarez et al., 2008; Almajano et al., 2007; Lee et al., 2007). En ésta se usan jeringas especiales, que poseen en su interior una fibra cubierta con una fase estacionaria similar a la empleada en CG (polidimetilsiloxano, fenilpolidimetilsiloxano y polietilenglicol). La fibra está protegida por una aguja, la cual es introducida a través de la tapa de caucho del vial, una vez dentro, la fibra es expuesta al headspace y los compuestos son retenidos. Cuando se alcanza el equilibrio, o pasado un tiempo suficiente para la adsorción de los compuestos, la fibra es introducida de nuevo en la aguja y la jeringa es retirada del vial. Finalmente, los compuestos adsorbidos son térmicamente desorbidos en el inyector del cromatógrafo. Normalmente, la concentración de los volátiles generados por la oxidación lipídica es baja, por tanto, su desorción en el cromatógrafo debe asegurar la transferencia total de los mismos (modo on-column o sin división de flujo).

El análisis de headspace estático es una metodología relativamente rápida y simple, no requiere de solventes y permite analizar varias muestras en poco tiempo. Sin embargo, ésta es menos sensible que el headspace dinámico y se limita a los compuestos más volátiles. La MEFS es una técnica rápida y fácil de usar; no requiere sistemas de inyección especiales o solventes, adicional a esto, la formación de artefactos es mínima. Sin embargo, esta técnica posee una baja sensibilidad, las fibras son frágiles, costosas y requieren de cambio periódico (Pokorny *et al.*, 2001).

Un método alternativo para el análisis de productos volátiles de oxidación es el headspace dinámico. Éste involucra la purga o burbujeo continuo de la muestras con helio o nitrógeno y posterior atrapamiento de los compuestos, empleando algún material sólido. La desorción en el cromatógrafo de los volátiles atrapados se realiza ubicando el material sólido en el inyector e incrementando la temperatura. Eventualmente, puede llevarse a cabo una extracción con solventes del material sólido, acompañada de una

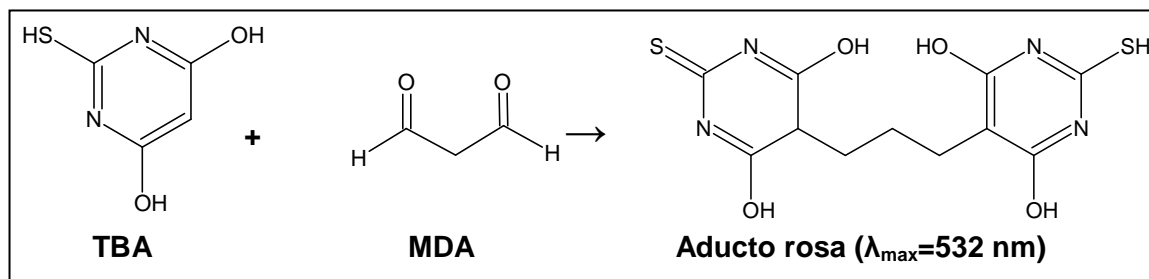


posterior evaporación del solvente e inyección en el cromatógrafo, sin embargo, esta modalidad es mucho menos sensible que la desorción térmica. El headspace dinámico permite analizar compuestos en un rango más amplio de volatilidad, sin embargo, en el caso de compuestos poco adsorbidos en el sólido pueden presentarse pérdidas.

En el seguimiento de la oxidación lipídica de aceites comestibles y emulsiones por headspace, el hexanal o el pentano son monitoreados cuando hay presencia de ácido linoléico u otros ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -6. En el caso de ácidos grasos  $\omega$ -3, los compuestos a monitorear son propanal, 2-hexenal, 3-hexenal, 2,4-heptadienal (Guillen y Goicoechea, 2008), mientras que en los lípidos ricos en ácidos grasos  $\omega$ -9, como el oleico (aceite de palma o de oliva), el seguimiento de su oxidación se realiza por monitoreo del nonanal (Mahungu et al., 1996). En la evaluación de la actividad de un antioxidante, la variación en la cantidad relativa o concentración de los volátiles es un indicador de la eficiencia de dicho compuesto. Niveles bajos de volátiles sugieren una buena actividad, por su parte, niveles altos indican baja actividad o un efecto prooxidante, en este último caso, una comparación directa con una muestra libre de antioxidante (CONTROL) es requerida.

### ▪ *Análisis de malondialdehído y otras TBARS*

El malondialdehído (MDA) y otras sustancias químicas formadas durante las etapas finales de la oxidación lipídica (alquenes y alcadienes) pueden reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA por sus siglas en inglés) para formar aductos con absorción a 532-535 nm (figura 34). El malondialdehído puede ser formado a partir de aldehídos  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados, hidroperóxidos cíclicos, endoperóxidos, epidioxidos, hidroperoxiepidioxidos, bicicloendoperóxidos y 1,3-dihidroperóxidos (Guillén-Sans y Guzmán-Chozas, 1998), mientras que, las otras TBARS se pueden formar a partir de hidroperóxidos. El análisis de estas TBARS proporcionan información acerca del desarrollo de la oxidación lipídica, la cual no es asequible por los métodos antes discutidos. Permite también cuantificar sustancias químicas que aportan off-flavour y son altamente nocivas para la salud humana, tales como 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE), glioxal, metilglioxal y el mismo MDA (Angel, 2009; Kazutoshi y Takayuki, 2004; Seppanen y Csallany, 2004; Koji, 2003).



**Figura 34. Reacción entre TBA y MDA.**

En la determinación de las TBARS, éstas reaccionan con un exceso de TBA en medio acuoso ( $\text{pH} \leq 3$ ) y a temperatura de ebullición (90-100 °C) (Bots oglou et al., 1994). El C3 del TBA (figura 34) posee una particular reactividad, la cual hace al compuesto susceptible de reaccionar con compuestos carbonílicos (aldehídos, cetonas, ácidos, esterés, azúcares entre otros) y nitrogenados (amidas, aminas, pirimidinas y aminoácidos). En el caso del MDA, alquenas y alcadienas, los productos de reacción poseen una coloración rosa (absorción a 532-535 nm), la cual caracteriza el ensayo de TBARS. La reacción con aldehídos saturados y algunos alquenas produce aductos con absorción a 450-455 nm, en este caso el incremento de la temperatura y tiempo de reacción hace que los aductos con los alquenas presenten absorción a 532 nm (Guillén-Sans y Guzmán-Chozas, 1998; Sun et al., 2001).

Diferentes componentes de los alimentos tales como proteínas, péptidos, azúcares, nitritos, sulfamidas y productos de la reacción de Maillard afectan la evaluación de las TBARS. Su interferencia es debida principalmente a la reacción con TBA dando productos con absorción a 532 nm, en el caso de las proteínas y azúcares, éstos también pueden interactuar con el MDA formando aductos. En este caso el MDA debe ser liberado por incremento del pH y temperatura, antes de proceder a reaccionar con el TBA. Una opción para incrementar la especificidad del método consiste en la separación cromatográfica de las diferentes TBARS, sin embargo, debido a las similitudes espectrales y cromatográficas de éstas, una derivatización precolumna es necesaria. Al respecto, la 2,4-dinitrofenilhidrazina ha sido empleada en el análisis de las TBARS por CLAE-DAD (Rudnicki et al., 2007).

Los antecedentes y bases teóricas previamente descritos, permitieron considerar que los residuos generados en el procesamiento de algunas frutas cultivadas en Colombia son fuente promisoría de antioxidantes, y que éstos pueden ser extraídos de forma eficiente y selectiva empleando la *EFS*. Teniendo en cuenta esto, dicho marco teórico fue empleado como herramienta durante el desarrollo experimental del presente trabajo, al igual que en el análisis y discusión de los resultados obtenidos.



## 2. Metodología

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos, se desarrolló la metodología esquematizada en la figura 35. El trabajo fue dividido en dos partes independientes enfocadas hacia la obtención de antioxidantes a partir de residuos frutícolas y su aplicación en alimentos como agentes protectores contra su oxidación lipídica. En la primera parte se evaluó la actividad antioxidante (AA) en aceite palma comestible (AP), mientras que en la segunda parte la AA fue evaluada en carne de res cocida (CRC). Cada parte del trabajo fue dividida en tres etapas, en la primera se obtuvieron extractos metanólicos, empleando extracción Soxhlet a presión reducida, a partir de cada uno de los residuos estudiados y su actividad antioxidante (AA) fue evaluada en AP y CRC. Los residuos que proporcionaron los extractos con mayor AA en AP y CRC fueron seleccionados y sometidos a extracción con fluidos supercríticos (*EFS*) durante la segunda etapa; en ésta, diferentes presiones, temperaturas y porcentajes de cosolvente fueron empleados y su efecto sobre el rendimiento y AA de los extractos fue evaluado. Finalmente, en la última etapa se llevó a cabo la identificación de algunos compuestos presentes en los extractos que mostraron mayor AA. A continuación se describen los métodos empleados en cada etapa.

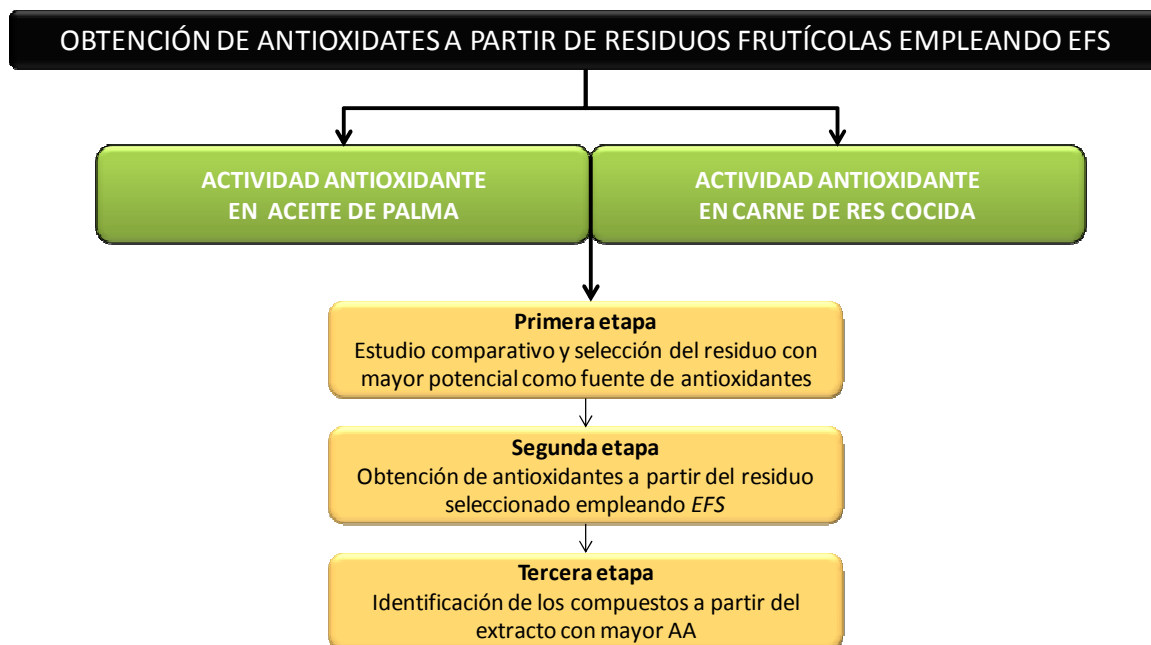


Figura 35. Esquema general de la metodología desarrollada.

## 2.1 Obtención de extractos Soxhlet

### 2.1.1 Muestras y preparación

Los residuos fueron obtenidos a partir del material descartado durante el procesamiento de los respectivos frutos, éstos fueron proporcionados por Alimentos SAS (Bogotá) y la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (La Vega, Cundinamarca) (ver tabla 5). Las semillas y epicarpios fueron limpiados, lavados y secados a temperatura ambiente por 72 h, posteriormente se molieron usando un molino para granos de tolva baja con adición de CO<sub>2</sub> sólido para minimizar la degradación de los antioxidantes. Cada residuo molido fue tamizado, seleccionando las fracciones con tamaños entre 0.850 y 0.180 mm (US Standard -18/+80). Finalmente, las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas a -20 °C hasta su uso.

**Tabla 5. Residuos frutícolas empleados en el estudio comparativo de actividad antioxidante.**

Nombre común	Nombre científico	Familia	Residuo estudiado	Siglas <sup>a</sup>
Mango de azúcar	<i>Mangifera indica</i> L.	Anacardiaceae	Epicarpio	EMa
			Cubierta de semilla	CSMa
Mango tomy	<i>Mangifera indica</i> L. var Tommy Atkins		Kernel de semilla <sup>b</sup>	KSMa
			Epicarpio	EMT
			Cubierta de semilla	CSMt
			Kernel de semilla <sup>b</sup>	KSMt
Lulo	<i>Solanum quitoense</i> Lam	Solanaceae	Epicarpio	EL
Tomate de árbol <sup>c</sup>	<i>Solanum betaceum</i> Sendtn		Semillas	SL
Uchuva	<i>Physalis peruviana</i> L.		Epicarpio	ETA
			Cáliz	CU
Maracuyá	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Passifloraceae	Epicarpio	EMc
			Semillas	SMc
Curuba	<i>Passiflora mollissima</i> Bailey		Semillas	SC
Café	<i>Coffea arabica</i> L.	Rubiaceae	Epicarpio	ECf
Papaya	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	Epicarpio	EPy
			Semillas	SPy
Guanabana	<i>Annona muricata</i> L.	Anonaceae	Epicarpio	EG
			Semillas	SG
Guayaba	<i>Psidium guajava</i> L.	Mirtaceae	Semillas	SGy
Naranja	<i>Citrus sinensis</i> L.	Rutaceae	Epicarpio	EN
Piña	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr	Bromeliaceae	Epicarpio	EP
Mora	<i>Rubus glaucus</i> Benth	Rosaceae	Semillas	SM

<sup>a</sup> Siglas usadas para hacer referencia a cada residuo.

<sup>b</sup> Almendra de la semilla.

<sup>c</sup> En este trabajo se empleó la variedad amarilla (tomate de árbol común).

### 2.1.2 Obtención de extractos

Los extractos fueron obtenidos por el método Soxhlet a presión reducida usando metanol (MeOH) como solvente. Las muestras (entre 5 a 30 g) fueron ubicadas en un dedal de celulosa y cargadas en el extractor. El tiempo y temperatura de extracción empleados fueron 8 h y  $35 \pm 1$  °C, respectivamente. En cada extracción se empleó 150 mL de solvente. Para evaluar el rendimiento de extracción cada extracto fue sometido rotaevaporación y liofilización. Finalmente los extractos fueron reconstituidos en etanol y almacenados a -10 °C hasta la evaluación de su AA en AP y CRC siguiendo los procedimientos descritos en la sección 3.2.

## 2.2 Estudio comparativo y selección de residuos con el mayor potencial como fuentes de antioxidantes

### 2.2.1 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos

La AA de los diferentes extractos obtenidos fue evaluada en AP y CRC, se determinó la eficiencia de cada uno para retardar o inhibir la oxidación lipídica por medición de algunos productos de oxidación tales como hidroperóxidos, aldehídos volátiles (hexanal y nonanal) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

#### ▪ Actividad antioxidante en aceite de palma comestible

La actividad antioxidante de los extractos obtenidos fue evaluada empleando AP (refinado, blanqueado y desodorizado) libre de antioxidantes y con un contenido de ácidos grasos insaturados igual al 70%<sub>p/p</sub> (60 y 35%<sub>p/p</sub> de oleico y linoleico, respectivamente), el cual fue proporcionado por la productora de grasas y aceites Duquesa S.A. (Bogotá). La oxidación del AP y la medición de la AA de los extractos fueron realizadas con base en trabajos previos sobre oxidación de aceites comestibles (Hernández-Acosta et al., 2011; Huang y Frankel, 1997).

#### ▪ Oxidación del aceite de palma comestible

Muestras de AP (20 g) fueron ubicadas en frascos de vidrio ámbar con tapa y se les adicionó una disolución metanólica de cloruro ferroso obteniendo una concentración final de Fe<sup>+2</sup> igual a 3.5 mg/kg. Posteriormente, los extractos fueron adicionados a una concentración final de 300 mg/kg (World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO, 2009) y la mezcla se homogenizó en vortex por 2 min. Muestras adicionales fueron preparadas de la misma forma, sin embargo, a éstas se les adicionó los antioxidantes sintéticos, BHT, BHA, TBHQ y el antioxidante de referencia ácido gálico (AG). Una muestra CONTROL se preparó de la misma forma adicionando EtOH sin antioxidantes. Un set de muestras fue tomado para análisis inmediato (día cero) y las otras (adicionadas con los extractos o compuestos) fueron sometidas a oxidación por calentamiento a 60 ± 2 °C en estufa por 15 días, con agitación y burbujeo de aire cada 12 h. El desarrollo de la oxidación lipídica fue determinada cada



3 días por medición del contenido de hidroperóxidos del ácido linoleico (HPL), hexanal (HEX) y nonanal (NON) y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

▪ ***Medición de los hidroperóxidos de ácido linoleico***

La formación de HPL fue evaluada por el método de dienos conjugados (Huang y Frankel, 1997; Frankel et al., 1994). 50 mg de AP oxidado fueron diluidos en isooctano y la absorbancia de la disolución fue medida a 234 nm. La concentración de HPL fue calculada usando el coeficiente de extinción molar de los HPL ( $\xi=26000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Chan y Levett, 1977), los resultados son expresados como mmol de HPL por kilogramo de AP (mmol HPL/kg).

▪ ***Medición de hexanal y nonanal***

La descomposición de los HPL y los hidroperóxidos del ácido oleico (HPO) a aldehídos (HEX y NON, respectivamente) fue medida empleando la técnica de espacio de cabeza, microextracción en fase sólida y análisis por cromatografía de gases (Lee et al., 2007). EL AP oxidado (500 mg) fue ubicado en un vial ámbar para headspace de 20 mL, un agitador magnético fue puesto en el interior y el vial se selló con una septa de caucho y tapa de aluminio. El vial fue ubicado en un baño de agua a  $50 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  con agitación continua (700 rpm) y la muestra se equilibró durante 20 min. Posteriormente se insertó la fibra de divinilbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (50/30  $\mu\text{m}$ , DVB/CAR/PDMS) y se expuso durante 30 min. Los compuestos adsorbidos fueron analizados por CG con detector de ionización a la llama (FID).

En el análisis por CG se usó un cromatógrafo perteneciente al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá. El Cromatógrafo (GC Agilent Technologies 6820 GC System) estaba equipado con un inyector split/splitless con inserto de vidrio de 0.75 mm d.i. para inyección en modo splitless, una columna DB-5 (30 m; 0.25 mm; 0.1  $\mu\text{m}$ ) y detector de ionización a la llama. La temperatura de horno fue programada iniciando a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 min, incrementando desde  $30$  a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  y desde  $60$  a  $280 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , manteniéndose a  $280 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 min. Helio fue usado como gas de arrastre a un flujo de  $1.8 \text{ mL}/\text{min}$ . La temperatura del inyector y detector fue  $250$  y  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. La desorción de los compuestos a partir de la fibra de MEFS se realizó en modo splitless por 2 min. El HEX y NON fueron identificados por

coelución y comparación con estándares. Los resultados son expresados como unidades de área bajo la curva por mg de AP (ABC/mg).

▪ ***Medición de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico***

Las TBARS fueron medidas con base en reportes previos con ligeras modificaciones (Wang y Xiong, 2005; Maraschiello et al., 1999; Lee et al., 1999; Jun et al., 1999). Se ubicaron 100 mg de AP oxidado en un tubo falcon y se adicionó sucesivamente 50  $\mu$ L de una disolución metanólica de BHT (23 mM), 1.5 mL de disolución acuosa de ácido tiobarbitúrico (26 mM) y 10 mL ácido tricloroacético (0.30 M en HCl 0.2 M). La mezcla se agitó en vortex por 30 s y se ubico en baño de agua en ebullición por 40 min, pasado el tiempo de reacción, ésta se detuvo sumergiendo el tubo en un baño de hielo. Se tomaron 5 mL de la suspensión se mezclaron con 5 mL de cloroformo, se agitaron en vortex por 30 s y se centrifugaron a 5500 rpm por 20 min. Se tomó la fase acuosa y se determinó su absorbancia a 532 nm. Los resultados obtenidos son expresados en términos de mg de malondialdehído (MDA) por kilogramo de AP (mg MDA/Kg), para esto se preparó una curva de calibración MDA (0.036  $\mu$ M a 0.185  $\mu$ M) obtenido por hidrólisis de 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

▪ **Actividad antioxidante en carne de res cocida**

La AA de los extractos fue evaluada en CRC partiendo de trabajos previos realizados con carnes cocidas o sistemas similares (Brettonnet et al., 2010; Juntachote et al., 2006).

▪ ***Preparación de carne de res y almacenamiento***

La carne de res (CR) empleada fue un musculo semimembranoso (morrillo) con un contenido de grasa entre 20 y 30%, éste fue adquirido en un mercado local de Bogotá y de Florianópolis-Santa Catarina (Brasil). La CR (20 kg) fue lavada y el tejido conectivo y grasa externa fueron removidos. Posteriormente fue dividida, por cuarteos sucesivos, hasta obtener 32 fracciones de 600 g y cada fracción fue cortada en cubos de 1 cm<sup>3</sup> aproximadamente. Finalmente todas las fracciones fueron mezcladas de forma aleatoria y almacenadas en bolsas plásticas a -80 °C hasta los ensayos de AA.

La CR fue molida en licuadora a máxima velocidad usando ciclos cortos hasta obtener un pate homogéneo. Porciones de CR molida (20 g) fueron ubicadas en tubos falcon ambar

y se llevaron a cocción en baño de agua a 75 °C, hasta alcanzar una temperatura interna de 65 °C (aproximadamente 40 min), obteniendo la CRC. Los extractos, antioxidantes sintéticos (BHT, BHA y TBHQ) y AG fueron adicionados a CRC a una concentración final de 200 mg/kg (World Health Organization-WHO y Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO 2009). Una muestra CONTROL fue preparada de forma similar adicionando EtOH sin antioxidantes. Un set de CRC sin antioxidantes fue sometida a análisis inmediato (día cero), mientras que las adicionadas con los extractos y antioxidantes fueron almacenadas a 4 °C por 9 días. La oxidación lipídica fue determinada cada 3 días por medición del contenido de HPL y TBARS.

#### ▪ *Medición de hidroperóxidos*

La formación de hidroperóxidos fue evaluada por el método de dienos conjugados (Juntachote et al., 2006; Frankel et al., 1994). La CRC oxidada fue sometida a extracción de los hidroperóxidos con varias porciones hexano:MeOH (1:1), la capa apolar fue concentrada en vacío y los HPL fueron diluidos en isooctano, posteriormente se midió la absorbancia de la disolución a 234 nm. La concentración de hidroperóxidos fue calculada como se describió previamente y los resultados son expresados como mmol de HPL por kg de CRC (HPL/kg).

#### ▪ *Medición de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico*

Las TBARS fueron medidas siguiendo el procedimiento descrito previamente, sin embargo, en este caso se emplearon 500 mg de CRC oxidada en cada medición.

### 2.2.2 Diseño experimental y análisis estadístico

En esta etapa se empleó un diseño experimental por bloques completamente aleatorio. Todas las extracciones y mediciones de AA fueron realizadas por triplicado, los datos de rendimientos y AA son reportados como la media y su desviación estándar ( $\pm$ DE). Los datos obtenidos en la evaluación del rendimiento de extracción fueron sometidos a un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía (95% de confianza), con el fin de identificar diferencias significativas entre sus medias. Por su parte, los datos obtenidos en la evaluación de la AA fueron sometidos a un ANOVA de dos vías (95% de confianza). Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) como herramienta para el análisis de los datos de AA y al mismo tiempo establecer diferencias y similitudes en la AA de los

extractos. Adicional a esto, se realizó un análisis de clusters con el fin de agrupar los extractos en función de su AA. El ACP y el AC ayudaron a identificar los residuos más promisorios como fuente de extractos con AA en AP y CRC. Todos los análisis fueron realizados empleando el software R (Versión 2.13.0 para Windows).

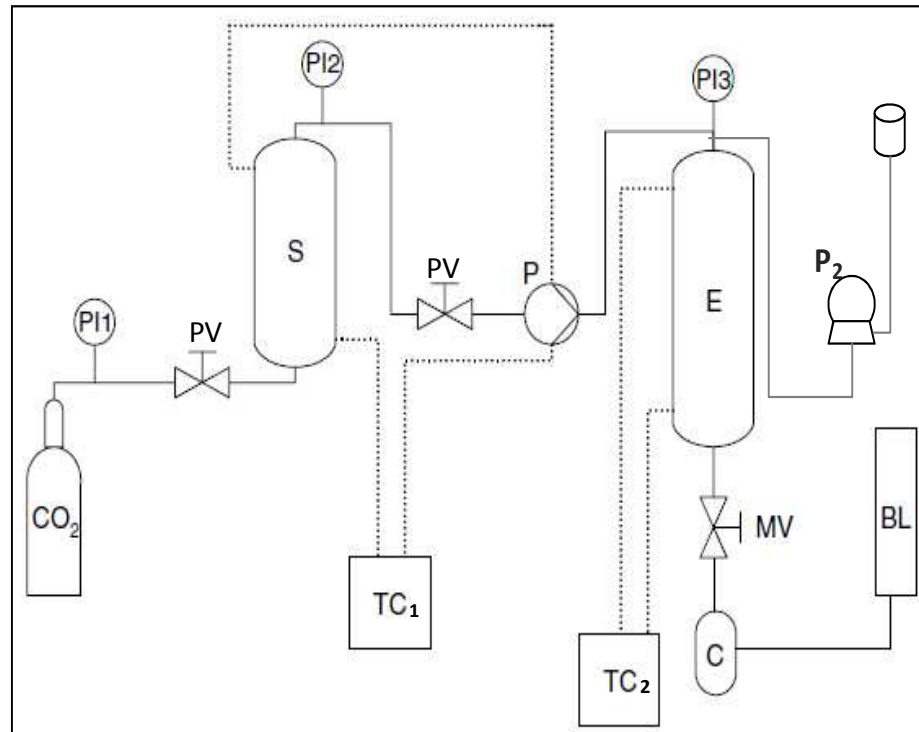
## 2.3 Obtención de antioxidantes empleando extracción con fluidos supercríticos

### 2.3.1 Preparación de muestras

Los residuos seleccionados fueron secados y molidos, de forma independiente, usando molino de cuchillas y el material resultante fue separado empleando una batería de tamices en agitador vertical. En la primera parte del trabajo se empleó el material con tamaños de partícula entre 0.850 y 0.300 mm (-18/+50 US Standard) y en la segunda parte el material con tamaños entre 0.500 y 0.208 mm (-35/+70 US Standard). Los tamaños medios de partícula de las muestras empleadas fueron  $0.496 \pm 0.003$  mm en la primera parte y  $0.278 \pm 0.008$  mm en la segunda parte, calculados con base en la distribución media de tamaños (Gomide, 1983). Finalmente, las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas a  $-20$  °C hasta su uso.

### 2.3.2 Obtención de extractos

La *EFS* fue realizada en una unidad de extracción dinámica perteneciente al Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica de la Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC, Brasil (Danielski et al., 2007; Zetzel et al., 2003). El equipo consistía de un reservorio de CO<sub>2</sub>, un acumulador de CO<sub>2</sub> (**S**), un baño frío a  $-10$  °C (**TC**<sub>1</sub>), una bomba neumática (**P**), una columna de extracción de 100 mL en acero inoxidable (**E**), válvulas de paso (**PV**), válvula micrométrica (**MV**), manómetros (**PI**<sub>1</sub>, **PI**<sub>2</sub> y **PI**<sub>3</sub>), un colector de extracto (**C**) y un flujometro (**BL**). La temperatura de extracción fue controlada con un baño termostático (**TC**<sub>2</sub>). El cosolvente fue suministrado empleando una bomba de CLAE (**P**<sub>2</sub>) a una presión y flujos preestablecidos, el cosolvente fue mezclado con el CO<sub>2</sub> antes de su ingreso a **E** (Figura 36).



**Figura 36. Unidad de extracción supercrítica empleada.**

Las muestras secas y molidas, en forma independiente, fueron ubicadas en la columna de extracción formando un lecho fijo de partículas, posteriormente se alcanzaron las condiciones de extracción (presión, temperatura y flujo de solvente) (Michielin et al., 2009). Para cada muestra los ensayos de *EFS* fueron divididos en tres grupos:

1. Obtención de la curva de extracción (CE); ésta fue realizada con el fin de determinar el tiempo de extracción más adecuado para llevar a cabo los ensayos de los grupos 2 y 3. La CE fue obtenida empleando  $\text{CO}_2$  a  $50\text{ }^\circ\text{C}$ /  $20\text{ MPa}$  y flujo constante de solvente de  $0.5 \pm 0.05\text{ kg/h}$ . El extracto fue recolectado en intervalos de tiempo previamente establecidos (Benelli, 2010; Mezzomo, 2008; Good et al., 2005); cada 5 min por 30 min, cada 10 min por 60 min, cada 30 min por 150 min y cada 60 min por 180 min.
2. Obtención de extractos con  $\text{CO}_2$  a diferentes condiciones de extracción; los extractos fueron obtenidos empleando el tiempo de extracción determinado para cada residuo en los ensayos del grupo 1, un flujo constante de  $\text{CO}_2$  ( $0.5 \pm 0.05\text{ kg/h}$ ) y diferentes temperaturas ( $40, 50$  y  $60\text{ }^\circ\text{C}$ ) y presiones ( $10, 20$  y  $30\text{ MPa}$ ).

3. Obtención de extractos con CO<sub>2</sub> adicionado con EtOH como cosolvente (CO<sub>2</sub>/EtOH); se emplearon las condiciones más adecuadas de tiempo, temperatura y presión, obtenidos en los ensayos de los grupos 1 y 2, con un flujo constante de CO<sub>2</sub> igual a  $0.5 \pm 0.05$  kg/h. Los extractos fueron obtenidos variando la concentración de cosolvente de 2, 5 y 8%<sub>p/p</sub>. Después cada extracción el cosolvente fue removido en rotavapor, los extractos fueron pesados y reconstituidos en EtOH.

La AA de todos los extractos supercríticos obtenidos fue evaluada en AP o CRC siguiendo los procedimientos descritos en la sección 3.2.. En este caso los resultados son presentados como la diferencia en el contenido de HPL, HEX, NON y TBARS entre los días 0 y 15 para la AA en AP y la diferencia en el contenido de hidroperóxidos y TBARS entre los días 0 y 9 para la AA en CRC.

### **2.3.3 Diseño experimental y análisis estadístico**

En esta etapa del trabajo se empleó un diseño factorial 3<sup>2</sup>, todas las extracciones y mediciones de AA fueron realizadas por triplicado, los datos de rendimientos y AA son reportados como la media y su desviación estándar. Los datos obtenidos en la evaluación del rendimiento de extracción y AA fueron sometidos a un ANOVA de de dos vías (95% de confianza), con el fin de identificar diferencias significativas entre sus medias. Todos los análisis fueron realizados empleando el software R (Versión 2.13.0 para Windows).

## **2.4 Identificación de los compuestos con actividad antioxidante en aceite de palma y carne de res cocida**

### **2.4.1 Fraccionamiento de extractos**

El extracto con mayor AA en AP fue fraccionado empleando un cartucho de extracción en fase solida empacado con octadecilsilano (ODS) como fase estacionaria (Reid y Sarker, 2005). 500 mg de extracto, previamente liofilizado y desengrasado, disueltos en una mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O (1:9), fueron inyectados en el cartucho (3.0 g de ODS); los

compuestos fueron eluidos empleando un gradiente de MeOH:H<sub>2</sub>O (flujo 1 mL/min), cinco fracciones fueron obtenidas correspondientes a cinco composiciones MeOH:H<sub>2</sub>O (1:9, 3:7, 6:4, 8:2 y 100% MeOH), cada fracción fue eluida empleando 65 mL de solvente, éstas fueron rotuladas como F1, F2, F3, F4 y F5, respectivamente.

Por otra parte, el extracto con mayor AA en CRC fue fraccionado empleando un cartucho empacado con diol como fase estacionaria. 300 mg de extracto, previamente liofilizado, disuelto en una mezcla acetato de etilo:hexano (1:9) fueron inyectados en el cartucho (2.0 g de diol); los compuestos fueron eluidos empleando un gradiente de acetato de etilo:hexano (flujo 1 mL/min), cuatro fracciones fueron obtenidas según la composición de la fase de elución (hexano:acetato de etilo 9:1, 7:3, 4:6 y 2:8, 25 mL de cada uno) éstas fueron rotuladas de F1 a F4, respectivamente.

Todas las fracciones fueron concentradas en rotavapor y liofilizadas evaluando su rendimiento, posteriormente fueron y reconstituidas en EtOH. La AA en AP o CRC de las fracciones fue evaluada siguiendo los procedimientos descritos en la sección 3.2, los resultados son presentados como la diferencia en el contenido de HPL, HEX, NON y TBARS entre los días 0 y 15, para la AA en AP, y la diferencia en el contenido de hidroperóxidos y TBARS entre los días 0 y 9, para la AA en CRC. Finalmente, las fracciones con mayor AA fueron sometidas a análisis por CLAE-EM o CLAE-DAD con el fin de identificar algunos de los compuestos presentes en éstas.

#### **2.4.2 Análisis por CLAE-EM**

Una de las fracciones con mayor AA en AP fue sometida a análisis por CLAE-ESI-EM y CLAE-ESI-EM/EM. Los análisis fueron realizados en un equipo de CLAE-EM perteneciente al Departamento de Química de la Universidad de los Andes, Bogotá. El Equipo (Agilent Technologies 1260) estaba dotado con una bomba binaria (Agilent Technologies G1312B), un autoinyector y se encontraba acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 6520) con un analizador híbrido, cuadrupolo y tiempo de vuelo en serie. Como fuente de ionización se empleó electrospray (ESI). La separación cromatográfica fue realizada empleando una columna en fase reversa Zorbax Extend C-18 (Agilent Technologies) 50 mm x 2.1mm x 1.8 µm a 30 °C. La elución se realizó en modo isocrático empleando como fase móvil MeOH:H<sub>2</sub>O (1:9), adicionada con formiato

de amonio (concentración final 10 mM), a un flujo de 0.2 mL/min. En todos los análisis se emplearon 0.5  $\mu$ L de fracción disuelta en MeOH en una concentración igual a 50 ppm. Todos los espectros fueron obtenidos en modo negativo empleando las siguientes condiciones<sup>1</sup>: nitrógeno como gas de nebulización a 300  $^{\circ}$ C, 10 L/min y 40 psi, voltaje del capilar 3.5 kV, voltaje del colimador (fragmentor) 175 V y voltaje del octopolo de referencia 750 V. El análisis de masas se realizó en modo scan en un rango de m/z entre 50 y 1000. En los análisis de CLAE-ESI-EM/EM se seleccionó un ion padre el cual fue sometido a fragmentación, para tal fin se emplearon diferentes temperaturas (entre 200 a 365  $^{\circ}$ C) y energías del gas colisión (entre 15 y 30 eV), seleccionando 350  $^{\circ}$ C y 20 eV como las más adecuadas para el análisis. Las condiciones cromatográficas y demás condiciones de detección se mantuvieron iguales a las indicadas previamente. Todos los resultados de EM y EM/EM fueron analizados empleando el software MassHunter Workstation de Agilent Technologies.

### 2.4.3 Análisis de compuestos fenólicos por CLAE-DAD

Los análisis fueron realizados empleando un método estandarizado por el Laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigación en Biomoléculas de la Universidad Industrial de Santander. Se empleó un cromatógrafo líquido (Agilent Technologies 1200 series) dotado con un detector de arreglo de diodos y autoinyector. La separación de los analitos fue realizada empleando una columna en fase reversa KINETEX C18 (Phenomenex) 100 mm x 4.6 mm x 2.6  $\mu$ m a 35  $^{\circ}$ C. La elución se realizó empleando el gradiente indicado en la tabla 6 a un flujo de 1 mL/min. En todos los análisis se emplearon 10  $\mu$ L de fracción disuelta en MeOH a una concentración de 5000 ppm.

---

<sup>1</sup> La elección de polaridad y condiciones de análisis fueron establecidas a partir de ensayos previos no reportados en el presente trabajo.



**Tabla 6. Gradiente de elución empleado en los análisis por CLAE-DAD.**

t (min)	% Solvente A (ácido acético 0.3%)	% Solvente B (Acetonitrilo)
0	95.5	4.5
13	95.5	4.5
14	85.0	15
17	85.0	15
20	78.0	22
28	78.0	22
30	0	100
33	0	100
34	95.5	4.5
40	95.5	4.5

Para la identificación de los compuestos se empleó una disolución de patrones certificados, a una concentración conocida, compuesta por ácidos fenólicos (gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, ferúlico y cinámico), catequinas (catequina, galato de epigalocatequina, epicatequina, galato de epicatequina y epigalocatequina), xantinas (cafeína, teobromina y teofilina) y flavonoides (ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, quercetina, naringenina, luteolina, kaempferol, ácido ursólico y pinocembrina). La asignación de identidades se realizó por comparación de los tiempos de retención y los espectros ultravioleta-visible (UV-Vis). Un blanco de muestra (MeOH) fue analizado, siguiendo el procedimiento antes indicado.

#### 2.4.4 Análisis por resonancia magnética nuclear

Una de las fracciones obtenidas fue sometida a análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN), los análisis fueron realizados empleando un espectrómetro de RMN Bruker DRX-400 operando a 400 MHz para protón y 100 MHz para carbono 13 y empleando metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) como solvente. La fracción fue sometida a experimentos de distorsión por incremento de polarización a  $135^\circ$  (DEPT 135, por sus siglas en inglés), correlación simple heteronuclear (HSQC, por sus siglas en inglés) y correlaciones multienlace heteronucleares (HMBC, por sus siglas en inglés).

### 3. Resultados y Discusión

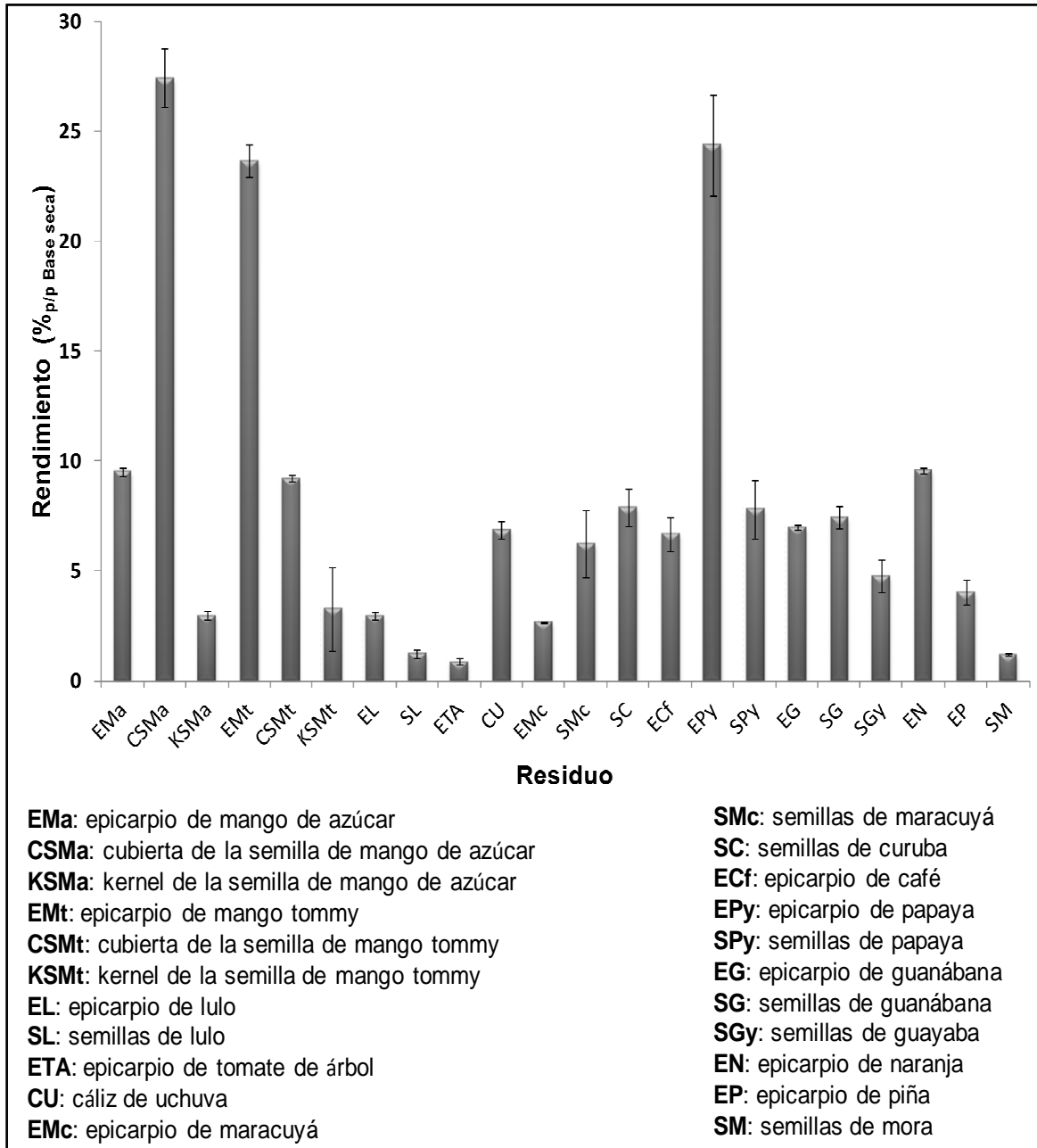
El presente trabajo consistió en la obtención de antioxidantes a partir de residuos frutícolas. En la primera parte de éste se evaluó la actividad antioxidante (AA) en aceite de palma comestible (AP) y en la segunda se evaluó la AA en carne de res cocida (CRC). Cada parte fue dividida en tres etapas; en la primera se realizó un estudio comparativo de la AA de extractos Soxhlet obtenidos a partir de cada residuo, seleccionando aquel que presentó el mayor potencial como fuente de antioxidantes. En la segunda etapa el residuo seleccionado en la etapa anterior fue sometido a extracción con fluidos supercríticos (*EFS*) y la AA de los extractos obtenidos fue evaluada. Finalmente, en la última etapa se llevo a cabo la identificación de algunos compuestos presentes en el extracto con mayor AA.

Antes de presentar los resultados obtenidos en la evaluación de la AA en AP y CRC, se presentan los rendimientos de extracción obtenidos en la extracción Soxhlet a partir de cada residuo (Figura 37<sup>2</sup>). De forma general los residuos estudiados se pueden organizar en cuatro grupos, según sus rendimientos de extracción. El primer grupo presentó rendimientos mayores al 20% (CSMa con 27.41%, EPy con 24.38% y EMt con 23.65%). El segundo grupo presentó rendimientos entre 5 y 10% (CSMt con 9.21%, EN con 9.56%, EMa con 9.51%, SC con 7.91%, SPy con 7.82%, EG con 7.47%, SG con 7.43%, CU con 6.85%, ECf con 6.67% y SMc con 6.25%). El tercer grupo con rendimientos entre 2 y 5% (SGy con 4.77%, EP con 4.04%, KSMt con 3.28%, KSMa con 2.98%, EL con 2.96% y EMc con 2.65%). En el último grupo están los residuos con rendimientos inferiores a 2% (SL con 1.23%, SM con 1.20% y ETA con 0.88%).

---

<sup>2</sup> Los datos se presentan en el ANEXO A

Una vez obtenidos los extractos Soxhlet de cada residuo se evaluó su AA en AP (sección 4.1) y CRC (sección 4.2), determinando su potencial como fuente de compuestos con capacidad para retardar la oxidación lipídica en dichos alimentos.



**Figura 37. Rendimientos obtenidos en la extracción Soxhlet de los residuos frutícolas estudiados.**

### **3.1 Obtención de antioxidantes a partir de residuos frutícolas y evaluación de su actividad antioxidante en aceite de palma comestible**

Para evaluar la AA en AP de los extractos Soxhlet de los residuos se determinó la producción de algunos productos de oxidación en función del tiempo y mediante un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de clusters (AC) fue posible seleccionar el residuo con el mayor potencial como fuente de antioxidantes. Con el propósito de emplear una técnica de extracción inocua, sobre el residuo elegido, éste fue sometido a extracción con fluidos supercríticos (EFS) empleando como solvente dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y CO<sub>2</sub> adicionado con etanol (EtOH) como cosolvente (CO<sub>2</sub>/EtOH). La AA de los extractos supercríticos fue determinada al medir la diferencia en el contenido de los productos de oxidación entre los días 0 y 15 de oxidación. Por último, el extracto con mayor AA en AP fue sometido a un fraccionamiento y algunos compuestos presentes en las fracciones con mayor AA fueron identificados empleando CLAE-EM y CLAE-DAD.

#### **3.1.1 Estudio comparativo y selección del residuo con el mayor potencial como fuente de antioxidantes**

La eficiencia de cada extracto para retardar la oxidación lipídica de AP fue determinada en función del tiempo por medición del contenido de algunos productos de oxidación como los hidroperóxidos del ácido linoleico (HPL), hexanal (HEX), nonanal (NON) y las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), dicha eficiencia fue comparada frente a la observada para los antioxidantes sintéticos BHT, BHA y TBHQ y el antioxidante de referencia AG. En las tablas 7 a 9 se presentan los resultados obtenidos en la medición de la concentración de HPL, HEX, NON y TBARS, respectivamente. En éstas se observa, salvo algunas excepciones, que el contenido de dichos productos de oxidación incrementa a medida que pasa el tiempo de oxidación, presentándose los valores más altos en el día 15. Los resultados obtenidos proporcionan información sobre la eficiencia de los extractos y antioxidantes para retardar la formación de productos en etapas diferentes de la autooxidación. Es decir, los HPL son productos formados en las etapas iniciales, las TBARS son productos secundarios y finales, mientras que el HEX y NON son productos finales. Teniendo en cuenta esto, el análisis de la AA de cada extracto o antioxidante debe hacerse tomando los resultados de HPL, HEX, NON y TBARS en

función de tiempo de forma conjunta, de tal manera que se establezca si el extracto o antioxidante retarda de forma eficiente la oxidación lipídica en sus diferentes etapas durante los 15 días de oxidación. Para tan fin, en el presente trabajo se realizó un ACP el cual permitió identificar los extractos con mayor AA; de forma complementaria mediante un AC se logró agrupar a los extractos y antioxidantes en función de su AA.

**Tabla 7. Hidroperóxidos formados durante la oxidación de AP adicionado con los extractos y antioxidantes.**

mmol hidroperóxidos de ácido linoleico/kg aceite de palma (mmol HPL/kg)					
Extracto o antioxidante	Días de oxidación*				
	3	6	9	12	15
CONTROL	11.28 ± 1.76	13.52 ± 2.10	32.22 ± 3.19	52.92 ± 5.52	54.69 ± 3.76
EMa	11.00 ± 0.73	12.44 ± 1.97	15.02 ± 0.60	16.22 ± 0.55	27.35 ± 1.00
CSMa	7.40 ± 0.54	15.55 ± 0.37	19.70 ± 0.63	22.90 ± 1.58	26.15 ± 0.14
KSMa	8.80 ± 0.33	12.23 ± 0.61	13.86 ± 0.27	17.43 ± 1.04	23.18 ± 1.06
EMt	17.28 ± 1.61	18.95 ± 2.75	21.13 ± 0.74	29.80 ± 0.94	48.21 ± 4.74
CSMt	8.53 ± 0.55	21.21 ± 2.64	23.47 ± 2.57	27.12 ± 0.74	29.31 ± 1.36
KSMt	18.96 ± 0.23	25.19 ± 0.45	33.10 ± 2.00	36.15 ± 0.60	26.53 ± 1.58
EL	9.46 ± 0.46	6.64 ± 0.72	13.88 ± 0.85	19.29 ± 1.39	22.28 ± 3.45
SL	7.64 ± 1.78	7.87 ± 0.48	19.29 ± 1.96	27.86 ± 2.87	36.46 ± 3.12
ETA	7.80 ± 0.52	9.24 ± 0.17	22.52 ± 0.59	37.81 ± 1.20	41.87 ± 0.71
CU	12.51 ± 1.27	12.61 ± 0.37	15.51 ± 0.80	19.07 ± 0.66	24.90 ± 0.25
EMc	13.95 ± 1.06	22.08 ± 0.32	24.80 ± 1.88	31.56 ± 1.37	36.14 ± 2.76
SMc	10.64 ± 1.08	11.70 ± 0.71	22.73 ± 0.69	25.02 ± 0.73	27.15 ± 2.77
SC	15.10 ± 0.88	17.54 ± 0.55	29.80 ± 2.01	30.90 ± 1.48	42.54 ± 0.96
ECf	9.78 ± 0.32	14.71 ± 0.75	17.93 ± 0.97	20.65 ± 0.76	23.32 ± 0.76
EPy	15.30 ± 0.98	14.28 ± 0.34	16.16 ± 0.27	20.02 ± 0.96	24.29 ± 1.30
SPy	10.12 ± 0.29	9.76 ± 0.41	20.25 ± 0.29	31.11 ± 0.12	24.22 ± 1.15
EG	13.21 ± 0.31	12.54 ± 0.60	20.17 ± 1.01	23.43 ± 1.74	22.98 ± 1.59
SG	10.21 ± 1.19	9.19 ± 3.65	17.34 ± 2.85	19.29 ± 1.00	44.40 ± 0.38
SGy	9.58 ± 0.76	10.32 ± 0.73	17.33 ± 1.04	32.17 ± 1.62	22.55 ± 0.85
EN	8.90 ± 0.32	12.18 ± 1.53	17.83 ± 1.70	20.74 ± 1.19	23.96 ± 1.83
EP	14.79 ± 1.24	16.20 ± 0.46	17.91 ± 0.49	21.23 ± 0.72	20.96 ± 0.69
SM	7.94 ± 0.96	8.42 ± 1.18	17.66 ± 1.20	19.29 ± 3.56	38.51 ± 1.40
BHT	8.94 ± 2.16	5.96 ± 1.30	12.82 ± 1.72	13.37 ± 1.63	8.46 ± 1.04
BHA	11.91 ± 1.65	12.81 ± 2.20	23.38 ± 0.31	25.60 ± 4.04	34.24 ± 1.10
AG	8.42 ± 0.54	10.91 ± 0.31	17.50 ± 1.60	19.33 ± 0.98	30.26 ± 0.82
TBHQ	9.23 ± 0.39	10.86 ± 0.37	17.89 ± 0.60	18.00 ± 1.57	18.18 ± 0.71

\* La concentración de HPL en el día cero fue  $7.35 \pm 0.53$  mmol HPL/kg.

**Tabla 8. Hexanal y nonanal formados durante la oxidación de AP adicionado con los extractos y antioxidantes.**

Área bajo la curva/mg aceite de palma (ABC/mg)										
Extracto o antioxidante	Hexanal					Nonanal				
	Días de oxidación					Días de oxidación				
	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
CONTROL	0.92 ± 0.06	1.19 ± 0.02	1.53 ± 0.07	2.00 ± 0.12	2.49 ± 0.05	0.39 ± 0.015	0.69 ± 0.064	0.81 ± 0.005	0.96 ± 0.078	1.38 ± 0.041
EMa	0.34 ± 0.00	0.62 ± 0.03	0.97 ± 0.03	1.67 ± 0.13	2.04 ± 0.18	0.06 ± 0.001	0.15 ± 0.001	0.20 ± 0.010	0.26 ± 0.012	0.28 ± 0.001
CSMa	1.06 ± 0.07	1.93 ± 0.03	2.16 ± 0.04	3.05 ± 0.04	3.91 ± 0.16	0.20 ± 0.004	0.31 ± 0.019	0.44 ± 0.020	0.57 ± 0.011	0.72 ± 0.016
KSMa	1.87 ± 0.02	2.85 ± 0.10	3.26 ± 0.13	3.57 ± 0.08	6.46 ± 0.28	0.15 ± 0.013	0.24 ± 0.019	0.34 ± 0.046	0.33 ± 0.015	0.76 ± 0.046
EMt	1.67 ± 0.03	2.30 ± 0.03	9.25 ± 0.38	8.87 ± 0.39	13.39 ± 1.04	0.17 ± 0.010	0.27 ± 0.010	0.75 ± 0.020	0.89 ± 0.020	1.33 ± 0.270
CSMt	1.97 ± 0.22	3.45 ± 0.26	3.50 ± 0.09	3.79 ± 0.15	7.04 ± 0.46	0.19 ± 0.007	0.37 ± 0.023	0.47 ± 0.026	0.48 ± 0.039	0.93 ± 0.046
KSMt	1.50 ± 0.07	2.02 ± 0.13	7.78 ± 0.05	8.29 ± 0.44	15.39 ± 1.84	0.23 ± 0.011	0.28 ± 0.004	0.80 ± 0.051	0.81 ± 0.059	1.74 ± 0.146
EL	0.42 ± 0.04	0.61 ± 0.08	0.92 ± 0.05	1.39 ± 0.13	1.78 ± 0.10	0.32 ± 0.010	0.53 ± 0.030	0.67 ± 0.001	0.58 ± 0.030	0.78 ± 0.080
SL	0.22 ± 0.03	0.80 ± 0.08	1.14 ± 0.04	1.52 ± 0.12	1.98 ± 0.04	0.15 ± 0.016	0.39 ± 0.008	0.47 ± 0.058	0.56 ± 0.059	0.63 ± 0.072
ETA	0.44 ± 0.01	0.77 ± 0.05	1.36 ± 0.08	2.62 ± 0.12	2.69 ± 0.09	0.12 ± 0.010	0.24 ± 0.010	0.40 ± 0.030	0.63 ± 0.040	0.55 ± 0.030
CU	0.63 ± 0.05	1.22 ± 0.09	1.60 ± 0.07	2.70 ± 0.05	2.32 ± 0.08	0.20 ± 0.020	0.34 ± 0.020	0.39 ± 0.030	0.45 ± 0.010	0.55 ± 0.060
EMc	1.22 ± 0.02	2.33 ± 0.25	8.11 ± 0.44	10.62 ± 0.38	13.45 ± 1.05	0.11 ± 0.001	0.22 ± 0.030	0.60 ± 0.060	0.85 ± 0.010	1.43 ± 0.150
SMc	0.84 ± 0.08	1.03 ± 0.03	1.19 ± 0.07	1.84 ± 0.06	2.23 ± 0.22	0.37 ± 0.077	0.47 ± 0.010	0.53 ± 0.028	0.54 ± 0.031	0.61 ± 0.052
SC	2.05 ± 0.16	2.77 ± 0.12	9.94 ± 0.25	11.52 ± 0.35	22.00 ± 0.48	0.28 ± 0.019	0.41 ± 0.006	1.20 ± 0.070	1.05 ± 0.030	2.53 ± 0.191
ECf	0.34 ± 0.04	0.72 ± 0.03	1.33 ± 0.02	1.74 ± 0.01	2.48 ± 0.04	0.08 ± 0.010	0.14 ± 0.010	0.19 ± 0.010	0.25 ± 0.020	0.25 ± 0.020
EPy	1.08 ± 0.06	2.07 ± 0.09	2.45 ± 0.09	2.64 ± 0.03	4.61 ± 0.08	0.11 ± 0.020	0.16 ± 0.010	0.21 ± 0.010	0.29 ± 0.020	0.25 ± 0.010
SPy	0.21 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.43 ± 0.02	1.16 ± 0.08	1.46 ± 0.11	0.03 ± 0.004	0.05 ± 0.002	0.06 ± 0.004	0.11 ± 0.005	0.14 ± 0.021
EG	0.59 ± 0.02	1.36 ± 0.17	1.68 ± 0.18	1.81 ± 0.09	2.04 ± 0.06	0.17 ± 0.010	0.34 ± 0.010	0.43 ± 0.060	0.61 ± 0.060	0.73 ± 0.020
SG	0.42 ± 0.09	0.73 ± 0.16	1.00 ± 0.17	1.39 ± 0.11	2.25 ± 0.03	0.28 ± 0.024	0.66 ± 0.049	0.69 ± 0.042	0.58 ± 0.044	0.68 ± 0.010
SGy	0.75 ± 0.06	1.47 ± 0.11	1.52 ± 0.31	2.54 ± 0.28	2.53 ± 0.15	0.15 ± 0.015	0.26 ± 0.025	0.27 ± 0.066	0.47 ± 0.024	0.55 ± 0.074
EN	1.59 ± 0.20	2.23 ± 0.33	2.98 ± 0.12	3.07 ± 0.12	4.79 ± 0.56	0.15 ± 0.010	0.24 ± 0.020	0.34 ± 0.050	0.33 ± 0.020	0.76 ± 0.050
EP	0.51 ± 0.08	0.62 ± 0.17	1.16 ± 0.05	1.38 ± 0.07	1.79 ± 0.09	0.11 ± 0.020	0.16 ± 0.010	0.21 ± 0.010	0.29 ± 0.010	0.35 ± 0.010
SM	0.19 ± 0.07	0.86 ± 0.07	1.17 ± 0.14	1.39 ± 0.03	2.69 ± 0.11	0.14 ± 0.047	0.35 ± 0.056	0.51 ± 0.051	0.58 ± 0.023	0.52 ± 0.043
BHT	0.32 ± 0.01	0.91 ± 0.02	1.36 ± 0.06	1.78 ± 0.06	2.41 ± 0.07	0.25 ± 0.029	0.32 ± 0.010	0.39 ± 0.059	0.46 ± 0.016	0.65 ± 0.033
BHA	1.01 ± 0.05	1.19 ± 0.04	1.59 ± 0.05	2.13 ± 0.08	2.57 ± 0.07	0.34 ± 0.046	0.53 ± 0.057	0.60 ± 0.023	0.60 ± 0.009	0.79 ± 0.014
AG	0.84 ± 0.06	1.06 ± 0.08	1.39 ± 0.12	1.89 ± 0.12	3.21 ± 0.26	0.17 ± 0.015	0.21 ± 0.026	0.29 ± 0.009	0.37 ± 0.020	0.71 ± 0.032
TBHQ	0.29 ± 0.01	0.95 ± 0.07	1.25 ± 0.07	1.90 ± 0.08	2.43 ± 0.15	0.28 ± 0.011	0.33 ± 0.012	0.37 ± 0.019	0.43 ± 0.034	0.54 ± 0.023

\*Los valores de HEX y NON para el día cero fueron  $0.12 \pm 0.01$  y  $0.01 \pm 0.001$  ABC/mg, respectivamente.

**Tabla 9. TBARS formadas durante la oxidación de AP adicionado con los extractos y antioxidantes.**

mg malondialdehído/kg aceite de palma (mg MDA/kg)					
Extracto o antioxidante	Días de oxidación <sup>*</sup>				
	3	6	9	12	15
CONTROL	2.68 ± 0.19	3.91 ± 0.79	6.35 ± 0.27	6.05 ± 0.28	7.03 ± 0.30
EMa	0,04 ± 0,02	0,39 ± 0,06	0,75 ± 0,06	1,37 ± 0,09	3,07 ± 0,24
CSMa	1.82 ± 0.23	2.96 ± 0.22	4.26 ± 0.64	5.07 ± 0.19	5.93 ± 0.30
KSMa	0.09 ± 0.01	1.79 ± 0.41	1.85 ± 0.24	2.17 ± 0.42	2.74 ± 0.12
EMt	0,83 ± 0,01	1,26 ± 0,08	1,89 ± 0,17	2,39 ± 0,13	2,05 ± 0,09
CSMt	0.16 ± 0.03	1.32 ± 0.34	1.52 ± 0.00	1.94 ± 0.30	2.83 ± 0.17
KSMt	0.85 ± 0.18	1.37 ± 0.15	1.73 ± 0.17	2.20 ± 0.08	2.07 ± 0.15
EL	0,07 ± 0,11	2,49 ± 0,27	3,75 ± 0,12	3,96 ± 0,22	5,27 ± 0,29
SL	0.79 ± 0.47	2.23 ± 0.35	2.66 ± 0.10	4.45 ± 0.57	4.71 ± 0.41
ETA	0,65 ± 0,02	0,72 ± 0,10	0,82 ± 0,15	2,86 ± 0,07	4,30 ± 0,34
CU	0,67 ± 0,09	1,08 ± 0,08	1,26 ± 0,10	2,11 ± 0,02	2,49 ± 0,02
EMc	0,92 ± 0,08	1,14 ± 0,15	1,62 ± 0,14	1,96 ± 0,13	2,01 ± 0,08
SMc	1.18 ± 0.43	3.75 ± 0.49	3.37 ± 0.18	4.39 ± 0.04	4.91 ± 0.36
SC	0.73 ± 0.05	1.27 ± 0.13	1.69 ± 0.19	2.06 ± 0.08	2.01 ± 0.14
ECf	1,52 ± 0,07	2,12 ± 0,14	2,38 ± 0,29	3,45 ± 0,21	4,57 ± 0,16
EPy	0,70 ± 0,09	0,89 ± 0,09	1,09 ± 0,02	1,32 ± 0,05	3,06 ± 0,10
SPy	0.06 ± 0.02	0.56 ± 0.04	1.20 ± 0.06	1.40 ± 0.09	1.89 ± 0.15
EG	0,68 ± 0,15	0,93 ± 0,18	1,30 ± 0,03	1,48 ± 0,03	2,40 ± 0,39
SG	0.33 ± 0.09	2.17 ± 0.49	3.85 ± 0.46	3.96 ± 0.55	6.37 ± 0.43
SGy	0.69 ± 0.04	1.12 ± 0.10	1.23 ± 0.04	2.57 ± 0.11	3.37 ± 0.43
EN	0,14 ± 0,03	1,30 ± 0,33	1,52 ± 0,20	1,88 ± 0,05	2,67 ± 0,20
EP	0,56 ± 0,10	0,90 ± 0,13	1,06 ± 0,05	1,41 ± 0,07	2,21 ± 0,07
SM	1.10 ± 0.09	2.54 ± 0.48	3.34 ± 0.33	3.96 ± 0.09	4.90 ± 0.60
BHT	0.81 ± 0.17	1.20 ± 0.09	1.48 ± 0.12	1.40 ± 0.09	1.83 ± 0.13
BHA	1.60 ± 0.28	3.25 ± 0.48	3.29 ± 0.29	3.99 ± 0.45	5.81 ± 0.21
AG	0.69 ± 0.02	0.99 ± 0.05	1.11 ± 0.16	1.29 ± 0.05	2.78 ± 0.13
TBHQ	0.40 ± 0.07	2.06 ± 0.39	2.94 ± 0.36	3.28 ± 0.39	3.67 ± 0.23

<sup>\*</sup> La concentración de TBARS en el día cero fue  $0.12 \pm 0.01$  mg MDA/kg.

En la tabla 10 se presentan los valores de los loadings, valores propios, porcentajes de varianza y varianza acumulada para los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2). Dos CP explican 71.98% de la varianza total, el CP1 explica la mayor parte de la variabilidad 41.00%, mientras que el CP2 explica el restante 30.97%, su elección fue llevada a cabo tomando como referencia sus valores propios (>1). Se observa que el CP1 correlaciona con HPL (loadings entre 0.58 y 0.81), HEX (loadings entre 0.61 y 0.87) y

NON (loadings entre 0.73 y 0.91), mientras que el CP2 correlaciona con las TBARS (loadings entre 0.64 y 0.89). Estos resultados muestran una diferencia importante entre la información proporcionada por los HPL, HEX y NON, y la obtenida a partir de las TBARS. La correlación entre el CP1 y las variables HPL, HEX y NON muestra una estrecha relación entre éstas; el HEX es un producto de la descomposición de los HPL, por tanto niveles altos de HEX pueden estar asociados a altas tasas de formación-descomposición de HPL y viceversa (Pokorny, 2001). Por su parte, el NON es producido por la descomposición de los hidroperóxidos del ácido oleico (HPO) siguiendo el mismo mecanismo asociado a la formación del HEX, no obstante, la tasa de formación de NON puede variar dependiendo de la concentración de ácido oleico y las condiciones de oxidación (Mahungu et al., 1998).

**Tabla 10. Loadings, valores propios, porcentaje de varianza y varianza acumulada para los dos primeros componente principales del ACP.**

Día de oxidación	Variable	CP1	CP2
3	HPL	0.5974	-0.3421
	HEX	0.7072	-0.3420
	NON	0.7357	0.3262
	TBARS	0.3498	0.6403
6	HPL	0.6366	-0.3540
	HEX	0.6184	-0.3391
	NON	0.7744	0.3874
	TBARS	0.1812	0.859
9	HPL	0.8173	0.1710
	HEX	0.8751	-0.4202
	NON	0.8671	0.2343
	TBARS	0.2138	0.9226
12	HPL	0.5868	0.3370
	HEX	0.8573	-0.4113
	NON	0.8861	0.1639
	TBARS	0.1541	0.8944
15	HPL	0.5998	0.4102
	HEX	0.8629	-0.4332
	NON	0.9152	-0.2145
	TBARS	-0.0967	0.8939
-	Valores propios	8.2019	6.1942
	% de varianza	41.0090	30.9710
	% de varianza acumulada	41.0090	71.9805

Por otra parte, la correlación de las TBARS con CP2 puede ser explicada teniendo en cuenta que estas sustancias son productos secundarios y finales de oxidación, formadas por reacciones de oxidación secundarias sobre los hidroperóxidos y otros productos de



oxidación (p.e. aldehídos  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados) (Fernández *et al.*, 1997; Guillén-Sans y Guzmán-Chozas, 1998).

Por otra parte, en la figura 38 se presenta el gráfico de scores obtenido para el ACP realizado, en éste la AA de los extractos y antioxidantes es presentada en función de la media general de AA, la cual corresponde al origen (X,Y=0) en el gráfico. La ubicación y distancia de separación entre dos puntos (extractos y/o antioxidantes) es proporcional al grado de similitud o diferencia en su AA. Por ejemplo, en el gráfico se observa que SPy y SC se encuentran en lados opuestos del CP1 (Dim 1 en el gráfico de scores) indicando una gran diferencia en la AA de sus extractos. Esta diferencia se debe principalmente al contenido de HEX y NON, es decir, el extracto de SPy inhibió considerablemente la formación de dichos aldehídos, mientras el extracto de SC estimuló su formación, a tal punto que su concentración superó la observada en la muestra CONTROL (efecto prooxidante). Por otra parte, el BHT mostró cercanía a SPy en el CP1, su pequeña separación se debe a diferencias pequeñas en HPL, HEX y NON. Teniendo en cuenta lo anterior, la ubicación de los puntos en el CP1 proporciona información acerca de la diferencia o similitud de los extractos y antioxidantes al retardar la formación de HPL y aldehídos en AP.

En relación al CP2 (Dim 2 en el gráfico de scores), se evidencia una gran separación entre el CONTROL y EMa, EP, EMc, EMt, KSMt y SC la cual es debida a diferencias en la concentración de TBARS. Este resultado indica que los extractos mencionados poseen una capacidad similar para retardar la formación de TBARS en AP. Sin embargo, al tener en cuenta el CP1 se evidencian diferencias en su capacidad para atenuar la formación de HPL, HEX y NON.

En términos generales, la ubicación de los puntos en el gráfico de scores proporciona información acerca de la capacidad de los extractos y antioxidantes para retardar la oxidación lipídica en AP. Se observa que la AA incrementa al desplazarse de derecha a izquierda por CP1 y de arriba abajo por CP2. Teniendo en cuenta esto, aquellos puntos ubicados en los valores más negativos de CP1 y CP2 corresponden a los extractos o antioxidantes con la mayor AA (p.e. SPy y EMa). Mientras que los puntos ubicados en valores positivos corresponden a los extractos y antioxidantes con baja AA y el CONTROL.

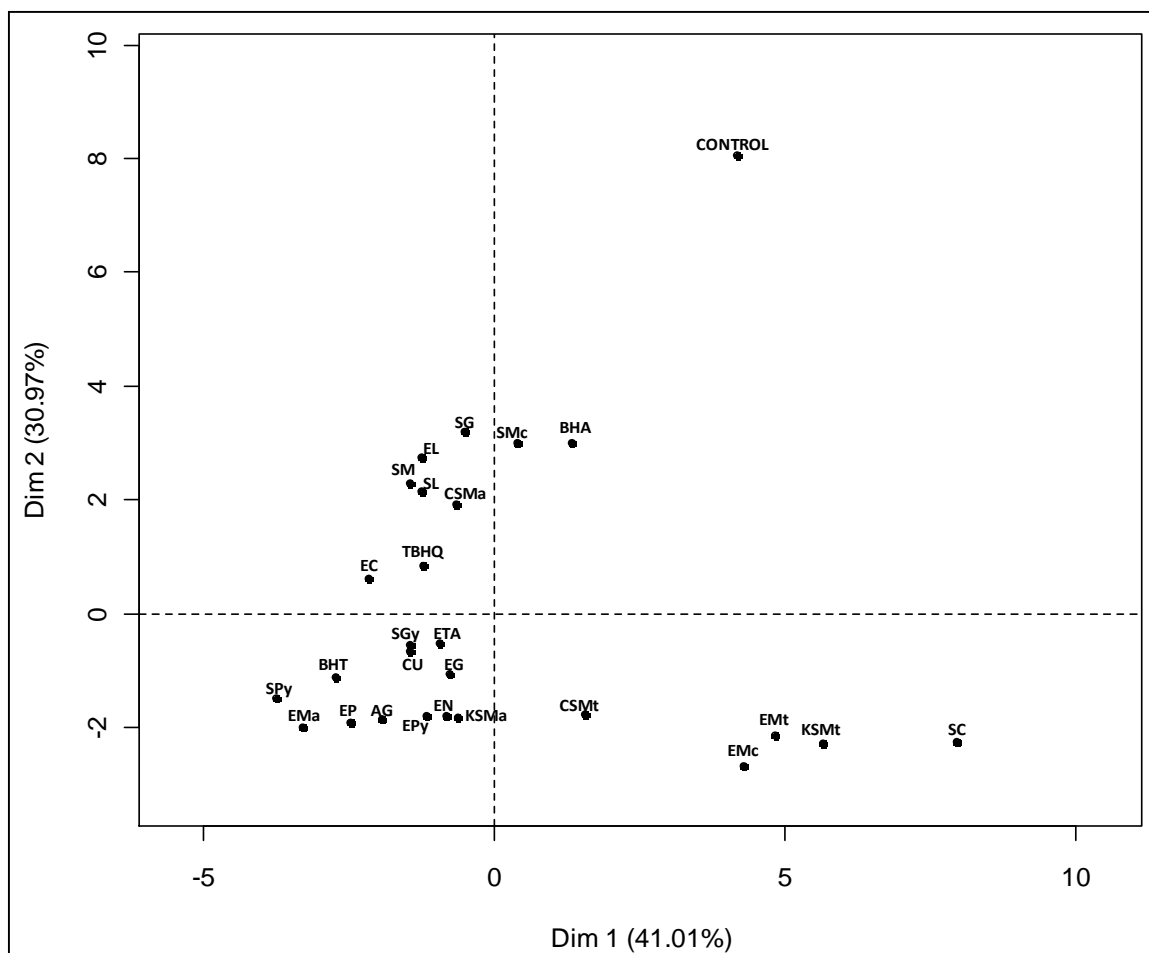
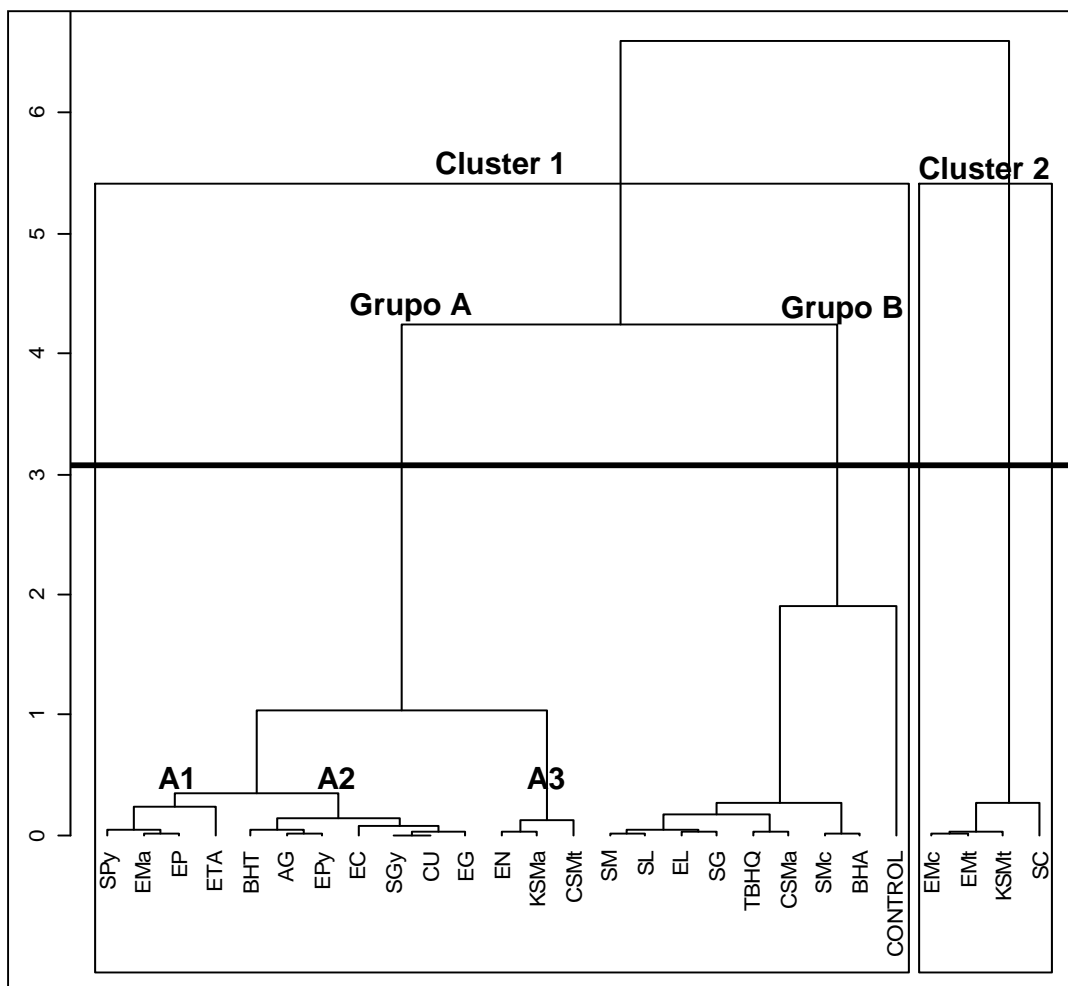


Figura 38. Gráfico de scores del ACP para la actividad antioxidante en AP.

Partiendo de los resultados obtenidos en el ACP, se llevó a cabo un AC con el fin de agrupar los extractos y antioxidantes en función de su AA y al mismo tiempo establecer cuales presentaron la mayor AA. Los resultados obtenidos son presentados en la figura 39 como un dendograma, en éste se puede evidenciar la formación de dos clusters los cuales corresponden a: extractos y antioxidantes con AA en AP (cluster 1) y extractos con efecto prooxidante (cluster 2). Es de resaltar que dicho efecto prooxidante está asociado a la formación de HEX y NON en las muestras adicionadas con dichos extractos, la cual fue superior a la observada en el CONTROL. El cluster 1 está dividido en dos grupos, rotulados como A y B, los cuales se diferencian por la magnitud de la AA de los extractos; el grupo A está formado por SPy, EMa, EP, ETA, BHT, AG, EPy, EC, SGy, CU, EG, EN, KSMa, CSMt, los cuales presentaron AA alta a media. El grupo B está formado por SM, SL, EL, SG, TBHQ, CSMa, SMC, BHA y CONTROL, los cuales presentaron baja a ninguna AA.



**Figura 39. Dendrograma del análisis de clusters para la actividad antioxidante en AP.**

En el dendrograma se observa que el grupo A se encuentra dividido en tres secciones (A1 a A3), las cuales se diferencian por la AA de los extractos o antioxidantes que las integran. En la primera sección (A1) se encuentran SPy, EMa, EP y ETA cuyos extractos presentaron alta AA. La sección A2 está conformada por BHT, AG, EPy, EC, SGy, CU, y EG, los cuales mostraron una buena capacidad para retardar la oxidación lipídica en AP, aunque inferior a la observada en la sección A1. Finalmente, en la sección A3 el AC ubicó a EN, KSMa y CSMt como los extractos con menor AA en el grupo A.

El ACP y el AC permitieron establecer que los residuos clasificados en A1 pueden ser considerados como fuentes promisorias de compuestos con AA en AP comestible. No obstante, estos resultados deben ser contrastados y analizados frente a los datos

experimentales, a continuación se hace un análisis de los resultados obtenidos en la evaluación de la AA de los extractos de A1. En las figuras 40 a 43 se representa el cambio en el contenido de los diferentes productos de oxidación, en función del tiempo, para las muestras adicionadas con los extractos clasificados en la sección A1 y el antioxidante BHT. En dichas figura se observa que el ETA fue clasificado en A1 debido a la eficiencia de su extracto para retardar la formación de productos de oxidación durante los primeros 6 días. Sin embargo, pasado el día 6 la AA de este extracto se vio drásticamente reducida, dando lugar a un considerable incremento en dichos productos (particularmente en los días 12 y 15). Esto muestra que el extracto de ETA posee la menor AA en comparación con los demás integrantes de A1, lo que explica su separación en el gráfico de scores y el dendograma respecto a los otros integrantes de la A1.

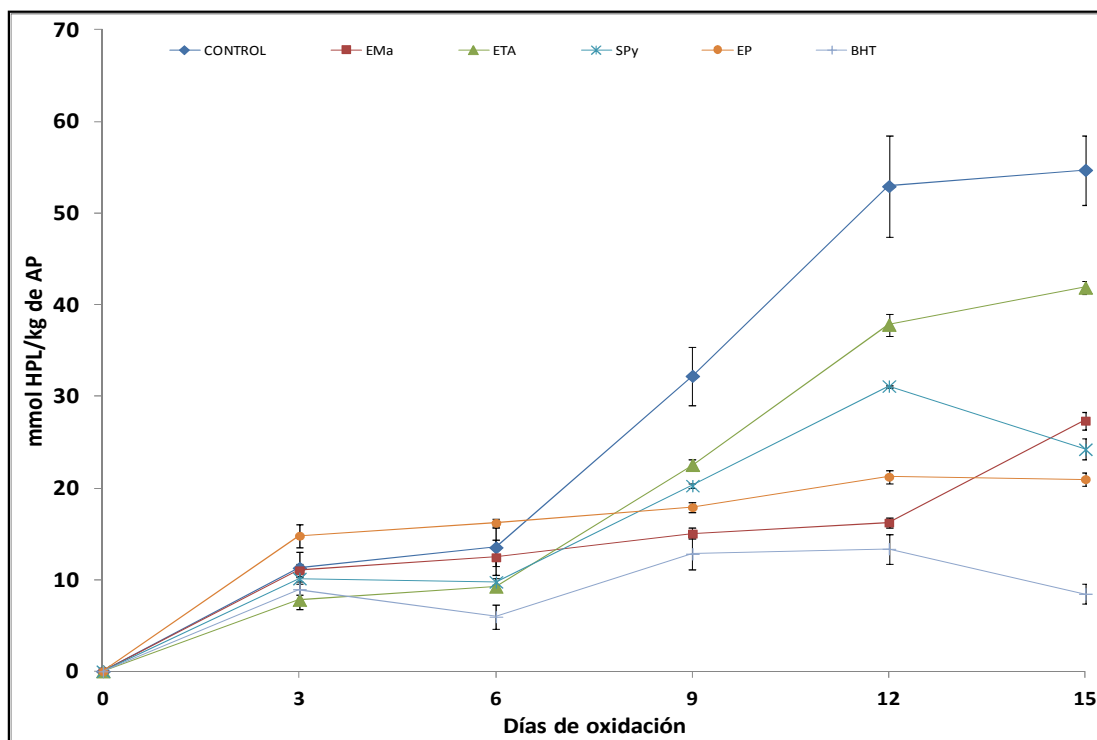


Figura 40. Concentración de hidroperóxidos en el AP adicionado con los extractos con mayor actividad antioxidante.

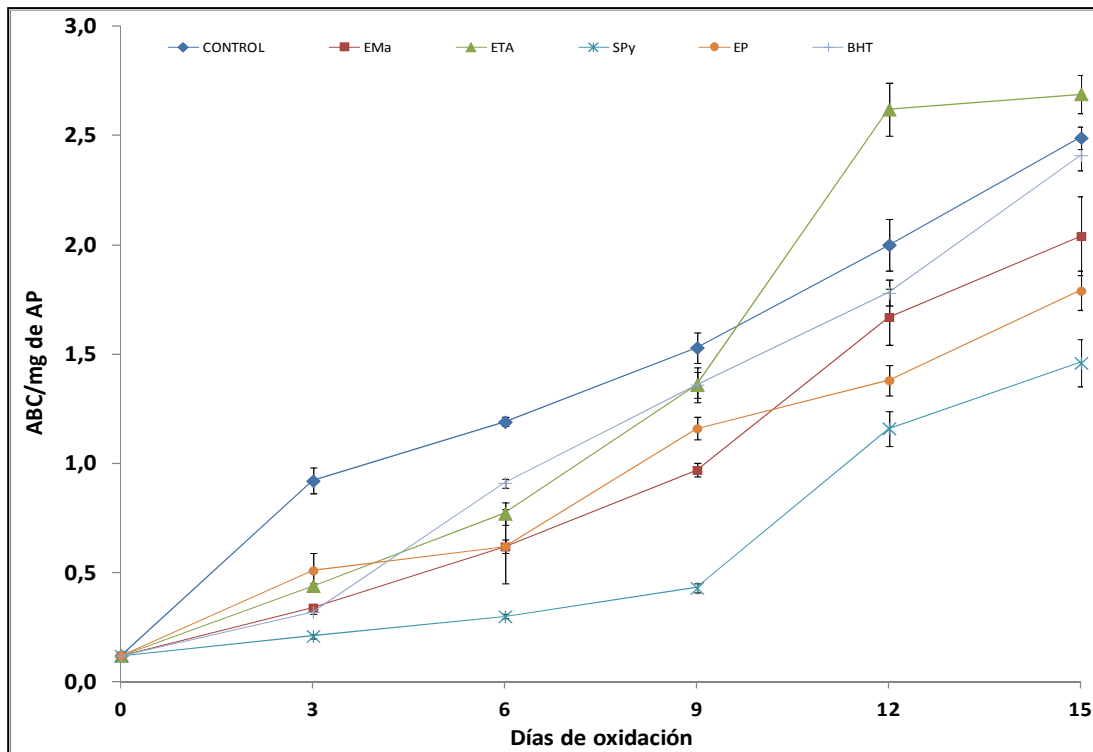


Figura 41. Contenido de hexanal en el AP adicionado con los extractos con mayor actividad antioxidante.

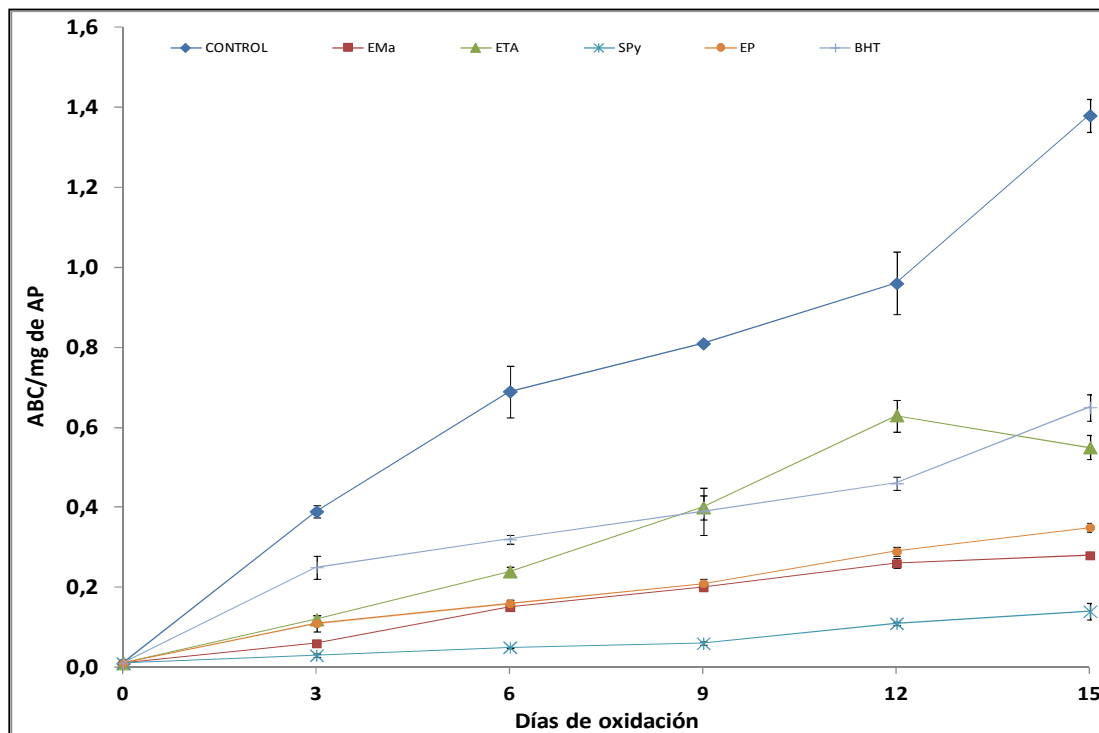
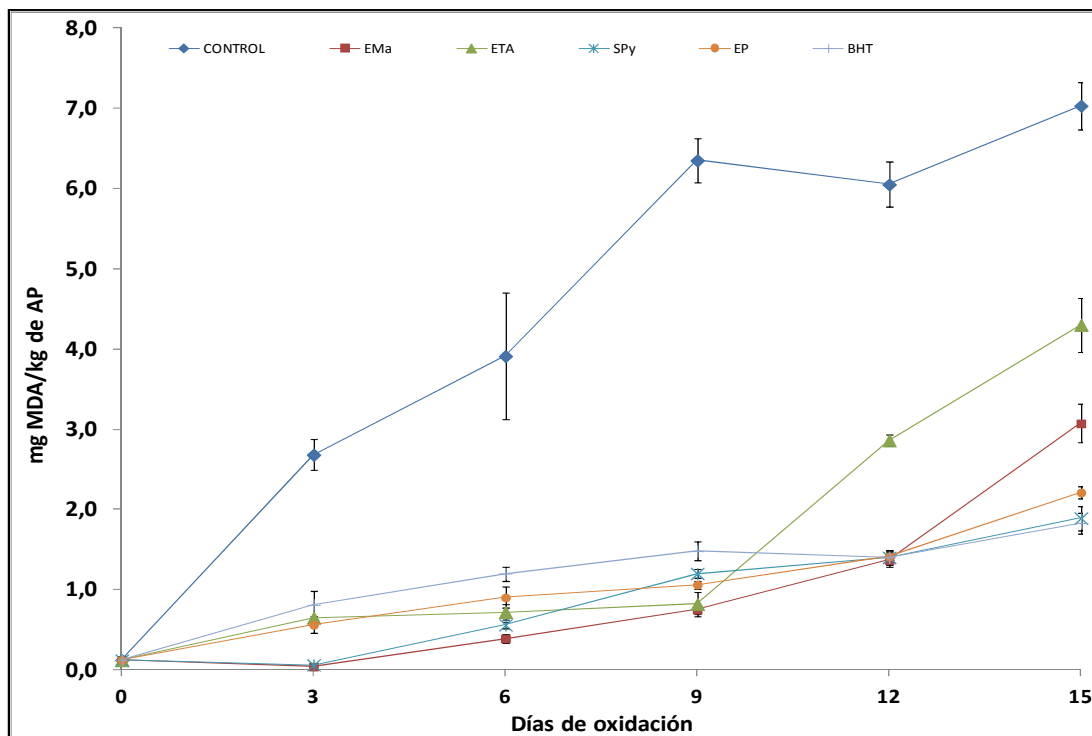


Figura 42. Contenido de nonanal en el AP adicionado con los extractos con mayor actividad antioxidante.



**Figura 43. Concentración de TBARS en el AP adicionado con los extractos con mayor actividad antioxidante.**

Otro de los residuos clasificados por el AC en la sección A1 fue el EP, al respecto en la figura 40 se observa que la muestra adicionada con el extracto de EP presentó un notable aumento en la concentración de HPL entre los días 0 y 6 (de 7.35 a 16.20 mmol HPL/kg), superando la concentración observada en el CONTROL. Sin embargo, pasado el día 6 la velocidad de producción de dichos compuestos presentó una importante disminución. Respecto al contenido de productos secundarios y finales de oxidación (HEX, NON y TBARS), el extracto en cuestión presentó una alta capacidad para retardar la formación de dichos compuestos. Ésta fue superior a la observada para los demás extractos y antioxidantes explorados con excepción de SPy y EMa. No obstante, el rendimiento de extracción observado para EP fue bajo lo que podría representar un problema en la disponibilidad durante obtención de los antioxidantes.

Por su parte, el extracto de EMa mostró una AA similar a la observada para el extracto de EP, lo que explica su ubicación al mismo nivel en el dendograma del AC. La principal diferencia en AA de dichos extractos estuvo en su capacidad para retardar la formación de HPL, la cual fue mayor para el extracto de EMa. Al respecto, la muestra adicionada

con dicho extracto presentó una variación en la concentración de HPL entre 7.35 y 27.35 mmol HPL/kg, mostrando su mayor cambio entre los días 12 y 15. Es de resaltar que la eficiencia del extracto de EMa para retardar la formación de HEX y NON fue superior a la observada para los demás extractos, con excepción de SPy. En relación a la TBARS, el extracto de EMa mostró la mayor capacidad para retardar la formación de éstas entre los días 0 y 9 de oxidación. Sin embargo, pasado el día 9 la velocidad de formación de dichos productos se incrementó, lo que sugiere una reducción de la AA del dicho extracto. El buen rendimiento de extracción obtenido para EMa (9.51%), indica que este residuo podría proporcionar una buena cantidad de extracto con AA, lo que permitiría considerarlo como una fuente potencial de antioxidantes.

El extracto obtenido a partir de SPy presentó la mayor AA en AP, esto se deduce gracias a su ubicación en el extremo negativo del gráfico de scores y el extremo izquierdo del dendograma. Dicha AA está asociada a un bajo contenido de todos productos de oxidación lipídica (HPL, HEX, NON y TBARS) en la muestra de AP adicionada con dicho extracto. La concentración de HPL presentes en la muestra adicionada con el extracto de SPy varió entre 7.35 y 31.11 mmol HPL/kg (días 0 y 12, respectivamente); su incremento entre los días 0 y 6 fue lento, indicando una baja tasa de oxidación, sin embargo, pasado el día 6 la velocidad de dicho proceso incrementó. No obstante, la concentración de HPL siempre fue inferior a la observada en el CONTROL, al respecto, el ANOVA indica que existen diferencias significativas en los HPL de estas muestras en los días 6 a 15. En relación al contenido de HEX, la muestra en cuestión presentó una variación en el contenido de éste entre 0.12 y 1.46 ABC/mg (entre los días 0 y 15). Dicha variación fue muy lenta entre los días 0 y 9 (figura 41) indicando una baja tasa de descomposición de los HPL, aunque pasado el día 9 ésta incrementó. Es de resaltar que el extracto de SPy presentó la mayor eficiencia para retardar la formación de HEX, comparado con los demás extractos y antioxidantes. Un resultado similar fue evidenciado en relación a la formación de NON, el extracto de SPy atenuó considerablemente la formación de este compuesto, su variación entre los días 0 y 9 fue muy lenta, con un ligero aumento pasado en día 9 (figura 42). Estos resultados muestran que el extracto de SPy no solo reduce la formación de HPL e hidroperóxidos del ácido oleico (HPO), también minimiza notablemente su descomposición para formar HEX y NON. Respecto a las TBARS, éstas mostraron un lento incremento entre los días 0 y 15 (figura 43), su concentración varió de 0.012 a 1.89 mg MDA/kg en dicho intervalo de tiempo, manteniéndose inferior a la

observada en el CONTROL. Los resultados previamente discutidos muestran que SPy es el residuo con el mayor potencial como fuente de antioxidantes, los cuales poseen una alta capacidad para reducir la oxidación lipídica en AP, incluso mayor a la observada para varios antioxidantes sintéticos empleados en la industria de aceites y grasas comestibles. Adicional a esto, el rendimiento observado para SPy (7.82%) indica que es posible obtener cantidades significativas de dicho extracto. Estos resultados permiten considerar a SPy para continuar con el estudio propuesto.

Las SPy han sido estudiadas en la obtención de extractos, fracciones y/o compuestos con diferentes aplicaciones, particularmente en sistemas biológicos. Se ha demostrado que extractos etanólicos de SPy poseen actividad antibacterial sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Emeruwa, 1982), como también actividad larvicida y ovicida (antihelmíntico) sobre *Heligmosomoides bakeri* (Wabo et al., 2011), mientras que sus extractos metanólicos han presentado actividad antiinflamatoria en ratas (Amazu et al., 2010). Una de las propiedades más estudiadas y documentadas de las SPy y sus extractos es su actividad anticonceptiva en machos; extractos clorofórmicos, sus fracciones y subfracciones han mostrado una alta eficacia en la anticoncepción en ratas (Goyal et al., 2010; Lohiya et al., 2006; 2005; Lohiya y Goyal, 1992), primates (Lohiya et al., 2008; 2002), conejos (Lohiya et al., 1999a; 1999b) y perros (Ortega-Pacheco et al., 2011; 2010). Los intentos iniciales por identificar los compuestos responsables de esta actividad sugieren que es una mezcla de ésteres de cadena larga (Goyal et al., 2010). Respecto a la AA de extractos de SPy, su capacidad para bloquear radicales libres fue evaluada empleando los radicales DPPH, hidroxilo y el anión superóxido (Kothari y Seshadri, 2010; Akira et al, 1993). Sin embargo, hasta donde se tiene conocimiento, no existen reportes en la literatura sobre la evaluación de la AA de extractos, fracciones y/o compuestos obtenidos a partir de SPy en alimentos. Esto hace del presente trabajo pionero en explorar el potencial de SPy como fuente de antioxidantes con aplicación en la industria alimenticia.

Actualmente los aceites vegetales comestibles son protegidos de la oxidación empleando antioxidantes sintéticos como el TBHQ y el BHT, los cuales son económicamente viables y mantienen los aceites aptos para su consumo. Sin embargo, el uso de estos compuestos como antioxidantes ha sido fuertemente criticados debido a su volatilidad,



inestabilidad térmica y posibles efectos carcinogénicos (Krishnakumar y Gordon, 1996; Rössing et al., 1985; Kahl, 1984). Teniendo en cuenta la alta AA observada para el extracto de SPy, este residuo se presenta como una alternativa viable en la búsqueda de compuestos destinados a remplazar los antioxidantes sintéticos. Teniendo en cuenta esto, dicho residuo fue seleccionado para llevar a cabo la *EFS* de antioxidantes durante la siguiente etapa.

### 3.1.2 Obtención de antioxidantes empleando extracción con fluidos supercríticos

Las SPy fueron sometidas a *EFS* empleando como disolventes dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y CO<sub>2</sub> adicionado con etanol (EtOH) como cosolvente (CO<sub>2</sub>/EtOH). Diferentes temperaturas, presiones y porcentajes de EtOH fueron empleadas y su efecto sobre el rendimiento y AA de los extractos fue evaluado. A continuación se presentan los resultados obtenidos, iniciando con la curva de extracción (CE), seguido por los rendimientos y finalizando con la AA de los extractos en AP (Castro-Vargas et al., sometido).

#### ▪ Curva de extracción

Con el fin de identificar las etapas asociadas a la *EFS* de SPy y establecer un tiempo de extracción adecuado para dicho proceso, se realizó una CE empleando CO<sub>2</sub> a 50 °C/20 MPa. En la figura 44<sup>3</sup> se presenta la CE obtenida, en ésta se pueden evidenciar los intervalos de tiempo correspondientes a las tres etapas de extracción; la etapa de velocidad constante de extracción (CER) se presentó entre los cero y 80 min de extracción, mientras que la etapa de velocidad de extracción decreciente (FER) se observó entre los 80 y 240 min y la etapa difusional o de extracción nula (DCP) se evidenció entre 240 y 420 min. El rendimiento máximo de extracción obtenido a los 420 min fue 22.09%, correspondiente a 3.32 g de extracto, es de resaltar que dicho rendimiento fue mayor al obtenido en la extracción Soxhlet (7.82%).

---

<sup>3</sup> Los datos de la figura 43 se presentan en el ANEXO B

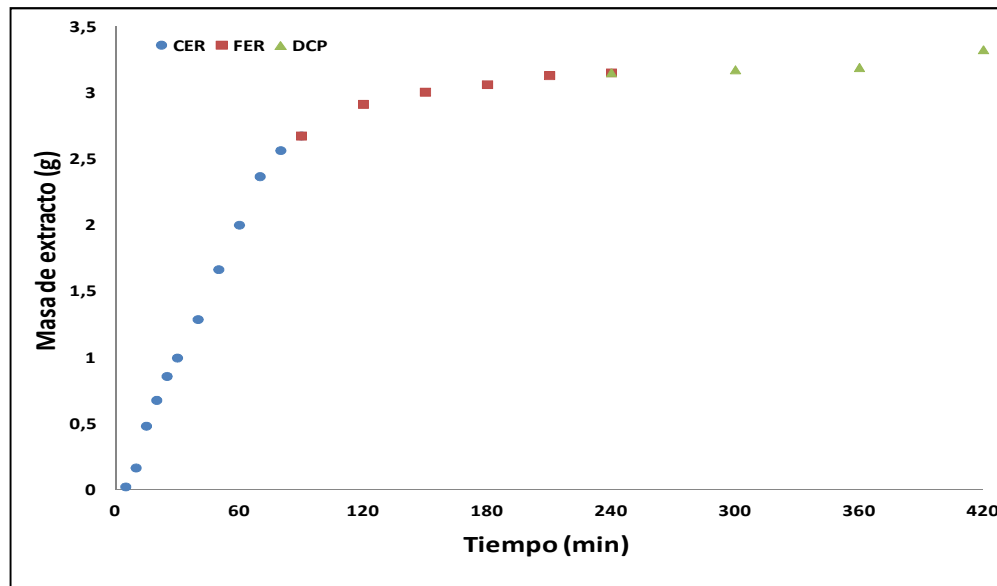


Figura 44. Curva de la *EFS* con  $\text{CO}_2$  a partir de SPy.

Durante la etapa CER se extrae el 77% del extracto total (2.56 g), el cual corresponde a los solutos removidos por convección en la fase fluida a una velocidad de extracción constante (0.034 g/min). Por su parte, en la etapa FER se obtuvo el 17% del extracto total (0.58 g). Esta reducción en la cantidad de solutos extraídos se debe a que al inicio de la etapa FER la mayor parte de los solutos presentes sobre las partículas de SPy se han agotado y por tanto la extracción depende de la combinación de los procesos de convección en la fase fluida y difusión en la fase sólida de la muestra. Finalmente en los últimos 180 min la cantidad de extracto obtenida correspondió al 5% del extracto total (0.17 g). Durante este tiempo la extracción de los solutos dependió solamente de la difusión en la fase sólida, dando lugar a un rendimiento de extracción casi nulo. A partir de los resultados obtenidos en la CE se eligió 180 min como tiempo de extracción para todos los ensayos de *EFS* realizados a partir de SPy, debido a que este tiempo incluye toda la etapa CER y parte de la etapa FER.

#### ▪ Rendimientos de extracción

Los rendimientos de extracción obtenidos en la *EFS* de SPy (con  $\text{CO}_2$  y  $\text{CO}_2/\text{EtOH}$ ) son presentados en la tabla 11, al igual que las densidades del  $\text{CO}_2$  SC a las condiciones empleadas. En las extracciones con  $\text{CO}_2$  el mayor rendimiento fue obtenido a 60 °C/30 MPa y 50 °C/20 MPa (20.50 y 20.42%, respectivamente), los cuales están asociados a

altas densidades de CO<sub>2</sub>. El ANOVA indica que no existen diferencias significativas entre estos rendimientos. Por otra parte, los rendimientos más bajos fueron observados en las extracciones realizadas a 10 MPa, los cuales están asociados a bajas densidades del CO<sub>2</sub>.

**Tabla 11. Rendimientos obtenidos en la EFS de SPy.**

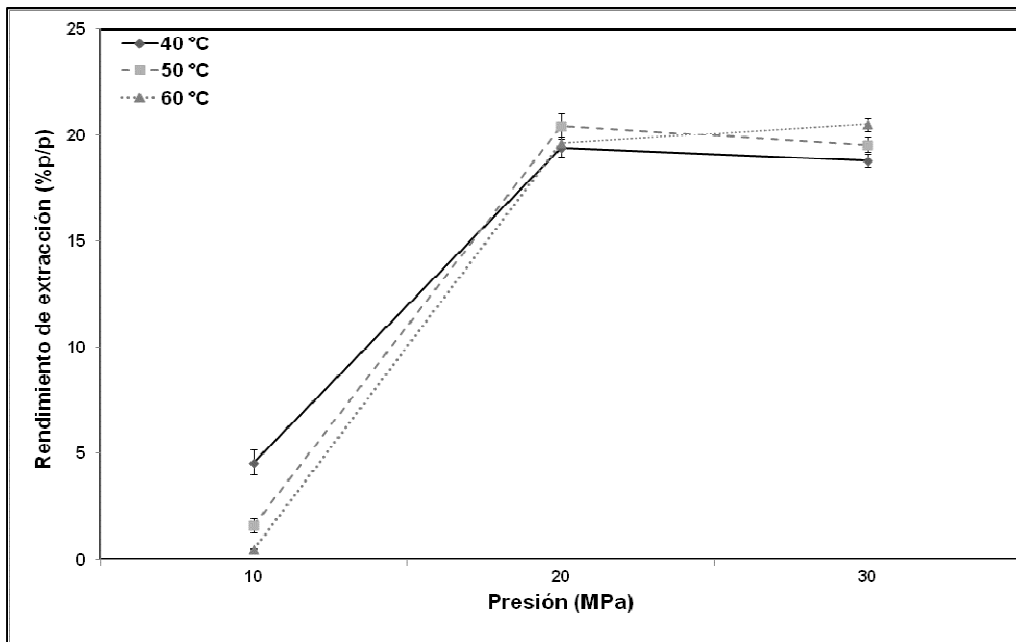
Condiciones de extracción	Solvente	$\rho_{\text{CO}_2}$ (g/mL) <sup>a</sup>	Rendimiento (% p/p) <sup>b</sup>
40°C/10 MPa	CO <sub>2</sub>	0.6290	4.59 ± 0.61
40°C/20 MPa	CO <sub>2</sub>	0.8413	19.41 ± 0.50
40°C/30 MPa	CO <sub>2</sub>	0.9104	18.80 ± 0.31
50°C/10 MPa	CO <sub>2</sub>	0.3860	1.60 ± 0.33
50°C/20 MPa	CO <sub>2</sub>	0.7857	20.42 ± 0.62
50°C/30 MPa	CO <sub>2</sub>	0.8713	19.56 ± 0.34
60°C/10 MPa	CO <sub>2</sub>	0.2914	0.51 ± 0.04
60°C/20 MPa	CO <sub>2</sub>	0.7249	19.63 ± 0.64
60°C/30 MPa	CO <sub>2</sub>	0.8302	20.50 ± 0.29
50°C/20 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (2%)	0.7857	21.02 ± 0.05
50°C/20 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (5%)	0.7857	23.75 ± 0.04
50°C/20 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (8%)	0.7857	22.52 ± 0.06
Soxhlet	MeOH		7.81 ± 1.32

<sup>a</sup> Densidad del CO<sub>2</sub> calculada de con la ecuación de Angus.

<sup>b</sup> Media ± desviación estándar.

Los efectos de las condiciones de extracción sobre la EFS son presentados en la figura 45 por medio de las isotermas de rendimiento. El incremento en la presión de extracción de 10 a 20 MPa resultó en un aumento en el rendimiento, debido al incremento en la densidad del CO<sub>2</sub> y consecuentemente en el poder solvente; a 60 °C el rendimiento se aumentó 38.8 veces, a 50 °C 12.7 veces, mientras que a 40 °C aumento 4.2 veces. El efecto de la temperatura es un poco más complejo; a 10 MPa el incremento en la temperatura de extracción produjo una reducción en el rendimiento, mientras que a 30 MPa dicho incremento aumento el rendimiento. El comportamiento observado a 30 MPa es causado por el incremento en la presión de vapor de los solutos con el aumento de la temperatura, el cual es más significativo que la reducción en la densidad del solvente. Dicho efecto generó un entrecruzamiento en las isotermas de rendimiento entre 17 y 20 MPa. Este resultado sugiere que a presiones inferiores a la presión de entrecruzamiento el efecto de la densidad es dominante, mientras que a presiones superiores a 20 MPa la presión de vapor de los solutos es más importante. Un comportamiento similar fue

evidenciado en la *EFS* de semillas de guayaba (Castro et al., 2010) y durazno (Mezzomo et al., 2010).



**Figura 45. Isotermas de rendimiento (40, 50 y 60 °C) de la *EFS* de SPy.**

Los resultados antes discutidos indican que las variables del proceso (temperatura y presión) ejercen un efecto sobre el rendimiento. Con el fin de corroborar esto se realizó un ANOVA de dos vías. De acuerdo al análisis, la presión ( $p << 0.0001$ ), temperatura ( $p = 0.0238$ ) e interacción presión-temperatura ( $p << 0.0000$ ) poseen un efecto significativo sobre el rendimiento, siendo la presión la variable con mayor efecto.

Por otra parte, 50 °C/20 MPa fueron las condiciones de extracción empleadas para llevar a cabo la *EFS* con CO<sub>2</sub>/EtOH, dado que éstas permiten obtener un alto rendimiento de extracción con menor consumo energético y a menor presión. Los rendimientos obtenidos se presentan en la tabla 11, se observa que el rendimiento incrementó con la adición de EtOH en comparación a los obtenidos con CO<sub>2</sub>. El incremento en el rendimiento observado es debido al aumento en la concentración en el extracto de compuestos medianamente polares, los cuales presentan una limitada solubilidad en CO<sub>2</sub> puro. Adicional a esto, la adición del cosolvente puede favorecer la ruptura de las interacciones soluto/matriz sólida, acompañada por la sustitución en los sitios activos con moléculas de

cosolvente y solubilización de los compuestos, al igual que la difusión de los solutos en la matriz por hinchamiento de la misma (Luque de Castro et al., 1993).

El incremento en la concentración de EtOH de 2 a 5% generó un aumento en el rendimiento (de 21.02 a 23.75%), debido al favorecimiento de la extracción de solutos medianamente polares. Sin embargo, el incremento de 5 a 8% de cosolvente disminuyó el rendimiento (de 23.75 a 22.52%). Este efecto puede ser debido al aumento en la formación de enlaces de hidrogeno entre las moléculas de EtOH, propiciado por el incremento en la concentración del cosolvente, el cual genera una reducción en su interacción con las moléculas de soluto (Luque de Castro et al., 1993).

Los rendimientos obtenidos en la *EFS* de SPy fueron mayores al observado en la extracción Soxhlet con MeOH (con excepción de los obtenidos a 10 MPa). En comparación con los rendimientos reportados en la literatura para la *EFS* en semillas de frutales, los rendimientos obtenidos en el presente trabajo fueron superiores a los observados para guayaba (17.30 % a 40 °C/30 MPa con 10% de EtOH) (Castro-Vargas et al., 2011), uva (11.5% a 40 °C/20 MPa) (Passos et al., 2009) y granada (14% a 60 °C/40 MPa) (Liu et al., 2009), aunque inferiores a los obtenidos para curuba (25.83% a 56°C/26 MPa) (Liu et al., 2009), durazno (32% a 51 °C/19.8 MPa con 5% mol de EtOH) (Sánchez-Vicente et al., 2009) y kernel de semilla de durazno (24 a 50 °C/30 MPa con 5% de EtOH) (Mezzomo et al., 2010).

Una vez obtenidos los extractos de SPy empleando *EFS*, su AA en AP fue evaluada. A diferencia de los ensayos realizados en la etapa anterior, la medición de los diferentes productos de oxidación fue realizada solo en los días 0 y 15, esto con el fin de conocer la cantidad global de productos formados durante los 15 días de oxidación.

#### ▪ Actividad antioxidante de los extractos obtenidos empleando *EFS*

Los resultados obtenidos en la evaluación de la AA de los extractos de SPy obtenidos empleando *EFS*, extracción Soxhlet y el antioxidante BHT son presentados en la tabla 12. De los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub>, el correspondiente a 50 °C/20 MPa presentó la mayor AA, éste mostró una alta eficiencia para retardar la formación de HPL, NON y

TBARS. Dicho extracto disminuyó la formación de HPL en un 83% comparado con el CONTROL (7.57 respecto a 45.72 mmol/kg), mientras que la formación de NON y TBARS fue atenuada en 77 y 78%, respectivamente (0.22 respecto a 0.96 ABC/mg y 1.58 respecto a 7.13 mg MDA/kg, respectivamente). Aunque la capacidad de dicho extracto para minimizar la formación de HEX no fue muy alta (24% comparado con el CONTROL), esta fue mayor a la observada para los demás extractos. Estos resultados indican que 50 °C/20 MPa son las condiciones de extracción más adecuadas para la obtención de antioxidantes a partir de SPy empleando CO<sub>2</sub> supercrítico (CO<sub>2</sub> SC).

**Tabla 12. Actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de SPy empleando EFS.**

Extracto o antioxidante	Solvente	Productos de oxidación lipídica en AP <sup>a</sup>			
		HPL <sup>b</sup> (mmol/kg)	Aldehidos (ABC/mg) <sup>b</sup>		TBARS <sup>b</sup> (mg MDA/kg)
			Hexanal	Nonanal	
CONTROL		45.72 ± 1.46	2.57 ± 0.05	0.96 ± 0.04	7.13 ± 0.13
40°C/10 MPa	CO <sub>2</sub>	7.97 ± 0.15	3.13 ± 0.01	0.34 ± 0.02	4.17 ± 0.03
40°C/20 MPa	CO <sub>2</sub>	7.32 ± 0.12	2.56 ± 0.01	0.24 ± 0.01	1.54 ± 0.05
40°C/30 MPa	CO <sub>2</sub>	10.16 ± 0.20	2.51 ± 0.06	0.27 ± 0.01	3.34 ± 0.15
50°C/10 MPa	CO <sub>2</sub>	8.00 ± 0.28	2.89 ± 0.05	0.43 ± 0.02	3.04 ± 0.11
50°C/20 MPa	CO <sub>2</sub>	7.57 ± 0.15	1.94 ± 0.03	0.22 ± 0.02	1.58 ± 0.12
50°C/30 MPa	CO <sub>2</sub>	8.28 ± 0.02	1.95 ± 0.14	0.24 ± 0.02	2.78 ± 0.18
60°C/10 MPa	CO <sub>2</sub>	8.29 ± 0.38	2.53 ± 0.09	0.32 ± 0.02	2.71 ± 0.04
60°C/20 MPa	CO <sub>2</sub>	7.27 ± 0.25	2.07 ± 0.05	0.34 ± 0.04	1.61 ± 0.08
60°C/30 MPa	CO <sub>2</sub>	8.97 ± 0.13	1.94 ± 0.09	0.24 ± 0.01	2.29 ± 0.08
50°C/20 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (2%)	13.06 ± 0.09	2.48 ± 0.01	0.39 ± 0.01	1.87 ± 0.04
50°C/20 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (5%)	10.51 ± 0.14	2.09 ± 0.09	0.24 ± 0.01	1.07 ± 0.09
50°C/20 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (8%)	21.46 ± 0.24	2.68 ± 0.09	0.53 ± 0.03	1.94 ± 0.09
Soxhlet	MeOH	17.81 ± 1.24	1.56 ± 0.04	0.14 ± 0.05	1.79 ± 0.17
BHT		6.02 ± 0.73	2.29 ± 0.06	0.65 ± 0.03	1.71 ± 0.12

<sup>a</sup> Media ± desviación estándar.

<sup>b</sup> Este valor corresponde a la diferencia entre los días 0 y 15 de oxidación.

Por otra parte, al comparar la AA del extracto obtenido empleando CO<sub>2</sub> a 50 °C/20 MPa frente a los obtenidos empleando CO<sub>2</sub>/EtOH (tabla 12) se observa que la adición de EtOH como cosolvente en la EFS de SPy no mejora la AA de los extractos. El único cambio

favorable se observó al adicionar 5% de EtOH, cuyo extracto presentó una buena eficiencia para retardar la formación de TBARS

En la figura 46 se comparan la AA de los extractos obtenidos a partir de SPy empleando *EFS* con CO<sub>2</sub> a 50 °C/20 MPa, extracción Soxhlet y el antioxidante BHT. Se observa que el extracto supercrítico presentó una menor AA en comparación al extracto Soxhlet, específicamente una menor eficiencia para retardar la formación de HEX y NON. Es de resaltar que la muestra de AP adicionada con el extracto supercrítico presentó una menor concentración de HPL en comparación a la adicionada con el extracto Soxhlet, sin embargo, esto es puede ser debido a su conversión a HEX y/o TBARS. Es importante tener en cuenta que los aldehidos HEX y NON son los principales productos finales formados en la oxidación de los ácidos linoleico y oleico, por tanto, entre mayor sea su contenido menor es la eficacia de un antioxidante.

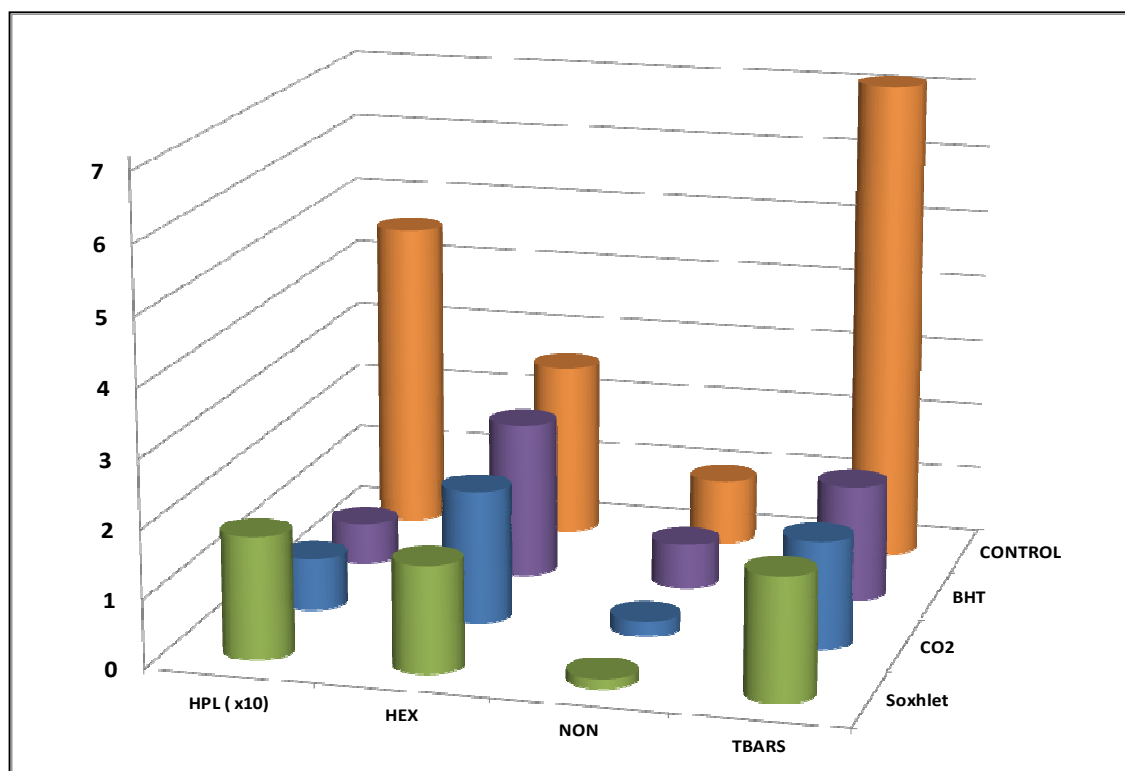


Figura 46. Actividad antioxidante de los extractos de SPy obtenidos por *EFS* y extracción Soxhlet.

Estos resultados indican que el extracto Soxhlet de SPy posee una mayor capacidad para atenuar la formación de productos secundarios y finales de oxidación lipídica en AP, lo que es de suma importancia en la conservación de alimentos debido a los efectos que éstos poseen sobre la calidad e inocuidad de los mismos. Teniendo en cuenta esto, dicho extracto fue seleccionado para llevar a cabo la identificación de algunos de los compuestos responsables de la AA observada.

### **3.1.3 Identificación de compuestos con actividad antioxidante en aceite de palma**

El extracto Soxhlet de SPy fue fraccionado y se evaluó la AA de las fracciones obtenidas. Las fracciones con mayor AA fueron sometidas a análisis por CLAE-EM o CLAE-DAD con el fin de identificar algunos de sus componentes.

#### **▪ Fraccionamiento y actividad antioxidante de las fracciones**

El extracto de SPy fue fraccionado empleando extracción en fase sólida (fase reversa) y los diferentes compuestos fueron eluidos empleando mezclas de H<sub>2</sub>O:MeOH. Se recolectaron cinco fracciones las cuales fueron rotuladas como F1 a F5 de mayor a menor polaridad. Los resultados obtenidos en el fraccionamiento y AA de las fracciones son presentados en la tabla 13. La mayor parte del extracto fue separada y recolectada en la fracción F1, de los 500 mg fraccionados 243 mg (48.6%<sub>p/p</sub>) fueron eluidos empleando MeOH:H<sub>2</sub>O (1:9). Las siguientes fracciones con mayor peso fueron las fracciones F2 y F3 con 61 y 63 mg, respectivamente, mientras que el menor peso fue observado para las fracciones F4 y F5 (41 mg y 39 mg, respectivamente). Una vez obtenidas las fracciones, su AA en AP fue evaluada, esto con el fin de identificar las fracciones con la mayor AA y proceder a realizar la identificación de los compuestos responsables de la AA observada.

Las cinco fracciones obtenidas presentaron capacidad para retardar la oxidación de AP superior a la observada para el extracto Soxhlet, particularmente en la formación de HPL, HEX y NON. La fracción F1 presentó una buena habilidad para retardar la formación de HPL, HEX y NON, reduciendo su contenido en 78, 86 y 94% con relación al CONTROL, respectivamente. Por otra parte, la mayor AA fue presentada por F4, ésta retardó la



formación de HPL en un 84% en comparación al CONTROL (7.65 respecto a 48.73 mmol/kg); sin embargo, su mayor eficiencia radicó en su habilidad para retardar la formación de productos secundarios y finales de oxidación, lo cual se evidenció mediante la reducción de la formación de HEX y NON en un 92 y 94%, respectivamente en comparación al CONTROL (0.20 respecto a 2.64 ABC/mg y 0.052 respecto a 0.855 ABC/mg, respectivamente), mientras que la producción de TBARS fue reducida en un 85% (1.07 respecto a 7.00 mg MDA/kg). Esto muestra un gran potencial por parte de F4 para inhibir la oxidación de AP en sus diferentes etapas.

**Tabla 13. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir del extracto Soxhlet de SPy.**

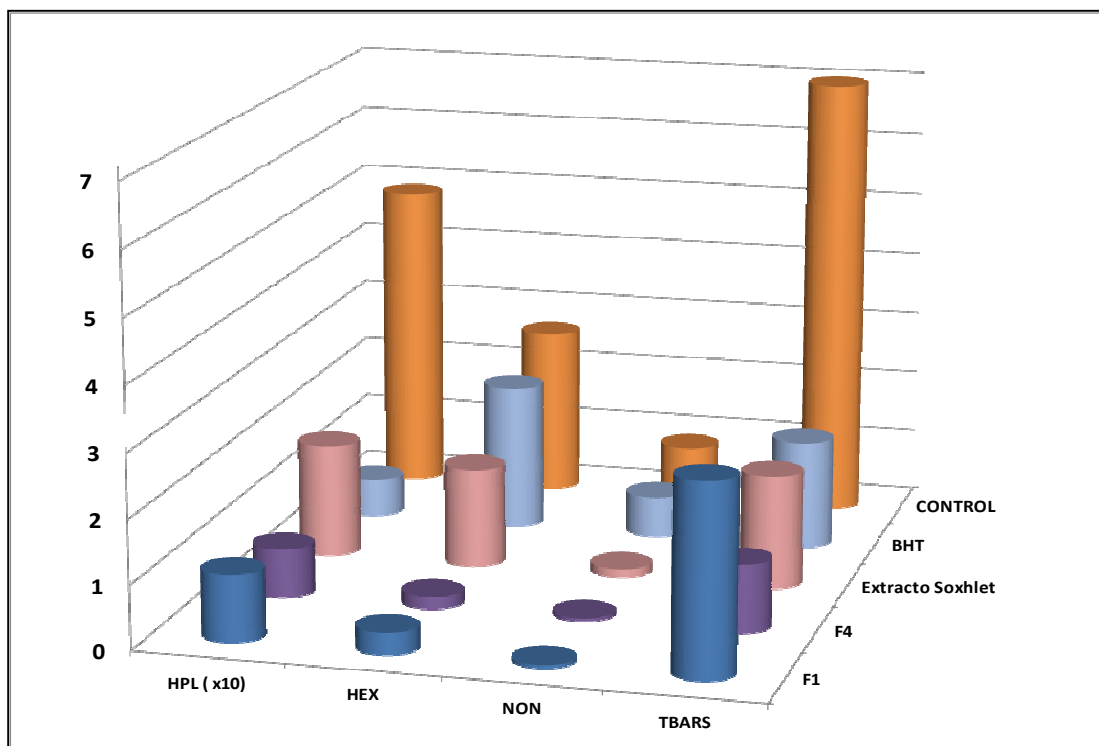
Extracto o fracción	Composición de fase móvil (MeOH:H <sub>2</sub> O)	% en peso <sup>a</sup>	Productos de oxidación lipídica en AP <sup>b</sup>			
			HPL <sup>c</sup> (mmol/kg)	Aldehidos (UBC/mg) <sup>c</sup>		TBARS <sup>c</sup> (mg MDA/kg)
				Hexanal	Nonanal	
CONTROL			48.73 ± 1.15	2.64 ± 0.05	0.855 ± 0.024	7.00 ± 0.14
F1	1:9	48.6	10.42 ± 0.35	0.35 ± 0.05	0.047 ± 0.003	2.98 ± 0.05
F2	3:7	12.2	12.27 ± 0.47	0.69 ± 0.04	0.117 ± 0.004	4.77 ± 0.05
F3	6:4	12.6	10.93 ± 0.46	0.84 ± 0.02	0.123 ± 0.002	3.00 ± 0.13
F4	8:2	8.2	7.65 ± 0.39	0.20 ± 0.01	0.052 ± 0.003	1.07 ± 0.04
F5	1:0	7.8	9.95 ± 0.36	0.30 ± 0.02	0.081 ± 0.005	2.83 ± 0.06
BHT			6.02 ± 0.73	2.29 ± 0.06	0.65 ± 0.03	1.71 ± 0.12
Extracto Soxhlet			17.81 ± 1.24	1.56 ± 0.04	0.140 ± 0.005	1.79 ± 0.17
BHT			6.02 ± 0.73	2.29 ± 0.06	0.65 ± 0.03	1.71 ± 0.12

<sup>a</sup> Total de extracto fraccionado 500 mg (lío-filizado y desengrasado)

<sup>b</sup> Media ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Este valor corresponde a la diferencia entre los días 0 y 9 de oxidación.

En la figura 47 se compara la AA de F1 y F4 frente a la observada para el extracto Soxhlet y el BHT. En cuanto a F1, ésta presentó una mayor capacidad para atenuar la formación de HPL, HEX y NON que el extracto de partida y superó al BHT en evitar o retardar la formación de HEX y NON, sumado a lo anterior, es de resaltar que dicha fracción presentó el mayor rendimiento en peso (48.6%). Por su parte, F4 superó la AA del extracto de partida y presentó un mejor comportamiento que el BHT en cuanto al control de la producción de HEX, NON y TBARS.



**Figura 47. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir de SPy.**

En la tabla 14 se presentan algunos datos reportados en la literatura para la evaluación de la AA de extractos y compuestos de origen natural en aceites comestibles, los cuales son comparados con los obtenidos en el presente trabajo para el extracto Soxhlet, F1 y F4. Sin embargo, se debe tener en cuenta que dicha comparación no es totalmente directa debido a algunos aspectos como: (1) las concentraciones de los extractos y compuestos presentan diferencias, (2) los periodos de oxidación no son iguales y (3) el tipo de aceite vegetal empleado es diferente. En dicha tabla se observa que el extracto Soxhlet, F1 y F4 poseen una capacidad mayor o similar para retardar la formación de HPL a la observada para los extractos de semillas de sésamo, hojas de olivo, epicarpio de granada, ajo y semillas de soya (en aceites vegetales). En relación a la concentración de TBARS, se observa que el extracto y las fracciones de interés procedentes de SPy presentaron una mayor capacidad para retardar la formación de dichas sustancias, comparado con lo reportado para los extractos de granada y ajo. Por otra parte, las catequinas de té presentaron una mayor capacidad para inhibir la producción de HPL y HEX que el extracto y las fracciones de interés.

**Tabla 14. Actividad antioxidante en aceites comestibles reportada en la literatura para algunos extractos y compuestos de origen natural.**

Extracto, fracción o compuesto	Concentración (ppm)	Aceite	Condiciones de oxidación	Productos de oxidación			Referencia
				HPL <sup>a</sup>	TBARS <sup>a</sup>	Hexanal <sup>a</sup>	
Extracto etanólico de semillas de sésamo ( <i>Sesamum indicum</i> L.)	NR <sup>b</sup>	Oliva	100 °C por 8 días	81.4	-	-	Konsoula y Liakopoulou, 2010
		Girasol		70.7	-	-	
		Soya		67.6	-	-	
		Maíz		61.8	-	-	
Extracto metanólico de hojas de olivo ( <i>Olea europea</i> L.)	400	Oliva	50 °C por 20 días	≈ 20	-	-	Bouaziz et al., 2008
Extracto metanólico de epicarpio de granada ( <i>Punica granatum</i> L.)	1000	Girasol	65 °C por 16 días	≈ 71	≈ 66	-	Iqbal et al., 2008
Extracto de metanólico de ajo ( <i>Allium sativum</i> )	1000	Girasol	50 °C por 16 días	≈ 81	≈ 64	-	Iqbal y Bhanger, 2007
Extracto metanólico de semillas de soya ( <i>Glycine max</i> )	4% <sub>v/v</sub>	Linaza	60 °C por 12 días	23 ± 1	-	-	Van Ruth et al., 2001
Catequinas de té	(-)-EGC <sup>c</sup> 40	Maíz	50 °C por 16 días	≈ 98	-	≈ 100	Huang y Frankel 1997
	(-)-GEGC <sup>d</sup> 60			≈ 100	-	≈ 100	
	(-)-GEC <sup>e</sup> 60			≈ 98	-	≈ 100	
Extracto Soxhlet SPy	300	Palma	60 °C por 15 días	63.4 ± 6 <sup>g</sup>	83.0 ± 7 <sup>g</sup>	41.0 ± 2 <sup>g</sup>	Trabajo actual
Fracción F1				78.6 ± 3	80.2 ± 3	86.7 ± 5	
Fracción F4				84.3 ± 4	84.7 ± 4	92.4 ± 3	

<sup>a</sup> Datos reportados como porcentaje de inhibición ( $\%_{inh} = 1 - \{ \text{valor}_{\text{antioxidante}} / \text{valor}_{\text{CONTROL}} \}$ ).

<sup>b</sup> NR: no reporta concentración.

<sup>c</sup> (-)-EGC: (-)-epigallocatequina.

<sup>d</sup> (-)-GEGC: (-)-galato de epigallocatequina.

<sup>e</sup> (-)-GEC: (-)-galato de epicatequina.

<sup>f</sup> Extracto obtenido con CO<sub>2</sub> a 50 °C/20 MPa.

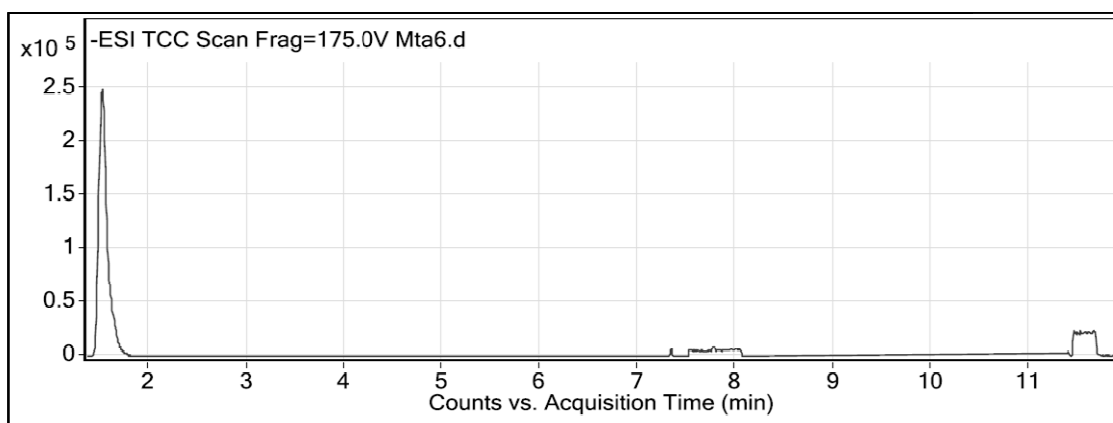
<sup>g</sup>  $\%_{inh}$  calculado con los datos del día 15 de oxidación (ver tablas 7 a 9).

Los resultados obtenidos permitieron identificar a F1 y F4 como las fracciones más promisorias en la protección de AP frente a su oxidación lipídica. Dichas fracciones fueron sometidas a análisis por CLAE-EM y CLAE-DAD, respectivamente, con el propósito de identificar algunos compuestos presentes en éstas y al mismo tiempo establecer una posible relación con su AA.

### ▪ *Identificación de compuestos presentes en F1*

La Fracción F1 fue sometida a análisis por CLAE-ESI-EM, modo negativo, con el fin de identificar los compuestos presentes en la misma, en la figura 48 se presenta el cromatograma obtenido en dicho análisis. Se observa una señal intensa a 1.553 min cuyo espectro de masas (figura 49a) indica la presencia de un ion abundante con m/z igual 408.0451, el cual corresponde al ion molecular desprotonado ([M-H]<sup>-</sup>). En la tabla 15 se

observan otras señales que corresponden a los iones  $[M-H+1]^-$  y  $[M-H+2]^-$ , el primero está asociado principalmente a la presencia del isótopo de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ) y en menor proporción a la presencia de isótopos de azufre 33 ( $^{33}\text{S}$ ) y nitrógeno 15 ( $^{15}\text{N}$ ); por su parte el ion  $[M-H+2]^-$  puede estar asociado a la presencia de isótopos de bromo 81 ( $^{81}\text{Br}$ ), cloro 37 ( $^{37}\text{Cl}$ ), azufre 34 ( $^{34}\text{S}$ ) y oxígeno 18 ( $^{18}\text{O}$ ). La abundancia relativa de  $[M-H+1]^-$  proporciona información sobre el número de átomos de carbono en  $[M-H]^-$ , al respecto en la tabla 15 se observa que la abundancia relativa de  $[M-H+1]^-$  fue 17% lo que sugiere la presencia de 14 o 15 átomos de carbono. Por otra parte, la abundancia relativa de  $[M-H+2]^-$  (10.6%) indica que no hay presencia de  $^{81}\text{Br}$  o  $^{37}\text{Cl}$  en el ion, por lo que ésta debida principalmente a los isótopos de  $^{34}\text{S}$  y  $^{18}\text{O}$ ; teniendo en cuenta esto, se puede considerar la presencia de 2 átomos de azufre y alrededor de 9 átomos de oxígeno. La presencia de azufre puede ser corroborada con la abundancia relativa de  $[M-H+1]^-$ , en este caso la presencia de los 2 átomos de azufre sumados a 14 átomos de carbono coinciden con la abundancia de  $[M-H+1]^-$ . Por otra parte, a partir del peso de  $[M-H]^-$  se deduce que el peso molecular del compuesto neutro es impar, esto es debido a la presencia de un número impar de átomos de nitrógeno en su estructura.



**Figura 48. Cromatograma del análisis por CLAE-ESI-EM de la F1 del extracto Soxhlet de SPy.**

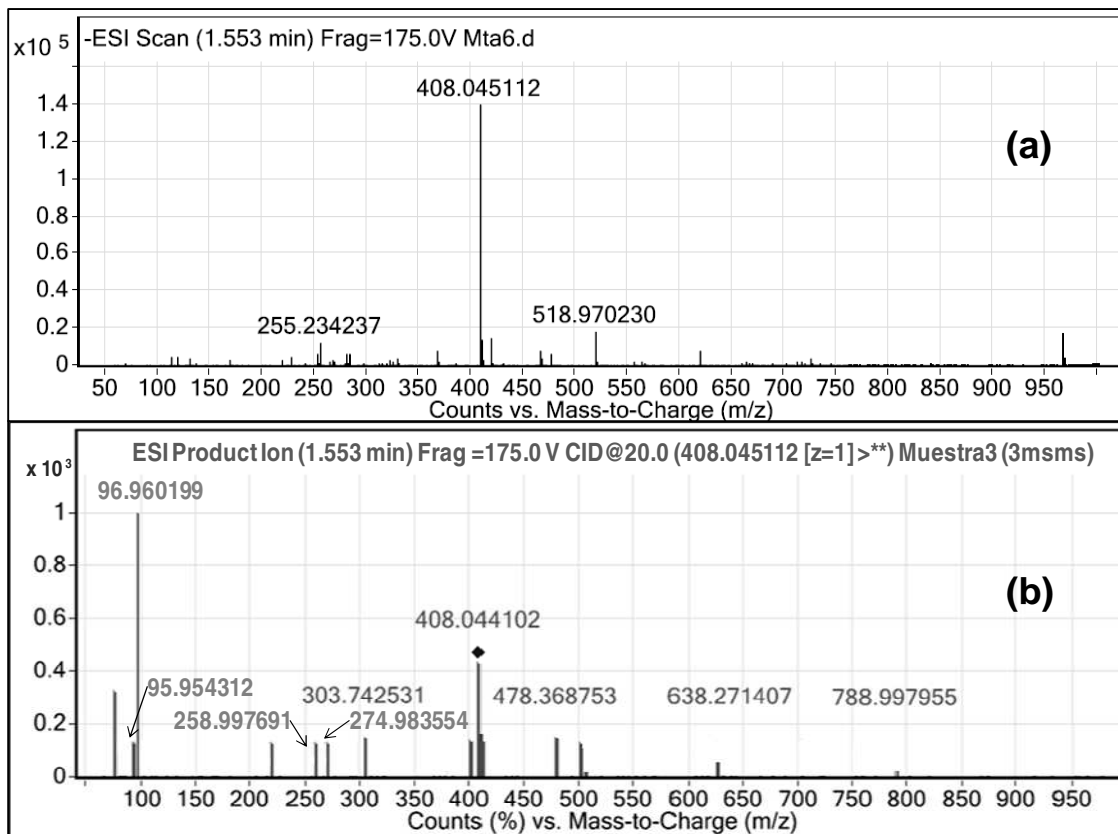


Figura 49. Espectros de masas obtenidos en el análisis por CLAE-ESI-EM de la F1. (a) Escaneo completo, (b) iones hijo de m/z 408.0451.

Tabla 15. Datos del espectro de masas del compuesto eluido a 1.553 min.

m/z	z	Abundancia	Abundancia relativa
255.2342		12763.4	9.0
367.3601		8190.1	5.8
<b>408.0451</b>	<b>1</b>	<b>140925.4</b>	<b>100</b>
409.0487	1	23929.5	17
410.0422	1	14970.8	10.6
418.9759		14722.1	10.5
466.0038		8291.9	5.8
518.9702		18724.4	13.3
618.9633		7995	5.7
966.0007		17285.6	12.2

Partiendo de los resultados discutidos previamente y empleando los datos de masa exacta de  $[M-H]^-$ , relación isotópica y abundancia, se llevó a cabo un análisis con el fin de obtener una fórmula molecular para  $[M-H]^-$  (para esto empleó como herramienta el software MassHunter Workstation). Como punto de partida se consideró que el  $[M-H]^-$  estaba formado por átomos de C, H, O, N y S, específicamente 14 átomos de C, alrededor de 9 átomos de O, número impar de átomos de N y 2 átomos de S. La

información fue analizada y se obtuvo la fórmula molecular  $C_{14}H_{18}NO_9S_2$ , la cual presentó un ajuste del 96.92% respecto a los datos experimentales. Dicha fórmula corresponde a un [M-H]<sup>-</sup> con una masa exacta igual a 408.0428 la cual coincide en un 99.9994% con la masa exacta experimental obtenida en el análisis de F1 (408.0451), este resultado permitió ratificar la fórmula  $C_{14}H_{18}NO_9S_2$  como la del [M-H]<sup>-</sup> bajo estudio.

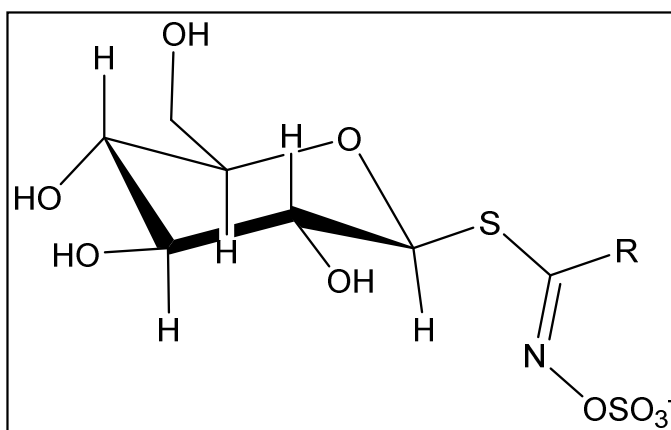
Con el propósito de obtener más información acerca de la estructura del compuesto de interés, la F1 fue sometida a análisis por CLAE-EM/EM. El ion con m/z 408.0451 fue sometido a fragmentación detectando los fragmentos hijos. En la figura 49b se presenta el espectro de masas obtenido (ver tabla16), el ion de mayor abundancia fue el correspondiente a m/z 97 (96.9601), seguido por los iones con m/z 75 (74.9929), 96 (95.9543), 303 (303.7425), 215 (214.9811), 259 (258.9976) y 275 (274.9835). Los fragmentos con m/z 97 y 96 concuerdan con los iones de fórmula [SO<sub>4</sub>H]<sup>-</sup> y [SO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, respectivamente, mientras que los de m/z 259 y 275 coincide con los iones [C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>9</sub>S]<sup>-</sup> y [C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, respectivamente. En trabajos previos varios autores han coincidido en que los fragmentos m/z 96, 97, 259 y 275 son iones diagnóstico de un grupo particular de compuestos denominado glucosinolatos (GSLs) (Lelario et al., 2012; Ediage et al., 2011; Cataldi et al., 2010; Rochfort et al., 2008; Tian et al., 2005; Bennett et al., 2004; Mellon et al., 2002).

**Tabla 16. Datos del espectro de masas obtenido en el experimento de iones hijo a partir del ion m/z 408.0451.**

m/z	z	Abundancia	Abundancia relativa
74.9929		322.6	32.2
95.9543		156	15.5
<b>96.9601</b>		<b>1002</b>	<b>100</b>
214.9811		147	14.7
258.9976		143.3	14.3
274.9835		142.3	14.2
303.7425		148.3	14.8
408.0441	1	436.8	43.6
409.0572	1	149	14.9
410.0498	1	163	16.3
478.3687		145	14.5

Los GSLs son un grupo β-D-tioglicosidos que se caracterizan por poseer en su estructura un grupo tihidroximato sulfatado, el cual está conjugado con una unidad de glucosa y un grupo “R” sustituyente, ver figura 50. La glucosa y el átomo central de carbono pueden estar modificados, este último con los diferentes sustituyentes. Dependiendo de la

naturaleza de R, los GSLs pueden ser alquílicos, aromáticos, indólicos, azufrados o con múltiples glicosilaciones, lo que resulta en un amplio número de compuestos que a la fecha supera los 200 (Brian, 2010).



**Figura 50. Estructura general de los glucosinolatos.**

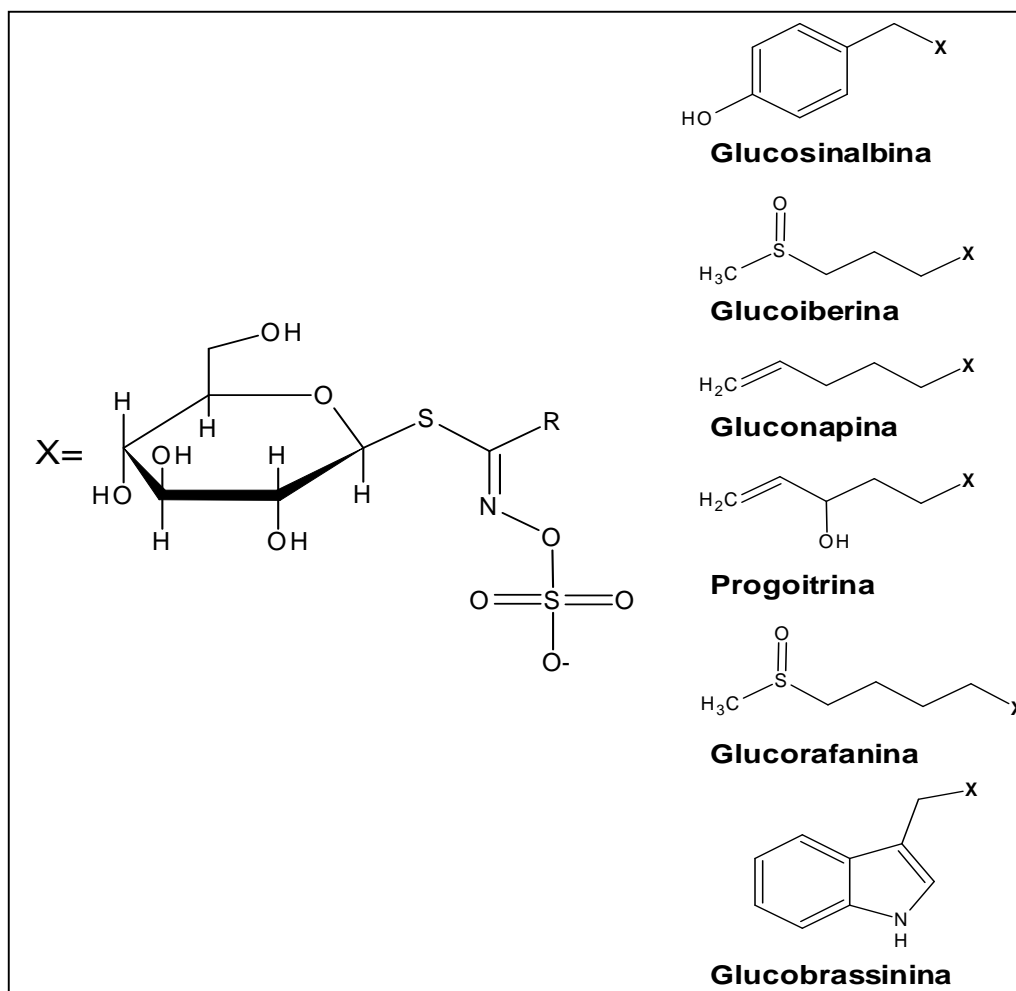
Los GSLs han sido reportados en Brassicaceae, Capparidaceae, Resedaceae y Caricaceae (Fahey et al., 2001). En el caso particular de las Caricaceae se han observado GSLs en frutos como el capiro o papayillo (*Jarilla chocola* Standl) (Daxenbichler et al., 1991), la papaya de monte (*Carica cauliflora* Jacq.), el papayo silvestre (*Carica chilensis*), la higuera del monte (*Carica quercifolia* (St.Hil.) Hieron) (Gmelin y Kaer, 1970) y la papaya (*Carica papaya* L.) (Bennett et al., 2004; Fahey et al., 2001; Kermanshai et al., 2001; Bennett et al., 1997). En éstas especies la presencia de los GSLs se ha evidenciado principalmente en sus semillas y en menor proporción en la pulpa de sus frutos.

Los GSLs son conocidos por su amplia variedad de propiedades entre las que se destacan su actividad biocida, herbicida, antimutagénica, antiproliferativa y antioxidante (Vig et al., 2009). En relación a la actividad biocida se evidenció que los GSLs poseen propiedades antifúngicas (Dandurand et al., 2000; Angus, 1994; Gamliel y Stapleton, 1993; Vierheilig y Ocampo, 1990; Chan y Close, 1987), antibacteriales (Koike y Subbarao, 2000; Smolinska et al., 1997; Zsolnai, 1966) y efecto pesticida sobre insectos e invertebrados (Smolinska et al., 2003; Manici et al., 2000; Kirkegaard et al., 2000; Sarwar et al., 1998; Brown y Morra, 1997, 1995; Lazzeri et al., 1993). Dichos compuestos también han demostrado ser una fuente viable en el control aleloquímico de hierbas no deseadas;

al respecto, abonos y extractos obtenidos a partir de especies de la familia Brassicaceae han mostrado ser herbicidas eficientes frente a diferentes tipos de plantas (Norsworthy et al., 2005; Buhler et al., 2001; Krishnan et al., 1998; Al-Khatib et al., 1997). Una de las propiedades de los GSLs de mayor interés actualmente es su efecto anticancer; algunas investigaciones han demostrado que el jugo obtenido a partir de Brassicaceae como el coliflor (*Brassica oleracea* var. botrytis) y brócoli (*Brassica oleracea italica*) exhibe un fuerte efecto antimutagénico (Mandelova y Totusek, 2007; Sedmikova et al., 1999). Algunos estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de vegetales crucíferos (coliflor, brócoli y coles - Brassicaceae) posee efecto protector sobre diferentes tipos de cáncer (Ambrosone et al., 2004; Cohen et al., 2000; Zhang et al., 2000; Verhoeven et al., 1996). Dicho efecto ha sido asociado a la presencia de GSLs y sus productos de hidrólisis.

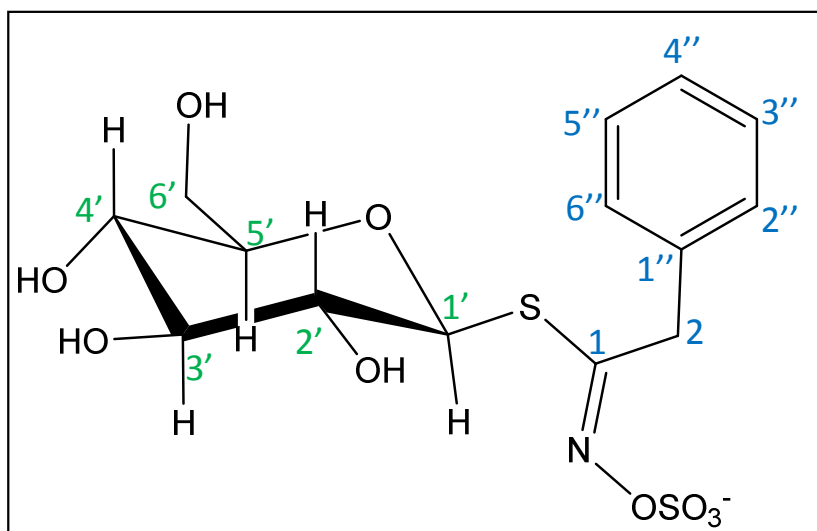
La AA de los GSLs es una de las propiedades menos estudiadas, dichos compuestos son considerados por muchos autores como antioxidantes indirectos, debido a que no pueden neutralizar radicales, pero si pueden interactuar con otros sistemas antioxidantes (p.e. enzimas del citocromo P450, glutatión-S-transferasa, aldehído reductasa, S-metil transferasa, N-acetiltransferasa, entre otros) mejorando su actividad (Vig et al., 2009). Plumb y colaboradores (1996) evaluaron la capacidad para neutralizar el radical ABTS<sup>+</sup> de algunos GSLs obtenidos de vegetales crucíferos, los resultados obtenidos les permitieron concluir que los GSLs no poseen una AA directa. En dicho estudio también se reportó la AA de algunos GSLs puros como la glucosinalbina, glucoiberina y gluconapina (ver figura 51), los cuales exhibieron una AA baja. Sin embargo, otras investigaciones demuestran que los GSLs poseen buena AA; Barillari y colaboradores (2005) reportaron que la glucoerucina (figura 51) posee una buena capacidad para bloquear hidroperóxidos, mientras que la glucorafasatina, principal GSL del rábano (*Raphanus sativus* - Brassicaceae), posee capacidad para reducir peróxido de hidrógeno y el radical ABTS<sup>+</sup>. Recientemente se reportó la AA de seis GSLs presentes en coliflor (gluconapina, glucoiberina, progoitrina, glucorafanina y glucobrassinina, figura 51), los cuales presentaron una alta capacidad para neutralizar radicales alcoxilo y superóxido (Cabello-Hurtado et al., 2012).





**Figura 51. Estructura de algunos glucosinolatos cuya actividad antioxidante ha sido reportada en la literatura.**

Los resultados obtenidos en los análisis de CLAE-ESI-EM y CLAE-ESI-EM/EM permitieron evidenciar, de manera preliminar, que un GSL hacía parte de la fracción F1. Varios autores han reportado al bencilglucosinolato (BGSL) o glucotropaeolina (GTL), ver figura 52, como el único GSL presente en las semillas y pulpa de fruto de *Carica papaya* (Williams et al., 2013; Toribio et al., 2011; Nakamura et al., 2007; Bennett et al., 2004; Fahey et al., 2001; Kermanshai et al., 2001; Bennett et al., 1997). La fórmula molecular de este compuesto coincide con la del GSL presente en F1, lo que permite inferir que el compuesto observado en dicha fracción es el BGSL.

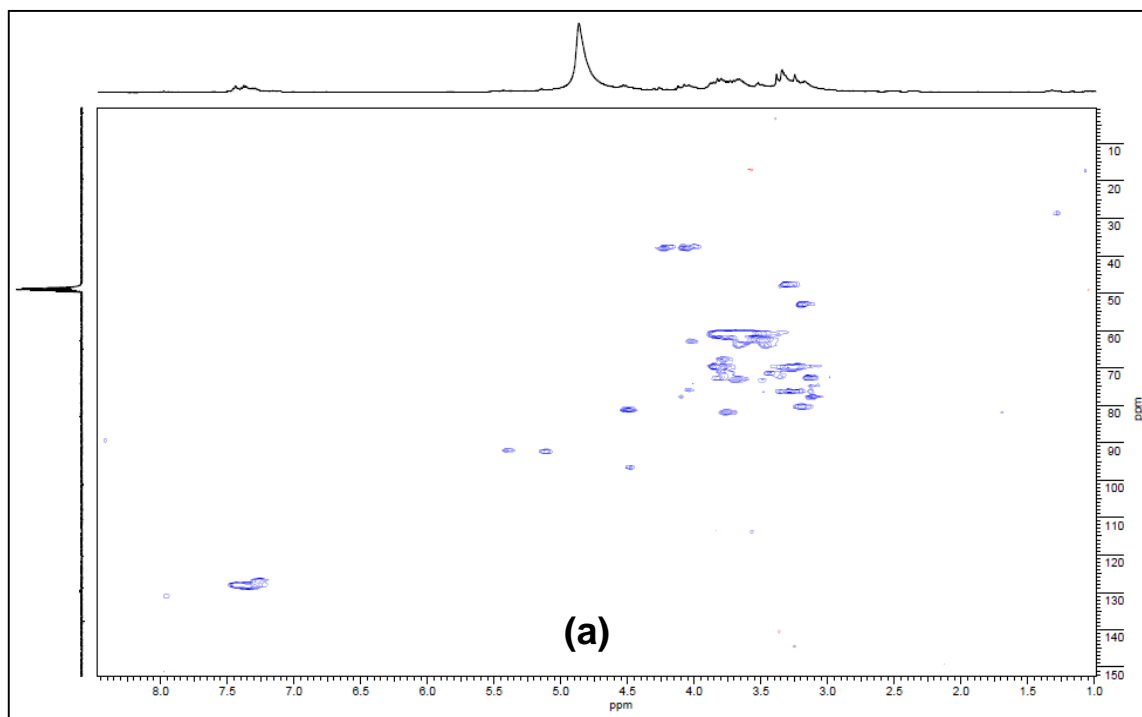


**Figura 52. Estructura de bencilglucosinolato.**

Con el fin de verificar la presencia de BGSL en F1, dicha fracción fue sometida a análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrogeno (RMN- $^1\text{H}$ ) y de carbono 13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ), ver tabla 17. El protón anomérico, H1', de la  $\beta$ -D-glucopiranososa fue observado a 4.55 ppm, su constante de acoplamiento fue de 9.3 Hz indicando la presencia del enlace  $\alpha$  de la glucopiranososa. Los protones H2' a H5' aparecieron entre 3.17 y 3.52 ppm, aunque sus señales se encontraron superpuestas, por su parte los protones no equivalentes H6'a y H6'b fueron observados a 3.67 y 3.82 ppm, respectivamente. En relación a la aglicona del BGSL sus protones bencílicos H2a y H2b fueron observados a 4.08 y 4.24 ppm, respectivamente. Los protones aromáticos fueron observados entre 7.29 y 7.44 ppm; el protón H4'' fue observado a 7.29 ppm y dos pares de protones equivalentes fueron observados a 7.35 y 7.44 ppm.

Los desplazamientos químicos correspondientes a los núcleos de  $^{13}\text{C}$  presentes en el BGSL también fueron evidenciados; los carbonos de la  $\beta$ -D-glucopiranososa fueron observados entre 61.33 y 81.59 ppm. Respecto a la aglicona el carbono C1 fue observado a 159.59 ppm y el carbono bencílico fue evidenciado a 38.33 ppm, por su parte los carbonos aromáticos fueron observados entre 126.77 y 136.43 ppm. Por otra parte, los resultados obtenidos en el análisis por DEPT 135 indican la presencia de cinco CH de la  $\beta$ -D-glucopiranososa, cinco CH aromáticos y dos  $\text{CH}_2$ , estos últimos correspondientes a C2 y C6''.

En la figura 53 se presenta el espectro de correlación simple heteronuclear (HSQC, por sus siglas en inglés) obtenido para F1, en éste fue posible evidenciar algunas correlaciones correspondientes a la  $\beta$ -D-glucopiranososa y a la aglicona del BGSL. La correlación entre el carbono y protón anoméricos, C1'-H1' fue observada en 4.55-81.59 ppm, mientras que las correlaciones entre los protones no equivalentes H6'a y H6'b con el C6' fueron observadas en 3.67 y 3.82 con 61.39. Las correlaciones de la aglicona también fueron observadas; el carbono bencílico C2 correlacionó con sus protones H2a y H2b en 4.08 y 4.24 con 38.33 ppm, ver figura 51b. Las correlaciones entre los carbonos y protones aromáticos equivalentes se observaron en 7.44-128.01 ppm y 7.35-128.48-7.35 ppm; para los núcleos en la posición 4'' se observó la correlación en 7.29-126.77 ppm, ver figura 51c.



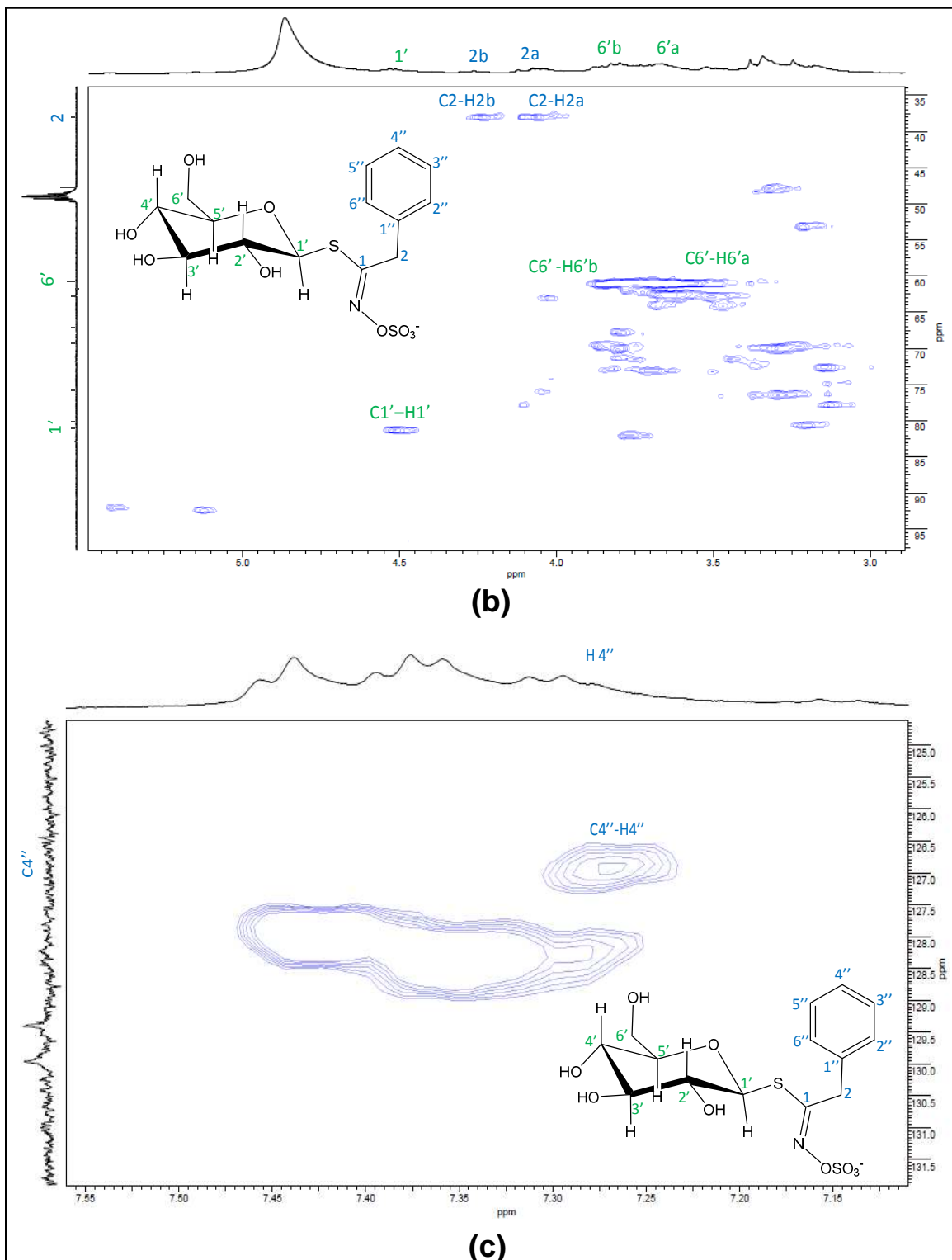


Figura 53. Espectros de RMN de F1 (experimento HSQC).

(a) espectro completo, (b) ampliación entre 2.45-8.0 ppm y 45-174 ppm, (c) ampliación entre 7.11-7.56 y 120-132 ppm.

En la figura 54 se presenta el espectro de correlaciones multienlace heteronucleares (HMBC, por sus siglas en inglés), en éste se evidencian algunas correlaciones entre los protones y carbonos a dos y tres encales de distancia. Para la  $\beta$ -D-glucopiranososa fue posible observar la correlación entre el protón anomérico H1' y el carbono C2' en 4.55-72.87 ppm, las correlaciones entre los demás protones y carbonos no fueron evidentes. En relación a la aglicona se observó la correlación entre los protones bencílicos no equivalentes y el carbono de la imida (C1) en 4.08 y 4.24 con 159.59 ppm. Las correlaciones entre H2a y H2b con los carbonos del anillo aromático también fueron evidentes; la correlación H2a-C1'' y H2b-C1'' fueron observadas a 4.08-136.43 ppm y 4.24-136.43 ppm, respectivamente. Por su parte, las correlaciones H2a y H2b con los carbonos equivalentes C2'', C6'' se observaron a 4.08-128.01 ppm y 4.24-128.01 ppm, respectivamente. Por otra parte, en el espectro también son evidentes las correlaciones entre los protones y carbonos del anillo aromático; los protones equivalentes H2'' y H6'' correlacionan con los carbonos equivalentes C3'' y C5'' y con el C4'', dichas correlaciones se observan en 7.44-128.49 ppm y 7.44-126.77 ppm. Por su parte, los protones equivalentes H3'' y H5'' correlacionan con C1'' a 7.35-136.43 ppm, mientras que el protón H4'' muestra una débil correlación con C3'' y C5'' a 7.29-128.49 ppm.

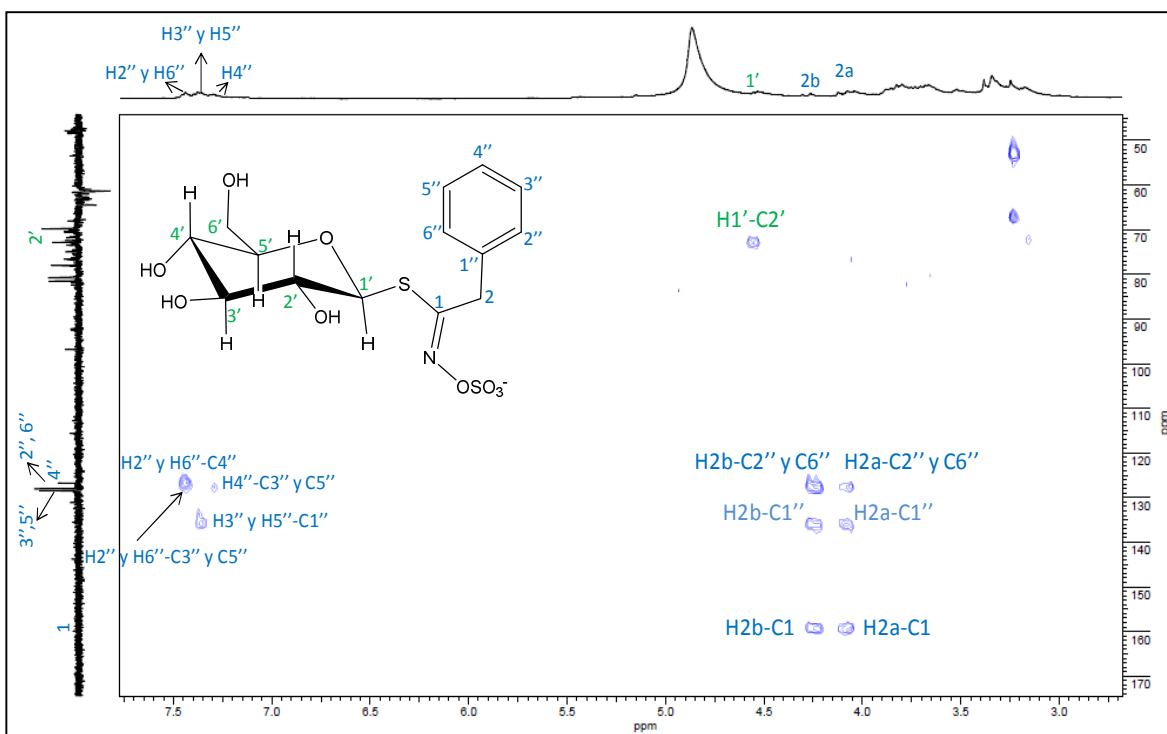


Figura 54. Espectro RMN de F1 (experimento HMBC).

**Tabla 17. Datos espectroscópicos obtenidos para F1.**

	Posición	<sup>1</sup> H (δ, J en Hz)	<sup>13</sup> C (δ)	DEPT 135
Glucosa	1'	4.55 (d, J = 9.3)	81.59	CH
	2'	Superposición entre 3.17-3.52	72.87	CH
	-		78.06	CH
	-		69.82	CH
	-		80.79	CH
	6'a	3.67	61.39	CH <sub>2</sub>
6'b	3.82			
Aglicona	1	-	159.59	C
	2a	4.08 (d, J = 16.2)	38.33	CH <sub>2</sub>
	2b	4.24 (d, J = 16.1)		
	1''	-	136.43	C
	2'', 6''	7.44	128.01	CH
	3'', 5''	7.35	128.49	CH
	4''	7.29	126.77	CH

En la tabla 18 se comparan los resultados obtenidos en el análisis de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de F1 frente a los reportados en la literatura para el BGSL; se observa que el desplazamiento químico observado en el presente trabajo para el protón anomérico H1' de la β-D-glucopiranososa coincide con el reportado por Piacente y colaboradores (1996) y es cercano a los evidenciados por Dini y colaboradores (2002) y Prester y colaboradores (1996). Mientras que los desplazamientos químicos de los protones 6'a y 6'b fueron muy similares a los reportados por Dini y colaboradores y Prester y colaboradores. Por su parte, para los protones correspondientes a la aglicona se observó una alta coincidencia entre los desplazamientos químicos del actual trabajo y los reportados en la literatura (con excepción de los desplazamientos reportados para los protones 2b, 3'', 5'' y 4'' por Prester y colaboradores). Adicional a esto las constantes de acoplamiento de los protones bencílicos coincidieron con las reportadas por Dini y colaboradores. Por otra parte, los desplazamientos químicos observados en el análisis RMN-<sup>13</sup>C de F1 fueron cercanos a los reportados por Dini y colaboradores con diferencias cercanas a un ppm, lo que permite asignarlas las señales correspondientes a los carbonos del BGSL.

Algunas de las correlaciones heteronucleares, a dos o tres enlaces de distancia, observadas en el presente trabajo fueron reportadas previamente por Dini y colaboradores; ellos evidenciaron la correlación entre el carbono cuaternario C1 y el protón bencílico H2a en 4.08-160.8 ppm, dicha correlación fue vista en el presente trabajo en 4.08-159.59 ppm. Otra correlación reportada fue la correspondiente al carbono aromático C1'' y el protón bencílico H2b a 4.28-137.4 ppm, ésta fue observada en el actual trabajo en 4.24-136.43 ppm.

**Tabla 18. Datos espectroscópicos obtenidos para F1 y reportados en la literatura para el BGSL.**

Posición	RMN- <sup>1</sup> H (δ, J en Hz)				RMN- <sup>13</sup> C (δ)		Correlación <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H HMBC		
	Trabajo actual 400 MHz en CD <sub>3</sub> OD	Dini et al., 2002 500 MHz en CD <sub>3</sub> OD	Piacente et al., 2002 600 MHz en CD <sub>3</sub> OD	Prester et al., 1996 600 MHz en D <sub>2</sub> O	Trabajo actual 100 MHz	Dini et al., 2002 125 MHz	Trabajo actual	Dini et al., 2002	
Glucosa	1'	4.55	4.82	4.52	4.71	81.59	82.8	C2' (72.87)	NR <sup>a</sup>
	2'	Superposición entre 3.17-3.52	3.25	NR <sup>a</sup>	3.33	72.87	74.2	-	NR <sup>a</sup>
	3'		Superposición entre 3.30-3.55	NR <sup>a</sup>	3.33	78.06	79.5	-	NR <sup>a</sup>
	4'			NR <sup>a</sup>	3.41	69.82	71.1	-	NR <sup>a</sup>
	5'	NR <sup>a</sup>	3.26	80.79	82.2	-	NR <sup>a</sup>		
	6'a	3.67	3.63	NR <sup>a</sup>	3.69	61.39	62.7	-	NR <sup>a</sup>
6'b	3.82	3.86	NR <sup>a</sup>	3.64	-	-	-	NR <sup>a</sup>	
Aglicona	1	-	-	-	-	159.59	160.8	-	NR <sup>a</sup>
	2a	4.08 (d, J = 16.2)	4.08 (d, J = 16.3)	4.09 (d, J = 10.0)	4.07	38.33	39.6	C2'' y 6'' (128.01) C1'' (136.43) C1 (159.59)	C1 (160.8 ppm)
	2b	4.24 (d, J = 16.1)	4.28 (d, J = 16.3)	4.27 (d, J = 10.0)	4.16			C2'' y 6'' (128.01) C1'' (136.43) C1 (159.59)	C1'' (137.4 ppm)
	1''	-	-	-	-	136.43	137.4	-	NR <sup>a</sup>
	2'', 6''	7.44	7.45	7.45	7.43	128.01	129.3	C3'' y 5'' (128.49)	NR <sup>a</sup>
	3'', 5''	7.35	7.37	7.36	7.43	128.49	129.9	C1'' (136.43)	NR <sup>a</sup>
	4''	7.29	7.29	7.29	7.43	126.77	128.2	C3'' y 5'' (128.49)	NR <sup>a</sup>

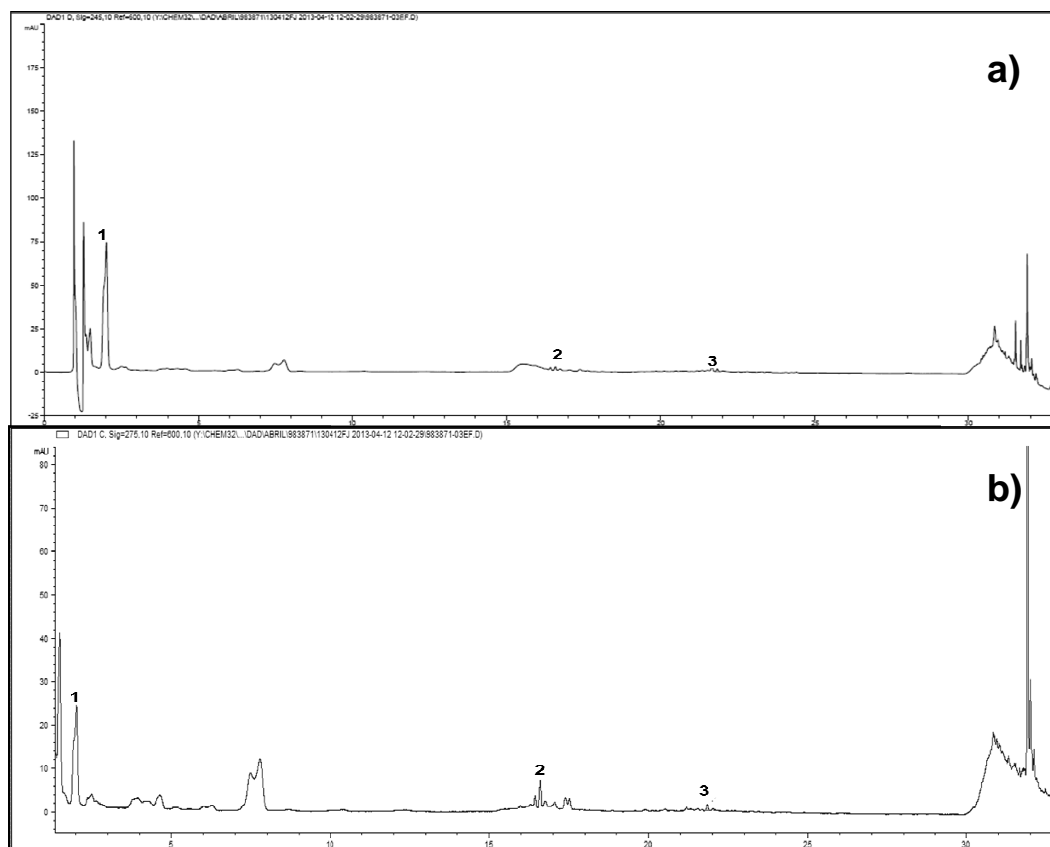
<sup>a</sup> NR: No reporta datos.

Los resultados presentados previamente permiten afirmar que el BGSL se encuentra presente en la F1 del extracto Soxhlet de SPy. Al parecer dicho compuesto aporta a la AA observada para F1 y el extracto Soxhlet de SPy

Diferentes actividades biológicas de BGSL, y sus productos de hidrólisis (particularmente el becilisotiocianato), han sido reportadas en la literatura; se observó estos compuestos poseen actividad antifúngica frente a diferentes especies (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Diaporthe phaseolorum* y *Pythium irregulare*) (Manici et al., 2000). Dichos compuestos han sido también asociados con las propiedades medicinales (antigripal, bronco y vasodilatador) del berro (*Lepidium sativum* L. - Brassicaceae), una planta tradicional de Tailandia (Songsak y Lockwood, 2002). Radulović y colaboradores (2012) han evaluado la actividad antimicrobial del BGSL, y sus productos de hidrólisis, en *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*, observando una alta eficiencia para los productos. Hasta donde se tiene conocimiento no hay reportes en la literatura acerca de la AA del BGSL. Teniendo en cuenta esto, el presente trabajo es pionero al considerar al BGSL como un antioxidante con capacidad para atenuar la oxidación lipídica de AP.

▪ *Identificación de compuestos presentes en F4*

La fracción F4 fue sometida a análisis por CLAE-DAD con el fin de identificar algunos de los compuestos fenólicos presentes en la misma, en la figura 55 se presentan los cromatogramas obtenidos en dicho análisis a 245 y 275 nm. La comparación de los tiempos de retención y espectros UV-Vis de los compuestos separados a partir de F4, versus los correspondientes a la disolución patrón de compuestos fenólicos<sup>4</sup>, permitió identificar tres compuestos presentes en la fracción, a saber: ácido gálico (AG, pico 1), galato de epigallocatequina (GEGC, pico 2) y ácido rosmarínico (AR, pico 3).



**Figura 55. Cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAE-DAD de F4. (a) 245 y (b) 275 nm.**

<sup>4</sup> El cromatograma y tiempos de retención de la disolución patrón de compuestos fenólicos son presentados en los ANEXO C. Adicional a esto, en el ANEXO D se comparan los espectros UV-Vis obtenidos para los patrones de compuestos fenólicos y los compuestos detectados en F4.



Los compuestos identificados no han sido previamente reportados en la literatura para extractos o fracciones de SPy, sin embargo, la presencia de algunas catequinas conjugadas, entre éstas la catequina, han sido evidenciada en la pulpa de papaya verde y madura (Agrawal y Agarwal, 1982; Chye y Wan, 1980).

La AA en AP del AG fue evaluada en el presente trabajo, allí se observó que dicho compuesto posee una buena capacidad para retardar la formación de TBARS, aunque su eficiencia para atenuar la formación de HEX fue baja. Dicha AA también ha sido evaluada en otras matrices lipídicas, al respecto, en la tabla 19 se presentan algunos resultados reportados en la literatura. Koşşar y colaboradores (2011) observaron que el AG presenta una buena eficiencia para retardar la formación de HPL y TBARS en ácido linoleico. Dicha capacidad fue mayor cuando se empleó la menor concentración de antioxidante (2500 ppm), permitiendo disminuir la formación de estos productos en un 70%. Por otra parte, la AA de dicho compuesto también ha sido evaluada en emulsiones agua/ácido linoleico, observando que para reducir la formación de HPL en un 50%, es necesario emplear una baja concentración de antioxidante (8.4 ppm), lo que sugiere una alta AA del AG en dicha matriz.

El GEGC presenta el mayor número de reportes en la literatura acerca de su AA en diferentes matrices lipídicas. Previamente se citó la excelente AA de dicho compuesto en aceite de maíz, el cual inhibió la formación de HPL y HEX, ver tabla 14. Este resultado concuerda con los reportados para otras matrices lipídicas (tabla 19), Zhou y Elias (2013) evaluaron la capacidad del GEGC para retardar la formación de HPL y TBARS en una emulsión agua/aceite de linaza, observando que dicho antioxidante disminuía la producción de HPL en cerca de 100% y la de TBARS en alrededor del 80%. Otra matriz empleada en la evaluación de la AA de GEGC fue las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en ingles), en este caso el compuesto mostró una alta eficiencia para inhibir la formación de TBARS (entre 90 y 100%) durante periodos cortos de oxidación (Zhang et al., 1997), sin embargo, al incrementar el tiempo de oxidación (Wu et al., 2010) dicha eficiencia se vio ligeramente atenuada (70%). Por otra parte, diferentes tipos de liposomas (vesículas de fosfatidilcolina y sinaptosomas) han sido sometidos a oxidación en presencia de GEGC, observando que este compuesto puede atenuar la formación de TBARS en forma significativa, empleando bajas concentraciones del mismo (Laporta et al., 2007; Guo et al., 1996). Estos resultados muestran que el GEGC posee una alta

capacidad para retardar la oxidación lipídica en diferentes matrices, indicando que para AP dicho compuesto posee un aporte significativo a la AA observada para F4 y para el extracto Soxhlet de SPy.

**Tabla 19. Actividad antioxidante en matrices lipídicas reportada para el ácido gálico, el galato de epigallocatequina y el ácido rosmarínico.**

Compuesto	Concentración (ppm)	Matriz sometida a oxidación	Condiciones de oxidación	Productos de oxidación		Referencia
				HPL <sup>a</sup>	TBARS <sup>a</sup>	
Ácido gálico (AG)	2500	Ácido linoleico	50 °C por 10 h <sup>b</sup>	70.79	69.44	Kosşar et al., 2011
	10000			59.57	72.67	
	8.4 <sup>c</sup>	Emulsión agua/ácido linoleico	40 °C por 4 días	50	-	Sánchez-Moreno et al., 1999
Galato de epigallocatequina (GEGC)	43	Emulsión agua/aceite de linaza	50 °C por 24 h <sup>e</sup>	96.5	83.7	Zhou y Elias 2013
	214			100	75.6	
	43	LDL <sup>d</sup>	37 °C 9 días	≈ 88	≈ 70	Wu et al., 2010
	1.8 <sup>g</sup>	Vesículas de Fosfatidilcolina	37 °C por 10 min <sup>b</sup>	-	50	Laporta et al., 2007
	4.3	LDL <sup>d</sup>	30 °C por 40 h <sup>f</sup>	-	≈ 90	Zhang et al., 1997
	8.5			-	≈ 100	
	17			-	≈ 100	
128	Sinaptosomas	37 °C por 30 min <sup>e</sup>	-	80	Guo et al., 1996	
Ácido rosmarínico (AR)	0.7	Liposomas de Fosfatidilcolina	37 °C por 30 min <sup>b</sup>	≈ 80	-	Fadel et al., 2011
	2.7			≈ 100	-	
	22			≈ 88	-	
	32.8 <sup>g</sup>	Emulsión agua/ácido linoleico	37 °C por 123 h	-	50	Erkan et al., 2011

<sup>a</sup> Datos reportados como % de inhibición ( $\%_{inh} = [1 - \{ \text{valor}_{antioxidante} / \text{valor}_{CONTROL} \}] \times 100$ )

<sup>b</sup> Oxidación acelerada por adición de ABAP

<sup>c</sup> Concentración requerida para disminuir la concentración de HPL en un 50% (EC<sub>50</sub>)

<sup>d</sup> LDL: lipoproteínas de baja densidad

<sup>e</sup> Oxidación estimulada con Fe<sup>+3k</sup>

<sup>f</sup> Oxidación estimulada con Cu<sup>+2</sup>

<sup>g</sup> Concentración requerida para disminuir la concentración de TBARS en un 50% (EC<sub>50</sub>)

La AA del AR en matrices como liposomas y emulsiones agua/acido linoleico ha sido previamente reportada; Fadel y colaboradores (2011) mostraron que durante periodos cortos de oxidación (30 min) la producción de HPL, a partir de liposomas, se puede inhibir empleando concentraciones de AR cercanas a 2.7 ppm, no obstante, este efecto puede verse atenuado al emplear concentración inferiores o mayores a ésta. Por su parte, Erkan y colaboradores (2011) observaron que para reducir en un 50% la producción de TBARS, en una emulsión agua/ácido linoleico, se requiere la adición de 32.8 mg de AR por cada

kg de emulsión. Estos resultados indican que el AR es un compuesto con un alto poder para minimizar la oxidación lipídica en emulsiones y liposomas, lo que puede ser extrapolado al caso del AP, tomando como punto de partida los resultados obtenidos para F4 y el extracto Soxhlet de SPy.

Los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo muestran que las SPy son fuente de extractos, fracciones y compuestos con alta AA. El extracto Soxhlet protegió de forma eficiente el AP frente a su oxidación, al mismo tiempo permitió obtener fracciones con alta AA en dicha matriz. La fracción F1 presenta como compuesto mayoritario al BGSL, el cual posee un amplio espectro de propiedades, entre éstas la protección de AP contra su oxidación lipídica. Por su parte, la F4 está conformada por compuestos fenólicos con una excelente capacidad para retardar la oxidación lipídica en diferentes matrices lipídicas, y en particular en AP. El potencial uso de dichas fracciones, o sus compuestos, en la conservación de alimentos (particularmente en aceites comestibles) se presenta como una opción viable. Esto se ve soportado por algunos aspectos importantes tales como la baja concentración de fracción o compuesto requerida (las fracciones fueron aplicadas a 300 ppm), la baja toxicidad de los compuestos identificados (BGSL:  $\approx$  180 mg/kg-día, Macholz, 1987; AG: 119 mg/kg-día, Niho et al., 2001; GEGC: 500 mg/kg-día, Isbrucker et al., 2006; AR: 561 mg/kg-día, datos para ratones adultos) y su AA superior a la observada para los antioxidantes sintéticos actualmente usados (BHT, TBHQ y BHA). Sin embargo, dicha aplicación estará supedita a pruebas y estudios adicionales que permitan establecer la inocuidad de las fracciones o compuestos en el alimento (p.e. análisis sensorial, identificación de productos de oxidación, estabilidad química y térmica de los compuestos y sus productos, solubilidad y disponibilidad, entre otras), los posibles beneficios para el consumidor, la existencia de efectos sinérgicos o antagónicos, la relación costo/beneficio, entre otros aspectos que pueden ser motivo de trabajos posteriores.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta parte del trabajo muestran que las SPy son una excelente fuente de extractos, fracciones y compuestos con alta AA en AP. Estos resultados permiten considerar a dicho residuo como una promisorio fuente de antioxidantes con potencial aplicación en alimentos. Esto se vería reflejado, en términos generales, en un aprovechamiento integral de la papaya.

## **3.2 Obtención de antioxidantes a partir de residuos frutícolas y evaluación de su actividad antioxidante en carne de res cocida**

En esta parte del trabajo los extractos y fracciones obtenidos a partir de los residuos frutícolas fueron adicionados a carne de res cocida (CRC), con el propósito de evaluar su eficiencia para retardar la oxidación lipídica. La AA de los extractos de residuos frutícolas en CRC se determinó por medición de la concentración de algunos productos de oxidación formados durante 9 días de almacenamiento. Posteriormente, mediante un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de clusters (AC) se identificó el residuo con el mayor potencial como fuente de antioxidantes en CRC (Castro-Vargas et al., sometido). Dicho residuo fue sometido a EFS con CO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>/EtOH y la AA de los extractos obtenidos fue evaluada. Finalmente el extracto más activo fue fraccionado y se identificaron algunos compuestos.

### **3.2.1 Estudio comparativo y selección del residuo con el mayor potencial como fuente de antioxidantes**

En la tabla 20 se presentan los resultados obtenidos en la medición de la concentración de HPL y TBARS, en general se observa que dicha concentración se incrementó en función del tiempo Sin embargo, para hacer referencia a su AA es necesario considerar en conjunto la variación de los HPL y TBARS, debido a que esto permite establecer si el extracto o antioxidante retarda la oxidación en sus diferentes etapas. Teniendo en cuenta esto, se empleó un ACP para describir la AA de los extractos y antioxidantes y establecer diferencias y similitudes en ésta, también se realizó AC con el fin de agrupar dichos extractos y antioxidantes en función de su AA.

**Tabla 20. Hidroperóxidos y TBARS formados durante el almacenamiento de CRC adicionada con los extractos y antioxidantes.**

Extracto o antioxidante	mmol hidroperóxidos de ácido linoleico/kg carne de res cocida (mmol HPL/kg)			mg malondialdehído/ kg carne de res cocida (mg MDA/kg)		
	Días de oxidación*			Días de oxidación*		
	3	6	9	3	6	9
<b>CONTROL</b>	11.04 ± 1.40	17.54 ± 0.91	28.07 ± 1.08	0.55 ± 0.05	0.70 ± 0.03	1.15 ± 0.05
<b>EMa</b>	6.91 ± 0.53	9.55 ± 0.32	10.11 ± 0.87	0.14 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.37 ± 0.01
<b>CSMa</b>	10.73 ± 0.86	6.18 ± 0.98	8.47 ± 1.12	0.15 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.61 ± 0.01
<b>KSMa</b>	9.31 ± 0.83	6.19 ± 0.96	8.92 ± 1.05	0.13 ± 0.03	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.05
<b>EMt</b>	7.55 ± 0.13	9.69 ± 0.35	10.84 ± 0.38	1.37 ± 0.03	1.47 ± 0.03	1.64 ± 0.06
<b>CSMt</b>	10.95 ± 0.65	6.42 ± 0.90	7.30 ± 0.30	0.19 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.55 ± 0.01
<b>KSMt</b>	7.48 ± 0.07	10.10 ± 0.25	10.66 ± 0.78	0.66 ± 0.10	0.66 ± 0.04	0.70 ± 0.04
<b>EL</b>	6.96 ± 0.66	11.99 ± 0.94	15.44 ± 0.73	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.47 ± 0.04
<b>SL</b>	6.31 ± 0.99	9.82 ± 0.78	12.07 ± 1.56	0.14 ± 0.01	0.38 ± 0.06	0.42 ± 0.06
<b>ETA</b>	4.18 ± 0.18	5.64 ± 0.26	7.03 ± 0.43	0.05 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.24 ± 0.01
<b>CU</b>	7.29 ± 0.35	9.73 ± 0.67	13.49 ± 0.83	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.30 ± 0.01
<b>EMc</b>	7.80 ± 0.34	9.75 ± 0.57	9.73 ± 0.91	0.93 ± 0.04	1.32 ± 0.05	1.51 ± 0.06
<b>SMc</b>	9.72 ± 0.16	11.12 ± 0.61	12.30 ± 0.60	1.04 ± 0.03	1.07 ± 0.04	1.47 ± 0.03
<b>SC</b>	7.53 ± 0.13	8.86 ± 0.34	9.54 ± 0.74	0.16 ± 0.01	0.33 ± 0.09	0.38 ± 0.01
<b>ECf</b>	5.37 ± 0.17	5.80 ± 0.75	10.61 ± 0.67	0.56 ± 0.03	0.64 ± 0.05	1.00 ± 0.05
<b>EPy</b>	7.53 ± 0.18	8.79 ± 0.17	11.63 ± 1.00	0.26 ± 0.03	0.52 ± 0.03	0.72 ± 0.04
<b>SPy</b>	7.50 ± 0.31	8.51 ± 0.83	9.50 ± 0.68	0.13 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.44 ± 0.04
<b>EG</b>	6.47 ± 0.34	8.30 ± 0.13	13.05 ± 0.32	0.25 ± 0.08	0.48 ± 0.05	0.63 ± 0.03
<b>SG</b>	9.05 ± 1.19	16.39 ± 0.72	26.16 ± 0.98	0.58 ± 0.05	0.65 ± 0.06	1.37 ± 0.06
<b>SGy</b>	9.40 ± 0.73	7.78 ± 0.66	10.61 ± 0.74	0.13 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.49 ± 0.03
<b>EN</b>	5.48 ± 0.41	6.17 ± 0.54	11.91 ± 0.26	0.19 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.38 ± 0.03
<b>EP</b>	7.34 ± 0.17	8.91 ± 0.19	12.98 ± 0.36	0.19 ± 0.08	0.28 ± 0.06	0.29 ± 0.03
<b>SM</b>	10.15 ± 1.40	12.21 ± 0.92	16.50 ± 0.25	0.36 ± 0.07	0.36 ± 0.03	0.47 ± 0.04
<b>BHT</b>	4.54 ± 0.35	6.77 ± 0.12	9.71 ± 0.72	0.38 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.45 ± 0.03
<b>BHA</b>	10.17 ± 0.08	10.81 ± 0.12	11.61 ± 0.03	0.52 ± 0.08	0.69 ± 0.12	0.89 ± 0.03
<b>AG</b>	8.12 ± 0.48	8.02 ± 1.03	10.30 ± 0.64	0.14 ± 0.48	0.38 ± 0.03	0.52 ± 0.64
<b>TBHQ</b>	4.75 ± 0.15	5.51 ± 0.19	6.92 ± 0.42	0.21 ± 0.02	0.37 ± 0.06	0.42 ± 0.03

\* Los valores de HPL y TBARS para el día cero fueron  $2.98 \pm 0.25$  mmol HPL/kg y  $0.03 \pm 0.01$  mg MDA/kg, respectivamente.

En relación al ACP, dos CP explican el 84.41% de la varianza total, el CP1 explica el 57.41%, mientras que el CP2 explica el 27.00%, su elección fue llevada a cabo tomando como referencia sus valores propios (>1). Los valores de los loadings obtenidos para cada componente principal muestran que las TBARS se correlacionan con el CP1 (loadings

entre 0.83 y 0.93), mientras que los HPL correlacionan con el CP2 (loadings entre 0.72 y 0.77). Estos resultados sugieren que la información proporcionada por HPL es independiente de la correspondiente a las TBARS, lo cual es debido a que los HPL son productos iniciales de oxidación lipídica, mientras que las TBARS son productos secundarios y finales (ver tabla 21).

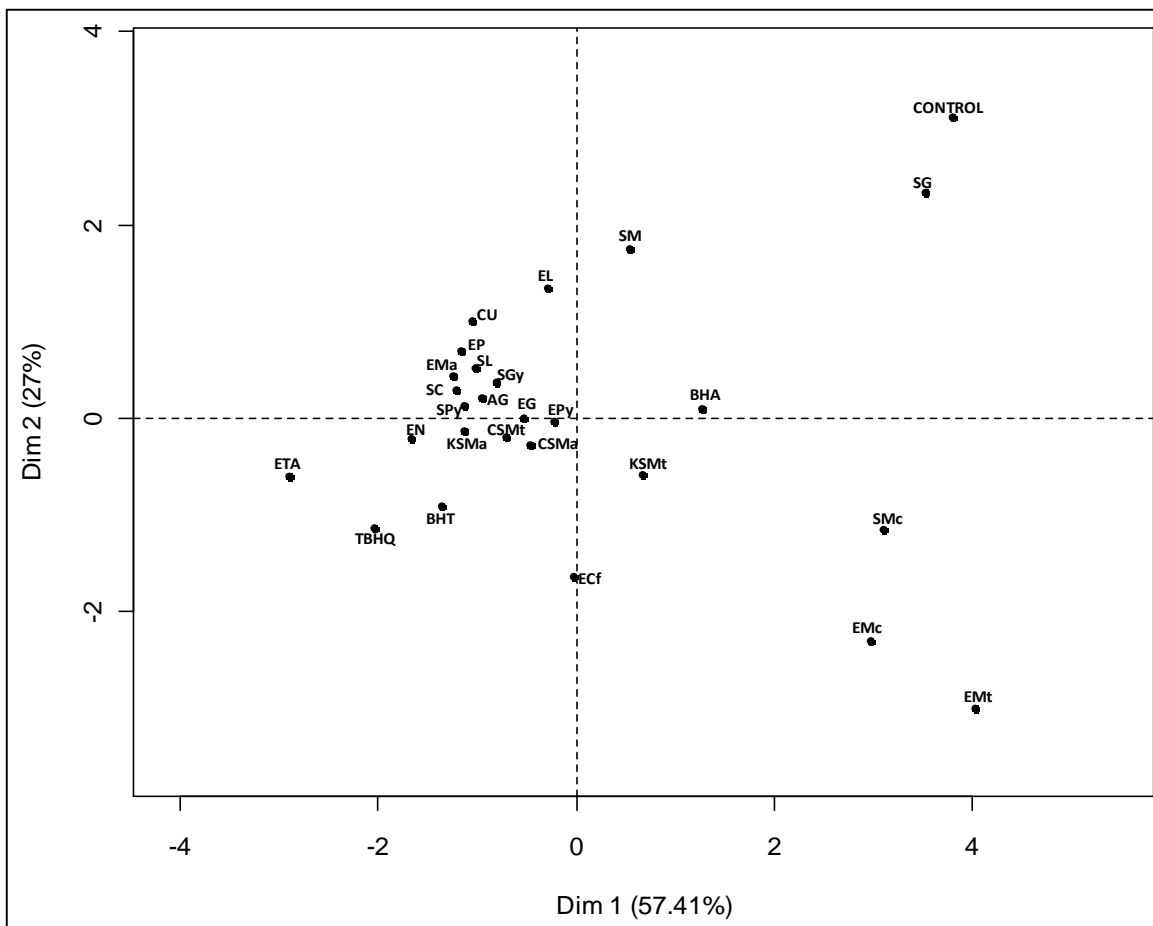
**Tabla 21. Loadings, valores propios, porcentaje de varianza y varianza acumulada para los dos primeros componentes principales del ACP.**

Día de Oxidación	Variable	CP1	CP2
3	HPL	0.5081	0.7743
	TBARS	0.8539	-0.3972
6	HPL	0.5240	0.7271
	TBARS	0.8341	-0.5288
9	HPL	0.6021	0.7231
	TBARS	0.9350	-0.2601
-	Valores propios	3.444	1.6200
	% de varianza	57.4071	27.0013
	% de varianza acumulada	57.4072	84.4085

La figura 56 corresponde al gráfico de scores obtenido en el ACP, en éste se observa que ETA y EMt se encuentran en lados opuestos del CP1 (Dim 1) indicando una gran diferencia en la AA de sus extractos. Dicha diferencia está asociada al contenido de TBARS presente en las muestras de CRC tratadas con estos extractos; el extracto de ETA minimizó considerablemente la formación de estas sustancias, mientras que el extracto de EMt estimuló su formación, presentando efecto prooxidante. Por su parte, el TBHQ mostró la menor separación de ETA en el CP1, indicando una concentración similar de TBARS en las muestras adicionadas con TBHQ y ETA. En relación al CP2 (Dim 2), se evidencia una gran separación entre el CONTROL y EMt, la cual es debida a diferencias en la concentración de HPL presentes en las respectivas muestras. Las muestras adicionadas con dicho extracto presentaron bajas concentraciones de HPL en comparación a lo observado en el CONTROL.

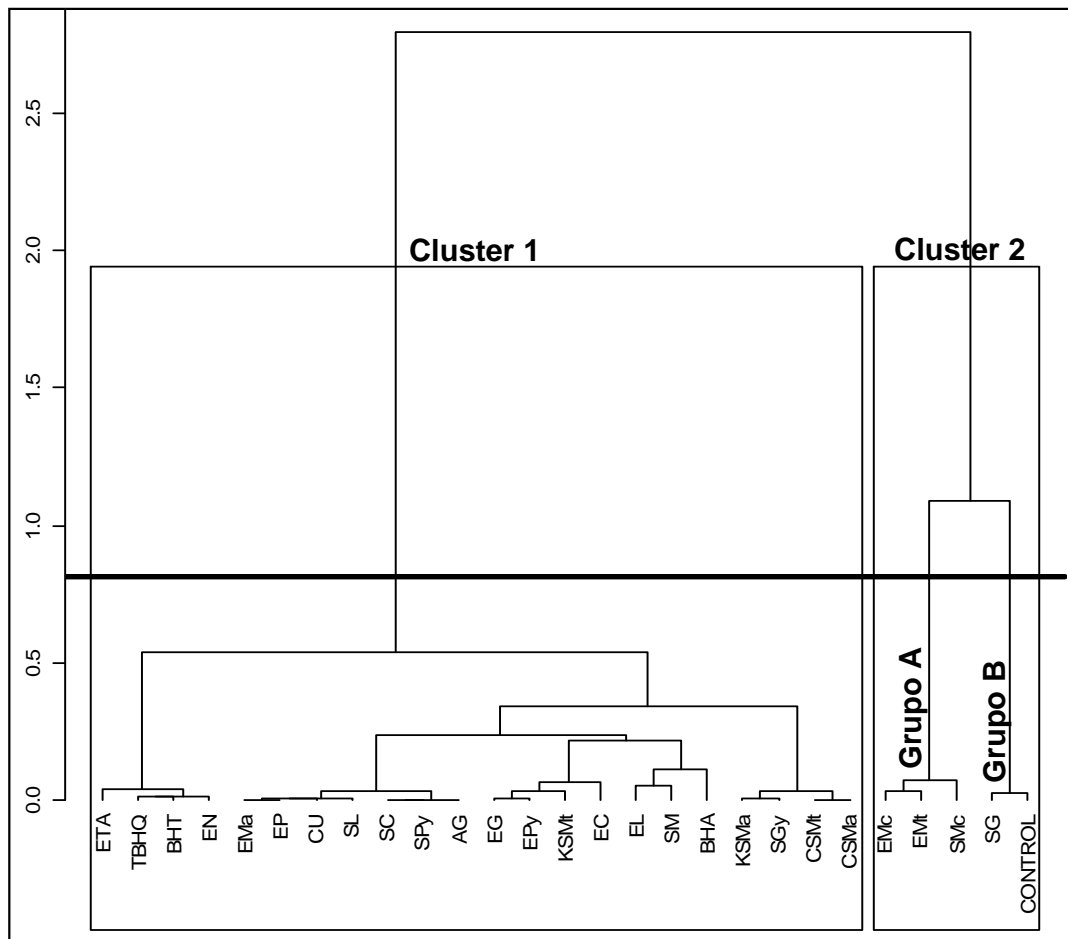
En el gráfico de scores se observa que la AA incrementa al desplazarse de derecha a izquierda por CP1 y de arriba abajo por CP2. Teniendo en cuenta esto, aquellos puntos ubicados en valores negativos para CP1 y CP2 corresponden a los extractos y

antioxidantes con la mayor AA, mientras que aquellos en valores positivos presentan baja o ninguna AA.



**Figura 56. Gráfico de Scores para el ACP para la actividad antioxidante en la CRC.**

Tomando como punto de partida los resultados obtenidos en ACP se realizó un AC, con el fin de agrupar los extractos y antioxidantes en función de la AA e identificar aquellos con la mayor eficiencia para atenuar la oxidación lipídica en CRC, ver figura 57. Se evidencia la formación de dos clusters, cada uno de los cuales presentan dos grupos. En el cluster 1 se encuentran los extractos y antioxidantes con alta AA y media a baja AA. Por su parte en el cluster 2 se encuentran los extractos con efecto prooxidante (grupo A), sin AA y la muestra CONTROL (grupo B). Es de resaltar que dicho efecto prooxidante está asociado a la producción de TBARS en las muestras adicionadas con dichos extractos, la cual fue mayor a la observada en la muestra CONTROL.

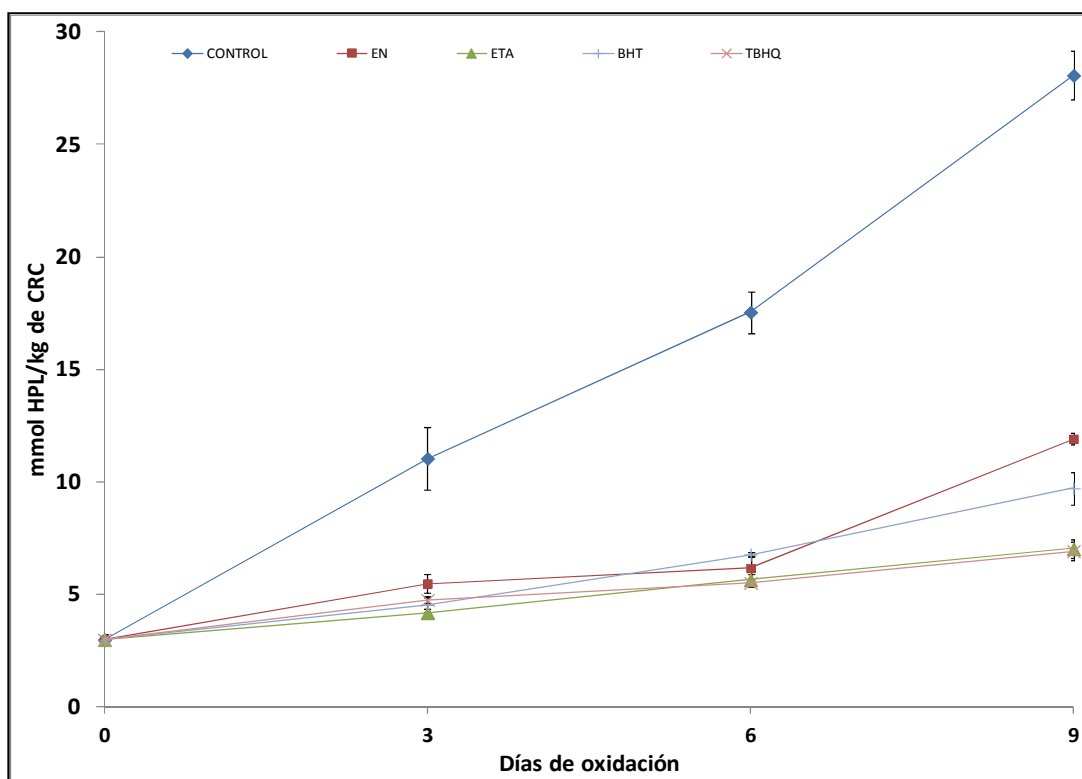


**Figura 57. Dendrograma del análisis de clusters para la actividad antioxidante en la CRC.**

Por medio del ACP y el AC fue posible identificar a ETA y EN como los residuos con el mayor potencial como fuente de compuestos con AA en CRC. Sin embargo, esta información debe ser contrastada y analizada frente a los datos experimentales, a continuación se hace una descripción de los resultados obtenidos en la evaluación de la AA de los extractos y antioxidantes clasificados en el grupo A, ver figuras 58 y 59. El extracto de EN presentó una buena capacidad para retardar la formación de TBARS, la concentración de estas sustancias presentes en la muestra adicionada con dicho extracto osciló entre 0.03 y 0.38 mg MDA/kg, para los días 0 y 9 respectivamente. Por su parte, la concentración de HPL aumento de 2.98 a 11.91 mmol/kg en el mismo intervalo de tiempo, esta concentración fue mayor a la observada en las muestras adiconas con el extracto de ETA y los antioxidantes TBHQ y BHT, lo que se ve reflejado en el alejamiento de EN

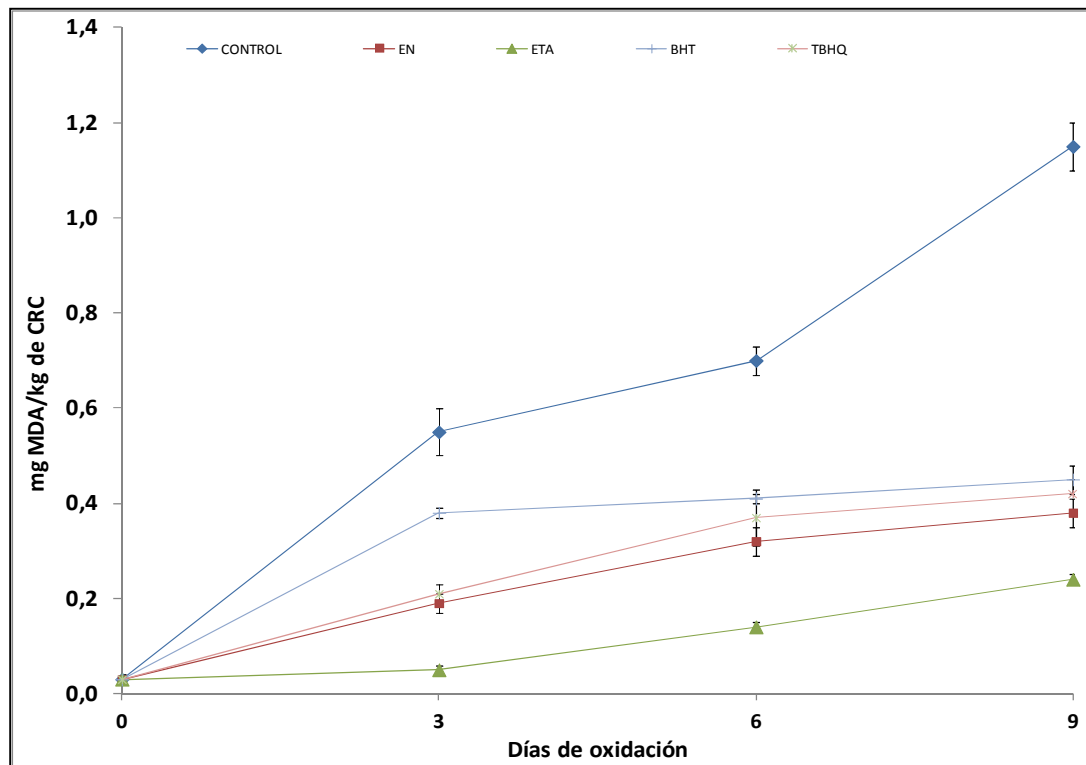


respecto a ETA, TBHQ y BHT en el gráfico de scores. Estos resultados sugieren que EN es una fuente promisoría de antioxidantes con capacidad para atenuar la oxidación lipídica en CRC, lo que permite considerarlo como una opción en la búsqueda de compuestos destinados a la conservación de alimentos.



**Figura 58. Concentración de hidroperóxidos en la CRC adicionada con los extractos con mayor actividad antioxidante.**

El extracto de ETA presentó la mayor AA en comparación con los extractos y antioxidantes evaluados, éste presentó una eficiencia similar y superior al TBHQ para atenuar la formación de HPL y TBARS en CRC, respectivamente (figuras 58 y 59). Esto muestra que el extracto de ETA posee una alta eficiencia para atenuar la formación de productos secundarios y finales de oxidación lipídica en CRC, incluso mayor a la observada para los antioxidantes sintéticos BHT y TBHQ, lo que confirma al ETA como el residuo más promisorio en la obtención de antioxidantes, siendo el mejor candidato para llevar a cabo la siguiente etapa del trabajo.



**Figura 59. Concentración de TBARS en la CRC adicionada con los extractos con mayor actividad antioxidante.**

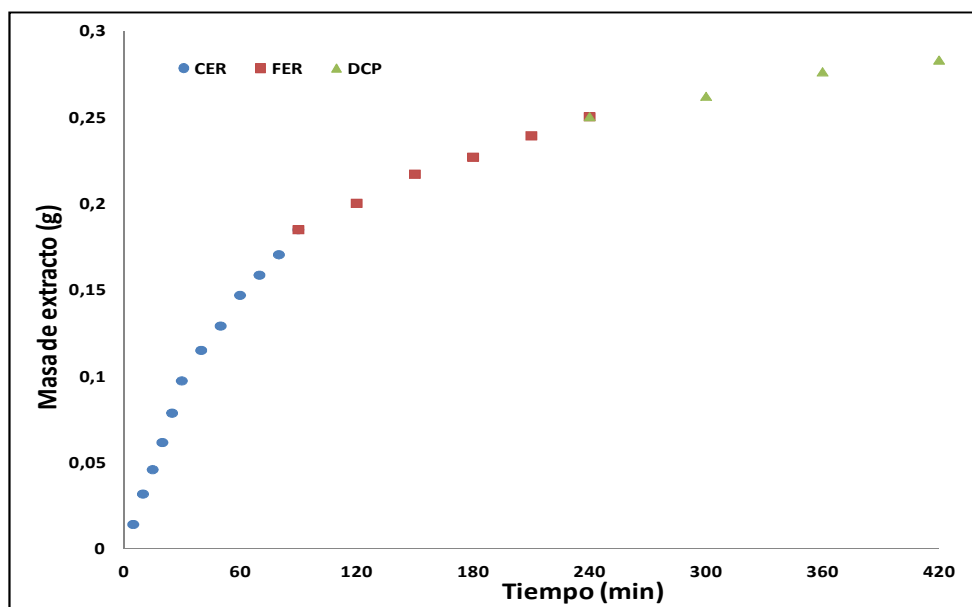
La capacidad para retardar la oxidación lipídica de extractos obtenidos a partir de ETA ha sido reportada previamente; fracciones obtenidas a partir de un extracto etanólico de dicho residuo redujeron la formación de TBARS en LDL en un 98% en comparación al CONTROL (0.072 respecto a 3.80 mg MDA/mg de LDL) (Kou et al., 2009). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto al potencial de ETA como fuente de extractos con alta AA.

### 3.2.2 Obtención de antioxidantes empleando extracción con fluidos supercríticos

El ETA fue sometido a EFS empleando CO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>/EtOH; diferentes temperaturas, presiones y porcentajes de cosolvente fueron empleadas y su efecto sobre el rendimiento y AA de los extractos fue evaluado. A continuación se presentan los resultados obtenidos, iniciando con la CE, seguido por los rendimientos y finalizando con la AA de los extractos (Castro-Vargas et al., 2013).

### ▪ *Curva de extracción*

En la figura 60<sup>5</sup> se presenta la CE obtenida, a 50 °C/20 MPa, en ésta se evidencia los intervalos de tiempo correspondientes a las tres etapas de la *EFS* a partir de ETA; la etapa CER se presentó entre los cero y 90 min de extracción, la etapa FER entre los 90 y 240 min y la etapa DCP entre los 240 y 420 min. Es de resaltar que fue posible obtener un rendimiento en la extracción de 1.88%, éste fue mayor al observado en la extracción Soxhlet el cual alcanzó 0.88%.



**Figura 60. Curva de la *EFS* con CO<sub>2</sub> a partir de ETA.**

Por otra parte, durante la etapa CER se extrajo el 65% del extracto total obtenido (0.18 g) a una velocidad aproximada de 0.002 g/min. Mientras que en las etapas FER y DCP se obtuvieron el 23 y 11% del extracto total (0.06 y 0.03 g, respectivamente). La mayor velocidad y rendimiento observados en la etapa CER están asociados al predominio de procesos convectivos, los cuales se ven favorecidos por la disposición de los solutos sobre las partículas de la muestra. Por su parte, en las etapas FER y DCP la resistencia a la transferencia de masa se hace más evidente y por tanto la tasa de extracción disminuye notablemente. A partir de los resultados obtenidos en la CE se eligió 210 min como tiempo de extracción para todos los ensayos de *EFS* realizados a partir de ETA.

<sup>5</sup> Los datos de la figura 43 son presentados en el ANEXO E.

▪ **Rendimientos de extracción**

Los rendimientos de extracción obtenidos en la EFS de ETA (con CO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>/EtOH) son presentados en la tabla 22, junto con las densidades del CO<sub>2</sub> SC a las condiciones empleadas. En las extracciones con CO<sub>2</sub> los mejores rendimientos fueron obtenidos al emplear densidades altas del solvente; el mayor rendimiento fue obtenido a 50 °C/30 MPa (0.83%), seguido de los obtenidos a 40 °C/30 MPa, 50 °C/20MPa y 40 °C/20MPa (0.71, 0.70 y 0.68%, respectivamente). El ANOVA indica que no existen diferencias significativas entre los tres últimos tratamientos.

**Tabla 22. Rendimientos obtenidos en la EFS de ETA.**

Condiciones de extracción	Solvente	ρCO <sub>2</sub> (g/mL) <sup>a</sup>	Rendimiento (% p/p) <sup>b</sup>
40°C/10 MPa	CO <sub>2</sub>	0.6290	0.56 ± 0.02
40°C/20 MPa	CO <sub>2</sub>	0.8413	0.68 ± 0.02
40°C/30 MPa	CO <sub>2</sub>	0.9104	0.71 ± 0.05
50°C/10 MPa	CO <sub>2</sub>	0.3860	0.32 ± 0.02
50°C/20 MPa	CO <sub>2</sub>	0.7857	0.70 ± 0.01
50°C/30 MPa	CO <sub>2</sub>	0.8713	0.83 ± 0.01
50°C/30 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (2%)	0.8713	0.87 ± 0.09
50°C/30 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (5%)	0.8713	1.87 ± 0.09
50°C/30 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (8%)	0.8713	1.62 ± 0.06
Soxhlet	MeOH		0.88 ± 0.14

<sup>a</sup> Densidad del CO<sub>2</sub> calculada con la ecuación de Angus.

<sup>b</sup> Media ± desviación estándar.

Los efectos de las variables de extracción sobre la EFS de ETA son presentados en la figura 61 por medio de las isotermas de rendimiento. El incremento en la presión de extracción, a temperatura constante, resultó en un aumento del rendimiento, debido al incremento en la densidad del CO<sub>2</sub>. Dicho aumento fue más notable a 50 °C donde la variación en la presión de 10 a 30 MPa aumentó 2.5 veces el rendimiento, mientras que a 40 °C éste fue 1.2 veces. En relación al efecto de la temperatura se observó que a 10 MPa el incremento en la temperatura generó una disminución en el rendimiento, el cual está asociado a la reducción en la densidad del CO<sub>2</sub>. Por su parte a 20 MPa el incremento en la temperatura no ejerció ningún efecto sobre el rendimiento, al respecto el ANOVA indica que no existen diferencias significativas en los rendimientos obtenidos a 40 °C/20

MPa y 50 °C/20 MPa. Mientras que a 30 MPa el incremento en la temperatura condujo a un aumento en el rendimiento de extracción. Este efecto es causado por el aumento en la presión de vapor de los solutos, favorecido por el incremento de la temperatura. Esto generó un entrecruzamiento en las isotermas de rendimiento alrededor de 20 MPa. Teniendo en cuenta este resultado, se puede decir que en la *EFS* de ETA a presiones inferiores a 20 MPa el efecto de la densidad es dominante, mientras que a presiones superiores la presión de vapor del soluto es más importante. Un comportamiento similar ha sido evidenciado en la *EFS* a partir del epicarpio de otras frutas como banano (*Musa* spp.) (Rosso et al., 2010) y naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Benelli et al., 2010). Con el fin de corroborar el efecto de la presión y temperatura sobre el rendimiento se realizó un ANOVA de dos vías, el cual mostró que la presión ( $p \ll 0.0001$ ), temperatura ( $p \ll 0.0001$ ) e interacción presión-temperatura ( $p \ll 0.0001$ ) poseen un efecto altamente significativo sobre el rendimiento en la *EFS* de ETA.

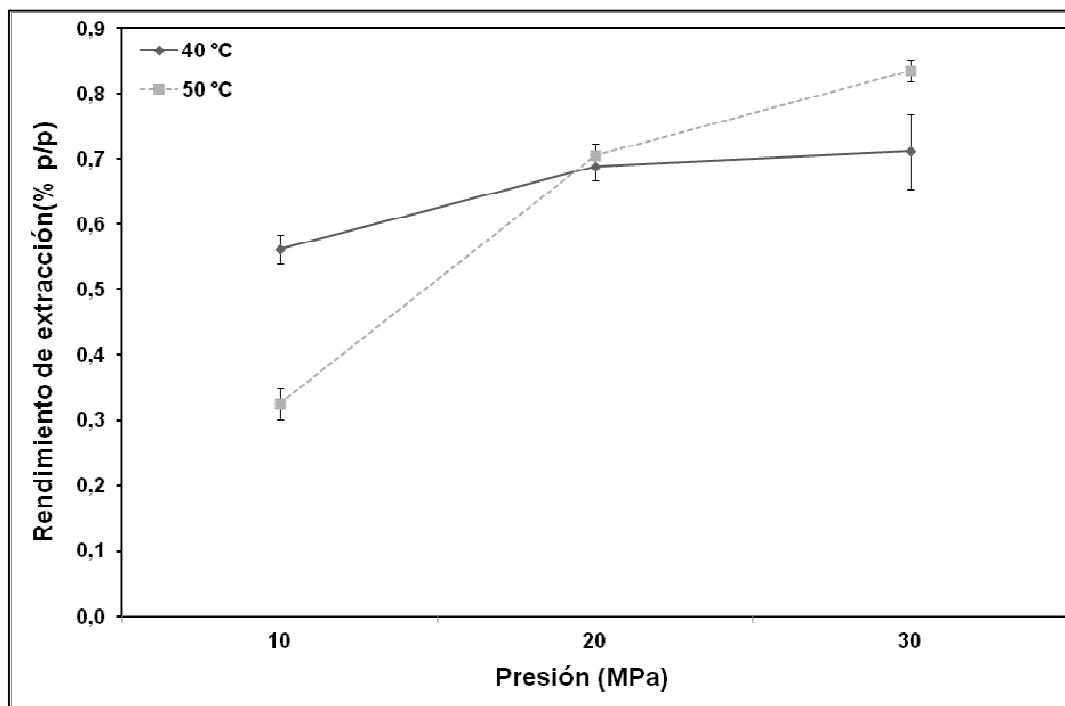


Figura 61. Isotermas de rendimiento (40 y 50 °C) de la *EFS* de ETA.

Por otra parte, 50 °C/30 MPa fueron las condiciones de extracción empleadas para llevar a cabo la *EFS* de ETA empleando CO<sub>2</sub>/EtOH. Los rendimientos obtenidos son presentados en tabla 20, en ésta se observa que la adición de EtOH incrementó el rendimiento de extracción en comparación a las extracciones realizadas con CO<sub>2</sub>. La

adición de 2% de EtOH aumentó ligeramente el rendimiento, sin embargo, el ANOVA indica que no existen diferencias significativas entre este rendimiento y el obtenido con CO<sub>2</sub>. Por su parte, la adición de 5% de EtOH incrementó el rendimiento 2.2 veces, mientras que la adición de 8% de cosolvente aumento el rendimiento 1.95 veces. Estos incrementos están asociados al aumento en la extracción de solutos medianamente polares por la adición de EtOH como cosolvente.

Una vez obtenidos los extractos de ETA empleando EFS, éstos fueron adicionados a CRC con el fin de evaluar su eficiencia para retardar la oxidación lipídica en dicho alimento.

#### ▪ *Actividad antioxidante de los extractos obtenidos empleando EFS*

Los resultados obtenidos en la evaluación de la AA en CRC de los extractos de ETA y los antioxidantes TBHQ y BHT son presentados en la tabla 23. De los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> el correspondiente a 50 °C/30 MPa presentó la mayor eficiencia para retardar la oxidación lipídica en CRC. Éste disminuyó la formación de los HPL en un 91% comparado con el CONTROL (2.20 respecto a 25.82 mmol/kg), mientras que la producción de TBARS fue reducida en un 71% comparado con el CONTROL (0.37 respecto a 1.27 mg MDA/kg). Empleando dichas condiciones se procedió a realizar las extracciones con CO<sub>2</sub>/EtOH empleando diferentes porcentajes de EtOH.

La adición de 2% de EtOH mejoró notablemente la AA del extracto obtenido, el cual inhibió de forma significativa la formación de HPL, a tal punto de no observar diferencias (ND) en la concentración de éstos entre los días 0 y 9. La formación de TBARS también se vio considerablemente atenuada por dicho extracto, su producción se redujo en un 91% en comparación al CONTROL (0.11 respecto a 1.27 mg MDA/kg). El incremento en la AA observado en los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub>/EtOH puede ser explicado por el aumento en la extracción de solutos medianamente polares. Estos compuestos mejoran la AA de los extractos debido a razones como: (1) su alto potencial para neutralizar especies reactivas de oxígeno y radicales libres formados durante la autooxidación; (2) su mayor solubilidad en fase acuosa de la carne (Decker y Crum, 1993) y (3) su capacidad para

quelar iones como  $\text{Fe}^{+3/+2}$  y  $\text{Cu}^{+2/+}$  minimizando su participación en los procesos de formación-descomposición de HPL (Morrissey et al., 2003).

**Tabla 23. Actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de ETA empleando EFS.**

Extracto o antioxidante	Solvente	Productos de oxidación lipídica en CRC <sup>a</sup>	
		HPL <sup>b</sup> (mmol/kg)	TBARS <sup>b</sup> (mg MDA/kg)
CONTROL		25.82 ± 1.79	1.27 ± 0.02
40°C/10 MPa	CO <sub>2</sub>	1.76 ± 0.03	2.51 ± 0.17
40°C/20 MPa	CO <sub>2</sub>	10.53 ± 0.53	3.00 ± 0.10
40°C/30 MPa	CO <sub>2</sub>	4.02 ± 0.87	0.33 ± 0.10
50°C/10 MPa	CO <sub>2</sub>	0.98 ± 0.01	1.90 ± 0.10
50°C/20 MPa	CO <sub>2</sub>	9.28 ± 1.09	2.50 ± 0.14
50°C/30 MPa	CO <sub>2</sub>	2.20 ± 0.06	0.37 ± 0.12
50°C/30 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (2%)	ND <sup>c</sup>	0.11 ± 0.04
50°C/30 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (5%)	0.72 ± 0.05	0.31 ± 0.02
50°C/30 MPa	CO <sub>2</sub> /EtOH (8%)	3.24 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Soxhlet	MeOH	3.95 ± 0.24	0.20 ± 0.01
BHT		6.78 ± 0.50	0.40 ± 0.03
TBHQ		3.88 ± 0.23	0.46 ± 0.03

<sup>a</sup> Media ± desviación estándar.

<sup>b</sup> Este valor corresponde a la diferencia entre los días 0 y 9 de oxidación.

<sup>c</sup> No hay diferencias significativas entre los días 0 y 9 de oxidación.

En la figura 62 se comparan los resultados obtenidos en la evaluación de la AA de los extractos obtenidos a partir de ETA empleando CO<sub>2</sub> (a 50 °C/30 MPa) y CO<sub>2</sub>/EtOH (2% de cosolvente), frente a los observados para el extracto Soxhlet y los antioxidantes TBHQ y BHT. Es evidente que el extracto obtenido con 2% de cosolvente presentó la mayor eficiencia para atenuar la oxidación lipídica en CRC, por tal razón, éste fue seleccionado para llevar a cabo la identificación de algunos de los compuestos presentes en el mismo.

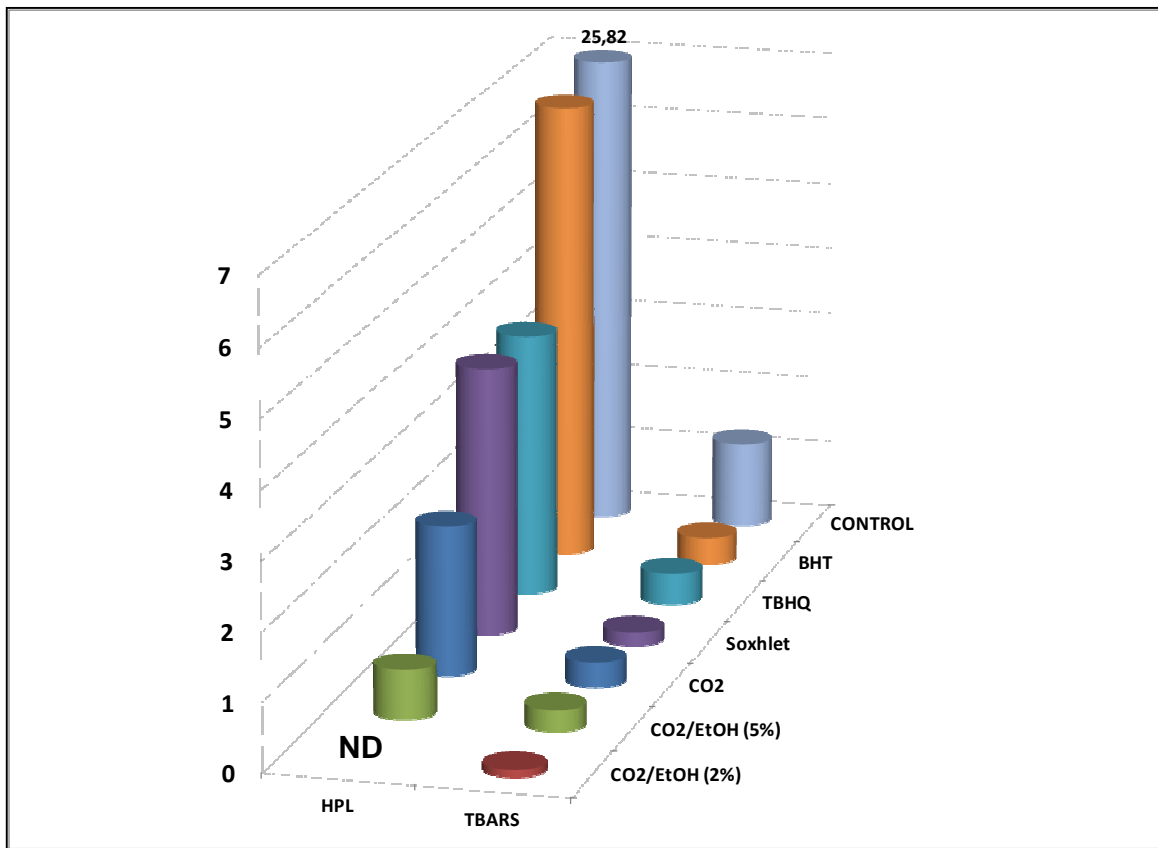


Figura 62. Actividad antioxidante de los extractos de ETA obtenidos por EFS y extracción Soxhlet.

### 3.2.3 Identificación de compuestos con actividad antioxidante en carne de res cocida

En esta última etapa el extracto obtenido con CO<sub>2</sub> adicionado con 2% de EtOH, el cual presentó la mayor AA en CRC, fue sometido a fraccionamiento y la AA de las fracciones fue evaluada. Finalmente, se seleccionó la fracción más activa, la cual fue sometida a análisis por CLAE-DAD, con el propósito de identificar algunos compuestos fenólicos.

- *Fraccionamiento y actividad antioxidante de las fracciones*

El extracto fue fraccionado empleando extracción en fase sólida y elución con mezclas de hexano:acetato de etilo. Se recolectaron cuatro fracciones las cuales fueron rotuladas como F1 a F4 en orden de incremento de polaridad. Los resultados obtenidos en el fraccionamiento y la AA de las fracciones son presentados en la tabla 24. La mayor parte



del extracto fue separada y recolectada en la fracción F1, el 69% del extracto fraccionado fue eluido empleando acetato de etilo:Hexano (1:9), mientras que las fracciones posteriores correspondieron al 12.5% para F2, 8.5% para F3 y 7% para F4, respecto al total de extracto fraccionado.

**Tabla 24. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir del extracto supercrítico de ETA.**

Extracto o fracción	Composicion de fase móvil (Acetato de etilo:hexano)	% en peso	Productos de oxidación lipídica en CRC <sup>a</sup>			
			HPL <sup>b</sup> (mmol/kg)		TBARS <sup>b</sup> (mg MDA/kg)	
CONTROL			26.24	± 1.13	1.34	± 0.03
F1	1:9	69.0	15.90	± 1.13	3.32	± 0.03
F2	3:7	12.5	9.72	± 0.74	2.19	± 0.03
F3	6:4	8.5	3.01	± 0.25	0.12	± 0.01
F4	8:2	7.0	ND <sup>c</sup>		0.02	± 0.00
Extracto SC			ND <sup>c</sup>		0.12	± 0.04
BHT			6.78	± 0.50	0.40	± 0.03
TBHQ			3.88	± 0.23	0.46	± 0.03

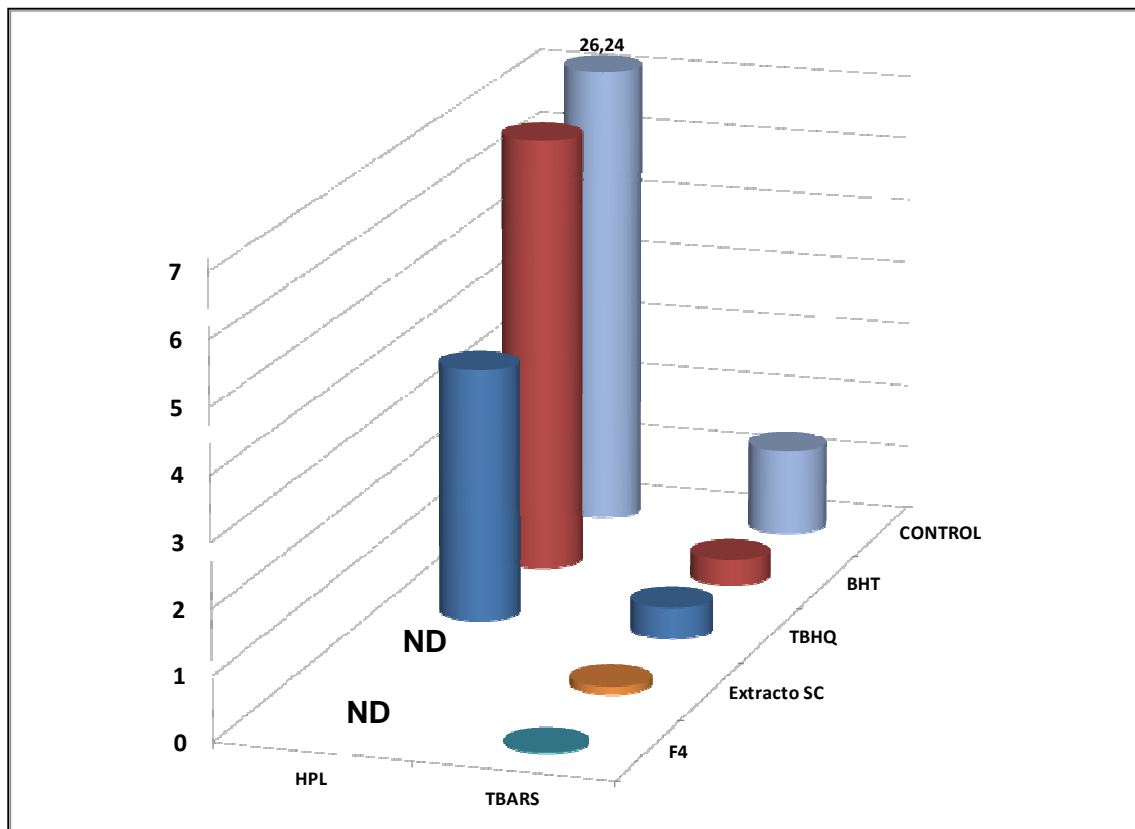
<sup>a</sup> Media ± desviación estándar (DE).

<sup>b</sup> Este valor corresponde a la diferencia entre los días 0 y 9 de oxidación.

<sup>c</sup> No hay diferencias significativas entre los días 0 y 9 de oxidación.

Por otra parte en la tabla 24 se observa que la mayor AA fue presentada por F4, ésta inhibió en un 100% la formación de HPL en CRC, a tal punto que no se observó diferencias significativas en su concentración entre los días 0 y 9 (ND). Un resultado similar fue observado para las TBARS, dicha fracción minimizó su formación en un 98.5% en comparación al CONTROL (0.02 respecto a 1.34 mg MDA/kg).

En la figura 63 se compara la AA de F4 frente a la observada para el extracto supercrítico y los antioxidantes TBHQ y BHT. La AA de F4 fue superior a la observada para los antioxidantes sintéticos y para el extracto supercrítico; lo que sugiere que F4 podría ser empleada en productos cárnicos en reemplazo de los antioxidantes sintéticos probados, obteniendo una alta protección frente a la oxidación lipídica y reduciendo los riesgos asociados a la presencia de compuestos sintéticos. Sin embargo, debido al bajo rendimiento alcanzado para F4, y dado que el extracto supercrítico fue más eficiente que los antioxidantes sintéticos, la opción más viable para dicho reemplazo sería el extracto supercrítico, el cual se obtiene con mayor rendimiento y no requiere de etapas posteriores de separación y purificación.



**Figura 63. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir de ETA.**

En la tabla 25 se presentan algunos datos de AA en carnes cocidas reportados en la literatura para extractos y compuestos de origen natural, los cuales puede ser comparados frente a los obtenidos para el extracto supercrítico de ETA y la F4. Sin embargo, es importante tener en cuenta que dicha comparación no es totalmente directa debido a aspectos como: (1) diferentes tiempos de almacenamiento, (2) diferentes concentraciones de extracto empleado y (3) las diferencia entre las matrices sometidas a oxidación (CRC y carne de cerdo cocida). Es de resaltar que los productos citados en la tabla 25 poseen particular importancia en muchas culturas, incluyendo la occidental, debido a que son parte importante de su alimentación o porque poseen diferentes propiedades medicinales. A modo de ejemplo se podrían citar las catequinas de té, las cuales están asociadas con las propiedades antioxidantes y medicinales ofrecidas por sus bebidas (Tang et al., 2001). Otro ejemplo son los aceites esenciales de orégano y salvia ampliamente usados como antioxidantes exógenos y endógenos (Tanabe et al., 2002). Comparativamente se observa que F4 y el extracto supercrítico poseen una mayor AA en

comparación a la reportada para los extractos de brócoli, grosellero negro, hierva de San Juan, kimchi, semillas de canola, flor de Jamaica, algarrobo, oliva, uva roja y aceite esencial de orégano y salvia. Adicional a esto F4 mostró también una AA mayor a la reportada para una mezcla de catequinas de té, los cuales son ampliamente conocidas por su AA en diferentes matrices lipídicas.

Por otra parte, Tarladis y colaboradores (1960) han reportado que el umbral para la detección, por panelistas entrenados, del sabor oxidado en CRC está asociado a una concentración de TBARS mayor 0.5 mg MDA/kg. Usando este umbral como indicador, se puede afirmar que F4 y los extractos obtenidos a partir de ETA (Soxhlet y *EFS* con CO<sub>2</sub> a 30 MPa y CO<sub>2</sub>/EtOH) controlaron el desarrollo del sabor oxidado en CRC durante su almacenamiento a 4 °C por 9 días.

Los resultados obtenidos permitieron identificar a la fracción F4 como la de mayor eficiencia para retardar la oxidación lipídica en CRC. Teniendo en cuenta esto, F4 fue seleccionada para llevar a cabo la identificación de algunos compuestos fenólicos relacionados con la AA observada.

**Tabla 25. Actividad antioxidante en carnes cocidas reportadas en la literatura para algunos extractos y compuestos de origen natural.**

Extracto, fracción o compuesto	Concentración (ppm)	Matriz sometida a oxidación	Condiciones de oxidación	Productos de oxidación		Referencia
				HPL <sup>a</sup>	TBARS <sup>a</sup>	
Extracto etanólico de brócoli ( <i>Brassica oleracea</i> L.)	5	Carne de res cocida	4 °C por 12 días	-	≈ 19	Kim et al., 2013
Extracto etanólico de grosellero Negro ( <i>Ribes nigrum</i> L.)	20000	Carne de cerdo cocida	4 °C por 9 días	-	≈ 80	Jia et al., 2012
Hierba de San Juan ( <i>Hypericum perforatum</i> )	10	Carne de cerdo cocida	4 °C por 5 días	-	42.2 ± 5	Sánchez-Muniz et al., 2012
			4 °C por 12 días	-	56.6 ± 7	
Extracto etanólico de kimchi <sup>b</sup>	10	Carne de cerdo cocida	4 °C por 10 días	-10 ± 4 <sup>c</sup>	34 ± 5	Lee et al., 2011
Extracto obtenidos con acetona a partir de semillas de canola ( <i>Brassica napus</i> )	100	Carne de res cocida	4 °C por 6 días	-	≈ 80	Brettonnet et al., 2010
		Carne de cerdo cocida		-	≈ 40	
Extracto acuoso de semillas de flor de Jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	7500	Carne de res cocida	4 °C por 7 días	-	≈ 62	Mohd-Esa et al., 2010
Extracto acuoso de algarrobo ( <i>Ceratonia siliqua</i> ) <sup>d</sup>	30000	Carne de cerdo cocida	3 °C por 10 días	-	90 ± 14	Bastida et al., 2009
Extracto acuosos de oliva ( <i>Olea europea</i> L.)	100	Carne de res cocida	4 °C por 6 días	-	≈ 80	De Jong y Lanari 2009
Extracto acuoso de uva roja ( <i>Vitis vinifera</i> )				-	≈ 73	
Aceite esencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	30	Carne de res cocida	4 °C por 8 días	-	≈ 66	Fasseas et al., 2007
Aceite esencial de salvia ( <i>Salvia officinalis</i> )				-	≈ 46.4	
Catequinas de té ( <i>Camellia sinensis</i> L.) <sup>e</sup>	300	Carne de res cocida	4 °C por 10 días	-	94.3 ± 1.2	Tang et al., 2001
Extracto supercrítico ETA <sup>f</sup>	300	Carne de res cocida	4 °C por 9 días	≈ 100	91 ± 13	El presente trabajo
Fracción F4				≈ 100	98.5 ± 1	

<sup>a</sup> Datos reportados como porcentaje de inhibición ( $\%_{inh} = [1 - \{valor_{extracto/compuesto} / valor_{CONTROL}\}] \times 100$ ).

<sup>b</sup> Kimchi es un plato típico coreano preparado con diferentes vegetales fermentables con alto contenido de ácidos orgánicos.

<sup>c</sup> Efecto prooxidante.

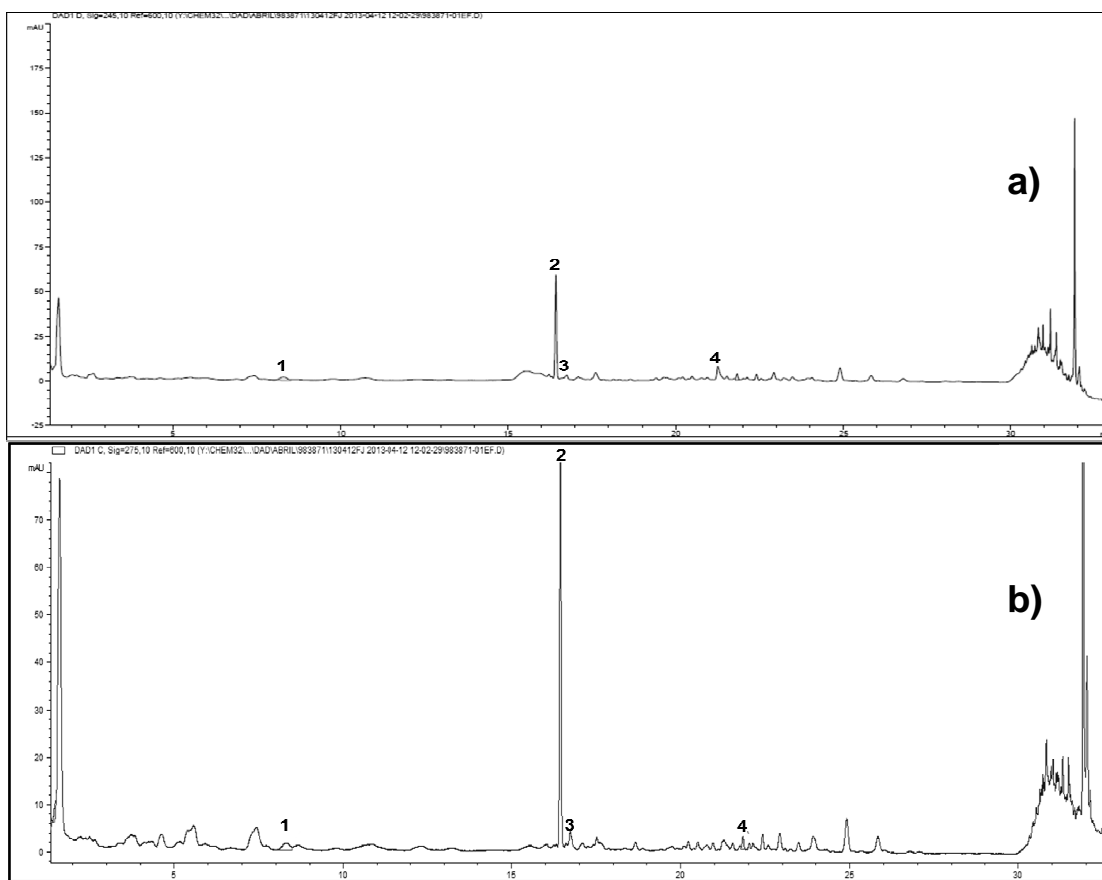
<sup>d</sup> Extracto comercial de algarrobo Liposterine<sup>®</sup>.

<sup>e</sup> Mezcla de catequinas: epigalocatequina, galato de epigalocatequina, galato de epicatequina y epicatequina (24, 40, 12 y 10%, respectivamente).

<sup>f</sup> Obtenido con CO<sub>2</sub>/EtOH (2% de cosolvente) a 50 °C/30 MPa.

▪ **Identificación de compuestos presentes en F4**

La fracción F4 fue sometida a análisis por CLAE-DAD con el fin de identificar algunos compuestos fenólicos presentes en la misma, ver figura 64. La comparación de los tiempos de retención y espectros UV-Vis de los compuestos separados a partir de F4 contra la disolución de patrones de compuestos fenólicos (ANEXOS C, y F), permitió identificar cuatro compuestos presentes en F4, a saber; epigallocatequina (EGC, pico 1), epicatequina (EC, pico 2), galato de epigallocatequina (GEGC, pico 3) y ácido rosmarínico (AR, pico 4).



**Figura 64. Cromatogramas obtenidos en el análisis por CLAE-DAD de F4.**

**(a) 245 y (b) 275 nm.**

Actualmente no existen reportes en la literatura relacionados con la AA de EGC, EC y GEGC en CRC o matrices similares (carnes cocidas). Sin embargo, la AA de dichos compuestos ha sido evaluada en matrices menos complejas como emulsiones agua/aceite. Huang y Frankel (1997) reportaron una alta eficiencia del GEGC para atenuar la formación de HPL y TBARS en

emulsiones agua/aceite de linaza, cuya formación fue reducida entre 75 y 100% en comparación al CONTROL. Por otra parte, la AA de EC fue evaluada en emulsiones agua/aceite de girasol sometidas a oxidación a 50 °C por 22 días, dicho compuesto ( $\approx 140$  ppm) redujo la formación de HPL en un 66% durante los primeros 11 días de oxidación, sin embargo, su eficiencia disminuyó a 33% hacia el día 22 (Almajano et al., 2007). Estos resultados muestran que el GEGC y la EC son compuestos con una notable habilidad para retardar la oxidación lipídica en emulsiones agua/aceite, es probable que éstos exhiban una capacidad similar en matrices como CRC, lo que permite inferir sobre su aporte a la AA observada en F4.

La AA en CRC del AR ha sido previamente reportada en la literatura, Allen y Cornforth (2010) observaron que la adición de 500 ppm de AR, en forma de rosmarinato, a muestras de CRC inhibía totalmente la formación de TBARS durante su almacenamiento a 4 °C por 14 días. Este resultado muestra que el AR posee una alta eficiencia para retardar la oxidación lipídica en CRC, lo que concuerda con lo observado en emulsiones agua/ácido linoleico en las cuales el AR retardó la formación de HPL en más de un 80% (Fadel et al., 2011). Teniendo en cuenta esto, se puede considerar que el AR aporta de forma significativa a la AA observada para F4 y el extracto de ETA.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo muestran que el epicarpio de tomate de árbol es un residuo altamente promisorio para la obtención de antioxidantes con gran eficiencia para retardar la oxidación lipídica en matrices como CRC. Dicho residuo proporcionó extractos y fracciones con alta capacidad para reducir la oxidación lipídica en CRC. Teniendo en cuenta esto, el ETA se presenta como una fuente de antioxidantes con potencial aplicación en la conservación de productos cárnicos similares. Esta alternativa de aprovechamiento para el ETA podría beneficiar la cadena productiva del tomate de árbol al proporcionarle un valor agregado para el fruto, generado por la comercialización de los extractos o fracciones de ETA como un subproducto. Adicional a esto, las exportaciones del fruto podrían mejorarse, al conocerse sus propiedades como fuente de antioxidantes. Las industrias procesadoras de tomate de árbol también podrían verse beneficiadas al comercializar el residuo, obteniendo así un ingreso adicional y resolviendo el problema de disposición del mismo. Por su parte, la industria procesadora de carne dispondría de un aditivo alternativo para conservar sus productos, el cual reemplazaría los actualmente en uso e incrementaría la vida útil de sus productos. En el caso particular de los productos cárnicos se tendrían una alternativa para su conservación

---

empleando antioxidantes de origen natural, los cuales aumentarían la vida útil de los productos y le proporcionarían un carácter funcional.

El presente trabajo es un aporte en la búsqueda de alternativas de aprovechamiento para nuestros recursos naturales, particularmente sus residuos, como también al conocimiento de los mismos. De tal forma, por medio de este trabajo fue posible identificar el potencial de algunos residuos frutícolas como fuente de antioxidantes con alta eficiencia para retardar la oxidación lipídica en alimentos. Por otra parte, nuevas tecnologías de extracción fueron implementadas en la obtención de extractos con AA en AP y CRC. Así mismo, se identificaron algunos compuestos presentes en los residuos frutícolas más promisorios, como fueron SPy para proteger AP y ETA para actuar sobre CRC. En términos generales este trabajo es un aporte desde la química hacia otras áreas del conocimiento, el cual podría representar a futuro nuevas oportunidades para la biodiversidad colombiana, no solo en el área de los alimentos, sino también en áreas como la medicina, farmacia y la cosmética.





## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

Se logró obtener extractos con actividad antioxidante a partir de residuos frutícolas empleando extracción con fluidos supercríticos y extracción Soxhlet a presión reducida. Algunos de dichos extractos retardaron de forma eficiente el desarrollo de la oxidación lipídica en alimentos como aceite de palma comestible y carne de res cocida.

Fue posible comparar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de diferentes residuos frutícolas, identificando los más promisorios como fuente de antioxidantes con capacidad para retardar la oxidación lipídica en aceite de palma comestible y carne de res cocida por medio del uso de análisis de componentes principales y análisis de clusters. Al respecto, las semillas de papaya y el epicarpio de tomate de árbol proporcionaron los extractos y fracciones con mayor actividad antioxidante en aceite de palma y carne de res cocida, respectivamente.

Al someter las semillas de papaya a extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (50 °C/20 MPa) y CO<sub>2</sub> con etanol (50 °C/20 MPa y 5% de etanol) se lograron rendimientos mayores que mediante extracción Soxhlet (20.52%, 23.75% y 7.82%, respectivamente). Sin embargo, la actividad antioxidante de los extractos supercríticos fue inferior a la observada para el extracto Soxhlet; este último fue más eficiente controlando la formación de hexanal y nonanal en aceite de palma.

Se identificaron algunos compuestos presentes en el extracto Soxhlet de semillas de papaya, los cuales están asociados a la actividad antioxidante observada para el mismo. Estos compuestos fueron el bencilglucosinolato y los compuestos fenólicos ácido gálico, galato de epigallocatequina y ácido rosmarínico. Es de resaltar que la actividad antioxidante del bencilglucosinolato no ha sido previamente reportada, mientras que los

compuestos fenólicos identificados son ampliamente reconocidos por su capacidad para inhibir la oxidación lipídica en alimentos.

A partir del epicarpio de tomate de árbol, empleando como agentes extractantes CO<sub>2</sub> supercrítico (50 °C/30 MPa) y CO<sub>2</sub> con etanol (50 °C/30 MPa y 5% de etanol) se lograron rendimientos mayores que mediante extracción Soxhlet (0.83%, 1.87% y 0.88%, respectivamente). Sin embargo, la mejor actividad antioxidante la presentó el extracto obtenido con CO<sub>2</sub>-etanol (50 °C/30 MPa y 2% de etanol), bajo dichas condiciones se logró un rendimiento en la extracción del 0.88%. Dicho extracto inhibió la formación de hidroperóxidos y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en carne de res cocida.

En el extracto con mejor actividad antioxidante, obtenido a partir del epicarpio de tomate de árbol, se identificaron las catequinas epigallocatequina, epicatequina y galato de epicatequina, así como el ácido rosmarínico, éstos aportan de forma significativa a la actividad antioxidante observada para dicho extracto.

## 4.2 Recomendaciones

Evaluar la actividad antioxidante, en aceite de palma comestible o carne de res cocida, de los compuestos identificados, con el fin de determinar su aporte a la actividad antioxidante observada.

Determinar la existencia de efectos sinérgicos o antagónicos en la actividad antioxidante de los extractos de semillas de papaya y epicarpio de tomate de árbol, como también entre las fracciones F1 y F4 de semillas de papaya y los compuestos identificados en las semillas de papaya y el epicarpio de tomate de árbol.

Aplicar los extractos y fracciones con mayor actividad antioxidante en otras matrices lipídicas y evaluar su eficiencia para retardar su oxidación.

Continuar con la identificación de los compuestos presentes en las fracciones con mayor actividad antioxidante en aceite de palma y carne de res cocida.

Determinar la toxicidad de los extractos y fracciones con mayor AA con el propósito de evaluar su inocuidad sobre los alimentos.

Realizar un análisis sensorial sobre el aceite de palma y la carne de res cocida adicionados con los extractos y fracciones más activos, de forma tal que se pueda establecer su efecto sobre las características organolépticas de estos alimentos.

Evaluar la estabilidad térmica y química de los extractos, fracciones y compuestos obtenidos y el efecto de éstas sobre la actividad antioxidante de los mismos.



## A. Anexo: Rendimientos obtenidos en la extracción Soxhlet de los residuos frutícolas estudiados.

RESIDUO	SIGLA	Rendimiento % <sub>op/p</sub>	DE
Semillas de guayaba	SGy	4.77	0.72
Semillas de mora	SM	1.20	0.06
Semillas de papaya	SPy	7.82	1.32
Semillas de lulo	SL	1.23	0.18
Semillas guanábana	SG	7.43	0.49
Semilla de maracuyá	SMc	6.25	1.54
Semillas de curuba	SC	7.91	0.84
Kernel semillas mango tommy	KSMt	3.28	1.91
Kernel semillas mango azúcar	KSMa	2.98	0.20
Epicarpio de naranja	EN	9.56	0.14
Calix de uchuva	CU	6.85	0.41
Epicarpio de guanábana	EG	6.96	0.11
Epicarpio de piña	EP	4.04	0.57
Epicarpio de lulo	EL	2.96	0.15
Epicarpio de papaya	EPy	24.38	2.29
Epicarpio de mango Tommy	EMt	23.65	0.75
Epicarpio mango azúcar	EMa	9.51	0.20
Epicarpio de maracuyá	EMc	2.65	0.05
Epicarpio de tomate árbol	ETA	0.88	0.14
Cubierta semillas mango Tommy	CSMt	9.21	0.16
Cubierta semillas mango azúcar	CSMa	27.41	1.33
Epicarpio de café	EC	6.67	0.76



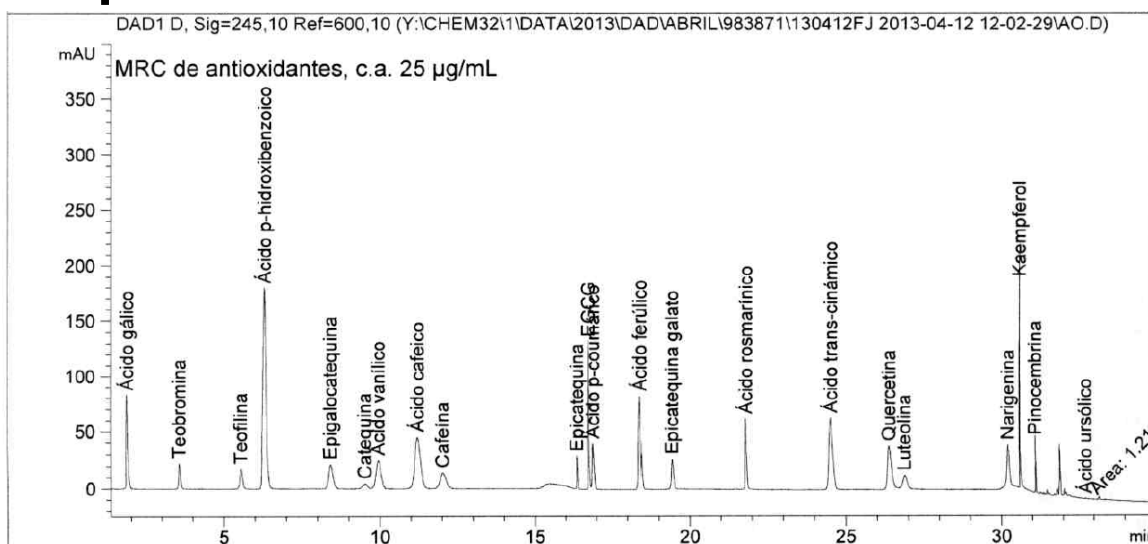
## B. Anexo: Datos obtenidos en curva de extracción de SPy

Tiempo (min)	Cantidad de extracto (g)	Sumatoria cantidad de extracto
5	0.022	0.022
10	0.143	0.165
15	0.316	0.481
20	0.195	0.676
25	0.181	0.857
30	0.139	0.996
40	0.291	1.287
50	0.377	1.664
60	0.336	2.000
70	0.367	2.366
80	0.197	2.563
90	0.111	2.674
120	0.239	2.913
150	0.093	3.005
180	0.056	3.061
210	0.069	3.130
240	0.020	3.151
300	0.023	3.174
360	0.017	3.191
420	0.134	3.325



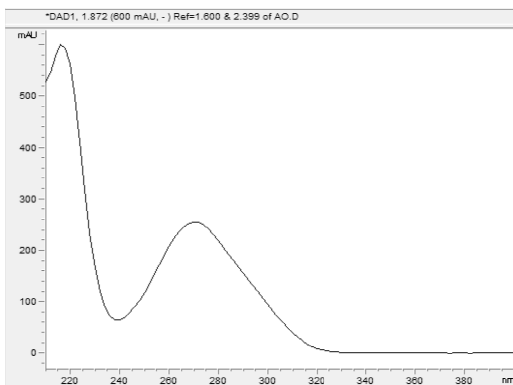


## C. Anexo: Cromatograma y tiempos de retención obtenidos en el análisis por CLAE-DAD de la disolución patrón de ácidos fenólicos

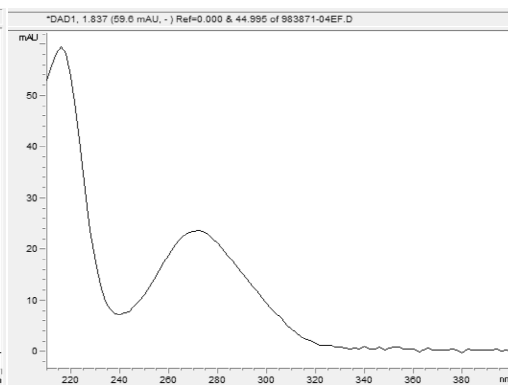


$t_{\text{retención}}$ (min)	Compuesto
1.87	ácido gálico
3.57	Teobromina
5.56	Teofilina
6.32	ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico
8.43	epigalocatequina
9.52	Catequina
9.96	ácido vanílico
11.22	ácido caféico
12.03	Cafeína
16.38	epicatequina
16.75	galato de epigalocatequina
16.90	ácido <i>p</i> -cumárico
18.41	ácido ferúlico
19.44	galato de epicatequina
21.82	ácido rosmarínico
24.54	ácido cinámico
26.40	quercetina
26.89	luteolina
30.23	naringenina
30.61	kaempferol
31.11	pinocembrina
33.17	ácido ursólico

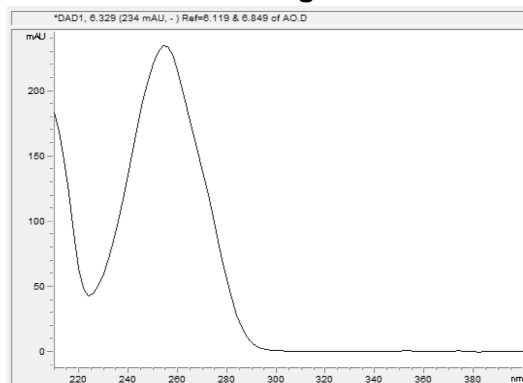
## D. Anexo: Comparación de los espectros UV-Vis de los patrones de compuestos fenólicos y los compuestos detectados en la F4 de SPy



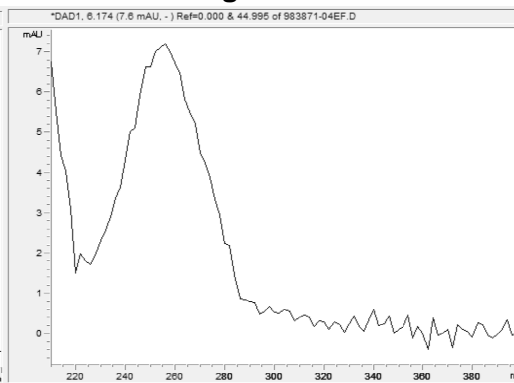
**Patrón ácido gálico**



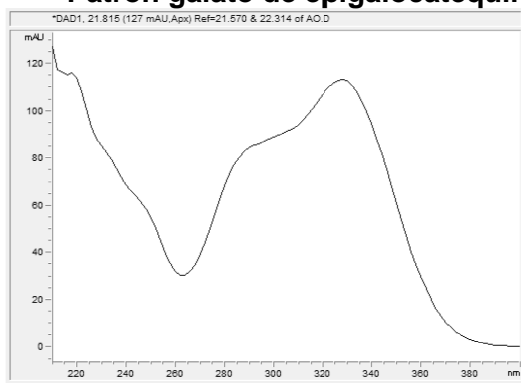
**Ácido gálico F4**



**Patrón galato de epigalocatequina**



**Galato de epigalocatequina F4**



**Patrón de ácido rosmarínico**



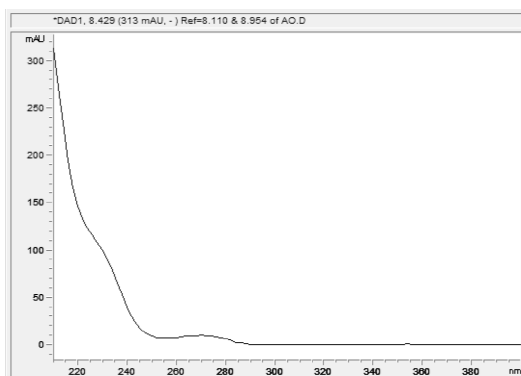
**Ácido rosmarínico F4**

## E. Anexo: Datos obtenidos en curva de extracción de ETA

Tiempo (min)	Cantidad de extracto (g)	Sumatoria cantidad de extracto
5	0.014	0.014
10	0.018	0.032
15	0.014	0.046
20	0.016	0.062
25	0.017	0.079
30	0.019	0.097
40	0.018	0.115
50	0.014	0.129
60	0.018	0.147
70	0.012	0.159
80	0.012	0.171
90	0.014	0.185
120	0.015	0.200
150	0.017	0.217
180	0.010	0.227
210	0.012	0.239
240	0.011	0.251
300	0.012	0.262
360	0.014	0.277
420	0.007	0.283



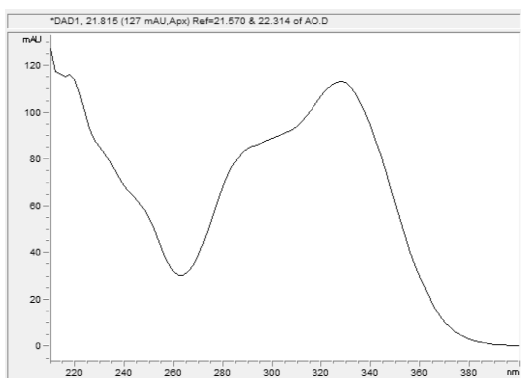
## F. Anexo: Comparación de los espectros UV-Vis de los patrones de compuestos fenólicos y los compuestos detectados en la F4 de ETA



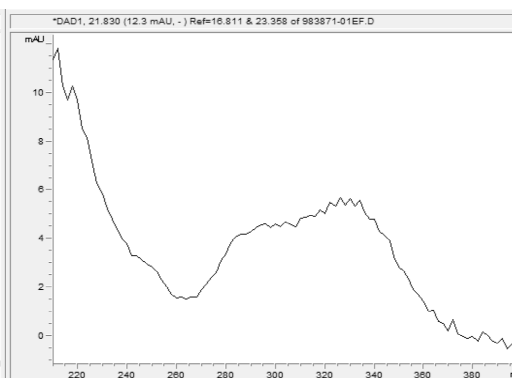
Patrón epigalocatequina



Epigalocatequina F4



Patrón de ácido rosmarínico



Ácido rosmarínico F4



## **G. Anexo: Productividad académica**

### **Artículos publicados:**

Castro-Vargas, H.I., Benelli, P., Ferreira, S.R.S., Parada-Alfonso, F. **Supercritical fluid extracts from tamarillo (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp and its application as protectors against lipid oxidation of cooked beef meat.** *Journal of Supercritical Fluids*, 2013, 76, 17-23.

### **Artículos sometidos:**

Castro-Vargas, H.I., Ferreira, S.R.S., Parada-Alfonso, F. **Supercritical fluid extraction from papaya (*Carica papaya* L.) seeds and antioxidant activity in edible palm oil.** *Journal of Supercritical Fluids*.

Castro-Vargas, H.I., Gutiérrez-Ulloa, C.E., Parada-Alfonso, F. **Antioxidant activity of fruits residues extracts in cooked beef meat during chilled storage.** *Meat Science*.

### **Artículos en preparación:**

Castro-Vargas, H.I., Parada-Alfonso, F. Antioxidant activity of tropical fruits seed extracts in edible oil. An alternative use for agro-industrial residues.

### **Participación en eventos académicos:**

***III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids PROSCIBA 2013. Cartagena de Indias – Colombia, 2013.***

Presentación Oral “Supercritical fluid extracts from tamarillo (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp and its application as protectors against lipid oxidation of cooked beef meat”. Autores: Henry I. Castro-Vargas, Patricia Benelli, Sandra Regina Salvador Ferreira, Fabián Parada.

Presentación Poster “Antibacterial activity of supercritical extracts from guava (*Psidium guajava* L.) seeds”. Autores: Liliana Hilarión, A. Lozano, Andrea Mojica, Eduardro López, Henry Castro, Fabián Parada.

***XXX Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2012, Cancún-México, 2012.***

Presentación poster. “Antioxidant activity of phenolic extracts from Colombian agroindustrial waste: 2. *Psidium guajava* L. seeds”. Autores: Henry Isaac Castro-Vargas, Fabián Parada-Alfonso, Luz Patricia Restrepo-Sánchez.

***ISSF 2012: 10th International Symposium on Supercritical Fluids. San Francisco CA-USA, 2012.***

Presentación poster “Antioxidant Activity from Guava Seeds (*P. guajava* L.) of White Fruits, Pink Fruits and Red Fruits from Colombia” Autores: Henry Isaac Castro-Vargas, Luz Patricia Restrepo-Sanchez, Fabián Parada-Alfonso.

***XI Congreso Colombiano de Fitoquímica, Medellín-Colombia, 2011.***

Presentación poster “Actividad antioxidante de extractos fenólicos de residuos de la agroindustria colombiana: 2. Epicarpio de papaya (*Carica papaya* L.)”. Autores: Angela M. González, Carlos E. Gutierrez, Patricia Restrepo, Henry I. Castro, Fabián Parada.

***43<sup>rd</sup> IUPAC World Chemistry Congress, San Juan-Puerto Rico, 2011.***

Presentación oral “Antioxidant activity extracts obtained from Colombian guava (*P. guajava* L.) seeds by supercritical fluids extraction-SFE”. Autores: Henry I. Castro-Vargas, Patricia Restrepo, Fabián Parada.



Presentación poster “Antioxidant activity of phenolic extracts from Colombian agroindustrial waste: 1. *Mangifera indica* epicarp.”. Autores: Angela González, Carlos Gutierrez, Henry Castro, Patricia Restrepo, Fabián Parada.

***XXIX Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2010, Cartagena de Indias-Colombia, 2010.***

Presentación poster “Semillas de guayaba ¿residuos ó subproducto?” Autores: Henry Isaac Castro V., Luz Patricia Restrepo S., Fabián Parada A.

### **Reconocimientos académicos**

Becario Programa Estudiantes Sobresalientes de Posgrado, Vicerectoría Académica, Universidad Nacional de Colombia.



## Bibliografía

Agrawal, P., Agarwal, G.P. (1982). **Alterations in the phenols of papaya fruits infected by *Colletotrichum spp.*** *Proceeding of the Indian National Science Academy Part B*, 48, 422-426.

Ahmad, U., Sirat, H., Sanagi, M., Smith, R. (1994). **Supercritical fluid extraction and capillary gas chromatography of the rhizomes of *Z. zerumbet*.** *Journal of Microcolumn Separations*, 6, 27-32.

Akira Osato, J., Santiago, L.A., Remo, G.M., Cuadra, M.S., Mori, A. (1993) **Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya.** *Life Sciences*, 53, 1383-1389.

Al-Khatib, K., Libbey, C., Boydston, R. (1997). **Weed suppression with *Brassica* green manure crops in green pea.** *Weed Science*, 45, 439-445.

Albert, K. (1995). **On-line use of NMR detection in separation chemistry.** *Journal of Chromatography A*, 703, 123-147.

Allen, K., Cornforth, D. (2010). **Comparison of spice-derived antioxidants and metal chelators on fresh beef color stability.** *Meat Science*, 85, 613-619.

Almajano, P., Delgado, E., Gordon, M. (2007). **Albumin causes a synergistic increase in the antioxidant activity of green tea catechins in oil-in-water emulsions.** *Food Chemistry*, 102, 1375-1382.

Amazu, L.U., Azikiwe, C.C.A., Njoku, C.J., Osuala, F.N., Nwosu, P.J.C., Ajugwo, A.O., Enye, J.C. (2010). **Antiinflammatory activity of the methanolic extract of the seeds of *Carica papaya* in experimental animals.** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 884-886.

Ambrosone, C. B., McCann, S. E., Freudenheim, J. L., Marshall, J. R., Zhang, Y., Shields, P. G. (2004). **Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype.** *The Journal of Nutrition*, 134, 1134-1138.

Anagnostopoulou, M., Kefalas, P., Papageorgiou, V., Assimopoulou, A., Boskou, D. (2006). **Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*).** *Food Chemistry*, 94, 19-25.

Angel, C. (2009). **Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions.** *Chemistry and Physics of Lipids*, 157, 1-11.

Angus, J. F. (1994). **Biofumigation: isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit the growth of the take-all fungus.** *Plant and Soil*, 162, 107-112.

- Anitescu, G., Tavlarides, L. (1997). **Solubilities of solids in supercritical fluids—I. New quasistatic experimental method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) + pure fluids.** *Journal of Supercritical Fluids*, 10, 175-189.
- Anitescu, G., Tavlarides, L. (2006). **Supercritical extraction of contaminants from soils and sediments.** *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 167-180.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., Mc. Donald, S., Robards, K. (2002). **Methods for testing antioxidant activity.** *Analyst*, 127, 183-198.
- Arlorio, M., Coisson, J., Travaglia, J., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., Martelli, A. (2005). **Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO<sub>2</sub>.** *Food Research International*, 38, 1009-1014.
- Arts, M., Dallinga, J., Voss, H., Haenen, G., Bast, A. (2003). **A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures.** *Food Chemistry*, 80, 409-414.
- Ashraf-Khorassani, M., Combs, M., Schweighardt, F., Mathiasand, P., Taylor, L. (1997). **Solubility Study of Sulfamethazine and Sulfadimethoxine in Supercritical Carbon Dioxide, Fluoroform, and Subcritical Freon 134A.** *Journal of Chemical & Engineering Data*, 42, 636-640.
- Azevedo, A., Kopcak, U., Mohamed, R. (2003). **Extraction of fat from fermented Cupuaçu seeds with supercritical solvents.** *Journal of Supercritical Fluids*, 27, 223-237.
- Bakirel, T., Bakirel, U., Keles, O., Yardibi, H. (2008). **In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits.** *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 64-73.
- Balk, J. Bast, A., Haenen, G. (2009). **Evaluation of the accuracy of antioxidant competition assays: incorrect assumptions with major impact.** *Free Radical Biology & Medicine*, 47, 135-144.
- Barillari, J., Canistro, D., Paolini, M., Ferroni, F., Pedulli, G. F., Iori, R. (2005). **Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2475-2482.
- Barreto, J., Trevisan, M., Hull, W., Erben, G., De Brito, E., Pfundstein, B., Würtele, G., Spiegelhalder, S., Owen R. (2008). **Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5599-5610.
- Basile, A., Vuotto, M., Violante, U., Sorbo, S., Martone G., Castaldo-Cobianchi, R. (1997). **Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, 203, 199-203.
- Bastida, S., Sánchez-Muniz, F., Olivero, R., Pérez-Olleros, L., Ruiz-Roso, B., Jiménez-Colmenero, F. (2009). **Antioxidant activity of Carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage.** *Food Chemistry*, 116, 748-754.
- Benelli, P. (2010). **Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração.** Tesis

de Maestría, Universidad Federal de Santa Catarina, Departamento de Ingeniería Química e Ingeniería de Alimentos. Florianópolis, Santa Catarina. Brasil

Benelli, P., Riehl, C.A.S., Smânia, A. Jr., Smânia, E.F.A., Salvador Ferreira, S.R. (2010) **Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition.** *Journal of Supercritical Fluids*, 55, 132-141.

Beninger, C., Hosfield, G. (2003). **Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7879-7883.

Bennett, R.N., Kiddle, G., Wallsgrov, R. (1997). **Biosynthesis of benzylglucosinolate, cyanogenic glucosides and phenylpropanoids in *carica papaya*.** *Phytochemistry*, 45, 59-66.

Bennett, R.N., Mellon, F.A., Kroon, P.A. (2004). **Screening Crucifer Seeds as Sources of Specific Intact Glucosinolates Using Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 428-438.

Bertucco, A., Vetter, G. (2001). **High Pressure Process Technology: Fundamentals and Applications.** Amsterdam Holland: Elsevier Science.

Bicchi, C., Rubiolo, P., Rovida, C. (1993). Analysis of constituents of Iris rhizomes. Part II. Simultaneous SFE of irones and iridals from *Iris pallida* L. rhizomes *Flavour Fragrance Journal*, 8, 261-267.

Błaszczyk, J., Kędziora, I., Wesffal, J., Załonka, J., Kowalski, K., Kędziora-Komatowska, E., Fijałkowski, I. (2000). **Reactive oxygen species in peripheral blood of patients suffering due to coronary heart disease (CHD).** *Atherosclerosis*, 151, 229.

Botsoglou, N., Fletouris, D., Papageorgiou, G., Vassilopoulos, V., Mantis, A., Trakatellis, A. (1994). **Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1931-1937.

Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, J., Ayadi, M., Sayadi, S. (2008). **Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves.** *Food Chemistry*, 108, 253-262

Braga, M., Leal, P., Carvalho, J., Meireles A. (2003). **Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts Obtained Using Various Techniques.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6604-6611.

Braga, M., Santos, R., Seabra, I., Facanalic, R., Marques, M., de Sousa, H. (2008). **Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark.** *Journal of Supercritical Fluids*, 47, 37-48.

Brettonnet, A., Hewavitarana, A., De Jong, S., Lanari, M. (2010). **Phenolic acids composition and antioxidant activity of canola extracts in cooked beef, chicken and pork.** *Food Chemistry*, 121,927-933.

Brian, D.C. (2010). **Glucosinolates, structures and analysis in food.** *Analytical Methods*, 2, 310-325.

- Brown, P.D., Morra, M.J. (1997). **Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants.** *Advances in Agronomy*, 61, 167-231.
- Brown, P.D., Morra, M.J. (1995). **Hydrolysis products of glucosinolates in *Brassica napus* tissues as inhibitors of seed germination.** *Plant and Soil*, 181, 307-316.
- Brunner, G. (2005). **Supercritical fluids: technology and application to food processing.** *Journal of Food Engineering*, 67, 21-33.
- Brunner, G. (1994). **Gas extraction. A Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process.** Springer. New York USA. p. 3-5, 177-178, 240-248, 251-310, 197-198, 181-182
- Büchner, E. (1906). **Die beschränkte Mischbarkeit von Flüssigkeiten das System Diphenylamin und Kohlensäure.** *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 56, 257-281.
- Buhler, D.D., Kohler, K.A., Foster, M.S. (2001). **Corn, soybean, and weed responses to spring-seeded smother plants.** *Journal of Sustainable Agriculture*, 18, 63-79.
- Bunea, A., Andjelkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsu, M., Verhe, R. (2008). **Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.).** *Food Chemistry*, 108, 649-656.
- Burford, M., Clifford, A., Bartle, K., Cowe, C. (1996). **Variable flow control and collection device for use with supercritical fluids.** *Journal of Chromatography A*, 738, 241-252.
- Cabello-Hurtado, F., Gicquel, M., Esnault M M-A. (2012). **Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective.** *Food Chemistry*, 132, 1003-1009
- Capriel, P., Haisch, A., Khan, S. (1986). **Supercritical Methanol: An Efficacious Technique for the Extraction of Bound Pesticide Residues from Soil and Plant Samples.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 70-73.
- Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., Torres, A., Macías, F., Martínez, E. (2008). **Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from sunflower leaves with carbon dioxide and water on a pilot plant scale.** *Journal of Supercritical Fluids*, 45, 37-42.
- Castioni, P., Christen, P., Veuthey, J. (1995). **Supercritical fluid extraction of compounds from plant origin.** *Analysis*, 23, 95-106.
- Castro-Vargas, H.I., Benelli, P., Ferreira, S.R.S., Parada-Alfonso, F. (2013). **Supercritical fluid extracts from tamarillo (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp and its application as protectors against lipid oxidation of cooked beef meat.** *Journal of Supercritical Fluids*, 76, 17-23.
- Castro-Vargas, H.I., Ferreira, S.R.S., Parada-Alfonso, F. **Supercritical fluid extraction from papaya (*Carica papaya* L.) seeds and antioxidant activity in edible palm oil.** *Journal of Supercritical Fluids*, Artículo sometido.

Castro-Vargas, H.I., Gutiérrez-Ulloa, C.E., Parada-Alfonso, F. **Antioxidant activity of fruits residues extracts in cooked beef meat during chilled storage.** *Meat Science*, Artículo sometido.

Castro-Vargas, H.I., Rodríguez-Varela, L.I., Parada-Alfonso, F. (2011). **Guava (*Psidium guajava* L.) seed oil obtained with a homemade supercritical fluid extraction system using supercritical CO<sub>2</sub> and co-solvent.** *Journal of Supercritical Fluids*, 56, 238-242.

Castro-Vargas, H., Rodríguez-Varela, L., Salvador Ferreira, S.R., Parada-Alfonso, F. (2010). **Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents.** *Journal of Supercritical Fluids*, 51, 319-324.

Castro, H. (2008). **Extracción de fenoles a partir de semillas de guayaba (*Psidium guajava* L.) empleando fluidos presurizados.** Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Bogotá.

Cataldi, T.R.I., Lelario, F., Orlando, D., Bufo, S.A. (2010). **Collision-Induced Dissociation of the A + 2 Isotope Ion Facilitates Glucosinolates Structure Elucidation by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry with a Linear Quadrupole Ion Trap.** *Analytical Chemistry*, 82, 5686-5696.

Cavero, S., García-Risco, M., Marín, F., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F., Reglero, G., Ibañez, E. (2006). **Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays.** *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 62-69.

Cemeli, E., Baumgartner, A., Anderson, D. (2009). **Antioxidants and the Comet assay.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681, 51-67

Chan, H., Levett, G. (1977). **Autoxidation of Methyl Linoleate. Separation and Analysis of Isomeric Mixtures of Methyl Linoleate Hydroperoxides and Methyl Hydroxylinoates.** *Lipids*, 12, 99-104.

Chan, M.K.Y., Close, R.C. (1987). **Aphanomyces root rot of peas control by the use of cruciferous amendments.** *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30, 225-233.

Chang, H.T. Jr, Heu, R.A., Tang, C S., Okazaki, E.N., Ishizaki, S.M. (1978). **Composition of papaya seeds.** *Journal of Food Science*, 43, 255-256.

Chang, Y., Almy, E., Blamer, G., Gray, J., Frost, J., Strasburg, G. (2003). **Antioxidant Activity of 3-Dehydroshikimic Acid in Liposomes, Emulsions, and Bulk Oil.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2753-2757.

Chen, C., Lee, Y., Lee, M., Chang, C. (2009). **Supercritical fluids extraction of cinnamic acid derivatives from Brazilian propolis and the effect on growth inhibition of colon cancer cells.** *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40, 130-135.

Chester, L., Pinkston, J., Raynie, D. (1996). **Supercritical Fluid Chromatography and Extraction,** *Analytical Chemistry*, 68, 487R-514R.

Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., Rahmani, M. (1991). **Peroxy and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants.** *Journal of the American Chemical Society*, 68, 307-312.

- Choe, E., Min, D. (2006). **Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 1–22.
- Chye, T.S., Wan, T.S. (1980). **Relation of phenolic compounds to resistance of papaya fruits to rot.** *Proceedings Malaysian Biochemical Society Conference*, 6, 138-147.
- Cintra, R., Mancini-filho, J. (2001). **Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo.** *Nutrire*, 22, 49-62.
- Clifford, A., Bartle, K., Gelebart, I., Zhu, S. (1997). **Fractionation of polymers using supercritical fluid extraction.** *Journal of Chromatography A*, 785, 395-401.
- Cohen, J.H., Kristal, A.R., Stanfordm, J.L. (2000). **Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk.** *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 61-68.
- Colak, E. (2008). **Novi markeri oksidativnog oštećenja makromolekula.** *Journal of Medical Biochemistry*, 27, 1-16.
- Colbert, L., Decker, E. (1991). **Antioxidant activity of an ultrafiltration permeate from acid whey.** *Journal of Food Science*, 56, 1248-1250.
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. (2011). **Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia.** *Food Research International*, 44, 2047-2053.
- Criado, S., Bertolotti, S., Soltermann, A., Avila, V., Garcia, N. (1995). **Effect of flavonoids on the photooxidation of fats - a study on their activity as singlet molecular oxygen [O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>)] generators and quenchers.** *European Journal of Lipid Science and Technology*, 97, 265-269.
- Dandurand, L. M., Mosher, R. D., & Knudsen, G. R. (2000). **Combined effects of Brassica napus seed meal and Trichoderma harzianum on two soilborne plant pathogens.** *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 1051-1057.
- DANE, Departamento Administrativo Nacional de Estadística, (2010). **Documento de Discusión Nacional acerca de los Asuntos Claves en el Análisis del Sector Agricultura (Mitigación).** Consultado 16 mayo de 2013. Disponible en [http://www.pnud.org.co/img\\_upload/61626461626434343535373737353535/CAMBIOCLIMATICO/3.%20Memorias%20Di%C3%A1logo%20Nacional%20Interministerial%20sobre%20cambio%20clim%C3%A1tico%20en%20el%20sector%20agropecuario/2DocdiscusionAgriculturayMitigacionColombia.pdf](http://www.pnud.org.co/img_upload/61626461626434343535373737353535/CAMBIOCLIMATICO/3.%20Memorias%20Di%C3%A1logo%20Nacional%20Interministerial%20sobre%20cambio%20clim%C3%A1tico%20en%20el%20sector%20agropecuario/2DocdiscusionAgriculturayMitigacionColombia.pdf)
- Danielski, L., Michielin, E.M.Z., Ferreira, R.S. (2007). **Horsetail, (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO<sub>2</sub>: experimental solubility and empirical data correlation.** *Journal of Food Engineering*, 78, 1054-1059.
- Dauksas, E., Venskutonis, P., Sivik, B. (2002). **Supercritical fluid extraction of borage (*Borago officinalis* L.) seeds with pure CO<sub>2</sub> and its mixture with caprylic acid methyl ester.** *Journal of Supercritical Fluids*, 22, 211-219.
- Daxenbichler, M.E., Spencer, G.F., Carlson, D.G., Rose, G.B., Brinker, A.M., Powell, R.G. (1991). **Glucosinolate composition of seeds from species of wild plants.** *Phytochemistry*, 30, 2623-2638.



- De Campos, L., Leimann, F., Curi Pedrosa, R., Salvador Ferreira, S.R. (2008). **Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*)**. *Bioresource Technology*, 99, 8413-8420.
- De Jong, S., Lanari, M. (2009). **Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: Contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract**. *Food Chemistry*, 116, 892-897.
- De Oliveira, A., Valentim, I., Silva, C., Bechara, E., De Barros, M., Mano, C., Goulart, M. (2009). **Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues**. *Food Chemistry*, 115, 469-475.
- De Rezende, A., Graf, U., Da Rosa, Z., Kerr, W., Spanó M. (2009). **Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster***. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1466-1472.
- Dean, J., Khundker, S. (1997). **Review Extraction of pharmaceuticals using pressurised carbon dioxide**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, 875-886.
- Decker, E.A., Crum, A.D. (1993). **Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork**. *Meat Science*, 34, 245-253.
- Diepen, G., Scheffer, F. (1948). **The solubility of naphthalene in supercritical ethylene**. *Journal of the American Chemical Society*, 70, 4085-4089.
- Denisov, E., Afanas'ev, I. (2005). **Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology**. CRC Press. Boca Raton USA. p. 490-491.
- Denisov, E., Khudyakov, I. (1987). **Mechanism of action and reactivities of free radicals of inhibitors**. *Chemical Review*, 87, 1313-1357.
- Dewick, P. (2001) **Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach**. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex England. p. 150.
- Döker, O., Salgın, U., Sanal, I., Mehmetoglu, Ü., Çalimli, A. (2004). **Modeling of extraction of  $\beta$ -carotene from apricot bagasse using supercritical CO<sub>2</sub> in packed bed extractor**. *Journal of Supercritical Fluids*, 28, 11-19.
- Eckard, P., Taylor, L. (1997). **Feasibility of ion-pair/supercritical fluid extraction of an ionic compound pseudoephedrine hydrochloride**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, 613-619.
- Ediage, E.N., Di Mavungu, J.D., Scippo, M.L., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., Van Peteghem, C., De Saeger, S. (2011). **Screening, identification and quantification of glucosinolates in black radish (*Raphanus sativus* L. niger) based dietary supplements using liquid chromatography coupled with a photodiode array and liquid chromatography - mass spectrometry**. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4395-4405.
- Edward, R., Qiubai, S., Zhiqiang, Z., Chongmin, Z., Wei, G. (2009). **Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide**. *Journal of Environmental Sciences*, 21, 720-726.

- Emeruwa, A.C. (1982). **Antibacterial substance from Carica papaya fruit extract.** *Journal of Natural Products*, 45, 123-127.
- Erkan, N., Akgonen, S., Ovat, S., Goksel, G., Ayranci, E. (2011). **Phenolic compounds profile and antioxidant activity of *Dorystoechas hastata* L. Boiss et Heldr.** *Food Research International*, 44, 3013-3020.
- Erkey, C. (2000). **Supercritical carbon dioxide extraction of metals from aqueous solutions: a review.** *Journal of Supercritical Fluids*, 17, 259-287.
- Espinosa, S., Diaz, A., Brignole, E. (2008). **Food additives obtained by supercritical extraction from natural sources.** *Journal of Supercritical Fluids*, 45 213-219.
- Ettliger, M.G., Hodgkins, J.E. (1956). **The mustard oil of papaya seed.** *Journal of Organic Chemistry*, 21, 204-205.
- Fadel, O., El Kirat, K., Morandat, S. (2011). **The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808, 2973-2980.
- Fahey, J.W., Zalcmann A.T., Talalay, P. (2001). **The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants.** *Phytochemistry*, 56, 5-51.
- Fasseas, M.K., Mountzouris, K.C., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., Zervas G. (2007). **Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils.** *Food Chemistry*, 106, 1188-1194.
- Fernández, J., Pérez-Álvarez J., Fernández-López, J. (1997). **Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat.** *Food Chemistry*, 59, 345-353.
- Ferreira, S. R., Meireles, M. A. (2002). **Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil.** *Journal of Food Engineering*, 54, 263-269.
- Field, J., S., Miller, D., Field, T., Hawthorne, S., Giger, W. (1992). **Quantitative Determination of Sulfonated Aliphatic and Aromatic Surfactants in Sewage Sludge by Ion-Pair/Supercritical Fluid Extraction and Derivatization Gas Chromatography Mass Spectrometry.** *Analytical Chemistry*, 64, 3161-3167.
- Fine, A. M. (2000). **Oligomeric proanthocyanidin complexes: History, structure, and phytopharmaceutical applications.** *Alternative Medicine Review*, 5, 144-151.
- Foote, C., Denny, R., Weaver, L., Chang, Y., Peters, J. (1970). **Quenching of singlet oxygen.** *The New York Academy of Sciences*, 171, 139-148.
- Frankel, E., Huang, S., Aeschbach, R., Prior, E. (1996). **Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 131-135.
- Frankel, E., Huang, S.W., Kanner, J., German, J.B. (1994). **Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1054-1059.

- Frankel, E., Meyer, A. (2000). **The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- Fu, Y., Zu Y., Liu, W., Wang, W., Hua, X., Yang, M. (2009). **Ethanol modified supercritical fluid extraction and antioxidant activity of cajaninstilbene acid and pinostrobin from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves.** *Food Chemistry*, 117, 152-159
- Fuoco, R., Ceccarini, A., Onor, M., Lottici, S. (1997). **Supercritical fluid extraction combined on-line with cold-trap gas chromatography/mass spectrometry.** *Analytica Chimica Acta*, 346, 81-86.
- Gaitán, S., Solano, A., Restrepo, P., Rodríguez, I., Parada F. (2005). **Beneficio de la nuez del marañón (*Anacardium occidentale*) mediante producción e LCNM con CO<sub>2</sub> presurizado.** *Actualidades biológicas*, 27, 59-63.
- Gamliel, A., Stapleton, J.J. (1993). **Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues.** *Phytopathology*, 83, 899-905.
- Gardner, H. (1988). **Lipoxygenase pathways in cereals.** *Advances in Cereal Science and Technology*. St Paul USA: American Association of Cereal Chemists, 161-215 p.
- Gawenis, J., Kauffman, J., Jurisson, S. (2001). **Ion Pairing as a Strategy for Extraction by Modified Supercritical Carbon Dioxide: Extraction of Radioactive Metal Ions.** *Analytical Chemistry*, 73, 2022-2026.
- Ghafoor, K., Choi Y., Jeon, J., Jo, H. (2009). **Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4988-4994.
- Ghafoor, K., Park, J., Choi, Y. (2010). **Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology.** *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 485-490.
- Ghiselli, A., Damicis, A., Giacosa, A. (1997). **The antioxidant potential of the Mediterranean diet.** *Journal of the European Cancer Prevention Organisation*, 6, 15-19.
- Gmelin, R., Kjaer, A. (1970). **Glucosinolates in the Caricaceae.** *Phytochemistry*, 9, 591-593.
- Gomide, R. (1983). **Operações com sistemas sólidos granulares, v.1**, Catalogação da Câmara Brasileira de Publicação de Livros, São Paulo Brasil.
- Good, C., Smânia, A., Curi Pedrosa, R., Salvador Ferreira, S.R. (2007). **Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids.** *Journal of Food Engineering*, 80, 631-638.
- Good, C. (2005). **Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO<sub>2</sub> a Alta Pressão.** Tesis de Maestría, Universidad Federal de Santa Catarina, Departamento de Ingeniería Química e Ingeniería de Alimentos. Florianópolis, Santa Catarina. Brasil
- Goodship, V., Ogur, E. (2004). **Polymer Processing with Supercritical Fluids.** *Rapra Review Reports*, 15, 3-25.

- Goyal, S., Manivannan, B., Ansari, A.S., Jain, S.C., Lohiya, N.K. (2010). **Safety evaluation of long term oral treatment of methanol sub-fraction of the seeds of *Carica papaya* as a male contraceptive in albino rats.** *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 286-291.
- Grandison, A., Lewis, M. (1996). **Separation Processes In The Food And Biotechnology Industries Principles And Applications.** Woodhead Publishing Ltd. Great Yarmouth England. Capitulo 2.
- Guillen, M., Goicoechea, E. (2008). **Formation of oxygenated  $\alpha$ - $\beta$ -unsaturated aldehydes and other toxic compounds in sunflower oil oxidation at room temperature in closed receptacles.** *Food Chemistry*, 111, 157-164.
- Guillén-Sans, R., Guzmán-Chozas, M. (1998). **The Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction in Foods: A Review.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 315-330.
- Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J., Sousa, M., Carvalho, A., Ferreira, I. (2010). **Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange.** *Food and Chemical Toxicology*, 48, 99-106.
- Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S., Xin, W. (1996). **Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1304, 210-222.
- Gupta, R., Shim, J. (2007). **Solubility in supercritical carbon dioxide.** Boca: CRC Press. Raton USA. p. 43.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (1995). **The definition and measurement of antioxidants in biological systems.** *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 125-126.
- Hamdan, S., Daood, H., Toth-Markus, M., Illés, V. (2008). **Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane.** *Journal of Supercritical Fluids*, 44, 25-30.
- Hamilton, R. (1994). **Rancidity in Foods.** Chapman & Hall. London England. p. 16.
- Hannay, J. (1880). **On the solubility of solids in gases.** *Proceedings of the Royal Society of London*, 30, 484-489.
- Hannay, J., Hogarth, J. (1879). **On the solubility of solids in gases.** *Proceedings of the Royal Society of London*, 30, 178-188.
- Harborne, J., Simmonds, N. (1964). **Biochemistry of Phenolic Compounds.** London England: Academic Press. P. 101.
- Harfi, K., Bennouna, C., Mokhlisse, A., Ben, M., Lemeé, L., Joffre, J., Amblés, A. (1999). **Supercritical fluid extraction of Moroccan (Timahdit) oil shale with water.** *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 50, 163-174.
- Hawthorne, S., Langenfeld, J., Miller, D., Burford M. (1992). **Comparison of Supercritical  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ , and  $\text{CO}_2$  for the Extraction of Polychlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.** *Analytical Chemistry*, 64, 1614-1622.

Heinecke, J. (1997). **Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis.** *Current Opinion in Lipidology*, 8, 268-274.

Heinecke, J. (1996). **Atherosclerosis: Cell biology and lipoproteins.** *Current Opinion in Lipidology*, 7, U131-U136.

Hercegová, A., Dömötöröová, M., Matisová, E. (2007). **Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with Subsequent chromatographic determination.** *Journal of Chromatography A*, 1153, 54-73.

Hernández-Acosta, M.A., Castro-Vargas, H.I., Parada-Alfonso, F. (2011). **Integrated Utilization of Guava (*Psidium guajava* L.): Antioxidant Activity of Phenolic Extracts Obtained from Guava Seeds with Supercritical CO<sub>2</sub>-Ethanol.** *Journal of the Brazilian of Chemical Society*, 22, 2383-2390.

Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J.A., Ibañez, E. (2013). **Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, 67-83.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez E. (2006). **Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae A review.** *Food Chemistry*, 98, 136-148.

Herrero, M., Mendiola, J., Cifuentes, A., Ibañez E. (2009). **Supercritical Fluid Extraction: Recent Advances And Applications.** *Journal of Chromatography A*, 1217, 2495-2511.

Hopp, D., Zeng, L., Gu, Z., Mclaughlin, J. (1996). **Squamotacin: An Annonaceous Acetogenin with Cytotoxic Selectivity for the Human Prostate Tumor Cell Line (PC-3).** *Journal of Natural Product*, 59, 97-99.

Hu, H., Zhang, J., Guo, S., Chen, G. (1999). **Extraction of Huadian oil shale with water in sub- and supercritical states.** *Fuel*, 78, 645-651.

Hu, Q., Pan, B., Xu, J., Sheng, J., Shi, Y. (2007). **Effects of supercritical carbon dioxide extraction conditions on yields and antioxidant activity of *Chlorella pyrenoidosa* extracts.** *Journal of Food Engineering*, 80, 997-1001.

Hu, Q., Xu, J., Chen, S., Yang, F. (2004). **Antioxidant Activity of Extracts of Black Sesame Seed (*Sesamum indicum* L.) by Supercritical Carbon Dioxide Extraction.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 943-947.

Huang, S., Frankel, E. (1997). **Antioxidant Activity of Tea Catechins in Different Lipid Systems.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3033-3038.

Intra, E., Kuo, S. (2007). **Physiological levels of tea catechins increase cellular lipid antioxidant activity of vitamin C and vitamin E in human intestinal Caco-2 cells.** *Chemico-Biological Interactions*, 169, 91-99.

Iqbal, S., Bhangar M.I. (2007). **Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage.** *Food Chemistry*, 100, 246-254.

Iqbal, S., Haleem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M., Akbar, J. (2008). **Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions.** *Food Research International*, 41, 194-200.

- Isbrucker, R.A., Edwards, J.A., Wolz, E., Davidovich, A., Bausch, J. (2006). **Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies.** *Food and Chemical Toxicology*, 44, 636-650.
- Ismail, A., Marjan, Z. M., Foong, C. W. (2009). **Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables.** *Food Chemistry*, 87, 581-586.
- Ismail, H., Wei Chan, K., Mariod, A., Ismail, M. (2010). **Phenolic Content and Antioxidant Activity of Cantaloupe (*Cucumis melo*) Methanolic Extracts.** *Food Chemistry*, 119, 643-647.
- Jacobson, G., Moulder, R., Lu, L, Bergstro, M., Markides, M., Langstrom, B. (1997). **Supercritical Fluid Extraction of <sup>11</sup>C-Labeled Metabolites in Tissue Using Supercritical Ammonia.** *Analytical Chemistry*, 69, 275-280.
- Jacks, T., Kircher, H. (1967). **Fluorometric assay for hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone.** *Analytical Biochemistry*, 21, 279-285.
- Jadhav, S., Nimbalkar, S., Kulkarni, A., Madhavi, D. (1996). **Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives.**, Marcel Dekker Inc. New York USA. p. 5-6.
- Jaime, L., Mendiola, J., Ibáñez, E., Martín-Álvarez, P., Cifuentes, A., Reglero, G., Señoráns, F. (2007). **β-Carotene Isomer Composition of Sub- and Supercritical Carbon Dioxide Extracts. Antioxidant Activity Measurement.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10585-10590.
- Janda, V., Mikešova, M., Vejrosta, J. (1996). **Review Direct supercritical fluid extraction of water-based matrices.** *Journal of Chromatography A*, 733, 35-40.
- Jia, N., Kong, B., Liu, Q., Diao, X., Xia, X. (2012). **Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage.** *Meat Science*, 91, 533-539.
- Jiménez-Álvarez, D., Giuffrida, F., Golay, A., Cotting, C., Lardeau, A., Keely, B. (2008). **Antioxidant Activity of Oregano, Parsley, and Olive Mill Wastewaters in Bulk Oils and Oil-in-Water Emulsions Enriched in Fish Oil.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7151-7159.
- Jun, B., Hendricks, D., Cornforth, D. (1999). **A comparison of carnosine and ascorbic acid on color and lipid stability in a ground beef pattie model system.** *Meat Science*, 51, 245-253.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Siebenhandl, S., Bauer, F. (2006). **The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork.** *Meat Science*, 72, 446-456.
- Kahl, R. (1984). **Synthetic antioxidants: Biochemical actions and interference with radiation, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogens,** *Toxicology*, 33, 185-228.
- Kamath, V., Rajini, P. (2007). **The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger.** *Food Chemistry*, 103, 428.
- Karlsson, L., Torstensson, A., Taylor, L. (1997). **The use of supercritical fluid extraction for sample preparation of pharmaceutical formulations.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, 601-611.

- Karvela, E., Makrisb, D., Kalogeropoulou, N., Karathanos, V. (2009). **Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols.** *Talanta*, 79, 1311-1321.
- Kazutoshi, F., Takayuki, S. (2004). **Formation of Genotoxic Dicarbonyl Compounds in Dietary Oils upon Oxidation.** *Lipids*, 2004, 39, 481-486.
- Kennedy, T.A., Liebler, D. (1991). **Peroxy radical oxidation of  $\beta$ -carotene: formation of  $\alpha$ -carotene epoxides.** *Chemical Research in Toxicology*, 4, 290-295.
- Kermanshai, R., McCarry, R.R., Rosenfeld, J., Summers, P.S., Weretilnyk, E.A., Sorger, G.J. (2001). **Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts.** *Phytochemistry*, 57, 427-435.
- Khan, M., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A., Dangles, O., Chemat, F. (2010). **Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel.** *Food Chemistry*, 119, 851-858.
- Kim, K., Koo, K., Gong, D., Lee, Y., Kim, C. (2003). **Comparative effect of *Prunus persica* L. BATSCH-water extract and tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride) on concentration of extracellular acetylcholine in the rat hippocampus.** *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 149-154.
- Kim, S-J., Min, S.C., Shin, H.J., Lee, Y-J., Cho, A.R., Kim, S.Y., Han, J. (2013). **Evaluation of the antioxidant activities and nutritional properties of ten edible plant extracts and their application to fresh ground beef.** *Meat Science*, 93, 715-722
- Kirkegaard, J. A., Sarwar, M., Wong, P.T.W., Mead, A., Howe, G., Newell, M. (2000). **Field studies on the biofumigation of take-all by Brassica break crops.** *Australian Journal of Agricultural Research*, 51, 445-456.
- Kirschner, C., Taylor, L. (1993). **Quantitative Analysis by On-Line Supercritical Fluid Extraction/ Fourier Transform Infrared Spectrometry.** *Analytical Chemistry*, 65, 78-83.
- Ko, T., Weng, Y., Chiou R. (2002). **Squalene Content and Antioxidant Activity of Terminalia catappa Leaves and Seeds.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5343-5348.
- Koike, S., Subbarao, K.V. (2000). **Broccoli residues can control Verticillium wilt of cauliflower.** *California Agriculture*, 4, 30-33.
- Koji, U. (2003). **4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress.** *Progress in Lipid Research*, 42, 318-43.
- Kong, Y., Fu, Y., Zu, Y., Liu, W., Wang, W., Hua, X., Yang, M. (2009). **Ethanol modified supercritical fluid extraction and antioxidant activity of cajanin stilbene acid and pinostrobin from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves.** *Food Chemistry*, 117, 152-159.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. (2010). **Effect of endogenous antioxidants of sesame seeds and sesame oil to the thermal stability of edible vegetable oils.** *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1379-1386

- Koşar, M., Göger, F., Hüsnü Can Başer, K. (2011). **In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia halophila* Hedge from Turkey.** *Food Chemistry*, 129, 374-379.
- Kothari, V., Seshadri, S. (2010). **Antioxidant activity of seed extracts of *Annona squamosa* and *Carica papaya*.** *Nutrition & Food Science*, 40, 403-408.
- Kou, M. C., Yen, J. H., Hong, J. T., Wang, C. L. Lin, C. W., Wu, M. J. (2009). ***Cyphomandra betacea* Sendt. phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress.** *LWT - Food Science and Technology*, 42, 458-463.
- Kreuzig, R., Koinecke, A., Bahadir, M. (2000). **Use of supercritical fluid extraction in the analysis of pesticides in soil.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 43, 403-409.
- Krishnakumar, V., Gordon, I. (1996). **Antioxidants - Trends and developments.** *International Food Ingredients*, 12, 41-44.
- Krishnan, G., Holshauer, D.L., Nissen, S. J. (1998). **Weed control in soybean (*Glycine max*) with green manure crops.** *Weed Technology*, 12, 97-102.
- Ku, C., Mun, S. (2008). **Antioxidant activities of ethanol extracts from seeds in fresh Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) and wine processing waste.** *Bioresource Technology*, 99, 4503-4509.
- Kubo, I., Masuoka, N., Ha, T., Tsujimoto, K. (2006). **Antioxidant activity of anacardic acids.** *Food Chemistry*, 99, 555-562.
- Laint, K., Wai, C. (1992). **Extraction of Metal Ions from Liquid and Solid Materials by Supercritical Carbon Dioxide.** *Analytical Chemistry*, 64, 2875-2878.
- Lambelet, P., Saucy, F., Löliger, J. (1994). **Radical exchange reactions between vitamin E, vitamin C and phospholipids in autoxidation of polyunsaturated lipids.** *Free Radical Research*, 20, 1-10.
- Laporta, O., Pérez-Fons, L., Mallavia, R., Caturla, N., Micol, V. (2007). **Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from *Hypoxis rooperi* corm extract (African potato).** *Food Chemistry*, 101, 1425-1437.
- Lazzeri, L., Tacconi, R., Palmieri, S. (1993). **In vitro activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 825-829.
- Leal, P., Braga, M., Sato, D., Carvalho, J., Marques, M., Meireles, A. (2003). **Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid Extraction.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2520-2525.
- Lee, B.J., Hendricks, D.G., Cornforth, D.P. (1999). **A comparison of carnosine and ascorbic acid on color and lipid stability in a ground beef pattie model system.** *Meat Science*, 51 245-253.
- Lee, J., Kim, D., Chang, P., Lee, J. (2007). **Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) analysis of oxidized volatiles from free fatty acids (FFA) and application for measuring hydrogen donating antioxidant activity.** *Food Chemistry*, 105, 414-420.



Lee, M-A., Choi, J-H., Choi, Y-S., Kim, H-Y, Kim, H-W., Hwang, K-E., Chung, H-K., Kim, C-J. (2011). **Effects of kimchi ethanolic extracts on oxidative stability of refrigerated cooked pork.** *Meat Science*, 89, 405-411.

Lee, Y., Linton, A., Kung, H., Ho, C., Huang, T. (2010). **Extraction of nobiletin and tangeretin from Citrus depressa Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier.** *Industrial Crops and Products*, 31, 59-64.

Lelario, F., Bianco, G., Bufo, S.A., T.R.I., Cataldi. (2012). **Establishing the occurrence of major and minor glucosinolates in Brassicaceae by LC-ESI-hybrid linear ion-trap and Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.** *Phytochemistry*, 73, 74-83.

Li, J., Zhang, M., Zheng, T. (2009). **The in vitro antioxidant activity of lotus germ oil from supercritical fluid carbon dioxide extraction.** *Food Chemistry* 2009, 115, 939-944.

Liaw, C., Chang, F., Lin, C., Chou, C., Chiu, H., Wu, M., Wu, Y. (2002). **New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from Annona muricata.** *Journal of Natural Product*, 65, 470-475.

Lindley, M. (1998). **The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables.** *Trends in Food Science & Technology*, 9, 336-340.

Liu, G., Xu, X., Hao, Q., Gao, X. (2009). **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction optimization of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using response surface methodology.** *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1491-1495.

Liu, S., Yang, F., Zhang, C., Ji, H., Hong, P., Deng, C. (2009). **Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil by response surface methodology.** *Journal of Supercritical Fluids*, 48, 9-14.

Liu, W., Fu, Y., Zu, Y., Tong, M., Wu, N., Liu, X., Zhang S. (2009). **Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity.** *Food Chemistry*, 114, 334-339.

Lohiya, N.K., Goyal, R.B. (1992). **Antifertility investigations on the crude chloroform extract of *Carica papaya* Linn. seeds in male albino rats.** *Indian Journal of Experimental Biology*, 30, 1051-1055.

Lohiya, N.K., Manivannan, B., Garg, S. (2006). **Toxicological investigations on the methanol sub-fraction of the seeds of *Carica papaya* as a male contraceptive in albino rats.** *Reproductive Toxicology*, 22, 461-468.

Lohiya, N.K., Manivannan, B., Goyal, S., Ansari, A.S. (2008). **Sperm motility inhibitory effect of the benzene chromatographic fraction of the chloroform extract of the seeds of *Carica papaya* in langur monkey, *Presbytis entellus entellus*.** *Asian Journal of Andrology*, 10, 298-306.

Lohiya, N.K., Manivannan, B., Mishra, P.K., Pathak, N., Sriram, S., Bhande, S.S., Panneerdoss, S. (2002). **Chloroform extract of *Carica papaya* seeds induces long-term reversible azoospermia in langur monkey.** *Asian Journal of Andrology*, 4, 17-26.

Lohiya, N.K., Mishra, P.K., Pathak, N., Manivannan, B., Bhande, S.S., Panneerdoss, S., Sriram, S. (2005). **Efficacy trial on the purified compounds of the seeds of *Carica papaya* for male contraception in albino rat.** *Reproductive Toxicology*, 20, 135-148.

Lohiya, N.K., Mishra, P.K., Pathak, N., Manivannan, B., Jain, S.S. (1999b) **Reversible azoospermia by oral administration of the benzene chromatographic fraction of the chloroform extract of the seeds of *Carica papaya* in rabbits.** *Advances in Contraception*, 15, 141-161.

Lohiya, N.K., Pathak, N., Mishra, P.K., Manivannan, B. (1999a). **Reversible contraception with chloroform extract of *Carica papaya* Linn. seeds in male rabbits.** *Reproductive Toxicology*, 13, 59-66.

Luengthanaphol, S., Mongkholkhajornsilp, D., Douglas, S., Douglas, P., Pengsopa, L., Pongamphai, S. (2004). **Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat--preliminary experiments.** *Journal of Food Engineering*, 63, 247-252.

Luque de Castro, M., Tena, M. (1996). **Strategies for supercritical fluid extraction of polar and ionic compounds.** *Trends in analytical chemistry*, 15, 32-37.

Luque de Castro, M., Valcárcel, M., Tena, M. (1993). **Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico.**: Editorial Reverte. Barcelona España. p. 47-50, 65, 164-178, 217-226.

Luque-García, J., Luque de Castro, M. (2001). **Review Extraction of fat-soluble vitamins.** *Journal of Chromatography A*, 935, 3-11.

Macholz, R. (1987). **Studies on the degradation of glucotropaeolin and progoin--toxicity and reactivity of splitting products.** 7th International Rapeseed Congress / convened under the patronage of Stanislaw Zieba ; by the Plant Breeding and Acclimatization Institute under the auspices of the Group Consultatif International de Recherche sur le Colza.

Macías-Sánchez, M., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez, E. (2009). **Kinetics of the supercritical fluid extraction of carotenoids from microalgae with CO<sub>2</sub> and ethanol as cosolvente.** *Chemical Engineering Journal*, 150, 104-113.

Mahungu, S., Hansen, S., Artz, W. (1998). **Volatile Compounds in Heated Oleic Acid-Esterified Propoxylated Glycerol.** *Journal of the American Oil Chemical Society*, 75, 683-690.

Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D., Carle, R. (2009). **Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants.** *Food Chemistry*, 112, 551-559.

Maisuthisakul, P., Gordon, M. (2009). **Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product.** *Food Chemistry*, 117, 332-341.

Maiti, R., Jana, D., Das, U., Ghosh, D. (2004). **Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 85-91.

Mandelova, L., Totusek, J. (2007). **Broccoli juice treated by high pressure: chemoprotective effects of sulforaphane and indole-3-carbinol.** *High Pressure Research*, 27, 151-156.

Manici, L. M., Lazzeri, L., Baruzzi, G., Leoni, O., Galletti, S., Palmieri, S. (2000). **Suppressive activity of some glucosinolate enzyme degradation products on *Pythium irregulare* and *Rhizoctonia solani* in sterile soil.** *Pest Management Science*, 56, 921-926.

Maraschiello, C., Sárraga, C., García, J. (1999). **Glutathione Peroxidase Activity, TBARS, and  $\alpha$ -Tocopherol in Meat from Chickens Fed Different Diets.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 867-872.

Marinova, E., Yanishlieva, N. (1992). **Inhibited oxidation of lipids III On the activity of ascorbyl palmitate during the autoxidation of two types of lipid systems in the presence of  $\alpha$ -tocopherol.** *European Journal of Lipid Science and Technology*, 94, 448-452.

Martínez, J. (2008). **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds.** CRC Press. New York USA.

McHardy, J., Sawan, S. (1998). **Supercritical Fluid Cleaning Fundamentals, Technology and Applications.** Noyes Publications. New Jersey USA.

McHugh, A., Watkins, J., Doyle, B., Krukonis, V. (1988). **High-pressure naphthalene-xenon phase behavior.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 27, 1025-1033.

McHugh, M., Paulaitis, M. (1980). **Solid solubilities of naphthalene and biphenyl in supercritical carbon dioxide.** *Journal of Chemical & Engineering Data*, 25, 326-329.

Mellon, F.A., Bennett, R., Holst, B., Williamson G. (2002). **Intact Glucosinolate Analysis in Plant Extracts by Programmed Cone Voltage Electrospray LC/MS: Performance and Comparison with LC/MS/MS Methods.** *Analytical Biochemistry*, 306, 83-91.

Mendes, M., Pessoa, F., Coelho, C., Uller A. (2005). **Recovery of the high aggregated compounds present in the deodorizer distillate of the vegetable oils using supercritical fluids.** *Journal of Supercritical Fluids*, 34, 157-162.

Mendes, R., Fernandes, H., Coelho, J., Cabral, J., Palavra, A., Novais, J. (2003). **Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*.** *Journal of Applied Phycology*, 6, 289-293.

Meng, M., Hu, H., Zhang, Q., Ding, M. (2006). **Extraction of Tumuji Oil Sand with Sub- and Supercritical Water.** *Energy & Fuels*, 20, 1157-1160.

Mezzomo, N., Mileo, B.R., Friedrich, M.T., Martínez, J., Salvador Ferreira, S.R. (2010). **Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: process yield and extract composition.** *Bioresource Technology*, 101, 5622-5632.

Mezzomo, N. (2008). **Óleo de amêndoa de pêssego: Avaliação da técnica de extração, da qualidade dos extratos e de parâmetros para ampliação de escala.** Tesis de Maestría, Universidad Federal de Santa Catarina, Departamento de Ingeniería Química e Ingeniería de Alimentos. Florianópolis, Santa Catarina. Brasil

Michielin, E.M.Z., Salvador, A.A., Riehl, C.A.S., Smânia Jr., A., Smânia, E.F.A., Salvador Ferreira, S.R. (2009). **Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods,** *Bioresource Technology*, 100, 6615-6623.

- Michodjehoun-Mestres, L., Souquet, J., Fulcrand, H., Bouchut, C., Reynes, M., Brillouet, J. (2009). **Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.)**. *Food Chemistry*, 112, 851-857.
- Min, D., Stasinopoulos, T. (1983). **Effects of phosphatidylcholine on the flavor stability of oil during storage**. *Journal of the American Chemical Society*, 60, 684.
- Miyake, Y., Murakami, A., Sugiyama, Y., Koshimizu, Y., Ohigashi, H. (1999). **Identification of Coumarins from Lemon Fruit (*Citrus limon*) as Inhibitors of in Vitro Tumor Promotion and Superoxide and Nitric Oxide Generation**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3151-3157.
- Modell, M., Robey, R., Krukonis, V., De Filippi, R., Oestereich, D. (1979). **Supercritical fluid regeneration of activated carbon**. Paper presented at National AIChE Meeting, Boston USA.
- Mohamed, R., Saldaña, M., Mazzafera, P., Zetzi, C., Brunner, G. (2002). **Extraction of Caffeine, Theobromine, and Cocoa Butter from Brazilian Cocoa Beans Using Supercritical CO<sub>2</sub> and Ethane**. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41, 6751-6758.
- Mohamed, R., Saldaña, M., Socantaype, F., Kieckbusch, T. (2000). **Reduction in the cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina**. *Journal of Supercritical Fluids*, 16, 225-233.
- Mohd-Esa, N., Hern, F.S., Ismail, A., & Yee, C.L. (2010) **Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds**. *Food Chemistry*, 122, 1055-1060.
- Moon, J., Shibamoto, T. (2009). **Antioxidant Assays for Plant and Food Components**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655-1666.
- Morrissey, P.A., Kerry, J.P., Galvin, K. (2003). **Lipid oxidation in muscle foods**. *ACS Symposium Series*, 836, 188-200.
- Mukhopadhyay, M. (2000). **Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide**. CRC Press LLC. Boca Raton USA. p. 13,14, 17-19.
- Murga, R., Ruiz, R., Beltrán, S., Cabezas, J. (2000). **Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3408-3412.
- Murga, R., Sanz, M., Beltrán, S., Cabezas, J. (2002). **Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide**. *Journal of Supercritical Fluids*, 23, 113-121.
- Naito, Y., Uchiyama, K., Yoshikawa, T. (2006). **Oxidative stress involvement in diabetic nephropathy and its prevention by astaxanthin**. *Oxidative Stress Disease*, 21, 235-242.
- Nakamura, Y., Yoshimoto, M., Murata, Y., Shimoishi, Y., Asai, Y., Park, E.Y., Sato, K., Nakamura, Y. (2007). **Papaya Seed Represents a Rich Source of Biologically Active Isothiocyanate**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4407-4413.
- Nassner, A. (1985). **Die antioxidative Eigenschaften von Lecithin**. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 87, 477-481.

Neff, W., Warner, K., Byrdwell, W. (2000). **Odor Significance of Undesirable Degradation Compounds in Heated Triolein and Trilinolein.** *Journal of the American Oil Chemical Society*, 77, 1303-1314.

Niho, N., Shibutani, M., Tamura, T., Toyoda, K., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M. (2001). **Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats.** *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1063-1070.

Niki, E. (1987). **Antioxidants in relation to lipid peroxidation.** *Chemistry and Physics of Lipids*, 44, 227-253.

Norsworthy, J. K., Brandenberger, L., Burgos, N. R., & Riley, M. (2005). **Weed suppression in *Vigna unguiculata* with a spring-seeded Brassicaceae green manure.** *Crop Protection*, 24, 441-447.

Ortega-Pacheco, A., Jimenez-Coello, M., Acosta-Viana, K.Y., Guzman-Marin, E., Gutierrez-Blanco, E., Luna-Flores, W.S., Zavala-Sanchez, M.A., Gonzalez-Robles, A., Perez-Gutierrez, M.S. (2011). **Effects of papaya seeds extract on the sperm characteristics of dogs.** *Animal Reproduction Science*, 129, 82-88.

Ortega-Pacheco, A., Jiménez-Coello, M., Gutiérrez-Blanco, E., Acosta-Viana, K.Y., Guzmán-Marín, E., Zavala-Sánchez, M.A., Montalvo-Beltrán, N.E., Pérez-Gutiérrez, M.S. (2010). **Effects of chloroformic extracts from washed and unwashed papaya seeds (*Carica papaya*) on the sperm concentration of dogs.** *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 1126-1129.

Palma, M., Taylor, L. (1999) **Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide.** *Journal of Chromatography A*, 849, 117-124.

Passos, C.P., Silva, R.M., Da Silva, F.A., Coimbra, M.A., Silva, C.M. (2009). **Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed.** *Journal of Supercritical Fluids* 48, 225-229.

Paz-Elizur, T., Sevilya, Z., Leitner-Dagan, Y., Elinger, D., Roisman, L., Livneh, Z. (2008). **DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention.** *Cancer Letters*, 266, 60-72.

Plumb, G.W., Lambert, N., Chambers, S.J., Wanigatunga, S., Heaney, R.K., Plumb, J.A. (1996). **Are whole extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetables antioxidants.** *Free Radical Research*, 25, 75-86.

Pokorny, J., Janíček, G. (1965). **Stabilisierung der Fette durch natürliche Antioxidantien 1 Mitt Einfluss von Synergisten auf den Rückgang der antioxydativen Wirksamkeit von Quercetin unter dem Einfluss von Kupfer.** *Nahrung*, 9, 63-69.

Pokorny, J., Poskocilova, H., Davidek, J. (1981). **Effect of phospholipids on the decomposition of lipid hydroperoxides.** *Nahrung*, 25, K29-K31.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). **Antioxidants in food Practical applications.** CRC PRESS, Florida USA. p. 7-20.

Pokorny, J. (1987). **Major factors affecting the autoxidation of lipids, in: Autoxidation of Unsaturated Lipids.** Academic Press, London England. p. 141-206.

- Poudel, P., Tamura, H., Kataoka, I., Mochioka, R. (2008). **Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan.** *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 622-625.
- Pourmortazavi S., Hajimirsadeghi S. (2007). **Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis.** *Journal of Chromatography A*, 1163, 2-24.
- Prins, A. (1915). **On critical end-points and the system ethane-naphthalene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences Amsterdam*, 17, 1095-1111.
- Queckenberg, O.R., Frahm, A.W. (1994). **Supercritical Fluid Extraction - Schnelligkeit und Selektivität in der Naturstoffanalytik.** *Die Pharmazie*, 49, 159-166.
- Radulović, N.S. Dekić, M.S., Stojanović-Radic, Z.Z. (2012). **Antimicrobial volatile glucosinolate autolysis products from *Hornungia petraea* (L.) Rchb. (Brassicaceae).** *Phytochemistry Letters* 5 (2012) 351-357.
- Raeissi, S., Diaz, S., Espinosa, S., Peters, C., Brignole, E. (2008). **Ethane as an alternative solvent for supercritical extraction of orange peel oils.** *Journal of Supercritical Fluids*, 45, 306-313.
- Ramsay, W. (1880). **On the critical state of gases.** *Proceedings of the Royal Society London*, 30, 323-329.
- Ramsey, E., Sun, Q., Zhang, Z., Zhang, C., Gou, W. (2009). **Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide.** *Journal of Environmental Sciences*, 21, 720-726.
- Reid, R., Sarker, D. (2005). **Isolation of Natural Products by Low-Pressure Column Chromatography.** En **Natural Products Isolation.** Sarker, D., Latif, Z., Gray, A., Ed. Humana Press Inc. New Jersey. p 117-158.
- Reverchon, E., De Marco I. (2006). **Review Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter.** *Journal of Supercritical Fluids*, 38 146-166.
- Reverchon, E. (1997). **Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products.** *Journal of Supercritical Fluids*, 10, 1-37.
- Ribeiro, S., Barbosa, L., Queiroz, J., Knodler, A., Schieber, A. (2008). **Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties.** *Food Chemistry*, 110, 620-626.
- Robards, K., Prenzler, D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). **Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits.** *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- Rochfort, S.J., Trenerry, V.C., Imsic, M., Panozzo, J., Jones. R. (2008). **Class targeted metabolomics: ESI ion trap screening methods for glucosinolates based on MS<sup>n</sup> fragmentation.** *Phytochemistry*, 69, 1671-1679.
- Rodríguez, R., Romero, R., Chacón, J., Martínez, J., García, E. (2006). **Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate.** *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 687-693.

Rodriguez-Saona, C., Maynard, D., Phillips, S., Trumble, J. (2000). **Avocadofurans and Their Tetrahydrofuran Analogues: Comparison of Growth Inhibitory and Insecticidal Activity.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3642-3645.

Rose, J., Monnery, W., Chong, K., Svrcek, W. (2001). **Experimental data for the extraction of Peace River Bitumen using supercritical ethane.** *Fuel*, 80, 1101-1110.

Rose, J., Svrcek, W., Monnery, W., Chong, K. (2000). **Fractionation of Peace River Bitumen Using Supercritical Ethane and Carbon Dioxide.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39, 3875-3883.

Rössing, D., Kahl, R., Hildebrandt, A. (1985). **Effect of synthetic antioxidants on hydrogen peroxide formation, oxyferro cytochrome P-450 concentration and oxygen consumption in liver microsomes.** *Toxicology*, 34, 67-77.

Rosso, C.S.R., Madella, K., Oliveira, J.V., Salvador Ferreira, S.R. (2010). **Supercritical fluid extraction from dried banana peel (*Musa spp.*, genomic group AAB): Extraction yield, mathematical modeling, economical analysis and phase equilibria.** *Journal of Supercritical Fluids*, 54, 30-37.

Rudnicki, M., De Oliveira, M., Pereira, T., Reginatto, F., Dal-Pizzol, F., Fonseca, J. (2007). **Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts.** *Food Chemistry*, 100, 719-724.

Ruegger, M., Chapple, C. (2001). **Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism.** *Genetics*, 159, 1741-1749.

Ruiz-Roso, B., Pérez-Olleros, L., Requejo, A. (2003). **El Exxenterol®, un extracto de fibra vegetal con un potente efecto reductor del colesterol.** *Schironia*, 2, 5-9.

Ruiz-Roso, B., Requejo, A., Haya, J., Pérez-Olleros, L. (2008). **Efectos del Exxenterol sobre los lípidos séricos de un grupo de sujetos hipercolesterolémicos.** *Schironia*, 7, 21-25.

Sairam, K., Hemalatha, S., Srinivasan, T., Shankar, M., Enkataraman, S. (2003). **Evaluation of anti-diarrhoeal activity in seed extracts of *Mangifera indica*.** *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 11-15.

Saldaña, M., Mohamed, R., Mazzafera, P. (2002). **Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO<sub>2</sub> and ethane.** *Fluid Phase Equilibria*, 194-197, 885-894.

Salgın, U. (2007). **Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO<sub>2</sub>+ethanol mixture in green and high-tech separation process.** *Journal of Supercritical Fluids*, 39, 330-337.

Salleh, S., Saito, Y., Kiso, K., Jinno, K. (2001). **Solventless sample preparation procedure for organophosphorus pesticides analysis using solid phase microextraction and on-line supercritical fluid extraction/high performance liquid chromatography technique.** *Analytica Chimica Acta*, 433, 207-215.

Şanal, I., Bayraktar, E., Mehmetoglu, U., Çalimli A. (2005). **Determination of optimum conditions for SC-(CO<sub>2</sub> + ethanol) extraction of β-carotene from apricot pomace using response surface methodology.** *Journal of Supercritical Fluids*, 34, 331-338.

- Sanchez, F., Burse M. (2002). **Transient nature of rhizosphere carbon elucidated by supercritical freon-22 extraction and  $^{13}\text{C}$  NMR analysis.** *Forest Ecology and Management*, 169, 177-185.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1999). **Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents.** *Food Research International*, 32, 407-412.
- Sánchez-Moreno, C., Satué-Gracia, T., Frankel, E. (2000). **Antioxidant Activity of Selected Spanish Wines in Corn Oil Emulsions.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5581-5587.
- Sánchez-Muniz, F.J., Olivero-David, R., Triki, M., Salcedo, L., González-Muñoz, M.J., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Benedi, J. (2012). **Antioxidant activity of *Hypericum perforatum* L. extract in enriched n-3 PUFA pork meat systems during chilled storage.** *Food Research International*, 48, 909-915.
- Sánchez-Vicente, Y., Cabañas, A., Renuncio, J.A.R., Pando, C. (2009). **Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol.** *Journal of Supercritical Fluids*, 49, 167-173.
- Sarmento, L., Machado, R., Petrus, J., Tamanini, T., Bolzan, A. (2008). **Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes.** *Journal of Supercritical Fluids*, 45, 64-69.
- Sarwar, M., Kirkegaard, J.A. (1998). **Biofumigation potential of brassicas.** *Plant and Soil*, 201, 91-101.
- Sedmikova, M., Turek, B., Barta, I., Strohalm, J., Smerak, P., Houska, M. (1999). **Evaluation of the antimutagenic activity of pressure treated and heat pasteurized cauliflower juice.** *Czech Journal of Food Sciences*, 17, 149-152.
- Seppanen, C., Csallany, A. (2004). **Incorporation of the Toxic Aldehyde 4-Hydroxy-2-trans-nonenal into Food Fried in Thermally Oxidized Soybean Oil.** *Journal of the American Oil Chemical Society*, 81, 1137-1141.
- Setianto, W., Yoshikawa, S., Smith, R., Inomata, H., Florusse, L., Peters, C. (2009). **Pressure profile separation of phenolic liquid compounds from cashew (*Anacardium occidentale*) shell with supercritical carbon dioxide and aspects of its phase equilibria.** *Journal of Supercritical Fluids*, 48, 203-210.
- Shahidi, F., Janithaq, P., Wanasundara P. (1992). **Phenolic Antioxidants.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31, 67-103.
- Shahidi, F., Naczki, M. (2004). **Phenolics in Food and Nutraceuticals.** CRC PRESS. Florida USA. p. 2-3.
- Shahidi, F. (2000). **Antioxidants in food and food antioxidants.** *Nahrung*, 44, 158-163.
- Shaw, R., Brill, A., Clifford, A., Eckert C., Franck, E. (1991). **Special Report "Supercritical Water. A. Medium for Chemistry"**. *Chemical & Engineering News*, 23, 26-39.



- Siddhuraju, P. (2007). **Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat.** *LWT- Food Science and Technology*, 40, 982-990.
- Simoës, P., Matos, H., Carmelo, P., Gomes de Azevedo, E., Nunes da Ponte, M. (1995). **Mass Transfer in Countercurrent Packed Columns: Application to Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Terpenes.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 34, 613-618.
- Smolinska, U., Knudsen, G. R., Morra, M.J., Borek, V. (1997). **Inhibition of *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi* by volatiles produced by hydrolysis of Brassica napus seed meal.** *Plant Disease*, 81, 288-292.
- Smolinska, U., Morra, M.J., Knudsen, G. R., James, R.L. (2003). **Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*.** *Plant Disease*, 87, 407-412.
- Songsak, T., Lockwood, G.B. (2002). **Glucosinolates of seven medicinal plants from Thailand.** *Fitoterapia*, 73, 209-216
- Soong, Y., Barlow, P. (2006). **Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity.** *Food Chemistry*, 97, 524-530.
- Soong, Y., Barlow, P. (2005). **Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, 1885, 270-277.
- Soong, Y., Barlow, P. (2004). **Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds.** *Food Chemistry*, 88, 411-417.
- Stahl, W., Sies, H. (1993). **Physical quenching of singlet oxygen in cis-trans isomerization of carotenoids.** *Carotenoids in Human Health*. New York USA: New York Academy of Sciences. p. 10-19.
- Sudjaroen, Y., Haubner, R., Würtele, G., Hull, W., Erben, G., Spiegelhalder, B., Changbumrung, S., Bartsch, H., Owen R. (2005). **Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp.** *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1673-1682.
- Sun, Q., Faustman, C., Senecal, A., Wilkinson, A., Furr, H. (2001). **Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerated storage.** *Meat Science*, 57, 55-60.
- Sunarso, J., Ismadji, S. (2009). **Review Decontamination of hazardous substances from solid matrices and liquids using supercritical fluids extraction: A review.** *Journal of Hazardous Materials*, 161, 1-20.
- Suto, K., Kakinumaa, S., Ito Y., Sagaraa, K., Itokawa H. (1997). **Determination of magnolol and honokiol in Magnoliae Cortex using supercritical fluid chromatography on-line coupled with supercritical fluid extraction by on-column trapping.** *Journal of Chromatography A*, 786, 366-370.
- Suto, K., Kakinumaa, S., Ito Y., Sagaraa, K., Iwasaki H., Itokawa H. (1997). **Determination of berberine and palmatine in Phellodendri Cortex using ion-pair supercritical fluid**

**chromatography on-line coupled with ion-pair supercritical fluid extraction by on-column trapping.** *Journal of Chromatography A*, 786, 371-376.

Swain, T., Bate-Smith, E. (1962). **Flavonoid compounds**, in: **Comparative Biochemistry Vol. III**. New York USA: Academic Press. p. 755-809.

Tanabe, H., Yoshida, M., Tomita, N. (2002). **Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat.** *Animal Science Journal*, 73, 389-393.

Tang, S., Kerry J.P., Sheehan, D., Buckley D.J., Morrissey P. (2001). **Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation.** *Food Research International*, 34, 651-657.

Tarladis, B.G., Watts, B.M., Younathan, M.T. (1960). **A distillation method for the quantitative determination of malondialdehyde in rancid foods.** *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 37, 44-48.

Terauchi, F., Ohira, T., Yatagai, M., Ohgama, T., Aoki, H., Suzuki, T. (1993). **Extraction of Volatile Compounds from Coniferous Woods with Supercritical Carbon Dioxide.** *Mokuzai Gakkaishi*, 39, 1421-1430.

Termentzi, A., Zervou, M., Kokkalou, E. (2009). **Isolation and structure elucidation of novel phenolic constituents from *Sorbus domestica* fruits.** *Food Chemistry*, 116, 371-381.

Tian, Q., Rosselot, R.A., Schwartz, S.J. (2005). **Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry.** *Analytical Biochemistry*, 343, 93-99.

Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., Vlietinck, A. (1998). **Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants.** *Journal of Ethnopharmacology*, 61 57-65.

Toribio, A., Boudesocque, L., Richard, B., Nuzillard, J-M, Renault, J-H. (2011). **Preparative isolation of glucosinolates from various edible plants by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography.** *Separation and Purification Technology*, 83, 15-22.

Tsuda, T., Mizuno, K., Ohshima, K., Kawakishis, S., Osawa, T. (1995). **Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Antioxidative Components from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) Seed Coat.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2803-2806.

Turner, C., King, J., Mathiasson L. (2001). **Review Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis.** *Journal of Chromatography A*, 936, 215-237.

Tzeng, T., Lin, Y., Jong, T., Chang, C. (2007). **Ethanol modified supercritical fluids extraction of scopoletin and artemisinin from *Artemisia annua* L.** *Separation and Purification Technology*, 56, 18-24.

Van Ruth, S. M., Shaker, E. S., Morrissey, P.A. (2001). **Influence of methanolic extracts of soybean seeds and soybean oil on lipid oxidation in linseed oil.** *Food Chemistry*, 75, 177-184.

Van Sumere, C. (1989). **Phenols and phenolic acids**, in **Methods in Plant Biochemistry, Volume 1**. London England: Academic Press, 29-74p.

Vatai, T., Škerget, M., Knez, Z. (2009). **Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide**. *Journal of Food Engineering*, 90, 246-254.

Vaughn, L., Clausen, E., King, J., Howard L. Carrier, D. (2008). **Extraction conditions affecting supercritical fluid extraction (SFE) of lycopene from watermelon**. *Bioresource Technology*, 99, 7835-7841.

Vejrosta, J., Karásek, P., Planeta, J. (1999). **Analyte Collection in Off-Line Supercritical Fluid Extraction**. *Analytical Chemistry*, 71, 905-909.

Velasco, R., Villada, H., Carrera, J. (2007). **Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria**. *Información Tecnológica*, 18, 53-65.

Verhoeven, D.T., Goldbohm, R.A., Van Poppel, G., Verhagen, H., Van den Brandt, P. A. (1996). **Epidemiological studies on Brassica vegetables and cancer risk**. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 5, 733-748.

Vermerris, W., Nicholson, R. (2006). **Phenolic Compound Biochemistry**.: Springer. Dordrecht Holanda. p. 1.

Vierheilig, H., Ocampo, J.A. (1990). **Effect of isothiocyanates on germination of spores of G. mosseae**. *Soil Biology and Biochemistry*, 22, 1161-1163.

Vig, A.P, Rampal, G., Thind, T.S., Arora, S. (2009). **Bio-protective effects of glucosinolates – A review**. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1561-1572.

Villard, P. (1888). **On some new gas hydrates**. *Comptes Rendus des Seances de L'Academie des Sciences* 1888, 106, 1602-1603.

Wabo, J., Ngankam Ntemah, J.D., Bilong Bilong, C.F., Mbida, M. (2011). **A comparative study of the ovicidal and larvicidal activities of aqueous and ethanolic extracts of pawpaw seeds *Carica papaya* (Caricaceae) on Heligmosomoides bakeri**. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4, 447-450.

Wang, H., Cao, G., Prior, R. (1996). **Total Antioxidant Capacity of Fruits**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 701-705.

Wang, J., Marshall, W. (1994). **Recovery of Metals from Aqueous Media by Extraction with Supercritical Carbon Dioxide**. *Analytical Chemistry*, 66, 1658-1663.

Wang, L.L., Xiong, Y.I. (2005). **Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability**. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 9186-9192.

Wéle, L., Zhang, Y., Ndoye, Y., Brouard, J., Pousset, J., Bodo B. (2004). **A Cytotoxic Cyclic Heptapeptide from the Seeds of *Annona cherimola***. *Journal of Natural Product*, 67, 1577-1579.

Weng, X., Gordon, M. (1987). **Antioxidant synergy between phosphatidyl ethanolamine and tocopherol quinone**. *Food Chemistry*, 48, 165-168.

- Williams, D.J., Pun, S., Chaliha, M., Scheelings, P., O'Hare, T. (2013). **An unusual combination in papaya (*Carica papaya*): The good (glucosinolates) and the bad (cyanogenic glycosides)**. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 82-86.
- Winston, W., Regoli, F., Dugas, J., Fong, H., Blanchard, K. (1998). **A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids**. *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 480-493.
- Wolfe, K., Liu, R. (2008). **Structure-Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8404-8411.
- Wolfe, K., Liu, R. (2007). **Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8896-8907
- World Health Organization-WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO, (2009). **Codex Alimentarius, Norma general del Codex para los aditivos alimentarios, Codex Stan 192-1995, Revision 2009. Antioxidantes en grasas y aceites**. WHO/FAO, pp. 89, 91, 133, 171.
- World Health Organization-WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO. (2009). **Codex Alimentarius, Norma general del Codex para los aditivos alimentarios, Codex Stan 192-1995, Revision 2009. Antioxidantes en carnes y derivados cárnicos**. WHO/FAO, p. 133, 171.
- Wright, B., Frye, S., McMinn, D., Smith, R. (1987). **On-Line Supercritical Fluid Extraction-Capillary Gas Chromatography**. *Analytical Chemistry*, 59, 640-644.
- Wu, C-H., Yeh, C-T., Yen, G-C. (2010). **Epigallocatechin gallate (EGCG) binds to low-density lipoproteins (LDL) and protects them from oxidation and glycation under high-glucose conditions mimicking diabetes**. *Food Chemistry*, 121, 639-644.
- Wu, S., Tsai, J., Chang, S., Lin, D., Wang, S., Huang S., Ng, L. (2006). **Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana***. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 407-413.
- Yang, C., Lee, M., Hsueh, S., Chang, C. (2007). **Supercritical fluids extraction of capillarisin from *Artemisia capillaries* and its inhibition of in vitro growth of hepatoma cells**. *Journal of Supercritical Fluids*, 42, 96-103.
- Yang, H., Jiang B., Reynertson, K., Basile, M., Kennelly, E. (2006). **Comparative Analyses of Bioactive Mamea Coumarins from Seven Parts of *Mammea americana* by HPLC-PDA with LC-MS**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4114-4120.
- Yang, H., Protiva, P., Gil, R., Jiang, B., Baggett, S., Basile, M., Reynertson, K., Weinstein, I. Kennelly, E. (2005). **Antioxidant and Cytotoxic Isoprenylate Coumarins from *Mammea Americana***. *Planta Medica*, 71, 852-860.
- Yang, Y., Chang, F., Wu, C., Wang, C., Wu Y. (2002). **New ent-Kaurane Diterpenoids with Anti-Platelet Aggregation Activity from *Annona squamosa***. *Journal of Natural Product*, 65, 1462-1467

- Yang, Y., Hawthorne, S., Miller, D. (1995). **Estimating flow-rates for sub- and supercritical fluid extractions with linear restrictors.** *Journal of Chromatography A*, 690, 131-139.
- Yepez, B., Espinosa, M., López, S., Bolaños, G. (2002). **Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction.** *Fluid Phase Equilibria*, 879-884.
- Yilmaz, Y., Toledo, R. (2006). **Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols.** *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 41-48.
- Zamorano, M., Pérez, J., Aguilar, I., Ramos, A. (2007). **Study of the energy potential of the biogas produced by an urban waste landfill in Southern Spain.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11, 909-922.
- Zancan, K., Marques, M., Petenate, A., Meireles, A. (2002). **Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO<sub>2</sub> and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts.** *Journal of Supercritical Fluids*, 24, 57-76.
- Zetzel, C., Brunner, G., Meireles, A. (2003). **Standardized low-cost batch SFE units for university education and comparative research.** in: 6th International Symposium on Supercritical Fluids, Versailles.
- Zhang, A., Tim Chan, P., Shun Luk, P., Kwok Keung Ho, W., Chen, Z-Y. (1997). **Inhibitory effect of jasmine green tea epicatechin isomers on LDL-oxidation.** *Nutritional Biochemistry*, 8, 334-340.
- Zhang, S.M., Hunter, D.J., Rosner, B.A., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Speizer, F.E. (2000). **Intakes of fruits, vegetables, and related nutrients and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among women.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers Prevention*, 9, 477-485.
- Zheng, G., Xu, L., Wua, P., Xie, H., Jiang, Y., Chen, F., Wei X. (2009). **Polyphenols from longan seeds and their radical-scavenging activity.** *Food Chemistry*, 116, 433-436.
- Zhou, L., Elias, R.J. (2013). **Antioxidant and pro-oxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of pH and phenolic concentration.** *Food Chemistry*, 138, 1503-1509.
- Ziémons, E., Barillaro, V., Rozet, E., Wandji Mbakop, N., Lejeune, R., Angenot, L., Thunus, L., Hubert, Ph. (2007). **Direct determination of tagitinin C in *Tithonia diversifolia* leaves by on-line coupling of supercritical carbon dioxide extraction to FT-IR spectroscopy by means of optical fibres.** *Talanta*, 71, 911-917.
- Zsolnai, T. (1966). **Antimicrobial effect of thiocyanates and isothiocyanates.** *Arztliche Forschung*, 16, 870-876.