



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Actividad antioxidante de los residuos
del aguacate Hass (*Persea americana*
Mill. var Hass) sometidos a extracciones
clásicas y a fluidos presurizados

Wilson Polania Barreto

Código: 285587

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2014

Actividad antioxidante de los residuos
del aguacate Hass (*Persea americana*
Mill. var Hass) sometidos a extracciones
clásicas y a fluidos presurizados

Wilson Polania Barreto
Código: 285587

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Química

Director:
Fabián Parada Alfonso
Químico Dr. Ciencias Química

Línea de Investigación:
Química Agroalimentaria y Ambiental
Grupo de Investigación:
Estudio de los cambios químicos y Bioquímicos de alimentos frescos y procesados

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2014

*A Dios
por haberme permitido llegar hasta este punto y
haberme dado salud, ser el manantial de vida y darme
lo necesario para seguir adelante día a día para lograr
mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

*A mi madre
por la motivación constante,
que me ha permitido ser una persona de bien,
pero más que nada, por su amor.*

*A todos los docentes
quienes han confiado en mis aptitudes y capacidades
para culminar con éxito este trabajo.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por abrir sus puertas para permitirme formarme primero como profesional y culminar mis estudios de Maestría. También por permitirme ser parte de su personal docente bajo el cargo de docente ocasional en el área de la química orgánica (Art. 3o. y 4o Acuerdo 73/86 CSU) y como Becario de exención (Capítulo V Acuerdo 028/2010 CSU).

Al Departamento de Química de la Universidad de los Andes, profesor Wolfram Baumann y al químico Edwin Guevara por su apoyo en la realización de los análisis cromatográficos.

Al proyecto Red Nacional de Prospección de Frutas Tropicales (**Rifrutbio**), Proyecto III, por brindarme su apoyo al admitirme como miembro de esta gran red, enfocada en el aprovechamiento del potencial de la biodiversidad aportando en el desarrollo económico y científico del país.

Al profesor Fabián Parada Alfonso por su dirección para la culminación del presente trabajo, además de brindarme apoyo durante el curso de la Maestría.

A la profesora Patricia Restrepo Sánchez por acogerme en el grupo de investigación: “Estudio de cambios químicos y bioquímicos de alimentos frescos y procesados”.

Al profesor Ignacio Rodríguez del Departamento de Ingeniería Química, por su apoyo en el mantenimiento de los equipos del laboratorio de Alta Presión.

A todos mis compañeros de laboratorio y amigos del Departamento de Química, quienes no solamente aportaron al presente trabajo sino me brindaron su valiosa amistad.

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo financiero de:

1. La Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales-RIFRUTBIO (Código COLCIENCIAS 550854332012).

2. La Vicerrectoría de Investigación-Dirección de Investigación Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia, CONVOCATORIA DEL PROGRAMA NACIONAL DE PROYECTOS PARA EL FORTALECIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN, LA CREACIÓN Y LA INNOVACIÓN EN POSGRADOS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA 2013-2015-Modalidad 2. Proyecto: OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE TÉCNICAS EMERGENTES A PARTIR DE FUENTES NO TRADICIONALES (código 20723; quipu: 201010021420).

Resumen

El presente trabajo exploró la posibilidad de obtener extractos, a partir de semillas y epicarpio de aguacate Hass (*Persea americana* Mill. var. Hass), capaces de proteger la oleína de palma (OP) y la carne de res cruda (CR) de la oxidación lipídica; se empleó extracción soxhlet (E.Sox.) a presión reducida (Pred) usando tanto de forma directa como sucesiva hexano, acetato de etilo y etanol. En el caso de la oleína, con el extracto más activo se realizó un ensayo acelerado de oxidación durante 3 días, con una alta correlación frente al ensayo de oxidación convencional (Pearson \geq 0,93), por lo que éste se empleó en evaluaciones posteriores de actividad antioxidante (AA) sobre OP. Posteriormente se evaluó la AA del mejor extracto contra el correspondiente obtenido mediante E.Sox. a presión atmosférica (Patm, 560 mm Hg). Tanto para OP como para CR se encontró que la semilla fue más promisorio que el epicarpio sometidos a extracción soxhlet a presión reducida. Posteriormente esta biomasa fue sometida a extracción con fluidos supercríticos (EFSc) con cosolvente. El extracto que mejor protegió la OP contra la oxidación lipídica fue obtenido con CO₂ a 100 MPa, 40°C con 3% de EtOH como co-solvente (extracto 5); para CR el mejor extracto fue obtenido mediante extracción soxhlet a presión reducida con AcOEt luego de desengrasar con hexano. Finalmente los extractos con mayor AA en cada matriz grasa fueron sometidos a fraccionamiento por cromatografía en columna, empleando Diaion HP-20 como fase estacionaria. La AA de los extractos fue similar a la de las fracciones, por lo que se recomienda no fraccionar los correspondientes extractos; al someter las fracciones más activas de los respectivos extractos a análisis por HPLC-MS, se determinó, de forma preliminar, la presencia de compuestos con fórmula condensada C₁₆H₃₅N, C₂₇H₄₁NO₂, C₂₀H₃₄N₂O₆ y C₂₅H₃₄O₄.

Palabras clave: Oxidación lipídica, extracción soxhlet, extracción con fluidos supercríticos, *Persea americana* Mill.

Abstract

This paper explored the possibility of obtaining extracts from seeds and epicarp of Hass avocado (*Persea americana* Mill. var. Hass), they were able to protect palm olein (PO) and raw beef (CR) of lipid oxidation; soxhlet extraction (E.Sox.) was used under reduced pressure (Pred) using both, directly and successively hexane, ethyl acetate and ethanol. For olein, with the most active extract, accelerated oxidation for 3 days, with a high correlation with the conventional oxidation test (Pearson \geq 0,93) was carried out, so this test was used in subsequent evaluations of antioxidant activity (AA) on OP. Subsequently the AA from the best extract was evaluated against the corresponding obtained by E.Sox. at atmospheric pressure (Patm, 560 mm Hg). For OP and CR was found that the seed was more promising than the epicarp under soxhlet extraction at reduced pressure. Later this biomass was extracted with supercritical fluids (EFSC) with cosolvent. The best extract than protected olein against OP lipid oxidation was obtained with CO₂ at 100 MPa, 40 ° C with 3% EtOH as co-solvent (extract 5); for CR the best extract was obtained by Soxhlet extraction with AcOEt at reduced pressure after the biomass was degreasing with hexane also at reduced repressure. Finally, the extracts with better AA in every fat matrix were subjected to fractionation by column chromatography using Diaion HP-20 as stationary phase. The AA for the extracts was similar to the fractions, so it's recommended not divide the corresponding extracts; by subjecting the most active fractions of the respective extracts to HPLC-MS analysis was determined in a preliminary manner, the presence of compounds with condensed formula C₁₆H₃₅N, C₂₇H₄₁NO₂, C₂₀H₃₄N₂O₆ y C₂₅H₃₄O₄.

Keywords: lipid oxidation, soxhlet extraction, supercritical fluid extraction, *Persea americana* Mill

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VI
Lista de figuras.....	X
Lista de tablas.....	XII
Lista de símbolos y abreviaturas	XV
Introducción	1
1. Marco teórico	5
1.1 Generalidades del aguacate	5
1.2 Taxonomía y morfometría del fruto.....	6
1.3 El consumo del aguacate, beneficios.....	7
1.4 Aprovechamiento de los residuos de aguacate.....	9
1.5 Antioxidantes.....	11
1.5.1 Antioxidantes en alimentos	11
1.5.2 Oxidación de grasas y aceites y mecanismos de acción de los antioxidantes.....	12
1.6 Clasificación de los antioxidantes.....	13
1.6.1 Antioxidantes primarios	13
1.6.2 Antioxidantes secundarios.....	15
1.7 Antioxidantes naturales y sintéticos	16
1.8 Evaluación de la actividad antioxidante	18
1.9 Extracción con fluidos supercríticos	19
1.9.1 Definición e historia.....	19
1.9.2 Propiedades físicas.....	20
1.9.3 CO ₂ como fluido supercrítico.....	25
1.9.4 Pasos del proceso de extracción.....	25
1.9.5 Instrumentación.....	26
1.9.6 Aplicaciones de los FSC a nivel laboratorio e industria	27

2. Metodología	29
2.1 Materiales y reactivos	30
2.1.1 Muestras.....	30
2.1.2 Reactivos.....	31
2.2 Obtención de los extractos.....	31
2.2.1 Extracción Soxhlet	31
2.2.2 Extracción con fluidos supercríticos (EFSc).....	33
2.3 Contenido total de fenoles (CTF).....	36
2.4 Contenido total de flavonoides (CTFI).....	36
2.5 Actividad antioxidante en oleína de palma.....	36
2.6 Actividad antioxidante en carne de res cruda.....	37
2.7 Análisis de los productos de oxidación lipídica	38
2.7.1 Medida de los hidroperóxidos lipídicos	38
2.7.2 Medida de las especies reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS).....	38
2.8 Fraccionamiento y Análisis HPLC-MS.....	38
2.9 Análisis estadístico.....	40
3. Resultados y discusión.....	41
3.1 Extracción soxhlet.....	41
3.1.1 Rendimiento	42
3.1.2 Contenido total de fenoles.....	44
3.1.3 Contenido total de flavonoides.....	45
3.1.4 Actividad antioxidante.....	46
3.2 Extracción por fluidos supercríticos (EFSc).....	60
3.2.1 Rendimiento	60
3.2.2 Contenido total de fenoles.....	67
3.2.3 Contenido total de flavonoides.....	68
3.2.4 Actividad antioxidante.....	69
3.3 Fraccionamiento y análisis por HPLC-MS	77
3.3.1 Fraccionamiento	77
3.3.2 Actividad antioxidante en oleína de palma.....	77
3.3.3 Actividad antioxidante en carne de morrillo.....	81
3.3.4 Análisis por HPLC-MS	84
4. Conclusiones	88
Recomendaciones	89
Bibliografía.....	90
Anexos.....	96

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Descripción del fruto del aguacate.	5
Figura 2. Serotonina 5-hidroxitriptamina (5-HT).....	8
Figura 3. β -sitosterol, principal esteroles encontrado en pulpa de aguacate.	8
Figura 4. Crisantemaxantina, pigmento mayoritario en pulpa de aguacate.	8
Figura 5. Reacciones generales del proceso de autooxidación.	12
Figura 6. Posibles interacciones de los antioxidantes primarios y secundarios con la ruta de oxidación lipídica en alimentos.	14
Figura 7. Híbridos de resonancia del radical fenoxilo de un antioxidante fenólico.....	14
Figura 8. Estructuras químicas de antioxidantes sintéticos comúnmente usados en grasas y aceites.	16
Figura 9. Mecanismo de actividad antioxidante de un derivado de dihidroxibenceno.	17
Figura 10. Digestor de Papin o Marmita de Papin. Sirve para someter un sistema a una presión elevada.	20
Figura 11. Diagrama PVT de una sustancia pura (CO_2) y su proyección en el plano PT....	20
Figura 12. Variación de la densidad de un fluido supercrítico en función de la presión a diferentes temperaturas.	23
Figura 13. Variación de la densidad de un fluido supercrítico en función de la presión a diferentes temperaturas.	24
Figura 14. Variación de la viscosidad de un fluido supercrítico en función de la presión a diferentes temperaturas.	24
Figura 15. Diagrama de flujo para un proceso de extracción empleando fluidos supercríticos.	26
Figura 16. Esquema resumido sobre la metodología desarrollada.	29
Figura 17. Mapa ubicación de la vereda Tasajo (Sonsón, Antioquia). Tomado de https://maps.google.es/ . Fecha de consulta 29/08/2013	30
Figura 18. Metodología para el proceso de extracción soxhlet a presión reducida.	32
Figura 19. Diagrama equipo de extracción con fluidos supercríticos.....	35

Figura 20. ACP para el ensayo de oxidación lipídica. La última letra del extracto corresponde al tipo de biomasa.....	51
Figura 21. Cinética de oxidación de HPL para los extractos más promisorios.	52
Figura 22. Cinética de oxidación de TBARS para los extractos más promisorios.	52
Figura 23. ACP para el ensayo de oxidación de carne de morrillo.	58
Figura 24. Optimización del número de batches de la EFSc.	61
Figura 25. Coeficientes del modelo sinergista para el rendimiento de extracción.	63
Figura 26. Residuales para cada uno de los ensayos.....	65
Figura 27. Gráfica de curvas de nivel del rendimiento en función de la presión y la temperatura.	66
Figura 28. Gráfica de superficie del rendimiento de extracción en función de la temperatura y la presión de extracción.	66
Figura 29. ACP para el ensayo de oxidación lipídica en oleína para los extractos obtenidos por EFSc.....	72
Figura 30. Diagrama de dispersión para el ACP de los extractos obtenidos por EFSc adicionados a carne de morrillo.	76
Figura 31. Diagrama de dispersión para la AA en oleína para las fracciones del extracto más activo.....	80
Figura 32. ACP para las fracciones del extracto más activo para carne de morrillo cruda. .	83
Figura 33. Cromatograma de F1-5.	84
Figura 34. Cromatograma de F1-2S.	84
Figura 35. Espectro de masas del compuesto con t_r 38,8 min.....	85
Figura 36. Espectro de masas del compuesto con t_r 50,4 min.....	86
Figura 37. Espectro de masas del compuesto con t_r 54,4 min.....	86

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Resultados estudio morfométrico del aguacate Hass.	6
Tabla 2. Porcentaje de humedad para la semilla y epicarpio del fruto de aguacate Hass.....	7
Tabla 3. Estudios realizados sobre residuos del aguacate Hass	9
Tabla 4. Compuestos que exhiben actividad antioxidantes secundaria.....	15
Tabla 5. Antioxidantes primarios comúnmente usados en alimentos.....	18
Tabla 6. Condiciones supercríticas de algunos compuestos puros (Yépez, 2010).....	21
Tabla 7. Comparación entre las propiedades físicas de los fluidos supercríticos con la de los líquidos y la de los gases.....	22
Tabla 8. Algunos ejemplos del empleo de FS en la obtención de extractos a partir de fuentes naturales	28
Tabla 9. Dominio experimental.	33
Tabla 10. Diseño central compuesto	34
Tabla 11. Composición de fases móviles para el fraccionamiento del extracto más activo ...	39
Tabla 12. Resumen descriptivo del promedio de los rendimientos de extracción por extracción soxhlet a presión reducida.	42
Tabla 13. Análisis de Tukey de los valores del rendimiento de extracción por soxhlet a presión reducida.....	43
Tabla 14. Contenido total de fenoles para cada uno de los extractos obtenidos por extracción soxhlet a presión reducida.	44
Tabla 15. Contenido total de flavonoides para cada uno de los extractos obtenidos a presión reducida.	45
Tabla 16. Cuantificación de los HPL producidos durante la oxidación de oleína adicionada con antioxidantes y con extractos.....	47
Tabla 17. Cuantificación de los TBARS producidos durante la oxidación de oleína adicionada con antioxidantes y con extractos.....	47
Tabla 18. Valores de varianza explicada y varianza acumulada para el ACP.....	49
Tabla 19. Matriz de componentes rotada.	50

Tabla 20. Comparación del CTF y CTFI para el extracto más promisorio, obtenido a presión atmosférica (5Satm) y a presión reducida (5S).	54
Tabla 21. Cinética de oxidación para la oleína producida mediante el método de oxidación acelerado.	54
Tabla 22. Cuantificación de los HPL formados durante la oxidación de carne de morrillo adicionada con antioxidantes y con extractos.	55
Tabla 23. Cuantificación de TBARS formados durante la oxidación de la carne de morrillo adicionada con antioxidantes y con extractos.	56
Tabla 24. Varianza y varianza acumulada para el ACP.	56
Tabla 25. Valores de loading para los dos primeros componentes principales.	57
Tabla 26. Comparación del CTF y CTFI para el extracto más promisorio obtenido a presión atmosférica (2Satm) y a presión reducida (2S).	59
Tabla 27. Valores de HPL y TBARS en carne para el extracto más activo P. reducida vs. P. atmosférica.	59
Tabla 28. Resultados Diseño central compuesto.	62
Tabla 29. Análisis de varianza del diseño central compuesto	63
Tabla 30. ANOVA modelo lineal con una interacción de primer grado.	64
Tabla 31. Valores estimados del rendimiento según el modelo propuesto.	65
Tabla 32. CTF para los extractos obtenidos por EFSc.	67
Tabla 33. CTFI para los extractos obtenidos por EFSc.	68
Tabla 34. Cinética de oxidación de los HPL para los extractos obtenidos por FSc evaluados en oleína por el método de oxidación acelerado.	70
Tabla 35. Cinética de oxidación de los TBARS para los extractos obtenidos por FS evaluados en oleína por el método de oxidación acelerado.	71
Tabla 36. Varianza total y varianza acumulada para el ACP.	71
Tabla 37. Loadings para los dos primeros compontes del ACP.	71
Tabla 38. Hidroperóxidos formados durante la oxidación de carne de morrillo adicionado con antioxidantes comerciales y con extractos obtenidos por EFSc.	73
Tabla 39. TBARS formados durante la oxidación de carne de morrillo adicionado con antioxidantes comerciales y con extractos obtenidos por EFSc.	74
Tabla 40. Varianza explicada y varianza acumulada para el ACP.	75
Tabla 41. Loadings para los dos primeros componentes principales.	75
Tabla 42. Rendimiento de las fracciones para cada uno de los extractos más activos.	77
Tabla 43. Cuantificación de los HPL generados en oleína.	77
Tabla 44. Cuantificación de los TBARS generados en oleína.	78
Tabla 45. Valores de varianza explicada y varianza acumulada para el ACP.	78

Tabla 46. Matriz de componentes rotada.	79
Tabla 47. Cuantificación de los HPL en carne de morrillo	81
Tabla 48. Cuantificación de los TBARS en carne de morrillo	81
Tabla 49. Valores de varianza explicada y varianza acumulada para cada	82
Tabla 50. Matriz de componentes rotada ACP.	82
Tabla 51. Análisis del espectro de masas del compuesto con t_r 38,8 min.....	85
Tabla 52. Análisis del espectro de masas del compuesto con t_r 50,4 min.	86
Tabla 53. Análisis del espectro de masas $t_r=54,4$ min.	87

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>AA</i>	Actividad antioxidante
<i>AcOEt</i>	Acetato de etilo
<i>ACP</i>	Análisis de componentes principals
<i>CR</i>	Carne de res (morrillo)
<i>CTF</i>	Contenido total de fenoles
<i>CTFI</i>	Contenido total de flavonoides
<i>CUPRAC</i>	Capacidad antioxidante en reducción del ion cúprico
<i>DPPH</i>	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
<i>E</i>	Epicarpio
<i>E.Sox.</i>	Extracción soxhlet
<i>EtOH</i>	Etanol
<i>FRAP</i>	Poder antioxidante en capacidad de reducir el ion férrico
<i>Hex</i>	Hexano
<i>HPL</i>	Hidroperóxidos del ácido linoleico
<i>OP</i>	Oleína de palma
<i>ORAC</i>	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
<i>Patm</i>	Presión atmosférica
<i>Pred</i>	Presión reducida
<i>S</i>	Semilla
<i>TBARS</i>	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
<i>TEAC</i>	Capacidad antioxidante como equivalentes de Trolox
<i>Trolox</i>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

Introducción

En nuestro país, algunas frutas son sometidas a procesos industriales, obteniendo así, gran número de productos terminados, como jugos y mermeladas. A partir de dichos procesos y del consumo en fresco por parte de la población, se genera una cantidad considerable de residuos, de los cuales recientemente se ha motivado su estudio como fuente de metabolitos con diferentes propiedades de interés para la industria alimentaria, como es el caso de la actividad antioxidante, parte central del presente trabajo. No obstante, también pueden presentar otros tipos de actividad, como son: citotóxica, diurética, hipocolesterémica, larvicida, insecticida, entre otros ([Jaswir *et al.*, 2000](#); [Karre *et al.*, 2013](#); [Pahua *et al.*, 2012](#)).

Respondiendo a la anterior expectativa, el presente trabajo propone nuevas formas de aprovechamiento de los residuos del fruto del aguacate Hass (*P. americana*), mediante la obtención de extractos con actividad antioxidante aplicables en matrices grasas alimenticias ([Kosinska *et al.*, 2012](#)). Para lograr lo anterior, se obtienen extractos de epicarpio y de semillas de aguacate, empleando diferentes técnicas. Cada uno de los extractos, por separado, fueron evaluados como agentes protectores frente a la oxidación de OP ([Bansal *et al.*, 2010](#); [Muik *et al.*, 2005](#)) y CR ([Farouk *et al.*, 2014](#)), realizando un estudio comparativo mediante ACP.

1. Marco teórico

1.1 Generalidades del aguacate

Se considera que la especie que dio origen al aguacatero proviene de la zona montañosa del occidente de México y Guatemala. Su distribución natural va desde México hasta Perú, pasando por Centro América, Venezuela, Colombia y Ecuador (Bernal *et al.*, 2008).

Después del descubrimiento y conquista de América el cultivo del aguacate fue diseminado a Centro América, Colombia y Perú, y finalmente a otros lugares del mundo, como es Europa, Sur África, Sur América y Asia (Bernal *et al.*, 2008).

El fruto del aguacate es una baya que posee un endocarpio delgado y un mesocarpio carnoso y oleaginoso, rodeado del epicarpio que es de textura rugosa, en el caso de la variedad Hass, ver **figura 1**. En Colombia, el aguacate Hass de mayor aceptación proviene de los municipios de La Ceja, Retiro, Guarne, San Vicente, Rionegro, Marinilla, Sonsón y Abejorral (Antioquia) (DANE, 2013).

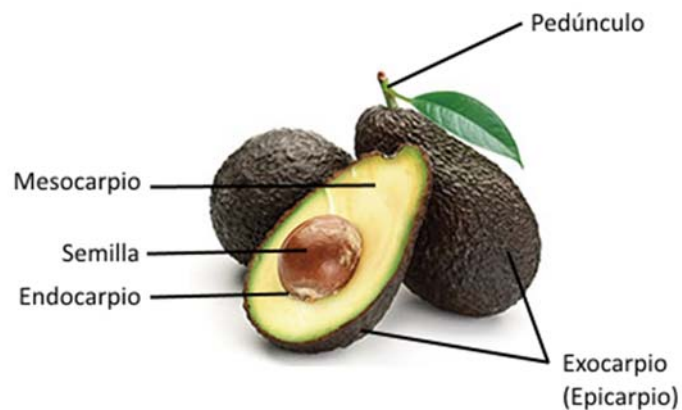


Figura 1. Descripción del fruto del aguacate.

1.2 Taxonomía y morfometría del fruto

Nombre científico: *Persea americana* Miller variedad Hass

Reino:	Vegetal
División :	Spermatophyta
Subdivisión:	Angiospermae
Clase:	Dicotyledoneae
Subclase:	Dipétala
Orden:	Ranales
Familia:	<i>Lauraceae</i>
Genero:	<i>Persea</i>
Especie:	<i>Persea americana</i> Miller
Variedad:	Hass

Los frutos de aguacate Hass son de tamaño pequeño, su peso oscila entre 150 a 400 g, es de forma ovoide periforme, con epicarpio rugoso, de color verde que en estado de madurez consumible se torna de color pardo intenso (a los 15 días de recolección, aprox.), el contenido de grasa de este fruto es de 17 a 21% en base húmeda. En Colombia se cultiva en climas fríos en alturas de 1800 a 2600 msnm, la relación en peso de epicarpio: semilla: pulpa es 8,5:11,5:70, su pulpa es abundante y de color verde claro, la semilla es pequeña; dadas sus características sensoriales, su intensidad de producción y su tardía época de maduración esta variedad es la de mayor volumen de producción y comercialización en el mundo. Además, hay que indicar que el fruto puede mantenerse bastante tiempo en el árbol sin disminuir apreciablemente su calidad y se comporta bien en el transporte debido a su corteza tosca y gruesa, y los parámetros de calidad para la exportación del fruto están referidos a esta variedad (Bernal *et al.*, 2008).

Para el presente trabajo, los frutos de aguacate sobre los cuales se realizó el estudio fueron sometidos a un estudio morfométrico con el propósito de verificar que éstos corresponden a la variedad Hass. El estudio morfométrico implicó medidas de la longitud, ancho, peso, grosor del epicarpio, peso del epicarpio, ancho de la semilla, peso de la semilla, la relación en peso del epicarpio respecto al fruto global (w/w) y finalmente la relación de la semilla respecto al fruto global (w/w). Los resultados se resumen a continuación en la **tabla 1**. También se determinó el porcentaje de humedad por gravimetría, ver **tabla 2**. A partir de los reportes por otros autores (Rodríguez *et al.*, 2011a), se concluyó que se está trabajando con la variedad Hass.

Tabla 1. Resultados estudio morfométrico del aguacate Hass.

Parámetro	Resultado	Rodriguez et al., 2011
longitud del fruto (cm)	8,62 ± 0,66	11,2 ± 0,8
Ancho del fruto (cm)	6,37 ± 0,30	7,6 ± 0,2
peso del fruto (g)	181,6 ± 26,4	310,3 ± 17,4
Grosor del epicarpio (cm)	0,14 ± 0,03	1,6 ± 0,4
Peso del epicarpio (g)	24,5 ± 3,3	34,5 ± 3,7
ancho de la semilla (cm)	3,6 ± 0,4	3,8 ± 0,2
Peso de la semilla (g)	31,3 ± 8,0	40,5 ± 6,5
Relacion (epicarpio/fruto, w/w)	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,02
Relacion (semilla/fruto, w/w)	0,17 ± 0,03	0,13 ± 0,03

Tabla 2. Porcentaje de humedad para la semilla y epicarpio del fruto de aguacate Hass.

Biomasa	%Humedad	n	Rodriguez et al., 2011
Semilla	48,8 ± 2,1 a	5	55,7 ± 4,3
Epicarpio	74,3 ± 0,9 b	5	75,9 ± 1,6

1.3 El consumo del aguacate, beneficios

A partir de la pulpa se obtienen ácidos grasos furánicos y alcoholes grasos polihidroxilados, que son de utilidad en cosmética (Parker and Parker, 2003); se ha determinado que el consumo de 68 gramos de pulpa suministra fibra dietaria (4.6 g), azúcar total (0.2 g), potasio (345 mg), sodio (5.5 mg), magnesio (19.5 mg), vitamina A (43 µg), vitamina C (6.0 mg), vitamina E (1.3 mg), vitamina K1 (14 µg), folato (60 mg), vitamina B-6 (0.2 mg), niacina (1.3 mg), ácido pantoténico (1.0 mg), riboflavina (0.1 mg), cloruro (10 mg), luteína/zeaxantina (185 µg), fitosteroles (57 mg), ácidos grasos insaturados (6.7 g) y 114 kcal ó 1.7 kcal/g. Su consumo tiene una influencia positiva en la memoria a corto plazo y reduce el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. La pulpa también es rica en serotonina 5-hidroxitriptamina (figura 2) (5-HT), que es un neurotransmisor monoamina molécula de señalización que juega un papel crucial en el desarrollo de los circuitos neuronales y plasticidad, compuesto que se ha reportado en otras frutas como bananas, ciruelas, piña, kiwi y tomate. El aceite de aguacate tan apetecido en la industria cosmética y alimentaria contiene 71% de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), 13% de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y 16% de ácidos grasos saturados (SFA) (Dreher and Davenport, 2013).

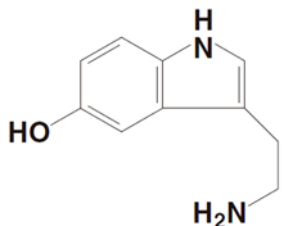


Figura 2. Serotonina 5-hidroxitriptamina (5-HT).

El ácido graso principal identificado y cuantificado en el aguacate fue el ácido oleico (aproximadamente 57% del contenido total de ácidos grasos), encontrándose también ácido linoleico, palmítico, cis-vaccénico (omega 7), y ácidos- γ -linolénico (de la serie omega 6). El esteroil principalmente encontrado (alrededor de 89% del contenido total de esteroides) fue el β -sitosterol (**figura 3**) junto al estigmasterol y campesterol. El pigmento más abundante hallado fue la crisantemaxantina [(3S,3'S,5R,8S,9cis)-5,8-Dihidro-5,8-epoxy- β,β -carotene-3,3'-diol] (**figura 4**) (Dembitsky *et al.*, 2011).

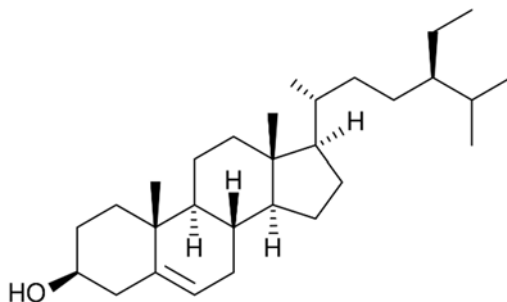


Figura 3. β -sitosterol, principal esteroil encontrado en pulpa de aguacate.

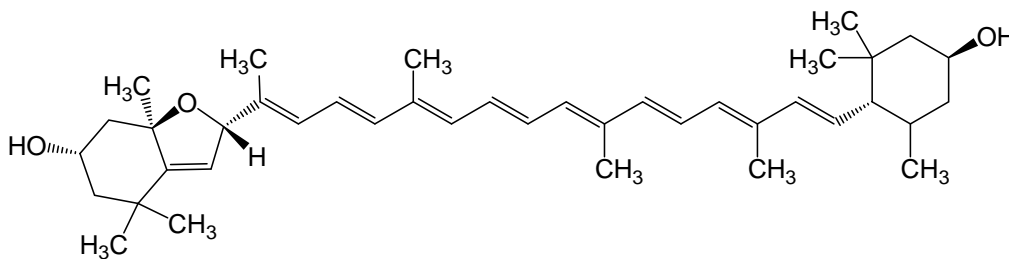


Figura 4. Crisantemaxantina, pigmento mayoritario en pulpa de aguacate.

Estudios han mostrado que fitoquímicos, como ciertos derivados del ácido abscísico, extraídos del fruto (pulpa) inducen la interrupción del ciclo celular, inhiben el crecimiento e inducen la apoptosis en líneas celulares precancerosas y cancerosas, sugiriendo una estrategia en la dieta para la prevención del cáncer (Ding *et al.*, 2007). Además se ha encontrado que el contenido de glutatión y de fenoles totales aumenta a medida que madura el fruto, observando comportamiento similar en su actividad antioxidante (FRAP, DPPH) (Wang *et al.*, 2012) e hipolipidémica (Padmanabhan and Arumugam, 2014).

1.4 Aprovechamiento de los residuos de aguacate

Después de la transformación industrial, aprovechamiento o consumo del fruto, se tienen materiales residuales (semilla y epicarpio) que podrían ser fuente potencial para complementos alimenticios por los metabolitos presentes en ellos (Ayala *et al.*, 2011). Los Aztecas utilizaban cocciones de la semilla como tratamiento micótico e infecciones parasitarias, también, ciertas preparaciones de la semilla reducen el dolor al ser aplicado como tónico (Del Refugio *et al.*, 2004).

Estudios fitoquímicos previos realizados sobre la semilla del aguacate se han identificado diferentes clases de metabolitos entre los que se encuentran glucósidos del ácido abscísico, importantes en la maduración del embrión (Del Refugio *et al.*, 2004), fitosteroles, triterpenos (Werman *et al.*, 1990; Lozano *et al.*, 1993), ácidos grasos con enlaces oleofínicos y acetilénicos (Kashman *et al.*, 1969), ácidos furanoicos (Farines *et al.*, 1995), dímeros de flavanoles (Geissman and Dittmar, 1965), proantocianidinas oligoméricas (Thompson *et al.*, 1972; Valeri and Gimeno, 1953), polifenoles y antocianinas (Hurtado *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). Por otra parte, los extractos de semillas obtenidos empleando acetona/agua/ácido acético han mostrado actividad frente al ensayo de absorbancia del radical oxígeno (ORAC) (Wang *et al.*, 2012) y la inactivación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Wang *et al.*, 2010). Los extractos de la semilla empleando cloroformo como solvente, fueron activos frente a la proliferación de líneas de células epiteliales orales (Ding *et al.*, 2007).

A continuación en la **tabla 3**, se resumen los últimos trabajos realizados sobre los residuos de aguacate Hass, junto al método de extracción empleado, el potencial uso de los extractos y el tipo de compuestos presentes en dichos extractos.

Tabla 3. Estudios realizados sobre residuos del aguacate Hass.

Residuo	Método de extracción y referencias	Usos potenciales	Compuestos aislados
Semilla	Maceración con acetona (1:2 w/v), 24 h, 25°C (Rodríguez <i>et al.</i> , 2013)	Antimicrobiano (<i>Clostridium sporogenes</i>)	Acetogeminas(trans-enona)
Semilla	Maceración con metanol de semillas desengrasadas previamente con hexano. (Del Refugio <i>et al.</i> , 2004).	N.A.	Derivados glucosidados del ácido abscísico
Semilla	Soxhlet P. atm., MeOH (Asaolu <i>et al.</i> , 2010)	Hipolipidémica	Ácido protocacécico, Ácido clorogénico, Ácido siríngico, Ácido vanílico, Rutina Kaempferol, kaempferide
Semilla (Pulpa) Epicarpio	Maceración empleando acetato de etilo, acetona/agua (70:30 v/v), Metanol/agua (70:30 v/v) a razón de 1 g/3 mL. (Pahua <i>et al.</i> , 2012)	Antimicrobiano (<i>Staphylococcus aureus</i>) Oxidación lipídica y de proteínas en carne de cerdo.	N.A.
Semilla Epicarpio	Maceración empleando acetona/agua (70:30 v/v), a razón de 1 g/3 mL. (Rodríguez <i>et al.</i> , 2011a; Rodríguez <i>et al.</i> , 2011b)	Oxidación lipídica y de proteínas en carne de cerdo	N.A.
Semilla Epicarpio	Maceración Metanol 80%. Relación 1:8 (w/v), 60°C, 15 min. (Del Refugio <i>et al.</i> , 2004; Kosinska <i>et al.</i> , 2012)	TEAC, ORAC, FRAP	Monomeris de flavonoles proantocianidinas, acids hidroxicinánicos glucósidos de flavonoles
Epicarpio	Maceración, Agua (15g/1000 mL). (Pahua <i>et al.</i> , 2012; Chávez <i>et al.</i> , 2011)	Antibacterial, DPPH, CUPRAC, FRAP	Procianidinas derivadas de epicatequina
Semilla	Extracción soxhlet, MeOH. (Asaolu <i>et al.</i> , 2010; Rodríguez <i>et al.</i> , 2013)	Hipolipidémico en ratones	
Semilla	Maceración, agua (Nwagwuikpe and Braide, 2011; Rodríguez <i>et al.</i> , 2011a)	Hipolipidémico en conejos	Taninos, saponinas, flavonoides, alcaloides

Aunque la semilla del aguacate Hass representa un porcentaje considerable del total del fruto, la investigación sobre los efectos biológicos y fitoquímica de la semilla está en las etapas incipientes. Actualmente, la semilla representa un recurso infrautilizado y es tema de preocupación en cuanto a generación de residuos para los procesadores del aguacate ([Restrepo *et al.*, 2012](#)). Hay información etnofarmacológica especialmente en los países de América del Sur sobre el uso de estas semillas para el tratamiento de ciertas enfermedades, donde en la actualidad se cultiva en gran escala. Recientemente se ha encontrado que las semillas de aguacate pueden mejorar la hipercolesterolemia, y ser útiles en el tratamiento de la hipertensión, afecciones inflamatorias, diabetes y osteoartíricas. También se han encontrado que poseen actividad insecticida, fungicida y antimicrobiana. Históricamente, también se utilizaron extractos de semillas de aguacate como tinta para la escritura, junto al tinte producido cuando se usa una polifenol oxidasa sobre los mismos extractos ([Dabas *et al.*, 2013](#)).

1.5 Antioxidantes

Las grasas y aceites presentes en los alimentos se deterioran a través de varias reacciones de degradación como se muestra en la presente sección, estas reacciones se dan por efecto del calor y del almacenamiento a largo plazo, lo cual se traduce en una disminución del valor nutricional del alimento y de la calidad sensorial. Un retraso de estos procesos de oxidación beneficiaría a la cadena de producción de alimentos ([Pokorny *et al.*, 2001](#)). Existen diferentes definiciones de antioxidantes ([Wanasundara and Shahidi, 2005](#)), no obstante, en un sistema biológico, un antioxidante puede ser definido como “cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones en comparación al sustrato oxidable, retarda significativamente o previene la oxidación del sustrato”([Halliwell *et al.*, 1995](#)); como sustrato oxidable se puede considerar a un alimento, el cual tiene una variedad compleja de biomoléculas susceptibles a la oxidación, tales como proteínas y lípidos.

1.5.1 Antioxidantes en alimentos

En grasas y aceites, los antioxidantes retardan el inicio de la oxidación o disminuye la velocidad de oxidación; por tanto, el uso de antioxidantes en alimentos incrementa la vida útil o vida media del material ([Wanasundara and Shahidi, 2005](#)). La oxidación de lípidos produce compuestos con diferentes olores y sabores para luego afectar otras moléculas del alimento.

1.5.2 Oxidación de grasas y aceites y mecanismos de acción de los antioxidantes

La oxidación de los lípidos es la causa principal del deterioro de la calidad del alimento, produciendo malos olores, pérdida de aminoácidos esenciales y el deterioro de las vitaminas liposolubles (Shahidi and Zhong, 2005). En grasas y aceites, el proceso de oxidación, es similar a la oxidación de cualquier compuesto orgánico insaturado, se requiere de un proceso de iniciación para generar los radicales libres a partir del sustrato. A continuación se esquematiza un proceso general de oxidación de un lípido, “R” es un grupo alquilo de una molécula de lípido insaturada. “H” es un átomo de hidrógeno α -metilénico. “RO·” es un radical alcóxilo, “ROO·” radical peroxilo, “I” es un iniciador.

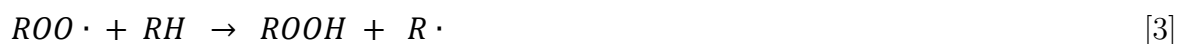


Figura 5. Reacciones generales del proceso de autooxidación.

La autooxidación es el deterioro oxidativo de un lípido por medio de un proceso auto-catalítico por medio de un mecanismo de radicales libres. Este mecanismo incluye reacciones de iniciación, propagación y terminación, a continuación describiremos en detalle cada una de ellas:

El proceso de iniciación genera radicales libres a partir del sustrato, el átomo de hidrógeno α -metilénico se abstrae de la molécula del lípido insaturado para generar un radical lipídico (R·) (**Figura 5**, ecuación [1]). El radical lipídico es altamente reactivo y reacciona rápidamente con oxígeno produciendo un radical peroxilo (ROO·) (**Figura 5**, ecuación [2]). La oxidación directa de lípidos por oxígeno triplete (3O_2) es prohibida por el espín, esto es debido a la dirección opuesta del espín del lípido en el estado basal de multiplicidad singulete y el oxígeno de multiplicidad triplete; sin embargo, cuando están presentes iniciadores, esta barrera de espín puede ser superada. El oxígeno en estado basal puede ser activado por la presencia de metales o complejos metálicos que pueden iniciar la oxidación por formación de radicales libres u oxígeno singulete. Otra forma de favorecer la oxidación de los lípidos es por acción de luz en presencia de fotosensibilizadores (clorofila, hemoproteínas, riovoflavina), temperatura, y/o la presencia de lipoxigenasa. Posteriormente, en las reacciones de propagación, el radical peroxilo

reacciona con otra molécula de lípido insaturada para formar un hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical lipídico (**figura 5**, ecuación [3]). Como se genera un nuevo radical en cada paso, se incorpora cada vez más oxígeno al sistema aumentando la concentración de radicales peroxilo, obteniendo por lo tanto un mecanismo cíclico auto-catalizado. Los hidroperóxidos son inestables y se pueden degradar a la formación de radicales que aceleran las reacciones de propagación, estos son pasos de ramificación (**figura 5**, ecuaciones [4] y [5]). Esta reacción en cadena procede hasta que dos radicales se combinan para formar un producto no radicalario. La degradación de los hidroperóxidos puede generar nuevas moléculas que tienen olores y sabores desagradables, asociada a la rancidez oxidativa de lípidos insaturados, tales cambios sensoriales son notados cuando la oxidación de los lípidos ha avanzado hasta etapas avanzadas. El malondialdehído es uno de los productos finales del proceso de oxidación lipídica, el cual es aceptado como un indicador de la peroxidación lipídica ([Alam *et al.*, 2013](#)).

Recientemente se determinó que los extractos obtenidos a partir de los residuos (semilla y epicarpio) de la pulpa del aguacate Hass obtenidos por maceración con acetona/agua 70:30, presentan actividad antioxidante frente a la oxidación lipídica en paté de carne de cerdo cruda ([Rodriguez *et al.*, 2011a](#); [Rodriguez *et al.*, 2011b](#)) y cocida ([Rodriguez *et al.*, 2012](#)).

1.6 Clasificación de los antioxidantes

Los antioxidantes pueden ser agrupados de forma general de acuerdo a su mecanismo de acción: antioxidantes primarios o de ruptura de cadena y secundarios o antioxidantes preventivos, aunque algunos antioxidantes muestran los dos mecanismos de actividad, a los cuales son referidos como antioxidantes multi-función.

1.6.1 Antioxidantes primarios

Los antioxidantes primarios también son referidos como tipo I, o antioxidantes de ruptura de cadena, los cuales pueden actuar como aceptores/secuestradores de radicales libres y retardar o inhibir los pasos de iniciación o interrumpir los pasos de propagación de la oxidación. Los antioxidantes primarios no pueden inhibir la oxidación fotosensibilizada o la eliminación de oxígeno singulete, la **figura 6** muestra los posibles eventos donde los antioxidantes pueden interferir a lo largo de la ruta de oxidación lipídica. Se ha encontrado que el paso de propagación es el más lento en el proceso de oxidación lipídica, debido a que los radicales peroxilo son encontrados en mayor cantidad que otros radicales, y al tener menor energía que los radicales alcóxilo, son más selectivos, y reaccionan con los átomos de hidrogeno presentes

en los antioxidantes primarios. Los radicales antioxidantes producidos ($A\cdot$) son menos propensos de participar en reacciones de propagación debido a que tienen una muy baja reactividad hacia lípidos insaturados u oxígeno, en lugar de ello, reaccionan con radicales peroxilo y así detiene la cadena de propagación.

La mayoría de los antioxidantes primarios son fenoles mono y polihidroxilados. El radical antioxidante formado es estabilizado por deslocalización del electrón desapareado alrededor del anillo fenólico para formar un híbrido estabilizado por resonancia, ver **figura 7**.

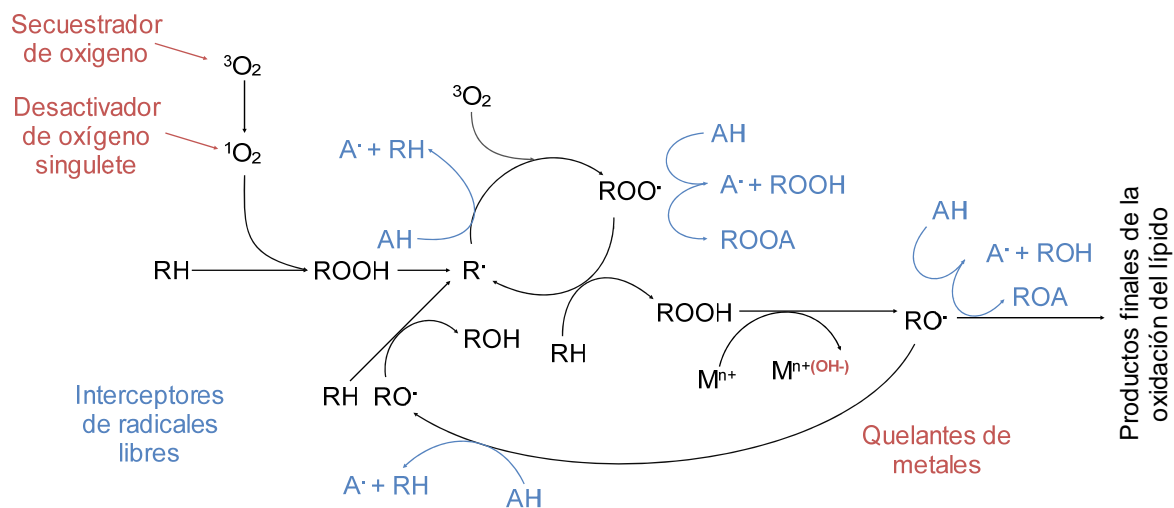


Figura 6. Posibles interacciones de los antioxidantes primarios y secundarios con la ruta de oxidación lipídica en alimentos.

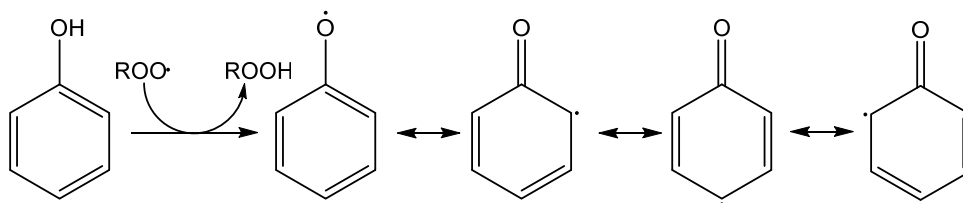


Figura 7. Híbridos de resonancia del radical fenoxilo de un antioxidante fenólico.

1.6.2 Antioxidantes secundarios

Los antioxidantes secundarios también son clasificados como antioxidantes preventivos, o de **clase II**, la principal diferencia con los antioxidantes primarios es que no convierten radicales libres hacia moléculas estables, sino que actúan como agentes quelantes de iones metálicos, proporcionando átomos de hidrógeno a los antioxidantes primarios, así como descomponer hidroperóxidos a especies no radicalarias, desactivando oxígeno singulete y absorber radiación UV, o actuando como secuestradores de oxígeno. La **tabla 4** muestra algunos ejemplos de compuestos que son considerados antioxidantes tipo II.

Tabla 4. Compuestos que exhiben actividad antioxidantes secundaria

Modo de actividad	Compuestos en uso
Quelantes de metales	Ácido cítrico, málico, succínico y tartárico. EDTA, fosfatos
Secuestrador de oxígeno y agentes reductores	Ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, ácido eritróxico, eritorbato de sodio, sulfitos
Desactivadores de oxígeno singulete	Carotenoides (β -caroteno, licopeno, luteína)

▪ Agentes secuestrantes/quelantes o desactivadores de metales

Metales pesados con dos o más estados de valencia acortan el periodo de inducción e incrementan la velocidad máxima de oxidación de los lípidos (p.ej. Co, Cu, Fe, Mn, etc), trazas de estos iones metálicos endógenos o exógenos están presentes en los alimentos que contienen lípidos. Los metales de transición pueden existir acomplejados (quelatos) con compuestos presentes en los alimentos, cambiando su actividad catalítica, la quelación puede incrementar la actividad prooxidante haciéndolos menos polares, incrementando su solubilidad en los lípidos o alterando su potencial redox. Los agentes quelantes pueden ejercer actividad antioxidante por prevención del conjunto de reacciones del ciclo redox, ocupando todos los sitios de coordinación del metal, formando complejos insolubles por impedimento estérico entre los metales y los lípidos. La quelación de estos iones metálicos reduce la actividad prooxidante elevando la energía de activación de las reacciones de iniciación. Los agentes antioxidantes secundarios forman enlaces sigma con los iones metálicos reduciendo el potencial redox y estabilizando la forma oxidada; los más comúnmente empleados son: ácido cítrico, EDTA y derivados del ácido fosfórico (polifosfatos y ácido fítico).

▪ **Secuestradores de oxígeno y agentes reductores**

El oxígeno singulete es el estado excitado del oxígeno, y su inactivación es una forma efectiva de prevenir la iniciación de la oxidación. Los carotenoides son capaces de inactivar los sensibilizadores fotoactivados por absorción de su energía para formar un estado excitado del carotenoide, transfiriéndola posteriormente a sus alrededores.

▪ **Actividad antioxidante sinérgica**

El sinergismo es el efecto cooperativo de los antioxidantes o un antioxidante con otros compuestos para mejorar su actividad antioxidante más allá de la suma individual de sus actividades al usarse separadamente. Dos tipos de sinergismo son observados: el primero que envuelve exclusivamente antioxidantes primarios y otro, que envuelve una combinación de antioxidantes primarios con agentes quelantes.

1.7 Antioxidantes naturales y sintéticos

Existen tanto compuestos naturales como sintéticos que pueden desempeñarse como antioxidantes primarios. La característica común de todos estos antioxidantes es que son mono o polihidroxifenoles con varias sustituciones en el anillo aromático, ver **figura 8**.

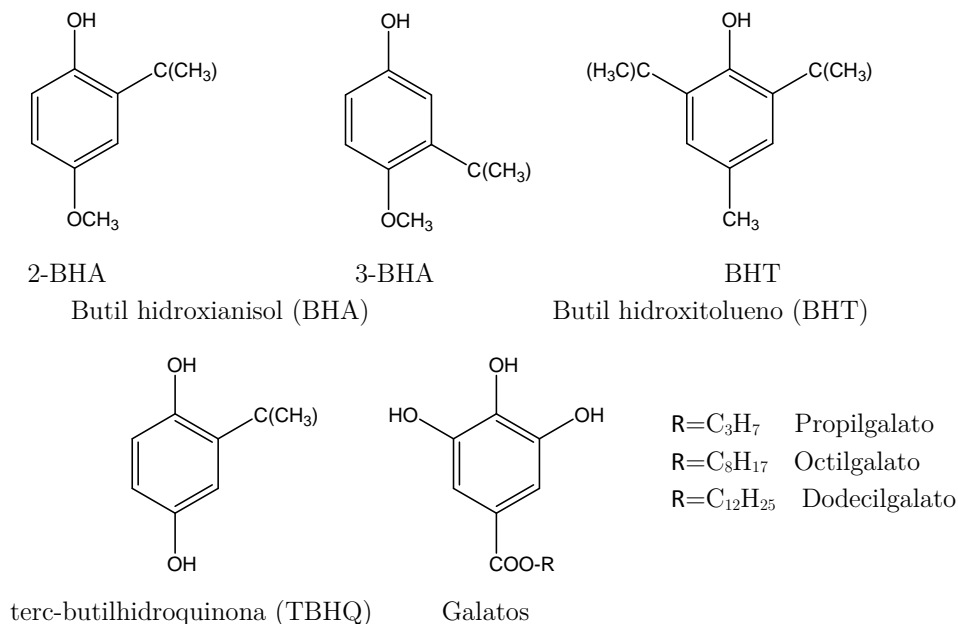


Figura 8. Estructuras químicas de antioxidantes sintéticos comúnmente usados en grasas y aceites.

Los antioxidantes fenólicos sintéticos son p-sustituídos, mientras que los de origen natural son en su mayoría o-sustituídos; los sintéticos son siempre sustituidos con grupos alquilo para mejorar su solubilidad en grasas y reducir su toxicidad. La sustitución con un grupo electrodonante en la posición orto o para al grupo hidroxilo del fenol, incrementa la actividad antioxidante del compuesto por efecto inductivo (p.ej. 2,6-ditertbutil-4-metilfenol, BHT). La presencia de un segundo grupo hidroxilo en la posición orto o para del fenol igualmente incrementa su actividad antioxidante (p.ej. TBHQ).

En derivados dihidroxibenceno el radical semiquinoide producido inicialmente puede ser oxidado a una quinona por reacción con otro radical lipídico, como se observa en la **figura 9**. Este radical semiquinoide puede transformarse en quinona y una molécula de hidroquinona, contribuyendo a la actividad antioxidante como secuestradores de radicales peroxilo. La **tabla 5** resume los antioxidantes primarios comúnmente usados en grasas y aceites para alimentos. Para ser más efectivos, los antioxidantes primarios deben ser adicionados durante el paso de iniciación de la cascada de reacciones de autoxidación.

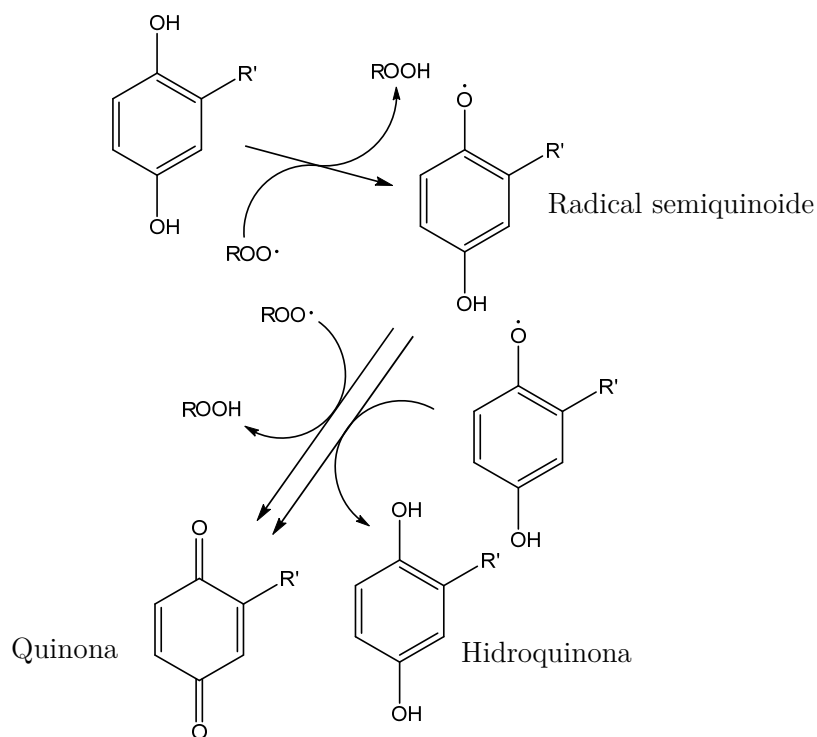


Figura 9. Mecanismo de actividad antioxidante de un derivado de dihidroxibenceno.

Tabla 5. Antioxidantes primarios comúnmente usados en alimentos.

Naturales	Sintéticos
Carotenoides	Butilhidroxianisol (BHA)
Flavonoides	Butilhidroxitolueno (BHT)
Ácidos fenólicos	Galato de propilo
Tocoferoles, tocotrienoles	terc-butilhidroquinona (TBHQ)

1.8 Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de un compuesto o de un extracto es evaluada por la resistencia a la oxidación de los lípidos contenidos en el alimento; por consiguiente, la mayoría de los métodos usados para evaluar la actividad antioxidante hacen seguimiento a los pasos de oxidación de los lípidos, los cuales pueden categorizarse en tres grupos:

- Decaimiento del sustrato, compuesto de prueba o consumo de oxígeno
- Formación de productos de oxidación a partir del sustrato oxidable
- Formación o decaimiento por el sondeo de radicales libres

La actividad antioxidante es función del tiempo (velocidad de reacción), tipo de sustrato, temperatura, concentración del antioxidante, concentración de otras sustancias (oxígeno, peróxidos, presencia de otros antioxidantes o prooxidantes) y el coeficiente de partición del antioxidante en el sustrato.

En la parte inicial, la oxidación ocurre lentamente, el momento en que se incrementa repentinamente se conoce como periodo de inducción. Los hidroperóxidos lipídicos se han identificado como productos primarios de autooxidación; su descomposición produce aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles y epoxi compuestos, conocidos como productos secundarios de oxidación (Shahidi and Zhong, 2005).

Un número de test físicos y químicos, incluyendo análisis instrumental, han sido desarrollados en los laboratorios y en la industria para hacer seguimiento a la oxidación de los lípidos. Estos incluyen: la ganancia en peso, consumo de oxígeno (headspace), análisis cromatográfico por cambios en reactantes, titulación iodométrica, colorimetría por formación de complejos de hierro, transformada FTIR, espectrometría para dienos y trienos conjugados, TBARS, medidas del índice de estabilidad oxidativa (Rancimat), resonancia electrónica de espín (EPR), Calorimetría Diferencial de Escaneo (DSC) y resonancia magnética nuclear (NMR).

Para la evaluación de la actividad antioxidante en el presente trabajo se emplea el test de almacenamiento empleando métodos acelerados de oxidación, para esto, el alimento se almacena en una estufa a temperaturas determinadas (usualmente 60°C) y se evalúa tanto la formación de productos primarios (hidroperóxidos del ácido linoleico; HPL) como secundarios de oxidación (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico; TBARS).

1.9 Extracción con fluidos supercríticos

Además del método soxhlet y maceración, que han sido los más usados en la obtención de extractos de los residuos de aguacate Hass, en el presente trabajo se propone obtener extractos empleado fluidos supercríticos, para posteriormente evaluar su actividad frente a la protección contra la oxidación lipídica.

1.9.1 Definición e historia

Un fluido supercrítico (FSc) es una forma de la materia en la que los estados líquido y gaseoso son indistinguibles entre sí, también se puede definir como un fluido que se encuentra en condiciones por encima de sus valores de presión y temperatura críticas (punto crítico)” ([De Castro et al., 1993](#)).

El descubrimiento de lo que ahora llamamos punto crítico se remonta a los experimentos de Cagniard de la Tour con el digestor de Papin (**figura 10**); en 1822, en el contexto de su interés en acústica, colocó un balón pedernal en un digestor parcialmente lleno con un líquido. Tras ebullición un sonido de “chapoteo” fue generado y el balón pedernal penetraba la interface líquido-vapor. Cagniard de la Tour notó que tras calentar el sistema más allá de su punto de ebullición del líquido, el sonido de “chapoteo” cesaba a cierto valor de temperatura. Esto marca el descubrimiento de la fase fluida supercrítica, en esta fase no hay tensión superficial ya que no hay frontera de fase líquido-gas.



Figura 10. Digestor de Papin o Marmita de Papin. Sirve para someter un sistema a una presión elevada.

1.9.2 Propiedades físicas

Los diferentes estados físicos de una sustancia pura pueden ser visualizados en un diagrama tridimensional de presión-volumen-temperatura (PVT), ver **figura 11**.

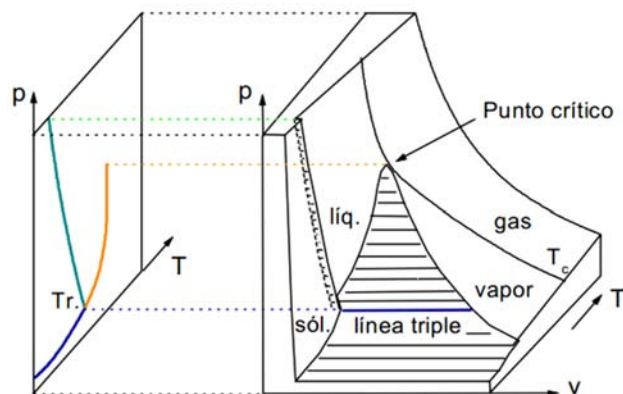


Figura 11. Diagrama PVT de una sustancia pura (CO_2) y su proyección en el plano PT.

Las superficies representan los diferentes estados –sólido, líquido o vapor- que corresponden a valores particulares de presión y temperatura. De acuerdo a la regla de las fases, las regiones de dos fases (sólido-líquido, sólido-vapor y líquido-vapor) de una sustancia pura tienen solamente un grado de libertad. Por consiguiente la presión de equilibrio en cada caso es función de la temperatura. Las proyecciones PT de las líneas de equilibrio sólido-líquido, sólido-vapor y líquido-vapor se muestran en la parte izquierda de la **figura 11**. En particular, la línea líquido-vapor representa la curva de presión de vapor que inicia en el punto triple (PT) donde coexisten las fases sólido, líquido y vapor y finaliza en el punto crítico (PC) (Martínez, 2008).

Las propiedades del punto crítico se pueden entender siguiendo los cambios de las propiedades del fluido a lo largo de la curva de presión de vapor, al incrementar los valores de la temperatura la densidad de la fase líquida disminuye y la densidad del vapor se incrementa debido a una mayor presión de vapor. Eventualmente ambas densidades convergen en el CP y no es posible diferenciar el líquido del vapor por encima de la temperatura crítica, cuando la temperatura y la presión son superiores a sus valores críticos el fluido se encontrará en la región supercrítica.

El punto crítico es característico de cada sustancia. En la **tabla 6** se encuentran los valores de presión, temperatura y densidad crítica para algunas sustancias químicas.

Tabla 6. Condiciones supercríticas de algunos compuestos puros (Yépez, 2010).

Compuesto	Estructura Química	Peso molecular	Tc (K)	Pc (Bar)	P (kg/m ³)
Agua	H ₂ O	18,01	647,3	221,2	315
Amoníaco	NH ₃	17,03	405,5	113,9	235
Clorotrifluorometano	CF ₃ Cl	172,82	301,1	39,2	579
Dióxido de carbono	CO ₂	44,01	304,4	73,8	448
Etano	CH ₃ CH ₃	30,07	305,4	48,7	203
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	46,07	516,1	63,8	276
Etileno	CH ₂ =CH ₂	28,05	282,4	50,3	218
Isobutanol	C ₄ H ₉ OH	74,12	548,1	43,0	272
Kriptón	Kr	83,80	209,3	55,0	91
Metano	CH ₄	16,04	191,0	46,4	200
Óxido nitroso	N ₂ O	44,01	309,6	72,6	450
Xenon	Xe	131,29	289,7	58,3	1110

El FSC que más se emplea en la actualidad es el dióxido de carbono, ya que es barato, no es tóxico, ni inflamable y sus condiciones críticas se pueden alcanzar fácilmente.

El empleo de solventes de altas temperaturas críticas (500K o superiores) puede generar pirolisis de compuestos de alto peso molecular, aunque tienen un mayor poder de solvencia para materiales de peso molecular elevado. Sin embargo tienen baja selectividad y severas condiciones de operación y degradan componentes térmicamente lábiles. Una buena característica de los solventes de baja temperatura crítica comparados con los solventes líquidos convencionales, es que operan a temperatura moderada y su poder de solvencia se manipula por operación de la presión y temperatura de operación y pueden ser separados

fácilmente del extracto. Estos son los solventes preferidos por las industrias farmacéuticas y las de productos naturales.

Stahl & Quirin han reportado la extractabilidad de una amplia gama de productos naturales usando CO₂, ellos mostraron que: “1) los hidrocarburos y otros compuestos orgánicos lipofílicos de masa molecular relativamente baja son fáciles de extraer; 2) la introducción de grupos funcionales polares, grupos hidroxilo o carbonilo, hacen la extracción más difícil o imposible; 3) azúcares o aminoácidos no pueden ser extraídos; 4) los efectos del fraccionamiento son posibles si hay diferencias marcadas en la masa, presión de vapor o polaridad de los constituyentes de la mezcla” (Stahl *et al*, 1983).

Las propiedades físicas de los FSC son intermedias entre las de gases y las de líquidos, en la **tabla 7** se hace una comparación entre la densidad (ρ), difusividad (D) y la viscosidad (μ) entre líquidos, gases y fluidos supercríticos (Yépez, 2010).

Tabla 7. Comparación entre las propiedades físicas de los fluidos supercríticos con la de los líquidos y la de los gases.

Estado del fluido	ρ Kg/m ³	D x 10 ⁷ m ² /s	μ x 10 ⁻⁵ Kg/(m.s)
<i>Gas</i>			
1 bar, 2288 - 303 K	0,6 - 2,0	100 - 400	0,6 - 2,0
<i>Líquido</i>			
1 bar, 288 - 303 K	600 - 1600	0,002 - 0,02	20 - 300
<i>Supercrítico</i>			
Pc, T \approx Tc	200 - 500	0,7	10 - 30
4 Pc, T \approx Tc	400 - 900	0,2	30 - 90

La densidad y viscosidad de los FSC son inferiores que la de los líquidos (**figura 12**), sin embargo la difusividad es más alta. Un aumento en la presión que se ejerce sobre el fluido (expresada como presión reducida $Pr=P/P_c$) conduce a un aumento en su densidad, el cual es pronunciado en cercanías al punto crítico (PC). Debido a que la densidad del FSC está relacionada con su poder solvatante, la variación de la densidad en función de la presión y la temperatura también genera una variación de la solubilidad de los solutos en el fluido (Bruno, 1993).

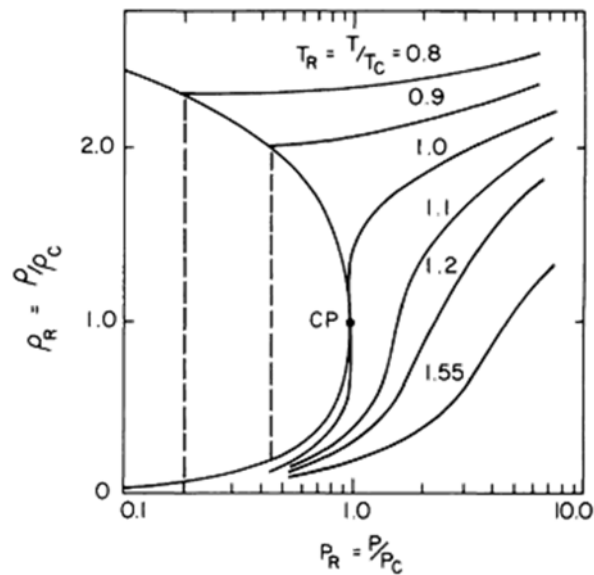


Figura 12. Variación de la densidad de un fluido supercrítico en función de la presión a diferentes temperaturas.

Por otra parte, se observa que entre mayor sea la temperatura del fluido ($T_R = T/T_c$) menor será el aumento en su densidad al aumentar la presión, es decir, bajo condiciones isobáricas, la densidad de un fluido supercrítico es inversamente proporcional a la temperatura.

La difusividad de los solutos de un fluidos supercrítico es similar a la que presenta un gas, es decir, la velocidad de transporte de las moléculas de soluto en un fluido supercrítico es alta, lo que hace que los procesos de transporte de masa desde el interior de la matriz de la muestra hacia el exterior de la misma sean rápidos, a diferencia de lo que se observa en el caso de los líquidos. En la **figura 13** se observa la variación de la difusividad de un FSC con la temperatura y la presión (aumenta con la primera y disminuye con la segunda respectivamente). También se observa el cambio abrupto en difusividad en las proximidades del PC.

La viscosidad de un FSC, la cual también afecta el transporte de los solutos, varía de la misma forma que la difusividad con la presión y la temperatura (McHugh and Krukoni, 1986), ver **figura 14**

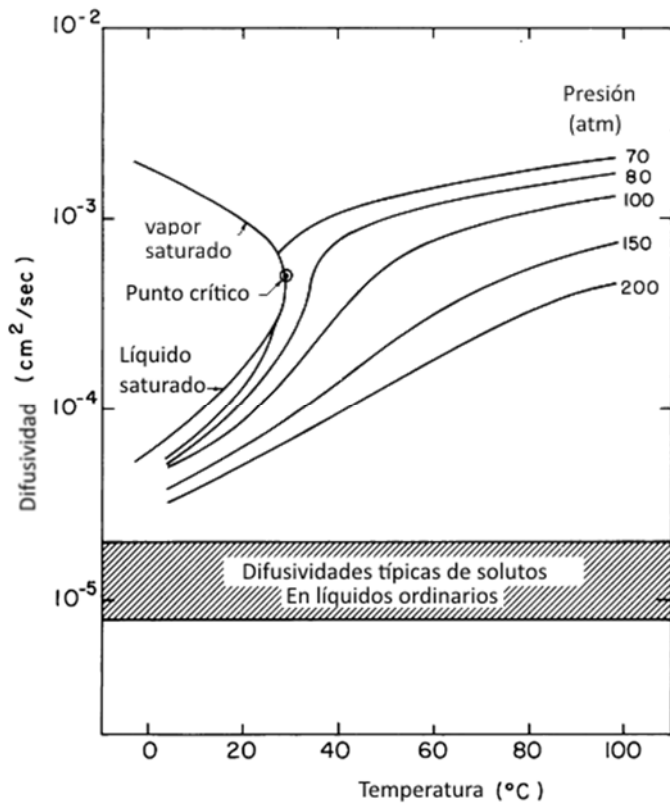


Figura 13. Variación de la densidad de un fluido supercrítico en función de la presión a diferentes temperaturas.

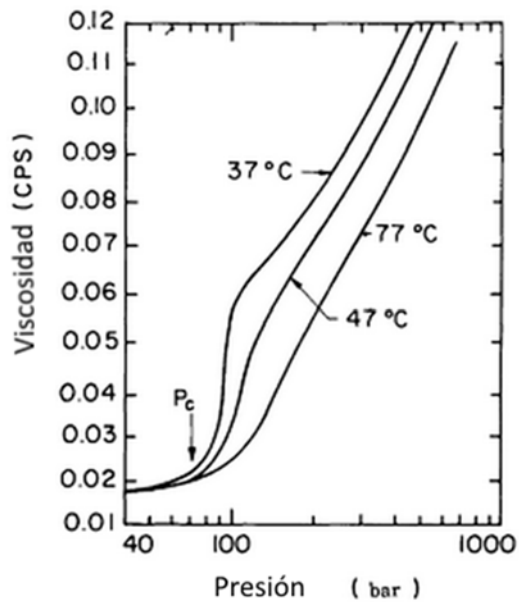


Figura 14. Variación de la viscosidad de un fluido supercrítico en función de la presión a diferentes temperaturas.

1.9.3 CO₂ como fluido supercrítico

Una sustancia a ser empleada como FSc debe tener una serie de requisitos: capacidad solvatante alta y selectiva, no inflamable, no tóxico, no corrosivo, condiciones críticas moderadas, bajo precio y fácil consecución, alta pureza, ser un gas a condiciones ambientales y tener compatibilidad con los métodos acoplados (GC, HPLC, SFC). La elección del FSC debe llevarse a cabo tratando de seleccionar aquel que cumpla con el mayor número de requisitos, en este caso, la elección más adecuada y común es el CO₂ ($P_c = 73.9 \text{ atm}$, $T_c = 31.1 \text{ °C}$). Otros fluidos empleados son el metanol, el cual ha llegado a ser muy eficiente en la extracción de plaguicidas, al igual que el freón-22, el monóxido de dinitrógeno, el etano y el amoníaco. Es importante destacar que entre las desventajas que presentan se tiene que los hidrocarburos son altamente inflamables, el agua supercrítica es corrosiva al igual que el amoníaco (además de reactivo y tóxico) y por lo general tienen condiciones críticas drásticas con excepción del xenón y el monóxido de dinitrógeno. Una de las desventajas del CO₂ supercrítico es su baja polaridad, la cual limita su uso a la extracción de solutos no polares y/o de baja polaridad. Una forma de superar esta limitación es el empleo de un cosolvente o modificador de polaridad, el cual ayuda a solubilizar aquellos solutos de polaridad media a alta que son poco solubles en CO₂ supercrítico. La elección del cosolvente depende del compuesto que se va a extraer, la matriz de análisis y el objetivo de la extracción. Los cosolventes más usados son metanol, acetona, acetato de etilo y tolueno ([Mukhopadhyay, 2000](#)).

1.9.4 Pasos del proceso de extracción

El proceso de extracción con un fluido supercrítico consiste en dos pasos: extracción de los componentes solubles en un solvente supercrítico y la separación de los solutos extraídos del solvente. La extracción puede ser aplicada a sólidos, líquidos o matrices viscosas. Basado en el objetivo de extracción, se pueden considerar dos escenarios:

1. Separación del material portador. En este caso los constituyentes del material de alimento forman el producto final después de la eliminación de componentes indeseables. Ej. Dealcoholización de bebidas alcohólicas, remoción de olores o descafeinización del café.
2. Separación de materiales extraídos. Los compuestos extraídos del material de alimento constituyen el producto final. Ej. Aceites esenciales, antioxidantes o vitaminas.

1.9.5 Instrumentación

Los elementos básicos de un extractor empleando fluidos supercríticos (**figura 15**) a escala analítica son: una fuente de fluidos supercrítico de alta pureza; una bomba de alta presión capaz de liberar el fluido a presión, para lo cual lo más común son compresores de membrana, bombas neumáticas y bombas empleadas en HPLC; una celda o cámara que alberga la muestra resistente a altas presiones, químicamente inerte y que deberá estar dotada de un mecanismo que permita mantener su temperatura al valor adecuado, pueden emplearse mantas de calentamiento o emplear un horno cromatografico; un restrictor para mantener la presión en la cámara de extracción, aunque también se puede emplear válvulas micrométricas, las cuales permiten el flujo continuo de FSc a través de la celda de extracción con caídas de presión bajas (inferior a 0,1 MPa); un sistema adecuado para la recogida de los componentes extraídos una vez que el FSc se despresuriza, ver **figura 15** (De Castro, 1993).

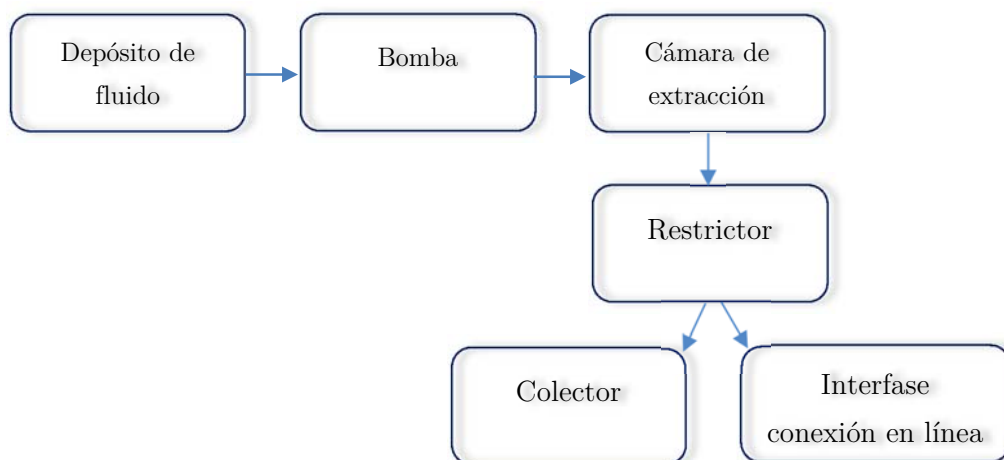


Figura 15. Diagrama de flujo para un proceso de extracción empleando fluidos supercríticos.

Inicialmente el fluido en estado líquido se presuriza hasta la presión de operación y posteriormente se somete a calentamiento hasta la temperatura de proceso. El fluido entonces pasa a través del extractor, donde previamente se ha cargado la matriz a extraer. El analito y el FSc se transportan hasta la unidad de separación, donde por efecto de la descompresión, el fluido se transforma en gas y se puede recircular mediante el enfriamiento y posterior bombeo (Yépez, 2010).

1.9.6 Aplicaciones de los FSC a nivel laboratorio e industria

- **Micronización y encapsulamiento**

Consiste en la producción de micro y nano partículas con el uso de FSC. Una forma consiste en la expansión súbita de soluciones supercríticas, en la cual la solución se expande a través de pequeños orificios y se obtiene el polvo finamente dividido. Es un proceso muy importante para la industria farmacéutica ya que permite controlar la dosificación de un componente activo. Otra forma de realizar el proceso de micronización consiste en disolver el FSC en una solución orgánica que contenga el soluto haciendo que la solubilidad del soluto decrezca y por lo tanto promueva la nucleación y el crecimiento de partículas. De esta forma se han obtenido tamaños de partícula de 50 nm, el cual no es posible lograr por técnicas convencionales de reducción de tamaño de partícula como la molienda y la cristalización. Esta técnica también se ha usado en la purificación de insulina.

- **Aplicaciones en reacciones químicas**

La alta difusividad que presenta un FSC lo hace llamativo para la realización de reacciones químicas beneficiando por ejemplo las reacciones heterogéneas que son muy controladas por la difusión, como en el caso de las reacciones controladas por enzimas. También se obtienen productos de alta pureza (libre de solventes).

- **Obtención de metabolitos a partir de residuos sólidos**

La lista de los productos que se obtienen por EFS se amplía en los recientes años donde se investigan principalmente muestras de origen vegetal. Dentro de las aplicaciones industriales se destaca la extracción del lúpulo de la cerveza, la nicotina del tabaco y la cafeína del té, así como la extracción de sabores, especias y aceites esenciales. En la actualidad más de 100 000 toneladas de café descafeinado se producen mediante esta técnica en el mundo entero ([Jessop and Leitner, 1999](#)). La extracción y fraccionamiento supercríticos se ha aplicado en la obtención de aceites esenciales, antioxidantes, aceites de diferentes fuentes vegetales, separaciones cromatográficas e igualmente cuantificaciones cromatográficas. La extracción a partir de fuentes naturales a partir de FSC es la más ampliamente estudiada y trabajada, ver **tabla 8**.

Tabla 8. Algunos ejemplos del empleo de FS en la obtención de extractos a partir de fuentes naturales

Nombre de la planta (parte usada)	Productos extraídos	Referencia
<i>Calendula officinalis</i> (flores)	Oleoresin	Campos et al., 2005
<i>Echinacea purpurea</i> (planta entera)	Alcamidas, polifenoles, ácido chicórico	Catchpole et al., 2002
<i>Eucaliptus spp.</i> (hojas)	Flavonoles, glicósidos (flavonoides) y terpenoides	Yang et al., 2002
<i>Hypericum perforatum</i> (hierba)	Naftodianonas, hipericina y pseudohipericina	Catchpole et al., 2002
<i>Levisticum officinale</i> (raíces secas)	Aceites esenciales	Dauksas and Venskutonis, 1988
<i>Matricaria chamomilla</i> (flores)	Oleoresina	Kotnik et al., 2007
<i>Menta spp.</i> (hojas)	Aceites esenciales	Marongiu et al., 2001
<i>Origanum spp.</i> (hierba)	Aceites esenciales	Gaspara and Leeke, 2002
<i>Piper Methysticum</i> (raíces, rizomas)	Kava lactonas	Catchpole et al., 2002
<i>Piper nigrum</i> (fruta)	Oleoresina	Ferreira et al., 1993
<i>Saccharum spp.</i> (cera cruda)	n-alcholes de cadena larga	De Lucas et al., 2005
<i>Salvia desoleana</i> (hojas)	Aceite esencial	Marongiu et al., 2001
<i>Serenoa repens</i> (fruta)	Ácidos grasos libres, fitosteroles (bajas concentraciones), alcholes grasos y triglicéridos	Catchpole et al., 2002
<i>Solanum lycopersicum</i> (fruta)	Carotenoides, tocoferoles, sitosteroles	Vagi et al., 2007
<i>Taxus brevifolia</i> (corteza)	Taxol	Jennins et al., 1992
<i>Taxus cuspidate</i> (agujas)	Paclitaxel y bacatina III	Moon-Kyoon chun et al., 1996
<i>Vitis vinifera</i> (semilla)	Procianidinas	Cao et al., 2003
<i>Zingiber officinale</i> (rhizome)	Oleoresina	Badalyan et al., 1998

Con el panorama anterior se consideró que los residuos de los frutos del aguacate Hass (*Persea americana* Mill. var. Hass), tanto epicarpio como semillas, son fuente promisoría de antioxidantes, los cuales pueden ser extraídos de forma eficiente y selectiva empleando técnicas de extracción como son soxhlet y EFSc.

2. Metodología

En este capítulo se describen las tres fases en las que se desarrolló el estudio, fundamentadas el nivel de protección de extractos de residuos de aguacate (epicarpio-E, semillas-S) contra la oxidación lipídica de oleína-OP y de carne cruda de vacuno-CR. En la primer fase se determinó la biomasa más activa tanto para OP como para CR, ésta se desarrolló empleando extracción Soxhlet. La segunda fase se centró en obtener extractos, a partir de la biomasa más activa para cada caso (OP y CR), empleando extracción con CO₂ supercrítico con cosolventes. En la tercer fase se fraccionaron los extractos más activos, para cada caso (OP y CR), y las fracciones más activas se sometieron a análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas. En la **figura 16** se muestra la metodología general.

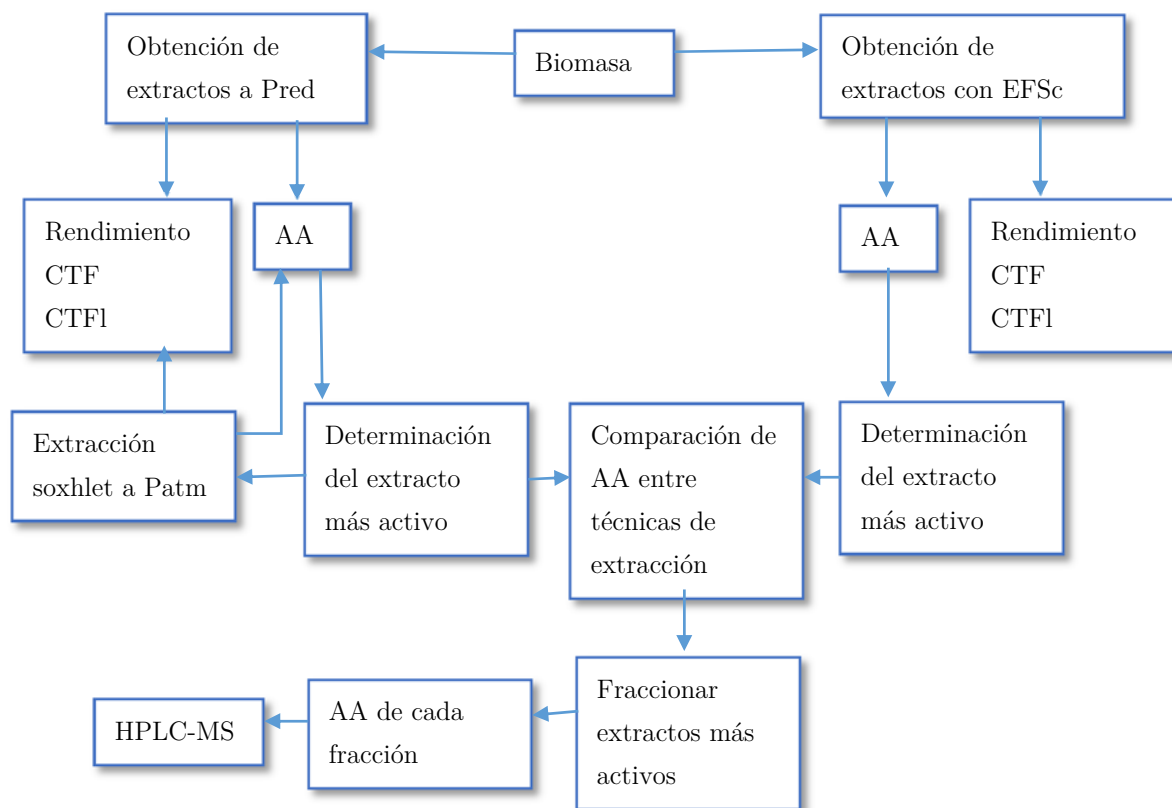


Figura 16. Esquema resumido sobre la metodología desarrollada.

2.1 Materiales y reactivos

2.1.1 Muestras

Los aguacates de la variedad Hass se adquirieron en un cultivo de la vereda Tasajo (Sonsón, Antioquia), con fecha de recolección entre el 23 y 24 de Julio de 2013, ver **figura 17**.



Figura 17. Mapa ubicación de la vereda Tasajo (Sonsón, Antioquia). Tomado de <https://maps.google.es/>. Fecha de consulta 29/08/2013

El aceite libre de antioxidantes (oleína) fue suministrado por **Grasco S.A**, vino en presentación de un galón, sellado, tapado, refinado, blanqueado y desodorizado, libre de antioxidantes, se mantuvo almacenado a temperatura ambiente. La muestra de carne de morrillo se adquirió en un supermercado local de la ciudad (10 kg); se lavó bajo corriente de agua y fue recortada del tejido conectivo y grasa externa; se dividió por cortes sucesivos hasta obtener 16 fracciones de 600 g aproximadamente. Cada fracción se cortó en cubos de aproximadamente 1 cm³ los cuales fueron mezclados aleatoriamente y almacenados en bolsas plásticas selladas libres de aire a -4°C (24 h) para su posterior preparación.

Frutos maduros y limpios fueron empleados en este estudio. La separación del epicarpio de la pulpa y de la semilla de los frutos se realizó manualmente.

La semilla se cortó en trozos más pequeños para facilitar su secado (1-3 mm de grosor) empleando un cuchillo de acero inoxidable y se secó a 45°C en un horno a vacío (Sheldom

Mfg. Inc., 15 in Hg; 51 kPa) por un periodo de 72 horas, se determinó la humedad y finalmente se almacenó herméticamente en bolsas plásticas a -4°C . Para los residuos del epicarpio se procedió de igual forma.

La muestra seca de cada residuo, mezclada con hielo seco, fue triturada usando un molino manual para granos (Corona Ref. 142). Finalmente el material se almacenó herméticamente en bolsas plásticas a -4°C para las posteriores extracciones.

2.1.2 Reactivos

Los reactivos empleados en los métodos de extracción fueron hexano, acetato de etilo y etanol (96%), en la determinación del CTF se empleó el Reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico y NaOH (0,45 M). en la determinación del CTFI se empleó quercetina, AlCl_3 , etanol (96%) y acetato de potasio (1 M). Finalmente en la determinación de HPL y TBARS se emplearon metanol, cloruro ferroso (0,1 % w/v), isooctano, butil hidroxil tolueno (BHT), metanol, ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), HCl, butil hidroxil anisol (BHA), cloroformo, tetraetoxipropano (TEP). Los solventes fueron destilados y demás reactivos eran grado analítico. Para el análisis cromatográfico se empleó acetonitrilo y ácido acético grado HPLC.

2.2 Obtención de los extractos

Para cada biomasa, epicarpio y semilla, se obtuvieron extractos mediante extracción soxhlet a presión reducida; sobre la biomasa más activa se procedió a obtener extractos mediante CO_2 supercrítico y cosolvente (acetato de etilo y etanol). Sobre cada uno de los extractos obtenidos se determinó el rendimiento, el CTF, el CTFI y la AA (medición de los productos de la oxidación lipídica de oleína y carne de morrillo).

2.2.1 Extracción Soxhlet

Cada biomasa, epicarpio y semilla, se sometió a extracción soxhlet a presión reducida. Un conjunto de extractos fue obtenido al realizar la extracción de forma directa o consecutiva, usando hexano, acetato de etilo y etanol como disolventes en proporción 15 mL disolvente/g muestra.

A partir del epicarpio (**E**) o de la semilla (**S**), sometida a extracción soxhlet de forma directa, con cada uno de los disolventes, se obtuvieron tres extractos de cada biomasa (extractos etiquetados como **1** son obtenidos con hexano; **3** obtenidos con acetato de etilo; **6** obtenidos con etanol, resultando seis extractos: **1E**, **1S**, **3E**, **3S**, **6E** y **6S**, la última letra indica el tipo de residuo). Al someter a extracción cada una de las biomásas, empleando los disolventes mencionados de forma consecutiva, se obtienen tres extractos de cada biomasa (los extractos etiquetados con **2** son obtenidos en acetato de etilo de biomásas previamente desengrasadas con hexano, **2E** y **2S**; etiquetados como **4** son extractos etanólicos de las biomásas sometidas a extracción con hexano y luego con acetato de etilo, **4E** y **4S**; **5** son extractos etanólicos de biomásas previamente sometidas a extracción con acetato de etilo, **5E** y **5S**), ver **figura 18**; teniendo en cuenta lo anterior, se obtuvieron doce extractos (**1E**, **2E**, **3E**, **4E**, **5E**, **6E**, **1S**, **2S**, **3S**, **4S**, **5S**, **6S**) cuyo tiempo total de extracción, fue de ocho horas para todas las extracciones, manteniendo 35°C para las extracciones con hexano, 35°C para las de acetato de etilo y 40°C para las etanólicas. Para cada uno de los extractos, el solvente orgánico se removió por uso del rotavapor a 40°C, finalmente se determinó el rendimiento de extracción, contenido total de fenoles (CTF) y contenido total de flavonoides (CTF1) para cada extracto. El sistema de solventes usado en extracción soxhlet a presión reducida que permitió obtener el extracto más activo, se empleó a presión atmosférica, con el propósito de comparar la actividad antioxidante de este último con la del extracto a presión reducida.

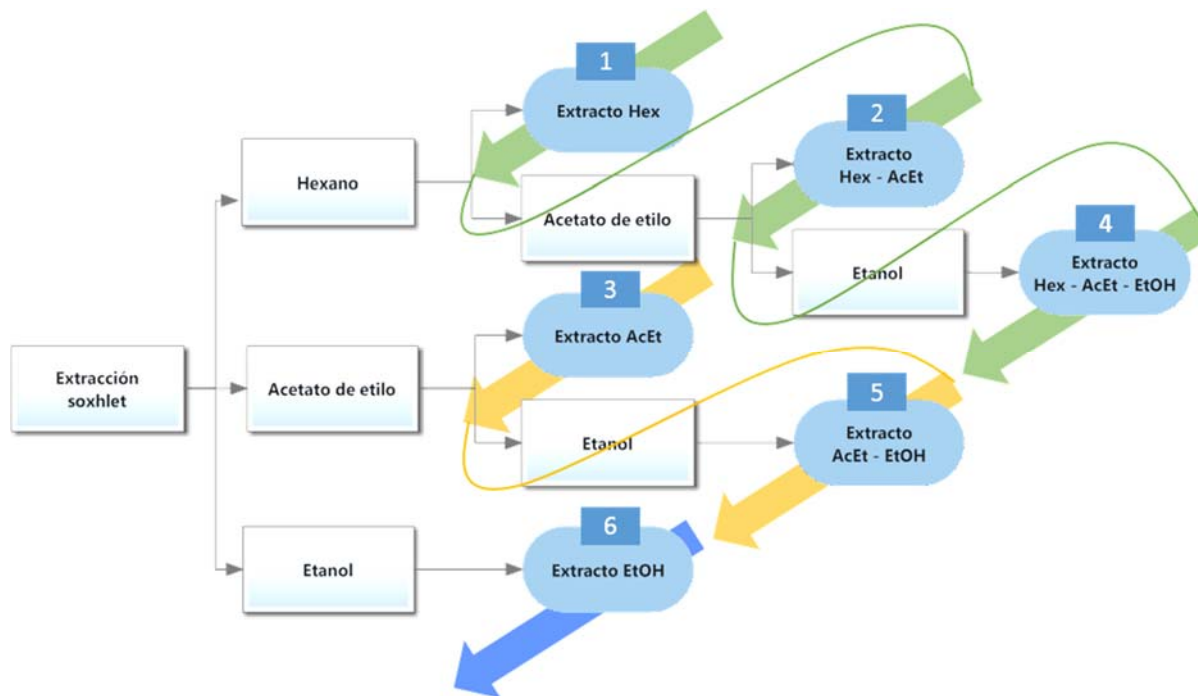


Figura 18. Metodología para el proceso de extracción soxhlet a presión reducida.

2.2.2 Extracción con fluidos supercríticos (EFSc)

La optimización de los parámetros de extracción se realizó en dos pasos para el residuo con mejor actividad antioxidante, a saber:

1. Se obtuvo la curva de extracción global a condiciones de presión (10 MPa) y temperatura (40°C) pre-establecidas usando CO₂ como solvente y acetato de etilo como cosolvente (3%). El procedimiento se realizó en modalidad estática en modo de baches de 10 minutos y buscó optimizar el número de éstos necesarios para un mayor rendimiento de extracción. Para este punto se usó un diseño de un factor.
2. Con el mejor número de baches, se realizaron las extracciones a diferentes temperaturas (40, 50 y 60°C), modificando las presiones (10, 15 y 20 MPa), las cantidades de cosolvente usadas (3, 6 y 9%) y la composición del cosolvente (mezcla de acetato de etilo y etanol: 0% etanol, 50% etanol y 100% etanol). En este paso se empleó un diseño central compuesto, dieciséis extracciones fueron requeridas para cubrir todas las posibles combinaciones de los niveles de los tres factores sin réplicas (ensayos 1 al 16); seis extracciones correspondieron al centro del diseño con el fin de estimar el error experimental (ensayos 17 a 22), ocho extracciones correspondieron a la parte axial (ensayos 23 al 30) del diseño, alfa centrado en las caras (1.0) y un bloque confirmado por las últimas tres extracciones (ensayos 31 a 33), ver **tabla 9** y **tabla 10**. Las variables respuesta fueron el rendimiento de extracción en base seca y la AA de los extractos. Para realizar las extracciones se ensambló dentro del grupo de investigación un sistema de extracción (ver **figura 19**) (Reyes *et al.*, 2011).

Tabla 9. Dominio experimental.

Factores		Bajo nivel (-)	nivel central 0	alto nivel (+)
Presión (MPa)	X₁	10	15	20
% cosolvente	X₂	3	6	9
composición cosolvente (AcOEt:EtOH)	X₃	1:0	1:1	0:1
Temperatura	X₄	40	50	60

Tabla 10. Diseño central compuesto

Factores experimentales				
Ensayo	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	-	0	0	0
24	+	0	0	0
25	0	-	0	0
26	0	+	0	0
27	0	0	-	0
28	0	0	+	0
29	0	0	0	-
30	0	0	0	+
31	0	0	0	0
32	0	0	0	0
33	0	0	0	0

Se empleó en su totalidad acero 316 permitiendo realizar extracciones en modo de baches. El equipo está conformado por: (**C**) cilindro de CO₂; (**BN**) bomba neumática (HASKEL® modelo AGT-7/30, CA. USA.); (**CT1**, **CT2**) regulador de temperatura (WATLOW serie SD 31, MI, USA, $\pm 1,0$ °C) con termocupla tipo K; celda de extracción de 50,0 mL; (**VP**) válvulas de aguja (WHITEY series SS-1 VS4, USA); (**BPR**) válvula reguladora de presión (AMFLOW BP-6); (**M**) manómetros (BOURDON HAENNI, vendôme cedex, France, 70 MPa); (**B**) bomba (BECKMAN-ALTEX 110A); (**R**) reservorio de cosolvente; (**E**) extracto.

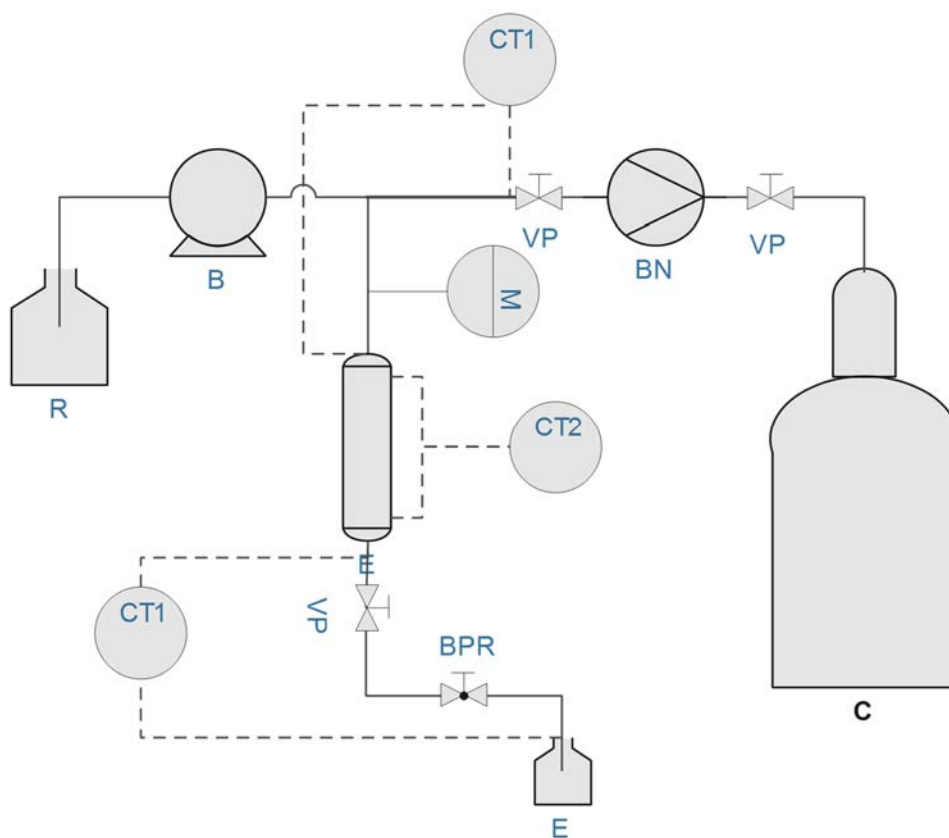


Figura 19. Diagrama equipo de extracción con fluidos supercríticos.

2.3 Contenido total de fenoles (CTF)

El contenido total de fenoles de cada extracto se determinó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu (Berker *et al.*, 2013) con algunas modificaciones. Una alícuota de 150 μ L del extracto diluido (10 ppm) se mezcló con 150 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu seguido por 1,55 mL de NaOH 0,45 M. La mezcla se agitó y se dejó en reposo 30 min. en oscuridad, luego se midió la absorbancia a 765 nm. El contenido de fenoles se calculó a partir de una curva estándar de ácido gálico. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por 100 gramos de material seco.

2.4 Contenido total de flavonoides (CTF1)

El contenido total de flavonoides se realizó por el método colorimétrico del cloruro de aluminio (Chang *et al.*, 2002) con algunas modificaciones. Se empleó quercetina (**Q**) para construir la curva de calibración. 10 mg de **Q** fue disuelta en etanol (96%) y luego diluido a 25, 50, 75 y 100 μ g/mL. Las diluciones de **Q** (250 μ L) fueron mezcladas separadamente con 750 μ L de etanol (96%), 50 μ L AlCl₃ (10%), 50 μ L acetato de potasio (1 M) y 1,4 mL de agua destilada. Después de un periodo de reacción por 30 min. a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 415 nm. De forma similar, 250 μ L de una dilución (2,0 mg/mL) de cada extracto en acetato de etilo:etanol (1:1 v/v) fueron sometidos a reacción con AlCl₃.

2.5 Actividad antioxidante en oleína de palma

Para el estudio de AA en oleína se emplearon dos procedimientos. El primero de ellos para escoger la biomasa más promisoría, el cual se realizaba en 15 días (Frankel *et al.*, 1994). El segundo procedimiento (ensayo de oxidación lipídica acelerado) se llevó a cabo en menor tiempo (3 días) y con éste se realizó la etapa final del estudio.

En el ensayo convencional de oxidación, cada muestra de oleína de palma (20 g) fue vertida en frascos ámbar con tapa, luego se adicionaron los antioxidantes disueltos en etanol (extractos a evaluar, antioxidantes comerciales: BHT, BHA y GA) hasta una concentración final de 200 ppm (Codex Alimentarius, 2011) y una solución de cloruro ferroso en etanol (aprox. 0,1% w/v) hasta una concentración final de 3.5 ppm en hierro (158 μ L en 20 gramos de aceite). El sistema se llevó a oxidación por calentamiento a 60°C empleando un horno termostatado, en condiciones de oscuridad, con burbujeo de aire cada 24 h y agitación esporádica. Se preparó una muestra control de forma similar, por adición de solvente sin

antioxidantes (blanco). Las muestras se mantuvieron en condiciones de oxidación por 15 días. Los análisis de los productos de oxidación se realizaron a los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15, comparando los productos de oxidación (HPL y TBARS) formados en la muestra de aceite libre de antioxidantes (blanco), la adicionada con antioxidantes comerciales y los adicionados con cada uno de los extractos obtenidos.

El ensayo de oxidación lipídica acelerado, consistió en trabajar a 80°C y con inyección de aire en forma continua, las otras condiciones del ensayo de oxidación convencional se mantuvieron constantes. Los análisis de los productos de oxidación se realizaron los días 1, 2 y 3.

2.6 Actividad antioxidante en carne de res cruda

La actividad antioxidante de los extractos fue evaluada en carne de res cruda (CRC), la oxidación de la carne y la eficiencia de los extractos fue medida en trabajos previos del grupo de investigación (Castro, 2013).

La carne de res cruda se molió en una licuadora a velocidad máxima usando 6 ciclos de 20 s, obteniendo una masa homogénea. Porciones homogéneas de CRC (20 g) fueron colocadas en frascos de vidrio ámbar (50 mL) cerrados herméticamente. Los extractos, junto a los patrones (BHA, BHT y GA) fueron disueltos en etanol y adicionados a las muestras homogéneas de CRC a una concentración final de 100 mg/kg de carne (Codex Alimentarius, 2011), luego las mezclas fueron homogeneizadas por 2 minutos usando un vórtex. Una muestra blanco se preparó usando solvente sin antioxidantes. Un conjunto de muestras de CRC (sin antioxidantes) fue usada para análisis inmediato (día cero) y los otros (adicionados con extracto o patrones) se mantuvieron a 4°C por nueve días. La oxidación lipídica en las muestras de CRC se determinó por la medida del contenido de hidroperóxidos lipídicos (HPL) y el contenido de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los resultados fueron presentados como la diferencia del contenido de HPL y contenido TBARS para los días 0, 3, 6 y 9 respectivamente (Stika *et al.*, 2007).

2.7 Análisis de los productos de oxidación lipídica

2.7.1 Medida de los hidroperóxidos lipídicos

La formación de los HPL tanto en oleína como en carne fue evaluada por el método de los hidroperóxidos (Frankel *et al.*, 1994). El contenido de HPL de las muestras de CRC (500 mg) fue determinado por extracción usando hexano:MeOH (1:1), se mezcló, se agitó en vórtex por 30 segundos y se centrifugó a 5500 rpm por 5 min. La capa de hexano fue removida y la capa metanólica fue lavada nuevamente con hexano. La capa de hexano y el hexano resultante del lavado se unieron y se rotaevaporó el hexano. El residuo con los HPL fue diluido en 1 mL de isooctano, se tomó una alícuota de 50 μL , se diluyó en 5 mL de isooctano y se midió la absorbancia a 234 nm. La concentración de HPL se calculó usando el coeficiente de extinción molar de los hidroperóxidos del ácido linoleico ($\epsilon = 26000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y los resultados fueron expresados como mmol de HPL por kilogramo de CRC (mmol HPL/kg CRC).

2.7.2 Medida de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los valores de TBARS tanto en oleína como en carne fueron medidos de acuerdo a trabajos previos realizados dentro del grupo de investigación (Castro, 2013). 500 mg de CRC se introdujeron en tubos falcon de 50 mL, luego se adicionó 50 μL de solución BHT en metanol (23 mM), 1.5 mL de solución de **TBA** (ácido tiobarbitúrico, 26 mM) y 10 mL de **TCA** (ácido tricloroacético, 0,30 M en HCl 0,25 M). La mezcla se agitó en un vórtex por 30 segundos y se calentó en un baño con agua en ebullición por 40 minutos. Luego los tubos se llevaron a un baño de hielo por 10 minutos, se tomó una alícuota de 5 mL de la suspensión, se mezcló con 5 mL de cloroformo y se agitó en vórtex por 30 segundos, seguido por centrifugación a 5500 rpm por 20 minutos. Se midió la absorbancia de la fase acuosa a 532 nm. Los resultados se expresaron como mg de malondialdehído (**MDA**) por kilogramo de CRC (mg MDA/kg CRC) calculados a partir de una curva estándar de MDA (36 nM a 185 nM) (Ohkawa *et al.*, 1979) obtenida de la hidrólisis de tetraetoxipropano (**TEP**).

2.8 Fraccionamiento y Análisis HPLC-MS

Los extractos que presentaron mayor actividad antioxidante en oleína de palma y en carne se fraccionaron por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria una resina Diaion HP-20 (250—850 μm) para posteriormente ser evaluadas en cuanto su AA con el fin

de seleccionar la fracción más activa para ser analizada por HPLC-MS. 400 mg de extracto se separaron empleando 7,7 g de resina, realizando elución con las fases móviles que se relacionan en la **tabla 11**.

Tabla 11. Composición de fases móviles para el fraccionamiento del extracto más activo

Fracción	Composición	Volumen (mL)
F1	Agua (100%)	20,0
F2	Agua – Metanol (8:2)	10,0
F3	Agua – Metanol (6:4)	10,0
F4	Agua – Metanol (4:6)	10,0
F5	Agua – Metanol (2:8)	10,0
F6	Metanol (100%)	20,0
F7	Acetato de etilo (100%)	20,0
F8	Hexano (100%)	40,0

Para las fracciones más activas frente al ensayo de AA se analizaron por la siguiente metodología (Universidad de los Andes): HPLC-MS (Agilent Technologies 6520) Accurate-masa Q-TOF LC/MS, estaba compuesto por dos bombas isocráticas (G1312B), Desgasificador (G1379B), automuestreador (HIP ALS G1367B) y columna Phenomenex Luna phenyl-hexyl (150 x 4.6mm i.d.; 5 micrometros). La separación se efectuó empleando como fases móviles (A) H₂O con ácido fórmico al 0.1 % y (B) ACN con ácido fórmico al 0.1% por un perfil de gradiente: 5% B (isocrático, 0-10 min); 10-45% B (10-45 min); 100% B (45-50 min); 100-5% (50-55 min) a un flujo de 0,30 mL/min, con un volumen de inyección: 1 µL. El espectro de masas se obtuvo empleando un cromatógrafo acoplado a espectrometría de masas modelo Q/TOF 6520, con ionización por electrospray (ESI). Se realizó ESI modo positivo, temperatura del gas: 350 °C, presión del nebulizador: 25 psi, voltaje del detector: 3000 V, rango de adquisición: 50- 1500 m/z y flujo N₂: 10 L/min.

2.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm desviación estándar. Las extracciones soxhlet y los diferentes ensayos se realizaron por triplicado. Los análisis para la optimización de las extracciones con fluidos supercríticos se realizaron por un diseño central compuesto (superficie de respuesta), optimizando: (1) temperatura, (2) presión, (3) porcentaje de cosolvente y (4) composición de cosolvente. El estudio de la AA tanto para oleína como para carne se realizó un análisis de componente principales (análisis multivariado por software R) para simplificar el análisis de los resultados. Finalmente se realizaron estudios de correlación (Coef. Corr. Pearson) entre los ensayos de actividad antioxidante, CTF y CTFI (*anexo A, tabla A16 a A69*).

3. Resultados y discusión

Dado que el propósito del presente trabajo fue evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de residuos de aguacate Hass empleando técnicas clásicas y emergentes de extracción, el trabajo se organizó en tres etapas, a saber:

- (i) En la primera etapa, a partir de cada biomasa se obtuvieron diferentes extractos a presión reducida, con los cuales se determinó el rendimiento de extracción, el CTF y el CTFI; posteriormente se evaluó la actividad antioxidante (**AA**) de cada extracto obtenido en oleína de palma (**OP**) y en carne de morrillo cruda (**CR**), seleccionando en cada caso aquel que presentó la mayor AA. Cabe señalar que las semillas de aguacate presentaron la mayor protección contra la oxidación lipídica tanto para **OP** como para **CR**: como complemento a lo anterior, se comparó la AA del extracto más activo con el correspondiente al obtenido a presión atmosférica.
- (ii) En la etapa intermedia el residuo más activo, en cada caso (**OP** y **CR**), se sometió a extracción con fluidos supercríticos (**EFS**), bajo diferentes condiciones de extracción, en los extractos obtenidos se evaluó el rendimiento de extracción, el CTF, el CTFI y la **AA**.
- (iii) En una última etapa se fraccionó el extracto más activo, se determinó la AA de las fracciones obtenidas y se realizó la identificación preliminar de algunos componentes presentes en el extracto con mayor AA por HPLC-MS.

3.1 Extracción soxhlet

Para cada biomasa (epicarpio – E; semillas – S) se obtuvieron seis extractos, a saber: extracción con hexano (**1E**, **1S**); extracto en AcOEt previa extracción con hexano (**2E**, **2S**); extracción con AcOEt (**3E**, **3S**); extracto etanólico previa extracción con hexano y con AcOEt (**4E**, **4S**), extracto etanólico previa extracción con AcOEt (**5E**, **5S**); extracción con EtOH (**6E**, **6S**).

3.1.1 Rendimiento

Inicialmente se realizó el análisis de varianza de un factor por bloques completamente al azar entre rendimiento, tipo de biomasa y el solvente de extracción, se observó que el tipo de biomasa empleado tiene un efecto significativo en cuanto al rendimiento de extracción (*Anexo A, tabla A1 y A2*), razón por la cual se realizan las comparaciones entre rendimientos entre cada biomasa por separado. A continuación se resume el estudio descriptivo de los datos en la **tabla 12**.

Tabla 12. Resumen descriptivo del promedio de los rendimientos de extracción por extracción soxhlet a presión reducida.

Solvente	Extracto	n	Media	Desviación estándar
<i>Hex</i>	1E	3	13,6	0,5
<i>Hex-AcOEt</i>	2E	3	0,9	0,1
<i>AcOEt</i>	3E	3	13,7	0,2
<i>Hex-AcOEt-EtOH</i>	4E	3	2,4	0,5
<i>AcOEt-EtOH</i>	5E	3	2,2	0,5
<i>EtOH</i>	6E	3	13,9	0,5
<i>Hex</i>	1S	3	2,5	0,1
<i>Hex-AcOEt</i>	2S	3	0,5	0,1
<i>AcOEt</i>	3S	3	3,0	0,2
<i>Hex-AcOEt-EtOH</i>	4S	3	2,3	0,6
<i>AcOEt-EtOH</i>	5S	3	2,6	0,2
<i>EtOH</i>	6S	3	5,8	0,1

Para comparar los rendimientos de extracción para cada biomasa, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (*Anexo A, tabla A2*). Se basa en el cumplimiento de dos supuestos fundamentales: normalidad y homocedasticidad. Este análisis permitió comparar varios grupos (extractos) en una variable cuantitativa (rendimiento). Esta prueba es una generalización del contraste de igualdad de las medias obtenidas para dos muestras independientes, es útil para contrastar la igualdad de medias cuando se tienen tres o más poblaciones independientes con distribución normal, es decir, supuestas k poblaciones independientes, las hipótesis son:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

$$H_1 = \mu_i \neq \mu_j \text{ para algún } i \neq j; i = 1,2,3 \dots j = 1,2,3 \dots$$

La hipótesis a probar que los rendimientos promedio de cada uno de los extractos fueran iguales, contra la hipótesis alterna de que por lo menos un par fueran distintos. Los resultados del análisis de varianza para cada biomasa (*Anexo A, tabla A4 y A11*), indicaron que la hipótesis nula debía rechazarse en ambos casos, puesto que el valor del estadístico de prueba ($F_{\text{calc}} = 682,78; 115,96$) fue mayor que el F teórico ($F_{0,95, 5, 12} = 3,268$). Por tanto, es posible asumir con un nivel de significancia $\alpha=0,05$, que existen diferencias significativas entre los rendimientos de extracción para cada una de las biomásas.

El resultado anterior hace necesario establecer entre cuales pares de medias existen diferencias respecto al promedio de los rendimientos. Para resolver este interrogante, se establecieron pruebas de comparación múltiple (prueba de diferencia honestamente significativa de Tukey, **DHS**) para hacer comparación entre todos los pares de medias, indicando estadísticamente cuales de ellas son diferentes. La hipótesis nula y alterna se describe a continuación:

$$H_0 = \mu_i = \mu_j ; i = 1,2,2,3 \dots, j = 1,2,3 \dots$$

$$H_1 = \mu_i \neq \mu_j ; i = 1,2,2,3 \dots, j = 1,2,3 \dots$$

En la *tabla A8 y A15* del *anexo A* aparecen todas las posibles combinaciones dos a dos entre los niveles o categorías del factor (extracto) para cada biomasa, las diferencias entre las medias, así como el *p-valor*. A partir de esa información, se construye la tabla de comparación múltiple para la prueba de Tukey, a partir de los subconjuntos donde se encuentra cada extracto, es asignada una letra del alfabeto: a, b, c y d, como se muestra en la **tabla 13**.

Tabla 13. Análisis de Tukey de los valores del rendimiento de extracción por soxhlet a presión reducida.

Solventes	Extracto	Rendimiento (%)
Hex	1E	13,6 ± 0,5 a
Hex-AcOEt	2E	0,9 ± 0,1 c
AcOEt	3E	13,7 ± 0,2 a
Hex-AcOEt-EtOH	4E	2,4 ± 0,5 b
AcOEt-EtOH	5E	2,2 ± 0,5 b
EtOH	6E	13,9 ± 0,5 a
Hex	1S	2,5 ± 0,1 b
Hex-AcOEt	2S	0,5 ± 0,1 c
AcOEt	3S	3,0 ± 0,2 b
Hex-AcOEt-EtOH	4S	2,3 ± 0,6 b
AcOEt-EtOH	5S	2,6 ± 0,2 b
EtOH	6S	5,8 ± 0,1 a

Se observó que los mayores rendimientos de extracción pertenecieron a los extractos donde se empleó un solvente de extracción sin que la biomasa hubiera pasado por otro solvente anteriormente, lo cual fue más notable para el extracto etanólico tanto para el epicarpio como para la semilla (rendimientos del 13,9 y 5,8 % respectivamente), por lo que estos extractos son los más ricos en cuanto la cantidad de sustancias que fueron extraídas. En el lado opuesto tenemos los extractos con menor rendimiento, que corresponden a los extractos en acetato de etilo donde la biomasa fue previamente desengrasada con hexano, estos son los extractos con mayor selectividad en cuanto a su composición en el tipo de analitos extraídos. En cuanto a trabajos de otros autores, se tiene el reporte del rendimiento de extracción de grasa a partir de la semilla de aguacate de la variedad Hass cultivada en México, donde se reportan valores cercanos a los obtenidos, donde emplearon extracción soxhlet y con CO₂ supercrítico: se encontró que con hexano y CO₂ supercrítico se extrajo aproximadamente la misma cantidad de grasa, 3.08 y 3.07% respectivamente (García *et al.*, 1999).

Luego de obtener los extractos soxhlet, se procedió a determinar el CTF y el CTFI.

3.1.2 Contenido total de fenoles

Los valores promedio de las medidas realizadas por triplicado junto a las comparaciones realizadas por la prueba de Tukey se muestran en la **tabla 14**.

Tabla 14. Contenido total de fenoles para cada uno de los extractos obtenidos por extracción soxhlet a presión reducida.

Solventes	Extracto	mg EAG/mg extracto	mg EAG/100 g muestra seca
Hex	1E	0,030 ± 0,001 f	411,2 ± 9,6 e
Hex-AcOEt	2E	0,079 ± 0,001 d	74,7 ± 1,3 f
AcOEt	3E	0,052 ± 0,001 e	714,5 ± 9,6 d
Hex-AcOEt-EtOH	4E	0,801 ± 0,001 a	1959,3 ± 3,4 b
AcOEt-EtOH	5E	0,508 ± 0,001 b	1093,3 ± 2,0 c
EtOH	6E	0,273 ± 0,001 c	3785,8 ± 9,1 a
Hex	1S	0,330 ± 0,001 e	828,1 ± 2,3 e
Hex-AcOEt	2S	0,847 ± 0,001 c	391,1 ± 0,6 f
AcOEt	3S	0,285 ± 0,001 f	857,3 ± 2,8 d
Hex-AcOEt-EtOH	4S	0,748 ± 0,002 d	1743,1 ± 4,5 c
AcOEt-EtOH	5S	1,050 ± 0,001 b	2741,7 ± 3,7 b
EtOH	6S	1,182 ± 0,001 a	6887,3 ± 8,2 a

Al comparar los resultados obtenidos con lo reportado en literatura (Rodríguez *et al.*, 2011a), se observaron resultados inferiores en cuanto el CTF del extracto en acetato de etilo empleando como técnica de extracción la maceración, tanto para epicarpio como para semilla (3293 ± 925 y 1699 ± 408 mg EAG/100 g material seco), aunque los valores se encuentran dentro del rango. Las diferencias pueden deberse a diferencias en las condiciones geográficas del sitio del cultivo, composición química del suelo de cultivo, metodología de extracción y estados de madurez (Wang *et al.*, 2010).

Se observó que el solvente de extracción jugó un papel importante en el momento de extraer compuestos fenólicos (o de mayor polaridad), debido a que dependiendo de la polaridad del solvente empleado, se afectó la polaridad de los compuestos extraídos (tipo fenol). Los extractos **2**, **4**, **5**, **6** para la semilla y **4** para el epicarpio, presentaron un alto contenido de fenoles en comparación frente a los demás extractos en general. Solamente uno de los cinco extractos mencionados corresponde a epicarpio, por lo tanto, se puede concluir que la semilla en comparación con el epicarpio es más rica en compuestos tipo fenólicos para la variedad Hass del presente estudio empleando extracción soxhlet.

3.1.3 Contenido total de flavonoides

En la **tabla 15** se realizó una prueba de Tukey para la cuantificación de los flavonoides por el método del cloruro de aluminio en medio básico, para los extractos obtenidos por soxhlet a presión reducida.

Tabla 15. Contenido total de flavonoides para cada uno de los extractos obtenidos a presión reducida.

Solventes	Extracto	mg Q/mg extracto		mg Q/100g muestra seca	
Hex	1E	0,028 ± 0,001	c	375,3 ± 8,2	bc
Hex-AcOEt	2E	0,078 ± 0,001	b	73,2 ± 1,2	d
AcOEt	3E	0,044 ± 0,001	bc	606,3 ± 8,9	bc
Hex-AcOEt-EtOH	4E	0,678 ± 0,004	a	1657,5 ± 3,5	a
AcOEt-EtOH	5E	0,078 ± 0,001	b	166,9 ± 2,0	cd
EtOH	6E	0,011 ± 0,001	c	150,3 ± 9,3	cd
Hex	1S	0,311 ± 0,002	b	780,6 ± 2,7	bc
Hex-AcOEt	2S	0,703 ± 0,005	a	324,6 ± 1,5	e
AcOEt	3S	0,269 ± 0,002	c	810,5 ± 2,6	bc
Hex-AcOEt-EtOH	4S	0,278 ± 0,002	c	647,1 ± 4,4	d
AcOEt-EtOH	5S	0,269 ± 0,002	c	702,6 ± 3,6	cd
EtOH	6S	0,178 ± 0,001	d	1034,7 ± 8,5	a

Se observa de forma general que la semilla es más rica en este tipo de compuestos que el epicarpio. De igual forma como se observó con los fenoles, los solventes de mayor polaridad tienden a dar valores superiores en flavonoides. Hasta la fecha, no se han encontrado reportes de cuantificación de flavonoides por el método empleado en el presente trabajo.

Luego de evaluar el rendimiento de extracción, el CTF y el CTFI para cada uno de los extractos obtenidos a presión reducida, se procedió a realizar el ensayo de AA en oleína de palma y en carne de res cruda (**sección 3.1.4**), como la capacidad que tiene cada extracto en retardar la oxidación de los lípidos presentes en cada matriz grasa.

3.1.4 Actividad antioxidante

- **Actividad antioxidante en oleína de palma**

Para evaluar la actividad antioxidante en oleína de palma de los extractos obtenidos por soxhlet a presión reducida, se realizó el seguimiento en la formación de los productos de oxidación entre los días 0 a 15 (días 0, 3, 6, 9, 12 y 15), en ciertas condiciones experimentales, las cuales se detallaron en la sección de metodología. El análisis de los resultados se hizo mediante un análisis de componentes principales (**ACP**), con el fin de determinar el extracto más promisorio en cuanto a la protección de la oleína frente a la oxidación lipídica mediante la cuantificación de los hidroperóxidos del ácido linoleico (HPL) y las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se realizó un blanco de la oleína sin antioxidantes, y controles positivos con butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) y ácido gálico (GA), antioxidantes empleados en la protección de aceites, siendo su uso reglamentado por el codex alimentarius 2011 (en aceites comestibles a una concentración de 200 ppm).

Definido el extracto más activo para cada una de las biomásas, las respectivas condiciones de extracción fueron reproducidas a presión atmosférica para determinar el efecto de la temperatura de extracción sobre la actividad antioxidante.

En la **tabla 16**, se resumen los resultados obtenidos en la medición de los HPL, expresados como el promedio \pm desviación estándar, junto a la prueba de Tukey para los doce extractos, los patrones y el blanco (HPL para el día cero $6,51 \pm 0,05$ HPL/kg oleína). En la **tabla 17**, se muestran los resultados del análisis de TBARS, expresados estadísticamente de igual forma que los HPL (TBARS día cero $0,01 \pm 0,01$ mg MDA/kg oleína).

Tabla 16. Cuantificación de los HPL producidos durante la oxidación de oleína adicionada con antioxidantes y con extractos.

Aditivo		mmol hidroperóxidos de ácido linoleico/kg oleína (mmol HPL/kg oleína)														
		Día 3		Día 6		Día 9		Día 12		Día 15						
Epicarpio	1E	10,70	± 0,21	de	12,22	± 0,32	bd	16,99	± 1,28	de	21,03	± 1,30	de	31,83	± 0,77	h
	2E	8,57	± 0,05	a	10,11	± 0,53	a	12,00	± 0,40	ab	14,88	± 0,77	a	21,64	± 0,34	bc
	3E	10,78	± 0,17	de	13,09	± 0,57	d	19,84	± 1,00	fg	24,41	± 0,67	fg	25,23	± 0,84	ef
	4E	11,22	± 0,13	e	11,80	± 0,52	bd	12,79	± 0,11	ab	16,86	± 1,10	ac	22,73	± 0,57	cd
	5E	10,32	± 0,09	cd	12,09	± 0,94	bd	20,56	± 0,46	g	24,90	± 0,91	g	26,16	± 0,68	f
	6E	10,76	± 0,22	de	15,51	± 0,37	e	16,29	± 0,55	cd	17,41	± 0,49	bc	28,86	± 1,40	gh
Semilla	1S	10,84	± 0,08	de	15,31	± 0,55	e	17,27	± 0,85	de	20,12	± 0,14	de	30,46	± 0,47	gh
	2S	11,14	± 0,13	e	11,94	± 0,30	bd	18,19	± 0,62	def	22,24	± 0,48	ef	24,57	± 0,44	df
	3S	11,17	± 0,08	e	18,35	± 0,27	f	19,07	± 1,60	eg	22,35	± 0,61	ef	23,83	± 0,20	de
	4S	10,29	± 0,31	cd	11,63	± 0,29	bd	14,21	± 0,62	bc	19,21	± 0,33	cd	21,52	± 0,85	bc
	5S	9,69	± 0,08	b	11,38	± 0,15	abc	12,65	± 0,49	ab	15,62	± 0,97	ab	17,51	± 0,08	a
	6S	11,91	± 0,08	f	15,62	± 0,10	e	17,04	± 0,66	de	19,11	± 0,16	cd	23,08	± 0,81	cde
	BHT	9,99	± 0,21	bc	11,20	± 0,32	abc	11,86	± 0,46	ab	17,55	± 1,20	bc	19,83	± 0,98	bc
	BHA	11,14	± 0,21	e	12,54	± 0,99	cd	17,25	± 0,92	de	17,58	± 0,57	bc	19,82	± 1,00	bc
	GA	9,06	± 0,13	a	10,88	± 0,46	abc	11,12	± 0,69	a	16,53	± 1,30	ab	22,39	± 0,04	cd
	Blanco	12,29	± 0,41	f	14,86	± 0,19	e	17,32	± 0,43	de	31,87	± 0,36	h	39,69	± 0,58	i

Tabla 17. Cuantificación de los TBARS producidos durante la oxidación de oleína adicionada con antioxidantes y con extractos.

Aditivo		mg malondialdehído/kg oleína (mg MDA/kg oleína)														
		Día 3		Día 6		Día 9		Día 12		Día 15						
Epicarpio	1E	0,42	± 0,16	cd	1,29	± 0,06	d	2,83	± 0,13	g	3,09	± 0,22	de	8,40	± 2,15	ac
	2E	0,36	± 0,15	ad	0,75	± 0,17	c	1,10	± 0,06	bc	1,16	± 0,02	ac	6,74	± 1,47	ac
	3E	0,65	± 0,14	d	2,12	± 0,17	e	2,48	± 0,06	fg	2,97	± 0,15	de	10,19	± 0,64	c
	4E	0,35	± 0,16	ad	0,52	± 0,03	ac	0,60	± 0,41	ab	0,88	± 0,30	ac	8,35	± 0,48	ac
	5E	0,39	± 0,14	bd	0,52	± 0,08	ac	0,60	± 0,28	ab	0,82	± 0,09	ac	9,90	± 0,80	bc
	6E	0,03	± 0,03	ab	0,23	± 0,23	ac	0,48	± 0,08	ab	0,50	± 0,12	ab	9,27	± 1,29	bc
Semilla	1S	0,32	± 0,11	ad	1,47	± 0,36	d	1,86	± 0,21	def	1,89	± 0,33	cd	8,31	± 2,69	ac
	2S	0,47	± 0,05	cd	2,09	± 0,04	e	2,37	± 0,31	eg	2,90	± 0,80	de	17,23	± 3,64	d
	3S	0,68	± 0,27	d	1,34	± 0,10	d	1,65	± 0,11	cd	3,44	± 0,44	e	10,44	± 1,19	c
	4S	0,22	± 0,11	abc	0,57	± 0,09	bc	0,69	± 0,38	ab	0,77	± 0,30	ac	7,40	± 0,67	ac
	5S	0,01	± 0,05	a	0,01	± 0,08	a	0,05	± 0,04	a	0,07	± 0,02	a	3,95	± 1,02	ac
	6S	0,04	± 0,07	ab	0,36	± 0,12	ac	0,37	± 0,15	a	0,44	± 0,13	ab	8,00	± 0,60	ac
	BHT	0,01	± 0,05	a	0,23	± 0,08	ac	0,46	± 0,23	ab	0,62	± 0,24	ab	9,81	± 0,57	bc
	BHA	0,16	± 0,09	abc	0,39	± 0,12	ac	0,68	± 0,16	ab	0,70	± 0,15	ac	8,97	± 1,33	bc
	GA	0,03	± 0,03	ab	0,09	± 0,14	ab	0,22	± 0,35	a	1,29	± 1,09	bc	5,59	± 0,39	ab
	Blanco	0,21	± 0,09	abc	1,62	± 0,41	de	1,72	± 0,29	ce	1,91	± 0,29	e	10,59	± 0,46	c

En las tablas anteriores se observó que el contenido de los productos de oxidación, es decir, tanto hidroperóxidos como TBARS, aumentaron a lo largo del tiempo del ensayo, presentándose los máximos en el último día de realización de las mediciones (día 15 para oleína y día 9 para carne) y los mínimos para el día tres. Los resultados anteriores proporcionan información sobre la capacidad de los antioxidantes de retardar la oxidación de cada una de las matrices grasas y por lo tanto de decrecer la concentración de los productos de oxidación en las diferentes etapas. Los HPL son productos iniciales de oxidación, y los TBARS son productos intermedios y finales de la oxidación. Por tanto, para tomar una decisión sobre el mejor antioxidante para retardar la oxidación de la oleína, es necesario tener en cuenta los productos que se forman no solamente al final del proceso oxidativo, sino también los productos iniciales.

Con el fin de lograr el objetivo anterior, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), el cual permitió tener en cuenta los resultados de forma conjunta y así, identificar los extractos con mayor AA. A continuación, se describirá de forma breve, su desarrollo para asegurar que el lector conozca las bases del principio.

El método de ACP tiene como objetivo transformar un conjunto de variables originales en un nuevo conjunto de variables (sin perder información), conocidas como componentes principales CP_1, CP_2, \dots, CP_n , donde cada una de ellas es una combinación lineal de las variables originales; en nuestro caso, las variables originales conciernen a los hidroperóxidos correspondientes para los días 3 (HPL_3), 6 (HPL_6), 9 (HPL_9), 12 (HPL_{12}), 15 (HPL_{15}), y los TBARS correspondientes a los días 3 ($TBARS_3$), 6 ($TBARS_6$), 9 ($TBARS_9$), 12 ($TBARS_{12}$) y 15 ($TBARS_{15}$).

Es decir, reuniendo la información de las **tablas 16 y 17**, habrían diez componentes principales ($CP_1, CP_2, \dots, CP_{10}$), los cuales se describen a continuación solamente dos de ellos para no extendernos demasiado:

$$\begin{aligned}
 CP_1 &= a_{11}HPL_3 + a_{12}HPL_6 + a_{13}HPL_9 + a_{14}HPL_{12} + a_{15}HPL_{15} + a_{16}TBARS_3 \\
 &\quad + a_{17}TBARS_6 + a_{18}TBARS_9 + a_{19}TBARS_{12} + a_{110}TBARS_{15} \\
 &\quad \vdots \\
 CP_{10} &= a_{101}HPL_3 + a_{102}HPL_6 + a_{103}HPL_9 + a_{104}HPL_{12} + a_{105}HPL_{15} + a_{106}TBARS_3 \\
 &\quad + a_{107}TBARS_6 + a_{108}TBARS_9 + a_{109}TBARS_{12} + a_{1010}TBARS_{15}
 \end{aligned}$$

Los coeficientes a_{ij} se eligen de forma que las nuevas variables sean ortogonales entre ellas. Hasta este punto no hay ninguna reducción en el conjunto de datos. No obstante, los coeficientes se eligen de forma que CP1 recoja la mayor variación en el conjunto de datos, CP2 recoge la siguiente mayor parte de la variación y así sucesivamente. Cuando existe una correlación significativa, el número de componentes es inferior al número de variables originales. Si las variables originales están correlacionadas de partida, entonces no tiene sentido realizar un ACP.

El cálculo de los componentes principales generalmente no debe depender de las unidades de medida empleadas, por lo tanto, se deben usar variables tipificadas. Con ello, se eliminan las diferentes unidades de medida y se consideran todas las variables implícitamente equivalentes en cuanto a la información recogida. Si las variables no se tipifican, y una ellas tiene una varianza mayor, entonces, esta controlará el CP1.

En el *anexo A, tabla A72*, se encuentra la matriz de correlación para las diez variables, donde se puede observar que ninguna variable explica a otra en su comportamiento, razón por la cual, se obtienen diez componentes principales, los cuales se muestran a continuación en la **tabla 18**, junto con los valores de varianza explicada por cada componente y su varianza acumulada.

Tabla 18. Valores de varianza explicada y varianza acumulada para el ACP.

componente	% Varianza	% Varianza acumulada
1	58,841	58,841
2	15,526	74,367
3	8,372	82,739
4	6,653	89,392
5	4,185	93,577
6	2,277	95,854
7	2,17	98,024
8	1,123	99,146
9	0,733	99,879
10	0,121	100,00

Se considera que se explican los resultados del ensayo de actividad antioxidante de forma aceptable con una varianza acumulada del 74,37% equivalente a analizar dos componentes principales, **CP1** y **CP2**, por lo tanto los resultados se pueden representar en dos dimensiones, en lugar de las 10 dimensiones originales.

En la **tabla 19** se encuentra la matriz de componente rotada con normalización Kaiser, la cual nos permite identificar el peso que tiene cada una de las variables originales sobre cada uno de los componentes. Se observa que el **CP1** correlaciona principalmente con TBARS (loadings de 0,62 a 0,93) y el **CP2** correlaciona principalmente con HPL (loadings de 0,66 a 0,89).

Estos resultados muestran una diferencia importante entre la información proporcionada por HPL y TBARS, sin que exista correlación entre éstos, por lo cual es necesario un seguimiento no solamente a los productos finales de oxidación sino a los intermediarios, para tener información completa sobre la forma en que actúan los antioxidantes sobre la oleína.

Tabla 19. Matriz de componentes rotada.

Ensayo	Días de oxidación	CP1	CP2
TBARS	3	,870	,062
	6	,916	,306
	9	,925	,198
	12	,873	,315
	15	,617	,364
HPL	3	,129	,890
	6	,047	,812
	9	,499	,665
	12	,510	,692
	15	,366	,663

A partir de los coeficientes de la **tabla 19** para **CP1** y **CP2**, al reemplazar los valores de cada variable tipificada para cada una de los extractos, se calculan las puntuaciones para cada extracto. Estas puntuaciones fueron representadas en un eje de coordenadas de dos dimensiones, **ver figura 20**, conocida como diagrama de dispersión.

Menores puntuaciones en cualquiera de los componentes, conllevan a mayor protección del aceite frente a la oxidación (loadings positivos). La interpretación de los puntajes se hace en función de su ubicación o de la distancia respecto a otro punto del diagrama (distancia euclídeana).

El **CP1** explica el 58,84% de la variabilidad total del ensayo y correlacionó principalmente con los TBARS (para las cinco variables que cuantificaron la formación de TBARS para los días 3, 6, 9, 12 y 15), el **CP2** el cual explica el 15,53% de la variabilidad total del ensayo correlacionó principalmente con HPL (cinco variables que cuantificaron la formación de HPL

para los días 3, 6, 9, 12 y 15). En el gráfico de dispersión se observó que el blanco presenta el nivel superior de oxidación en cuanto a la formación de HPL, pero no en cuanto a la formación de TBARS. En cuanto a los antioxidantes comerciales BHA, BHT y GA, presentaron diferencias en cuanto a la formación de HPL, siendo el GA quien mostró superioridad, no obstante, en cuanto a la formación de TBARS, mostraron niveles similares de protección frente a la oxidación (ver rectángulo, **figura 20**). El extracto **1S** y el extracto **2E** no presentan diferencias respecto al blanco en cuanto a la formación de TBARS (ver línea continua vertical, **figura 20**). Los extractos **3S**, **1E**, **3E** y **2S** estimularon la formación de TBARS, a tal punto que su concentración es superior a la del blanco, por lo que se concluye que presentaron un efecto prooxidante (ver elipse, **figura 20**), mientras que los extractos **5E**, **4E**, **4S**, **6E**, **5S** y **6S** (extractos ubicados hacia el lado izquierdo de la línea vertical) mostraron

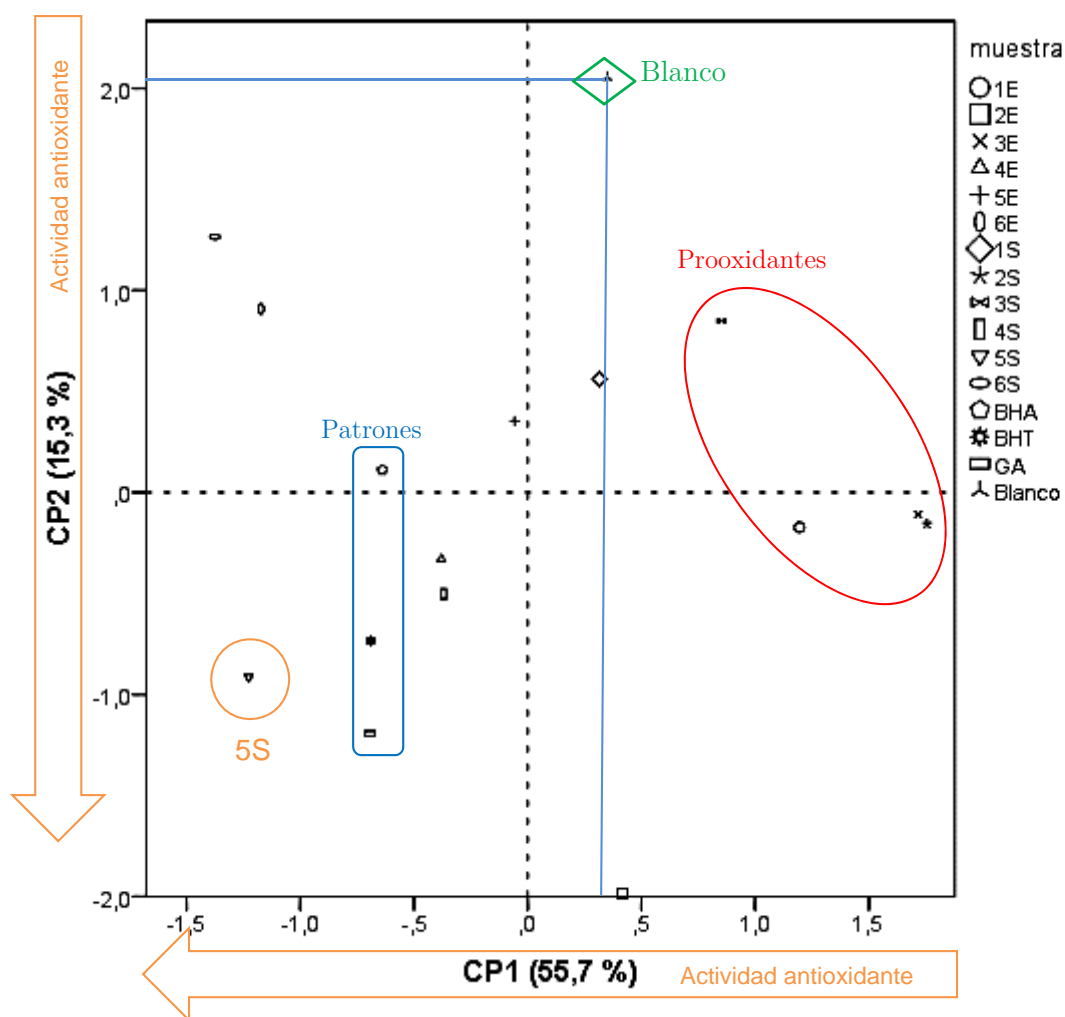


Figura 20. ACP para el ensayo de oxidación lipídica. La última letra del extracto corresponde al tipo de biomasa.

actividad en cuanto a la protección frente a la formación de los TBARS, siendo los más promisorios los extractos **5S**, **6S** y **6E**. Todos los extractos inhibieron la formación de hidroperóxidos, ya que al observar el gráfico de dispersión, se ubican a valores más negativos del blanco, siendo el extracto **5S** el que presentó mayor protección de la oleína, solamente se ve superado por el GA (comparar distancias euclidianas en el gráfico).

En la **figura 21** y **22** se representaron las cinéticas de oxidación para los extractos que mejor protegen a la oleína frente a la formación de productos de oxidación a partir del ACP (línea de tendencia exponencial). Se observó que para el extracto **5S** los niveles de HPL y TBARS fueron cercanos o inferiores a los producidos en la oleína protegido con el antioxidante comercial (GA). Teniendo en cuenta los resultados anteriores, el extracto **5S** fue el más promisorio frente a la protección ante la oxidación de oleína, debido a que inhibe tanto la formación de TBARS como la de HPL.

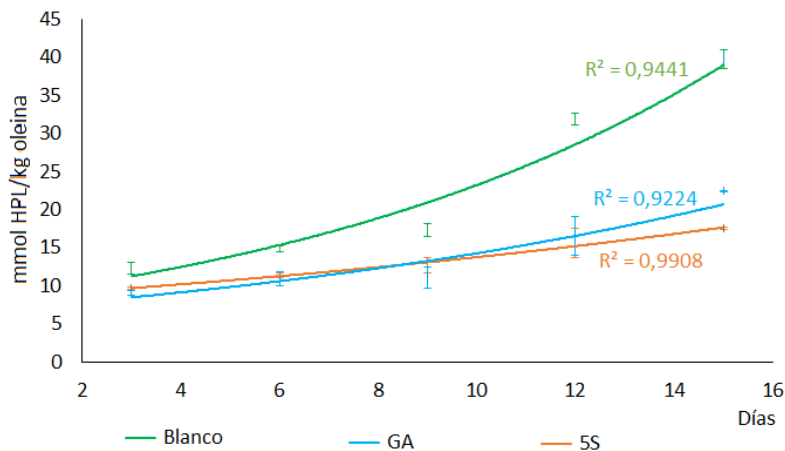


Figura 21 Cinética de oxidación de HPL para los extractos más promisorios.

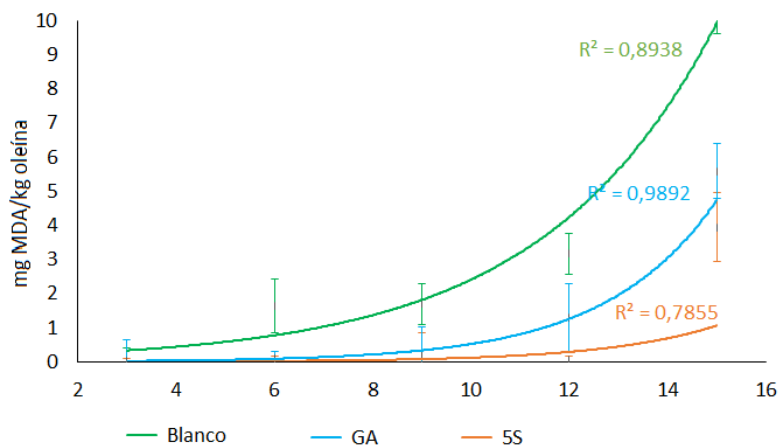


Figura 22 Cinética de oxidación de TBARS para los extractos más promisorios.

Respecto a este extracto, cabe anotar que presentó valores intermedios de rendimiento ($2,6 \pm 0,2$ %), de CTF ($1093,3 \pm 2,0$ mg EAG/100 g muestra seca, $1,050 \pm 0,001$ mg EAG/mg Extracto) y de CTFI ($702,6 \pm 3,6$ mg quercetina/100 g muestra seca, $0,269 \pm 0,002$ mg quercetina/mg extracto).

Un estudio de correlación realizado entre CTF y **CP1**, concluyó que existe correlación aceptable ($Pearson = -0,782$, $n=12$) entre estas dos variables, siendo el CTF expresado en términos de muestra seca (*Anexo A, tabla A73*).

La semilla del fruto del aguacate Hass se seleccionó como la biomasa promisorio, siendo el extracto etanólico de la biomasa previamente sometida a extracción con acetato de etilo, el que presentó el mejor desempeño frente a la oxidación lipídica en oleína de palma.

En el caso de la oleína de palma, la AA en el extracto a presión atmosférica y en los extractos obtenidos por EFS se determinaron al someter la oleína al ensayo de oxidación acelerado. Como se describió en la metodología, se realizó un cambio en la temperatura del ensayo de oxidación convencional y en la forma de suministrar el oxígeno necesario para llevar a cabo los procesos oxidativos de los lípidos en menor tiempo.

Empleando el extracto **5S** obtenido a presión reducida, **GA** y un **blanco**, se realizó un estudio de correlación entre el ensayo de oxidación acelerado y el convencional por medición de HPL y TBARS durante tres días, todas las mediciones fueron realizadas por triplicado. A partir de los resultados del estudio de correlación (Pearson) se concluyó que a partir del ensayo de oxidación acelerado se pueden obtener resultados confiables y comparables a los que se obtenían por el método convencional, lo que permite tomar decisiones en menor tiempo entre un conjunto de extractos, sobre cuál sería el más promisorio para la protección de la oleína de palma frente a la oxidación lipídica. La matriz de correlación tanto para HPL como para TBARS se encuentra en el *anexo A, tabla A74 y tabla A75*, respectivamente.

Los resultados para el extracto obtenido a presión reducida y presión atmosférica se muestran en la **tabla 20**.

Tabla 20. Comparación del CTF y CTFI para el extracto más promisorio, obtenido a presión atmosférica (5Satm) y a presión reducida (5S).

Variable	Extracto 5Satm	Extracto 5S
Rendimiento %	4,6 ± 0,2	2,6 ± 0,2
CTF (mg EAG/100 g m.seca)	2603,0 ± 62,0	2741,7 ± 3,7
CTF (mg EAG/mg Extracto)	0,567 ± 0,006	1,050 ± 0,001
CTFI (mg Q/100 g m.seca)	165,3 ± 9,8	702,6 ± 3,6
CTFI (mg Q/mg Extracto)	0,036 ± 0,002	0,269 ± 0,002

Para conocer el posible efecto de la temperatura sobre la AA del extracto promisorio obtenido a presión reducida (5S), se realizó un estudio comparativo por seguimiento de los productos de oxidación (HPL y TBARS) frente al extracto obtenido a presión atmosférica (5Satm), ver **tabla 21**.

De forma general, se observó que el extracto a presión reducida presentó un mejor desempeño en cuanto la protección de la oleína durante los tres días de oxidación, debido a que la concentración de HPL y TBARS es inferior para el extracto obtenido a presión reducida.

Tabla 21. Cinética de oxidación para la oleína producida mediante el método de oxidación acelerado.

HPL mmol hidroperóxidos de á.linoico/kg oleína (mmol HPL/kg oleína)					
muestra	Dia 1		Dia 2		Dia 3
Blanco	6,62 ± 0,04	d	6,82 ± 0,07	c	75,55 ± 0,20 d
5S	1,17 ± 0,08	b	5,05 ± 0,02	a	16,53 ± 0,12 a
5Satm	1,75 ± 0,01	c	5,10 ± 0,02	a	17,58 ± 0,20 c
GA	0,55 ± 0,02	a	5,47 ± 0,02	b	17,48 ± 0,18 b
TBARS mg malondialdehído/kg oleína (mg MDA/kg oleína)					
muestra	Dia 1		Dia 2		Dia 3
Blanco	8,55 ± 0,05	d	9,52 ± 0,03	d	68,81 ± 0,31 d
5S	0,53 ± 0,01	b	0,60 ± 0,01	b	18,42 ± 0,19 b
5Satm	0,73 ± 0,01	c	0,82 ± 0,01	c	19,78 ± 0,04 c
GA	0,19 ± 0,01	a	0,23 ± 0,01	a	13,29 ± 0,07 a

Aunque el método de extracción a presión atmosférica permite obtener mayor rendimiento de extracto, vemos que la temperatura tiene un efecto negativo no solamente sobre la actividad

antioxidante, sino sobre el CTF y el CTFI. Dicho de otra forma, existen compuestos con AA en el extracto que son sensibles a los efectos de cambios de temperatura, ver **tabla 21**; por tanto la extracción soxhlet a presión reducida permite obtener un extracto con mayor AA a partir de semillas de aguacate Hass.

▪ **Actividad antioxidante en carne de morrillo**

Para evaluar la AA en carne de morrillo de los extractos soxhlet, se realizó seguimiento de algunos productos de oxidación (HPL y TBARS), para los días 3, 6 y 9; para el día cero los valores fueron $0,45 \pm 0,01$ mmol HPL/kg carne; $0,02 \pm 0,01$ mg MDA/kg carne. Los resultados de AA se muestran en las **tablas 22** y **23**. Se observó que el contenido de los productos de oxidación se incrementa a medida que pasa el tiempo, aunque lo hace en menor proporción si lo comparamos con la cinética de oxidación de la oleína (cinética de oxidación más lenta). Se observó que el comportamiento es diferente para cada extracto en las diferentes etapas de la oxidación.

Tabla 22. Cuantificación de los HPL formados durante la oxidación de carne de morrillo adicionada con antioxidantes y con extractos.

Aditivo		mmol hidroperóxidos de ácido linoleico/kg carne (mmol HPL/kg carne)					
		Día 3		Día 6		Día 9	
Epicarpio	1E	1,86 ± 0,19	ac	2,70 ± 0,32	ab	4,19 ± 0,47	ab
	2E	1,80 ± 0,11	ac	2,48 ± 0,28	a	3,41 ± 0,22	a
	3E	2,71 ± 0,34	e	4,03 ± 2,47	b	4,58 ± 1,14	ac
	4E	2,43 ± 0,22	ce	3,46 ± 0,35	ab	3,48 ± 0,18	a
	5E	2,01 ± 0,29	ae	2,51 ± 0,23	ab	4,38 ± 0,24	ac
	6E	1,62 ± 0,20	a	2,43 ± 0,50	a	5,24 ± 0,28	bc
Semilla	1S	1,76 ± 0,09	ab	2,71 ± 0,44	a	3,33 ± 0,07	a
	2S	1,56 ± 0,18	a	2,43 ± 0,40	a	3,07 ± 0,55	a
	3S	2,42 ± 0,28	ce	3,34 ± 0,55	ab	5,95 ± 0,51	c
	4S	2,60 ± 0,09	de	3,05 ± 0,53	ab	4,01 ± 0,33	ab
	5S	2,08 ± 0,30	ae	2,96 ± 0,10	ab	3,71 ± 0,03	ab
	6S	2,32 ± 0,23	bce	3,01 ± 0,27	ab	3,45 ± 0,07	a
Patrones	BHT	1,95 ± 0,26	ac	3,19 ± 0,50	a	4,20 ± 0,26	ab
	BHA	2,09 ± 0,35	acd	3,42 ± 0,48	ab	3,50 ± 0,26	ab
	GA	1,74 ± 0,08	ae	1,96 ± 0,13	ab	3,90 ± 1,49	a
	Blanco	2,12 ± 0,23	ae	3,48 ± 0,32	ab	4,27 ± 0,27	ab

Tabla 23. Cuantificación de TBARS formados durante la oxidación de la carne de morrillo adicionada con antioxidantes y con extractos.

Aditivo		mg malondialdehído/kg carne (mg MDA/kg carne)		
		Día 3	Día 6	Día 9
Epicarpio	1E	0,09 ± 0,08 ab	0,13 ± 0,01 abc	0,29 ± 0,07 ab
	2E	0,28 ± 0,24 b	0,31 ± 0,08 d	0,77 ± 0,10 cd
	3E	0,11 ± 0,09 ab	0,20 ± 0,01 ad	0,37 ± 0,03 ab
	4E	0,14 ± 0,03 ab	0,21 ± 0,04 ad	0,39 ± 0,04 ab
	5E	0,12 ± 0,03 ab	0,33 ± 0,07 d	0,56 ± 0,32 bd
	6E	0,22 ± 0,01 ab	0,23 ± 0,16 bd	0,79 ± 0,12 d
Semilla	1S	0,09 ± 0,05 a	0,16 ± 0,04 abc	0,27 ± 0,04 ab
	2S	0,08 ± 0,02 ab	0,13 ± 0,02 ad	0,24 ± 0,07 ab
	3S	0,10 ± 0,02 ab	0,16 ± 0,03 ad	0,41 ± 0,15 abc
	4S	0,14 ± 0,04 ab	0,09 ± 0,02 abc	0,29 ± 0,07 ab
	5S	0,12 ± 0,06 ab	0,39 ± 0,01 d	0,19 ± 0,18 ab
	6S	0,12 ± 0,10 ab	0,16 ± 0,03 ad	0,31 ± 0,01 ab
Patrones	BHT	0,05 ± 0,02 ab	0,06 ± 0,15 a	0,17 ± 0,14 abc
	BHA	0,08 ± 0,05 a	0,08 ± 0,02 ab	0,12 ± 0,01 a
	GA	0,07 ± 0,02 ab	0,02 ± 0,03 abc	0,41 ± 0,08 a
	Blanco	0,12 ± 0,02 ab	0,18 ± 0,02 cd	0,36 ± 0,02 ab

El ACP permitió seleccionar el extracto con mayor potencial como fuente de antioxidantes para proteger la carne de morrillo de la autooxidación lipídica, la eficacia de los extractos fue comparada frente a antioxidantes comerciales (BHT, BHA y GA).

En la **tabla 24** se observa la varianza y la varianza acumulada de cada uno de los componentes principales. Explican más del 70% de la varianza del experimento.

Tabla 24. Varianza y varianza acumulada para el ACP.

componente	% varianza	% varianza acumulada
1	40,80	40,80
2	30,31	71,11
3	16,48	87,59
4	7,89	95,48
5	3,34	98,82
6	1,18	100,00

El peso que tiene cada una de las variables en cada componente, se observa en la **tabla 25**. De forma general, se observa que **CP1** correlaciona de forma positiva y en alto nivel con TBARS y que **CP2** lo hace con HPL.

Tabla 25. Valores de loadings para los dos primeros componentes principales.

Ensayo	Días de oxidación	CP1	CP2
TBARS	3	0,902	-0,067
	6	0,720	0,098
	9	0,915	-0,186
HPL	3	-0,071	0,922
	6	-0,192	0,913
	9	0,344	0,451

Al representar los puntajes que corresponden a cada extracto a partir de los dos componentes principales en un sistema de coordenadas, se obtuvo que el blanco no ocupa el nivel máximo de oxidación para TBARS ni para HPL, ver **figura 23**. El BHA y el GA presentaron niveles de protección similares en cuanto a TBARS mostrando diferencias en cuanto a HPL. El BHT mostró no ser tan eficiente en cuanto a la protección frente a la formación de TBARS. Los extractos que presentaron actividad prooxidante significativamente diferente respecto al blanco en cuanto a la formación de TBARS corresponden a los extractos **2E**, **5E** y **6E** (elipse figura 23) y en menor magnitud los extractos **3E**, **3S**, **4E** y **5S** (ver rectángulo de la figura 23). Para la formación de HPL, los extractos que presentaron actividad prooxidante fueron los extractos **3E**, **3S**, **4E** y **4S** (paralelogramo figura 23). Los que presentaron actividad antioxidante para TBARS fueron **4S**, **6S**, **1E**, **1S** y **2S**. Se observó que para TBARS los extractos que presentaron actividad antioxidante no hacen distinción en cuanto a polaridad, debido a que encontramos extractos obtenidos con hexano (**1E**, **1S**), acetato de etilo (**2S**) y etanol (**4S** y **6S**).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se concluyó que el extracto más promisorio corresponde al **2S**, con nivel de protección similar al BHT (ver círculo figura 23). El BHA y el GA mostraron niveles superiores de protección en TBARS, pero no en HPL, los cuales son importantes teniendo en cuenta la varianza explicada del **CP2**. Para este caso, se obtuvo un rendimiento bajo ($0,5 \pm 0,1$ %) en comparación con los rendimientos de las otras extracciones, cuya media estaba alrededor del 2,8%. El CTF estuvo en $391,1 \pm 0,6$ mg EAG/100 g muestra, $0,847 \pm 0,001$ mg EAG/mg extracto, y el CTFI fue de $324,6 \pm 1,5$ mg Q/100 g muestra; $0,703 \pm 0,005$ mg Q/mg extracto, destacándose por ser el extracto con mayor valor en cuanto al

nivel de flavonoides por masa de extracto frente a los demás extractos de la semilla y del epicarpio. Es importante resaltar además que no se encuentra correlación entre las variables CTF, CTFI y AA (ver coeficientes de correlación de Pearson, Anexo A, tabla A76).

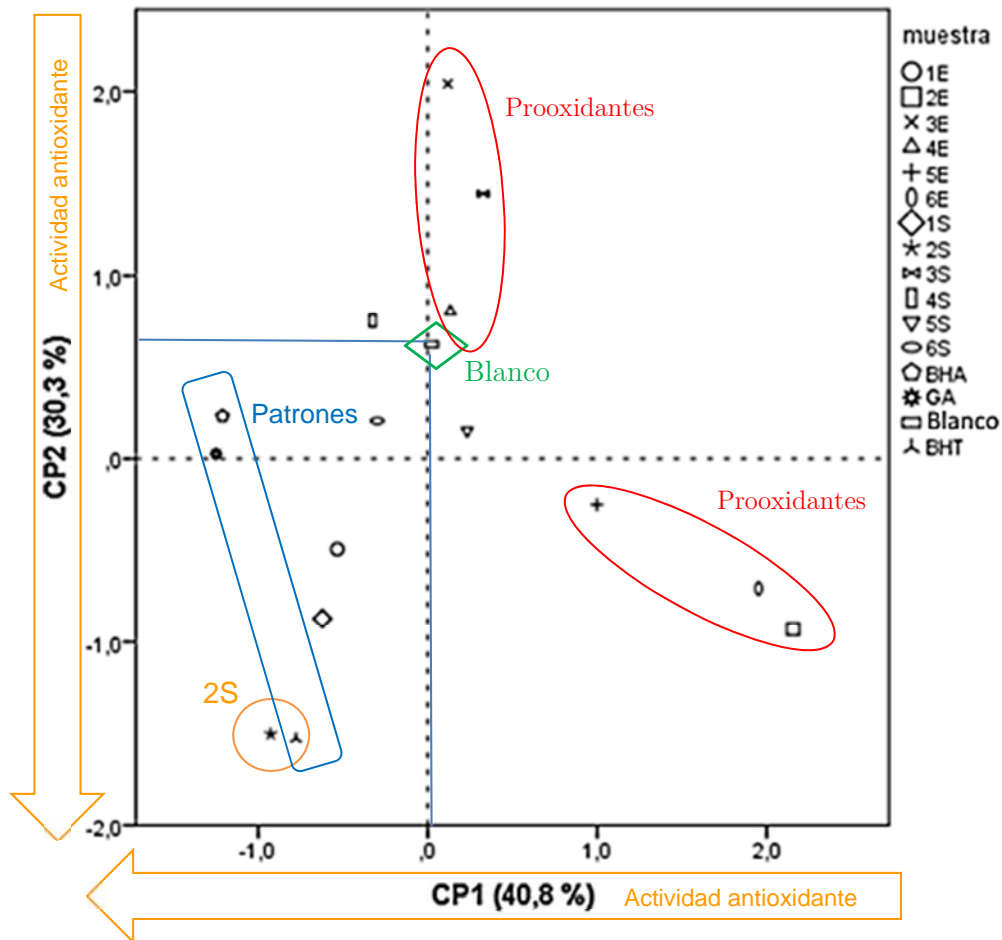


Figura 23. ACP para el ensayo de oxidación de carne de morrillo.

Conociendo el extracto más promisorio obtenido a presión reducida para la protección de la carne de morrillo, posteriormente se obtiene el extracto a presión atmosférica, para evaluar el efecto de la temperatura sobre el rendimiento de extracción, el CTF y el CTFI. Finalmente se observó un efecto negativo de la temperatura sobre el CTF y el CTFI como se muestra en los resultados promedio de la **tabla 26**. En la **tabla 27** se muestran las mediciones de HPL y TBARS para el ensayo de oxidación lipídica en carne, exactamente igual al ensayo realizado para los extractos obtenidos a presión reducida, es decir, con la carne refrigerada a 4°C, realizando mediciones los días 3, 6 y 9. Los resultados de la **tabla 27** mostraron que el extracto

a presión reducida presenta mayor eficiencia en cuanto a la protección de la carne de morrillo frente a la oxidación lipídica en comparación al extracto a presión atmosférica, lo que se observó al comparar directamente los valores de HPL y TBARS para cada uno de los días de oxidación.

Tabla 26. Comparación del CTF y CTFI para el extracto más promisorio obtenido a presión atmosférica (2Satm) y a presión reducida (2S).

Variable	Extracto 2Satm	Extracto 2S
Rendimiento %	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1
CTF (mg EAG/100 g m.seca)	366,8 ± 0,8	391,1 ± 0,6
CTF (mg EAG/mg extracto)	0,355 ± 0,001	0,847 ± 0,001
CTFI (mg Q/100 g m.seca)	174,8 ± 1,8	324,6 ± 1,5
CTFI (mg Q/mg extracto)	0,169 ± 0,006	0,703 ± 0,005

Tabla 27. Valores de HPL y TBARS en carne para el extracto más activo P. reducida vs. P. atmosférica.

HPL (mmol hidroperóxidos de á. linoleico/kg carne (mmol HPL/kg carne))						
muestra	Dia 3		Dia 6		Dia 9	
Blanco	1,55 ± 0,01	d	10,74 ± 0,01	d	12,67 ± 0,07	d
2S	0,46 ± 0,01	a	6,31 ± 0,02	b	6,96 ± 0,09	a
2Satm	0,71 ± 0,01	b	7,15 ± 0,01	c	11,58 ± 0,03	c
BHT	0,92 ± 0,01	c	6,14 ± 0,04	a	10,45 ± 0,08	b
TBARS (mg malondialdehído/kg carne (mg MDA/kg carne))						
muestra	Dia 3		Dia 6		Dia 9	
Blanco	0,18 ± 0,01	d	0,25 ± 0,01	d	0,72 ± 0,01	d
2S	0,06 ± 0,01	a	0,10 ± 0,01	a	0,32 ± 0,01	b
2Satm	0,15 ± 0,01	c	0,16 ± 0,01	b	0,46 ± 0,01	c
BHT	0,11 ± 0,01	b	0,18 ± 0,01	c	0,26 ± 0,01	a

A partir de los resultados anteriores se concluyó que la presión tiene un efecto significativo tanto en la actividad del extracto como en la cuantificación del CTF y el CTFI.

3.2 Extracción por fluidos supercríticos (EFSc)

Considerando que la semilla fue la biomasa más activa para la protección de la oleína y de la carne de morrillo frente a la oxidación lipídica (**sección 3.1.4**), la EFSc se realizó sobre ésta.

3.2.1 Rendimiento

Para determinar los variables que influyen en el rendimiento de extracción, así como sus interacciones, se planteó un diseño central compuesto. Las variables que se estudiaron fueron: presión (X_1 – 100, 150 y 200 MPa), porcentaje de cosolvente (X_2 – 3, 6 y 9%), composición de cosolvente (X_3 – AcOEt:EtOH 1:0, 1:1, 0:1) y temperatura (X_4 – 40, 50 y 60°C).

El número de baches de extracción se optimizó bajo las condiciones de presión y temperatura más suaves del diseño, es decir, el tratamiento con los factores de menor nivel: presión: 100 MPa; cosolvente 3%; composición del cosolvente (AcOEt:EtOH) 1:0; T: 40°C, ver **tabla 28**. Para lograr lo descrito anteriormente, se realizaron baches sucesivos, cada uno con duración de diez minutos, realizando dos lavados con CO₂ entre cada bache (60 MPa). Una representación de la cantidad de extracto que se obtiene en función del número de baches permitió definir cuantos baches eran necesarios para establecer un tiempo de extracción adecuado, ver **figura 24**.

En la parte derecha de la **tabla 28** se muestran los rendimientos obtenidos para cada uno de los ensayos del diseño experimental. Los rendimientos toman valores desde 0,5 a 3,6%, los cuales por lo general son similares a los que se obtenían por la metodología soxhlet a presión reducida (*rendimientos entre 2,2% y 3,0%*).

Para la extracción con fluidos supercríticos los rendimientos inferiores (*0,5; 0,7; 0,7; 1,7; 1,7%*) tienen en común que se realizaron al valor máximo de temperatura (60°C). Teniendo en cuenta lo anterior, al analizar los resultados de forma descriptiva, se pudo concluir que la temperatura tiene un efecto negativo sobre el rendimiento de extracción. Los máximos rendimientos corresponden a valores cercanos al centro del diseño, o a tratamientos que contienen dos factores en su menor nivel (*2,5; 2,5; 2,8; 3,0; 3,6%*).

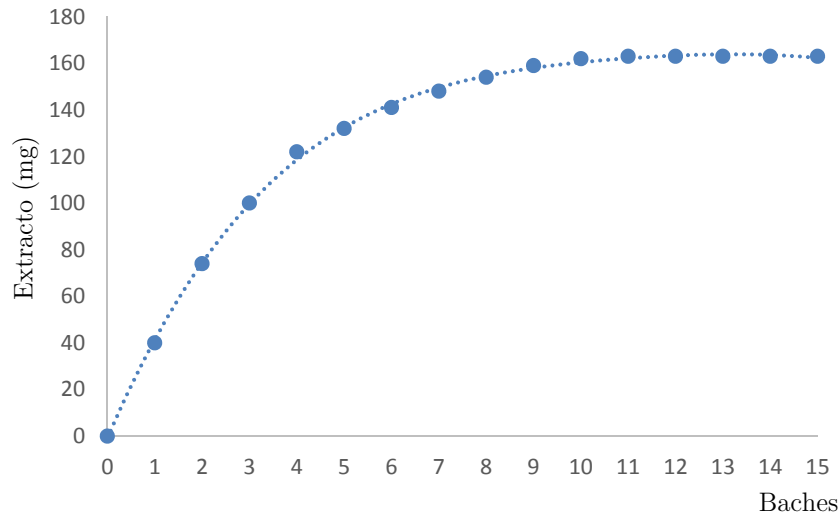


Figura 24. Optimización del número de batches de la EFSc.

Todos los experimentos se realizaron aleatoriamente sin replicación, donde la variable respuesta corresponde al rendimiento de extracción expresado en base seca como porcentaje (gramos de extracto obtenido por gramo de muestra seca por cien). Con el fin de determinar los factores representativos en cuanto al rendimiento de extracción, se realizó una relación múltiple, de la cual se obtuvo una expresión matemática entre la respuesta obtenida experimentalmente y el sistema de variables independientes. El modelo sinergista se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 \text{Rendimiento}(\%) = & b_0 + b_1^*X_1 + b_2^*X_2 + b_3^*X_3 + b_4^*X_4 + b_{12}^*X_1X_2 + b_{13}^*X_1X_3 + b_{14}^*X_1X_4 \\
 & + b_{23}^*X_2X_3 + b_{24}^*X_2X_4 + b_{34}^*X_3X_4 + b_{123}^*X_1X_2X_3 + b_{124}^*X_1X_2X_4 + b_{134}^*X_1X_3X_4 \\
 & + b_{234}^*X_2X_3X_4 + b_{1234}^*X_1X_2X_3X_4
 \end{aligned}$$

Los coeficientes b_i de este modelo fueron estimados (*Anexo A, tabla A 70*) y representados gráficamente en la **figura 25**, el intervalo de confianza se expresa como \pm desviación estándar. El análisis de varianza del diseño se muestra a continuación en la **tabla 29**.

Tabla 28. Resultados Diseño central compuesto.

Ensayo	Factores experimentales				Rendimiento (%)
	X ₁ (P)	X ₂ (%)	X ₃ (comp)	X ₄ (T)	
1	-	-	-	-	2,3
2	+	-	-	-	2,4
3	-	+	-	-	2,5
4	+	+	-	-	2,4
5	-	-	+	-	2,1
6	+	-	+	-	2,3
7	-	+	+	-	3,0
8	+	+	+	-	2,4
9	-	-	-	+	0,5
10	+	-	-	+	1,7
11	-	+	-	+	0,7
12	+	+	-	+	2,5
13	-	-	+	+	0,7
14	+	-	+	+	2,5
15	-	+	+	+	1,7
16	+	+	+	+	2,4
17	0	0	0	0	2,0
18	0	0	0	0	2,8
19	0	0	0	0	1,8
20	0	0	0	0	2,4
21	0	0	0	0	2,0
22	0	0	0	0	2,1
23	-	0	0	0	2,1
24	+	0	0	0	2,5
25	0	-	0	0	2,5
26	0	+	0	0	2,5
27	0	0	-	0	2,5
28	0	0	+	0	2,5
29	0	0	0	-	2,5
30	0	0	0	+	2,4
31	0	0	0	0	2,3
32	0	0	0	0	3,6
33	0	0	0	0	2,5

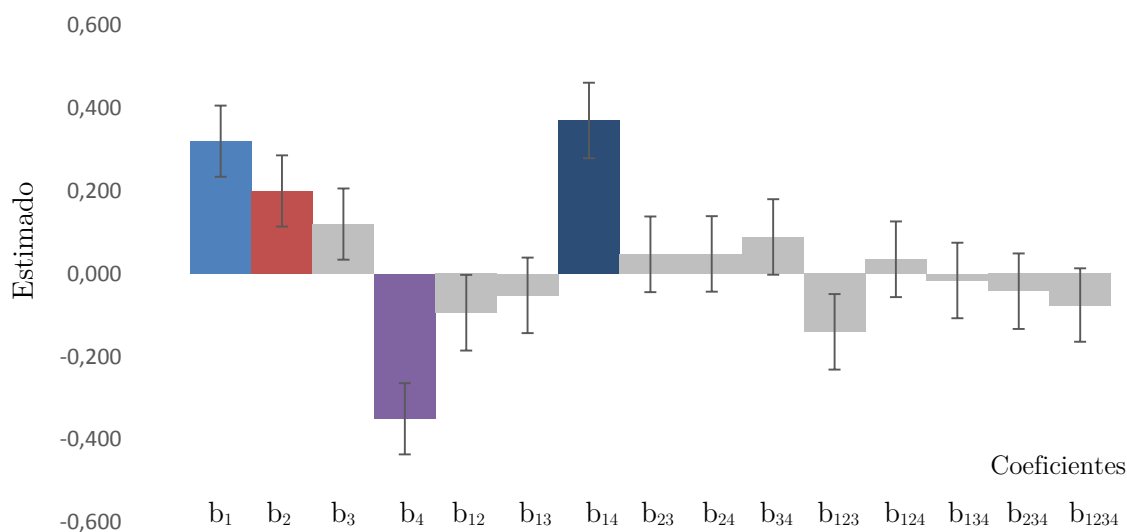


Figura 25. Coeficientes del modelo sinergista para el rendimiento de extracción.

Tabla 29. Análisis de varianza del diseño central compuesto

f fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Promedio cuadrados	Valor F	p-valor
Modelo	8.07	15	0.54	4.04	0.0063
Presión (b₁)	1.88	1	1.88	14.12	0.0021
%cosolvente (b₂)	0.73	1	0.73	5.52	0.0340
Composición cosolvente (b ₃)	0.28	1	0.28	2.09	0.1706
Temperatura (b₄)	2.22	1	2.22	16.67	0.0011
b ₁₂	0.14	1	0.14	1.07	0.3183
b ₁₃	0.043	1	0.043	0.33	0.5767
b₁₄	2.13	1	2.13	16.03	0.0013
b ₂₃	0.035	1	0.035	0.26	0.6178
b ₂₄	0.037	1	0.037	0.28	0.6063
b ₃₄	0.13	1	0.13	0.96	0.3439
b ₁₂₃	0.30	1	0.30	2.23	0.1577
b ₁₂₄	0.019	1	0.019	0.14	0.7102
b ₁₃₄	4,25	1	4,25	0.032	0.8607
b ₂₃₄	0.029	1	0.029	0.22	0.6491
b ₁₂₃₄	0.097	1	0.097	0.73	0.4083
Residual	1.86	14	0.13		
Cor Total	9,93	29			

A partir de los resultados representados en la **figura 25**, se observó que cuatro coeficientes fueron estadísticamente significativos. ($p\text{-valor} < 0,05$), el sinergismo de la presión con la temperatura ($b_{14} = -0,37$), la temperatura ($b_4 = -0,35$), la presión ($b_1 = 0,32$) y el porcentaje de cosolvente b_2 (0,20). Los valores estimados obtenidos para estos cuatro coeficientes del diseño se representan en color en la **figura 25**.

Teniendo en cuenta que son cuatro los coeficientes representativos, el modelo del análisis matemático se recalculó a partir de una regresión lineal múltiple con una interacción de primer nivel (el ANOVA para la estimación de los coeficientes se muestra en la **tabla 30**), es decir:

$$\text{Rendimiento}(\%) = b_0 + b_1^*X_1 + b_2^*X_2 + b_4^*X_4 + b_{14}^*X_1X_4$$

El valor F de *14,65* indicó que el modelo es significativo, así como el p-valor que es inferior a *0,05*, el cual indicó que cada término del modelo es igualmente significativo (*Anexo A, tabla A 71*).

Tabla 30. ANOVA modelo lineal con una interacción de primer grado.

fuelle	Suma de cuadrados	g.l.	Promedio cuadrados	Valor F	p-valor
Modelo	6,96	4	1,74	14,65	< 0,0001
Presión (b_1)	1,88	1	1,88	15,81	0,001
%cosolvente (b_2)	0,73	1	0,73	6,18	0,020
Temperatura (b_4)	2,22	1	2,22	18,67	0,0002
b_{14}	2,13	1	2,13	17,95	0,0003
Residual	2,97	25	0,12		
cor total	9,93	29			

Se obtiene finalmente la siguiente expresión:

$$\text{Rendimiento} = 2.16 + 0.32 \mathbf{X}_1 + 0.20 \mathbf{X}_2 - 0.35 \mathbf{X}_4 + 0.37 \mathbf{X}_1\mathbf{X}_4$$

Para el diseño global, se tiene: S.D. 0,37; C.V= 2,16; Coef. Determinación=0,70, (coef. Ajustado de determinación=0,65), al comparar los dos coeficientes de determinación se obtuvo una primera estimación sobre la validez del modelo, al ser muy próximos entre sí, se concluye que el modelo se ajusta a los resultados experimentales en términos de variación.

Este modelo permitió establecer la superficie de respuesta y predecir cualquier valor dentro del diseño experimental. Por ejemplo, a partir de los siguientes valores de las variables, se predicen los rendimientos mostrados a continuación (**tabla 31**).

Tabla 31. Valores estimados del rendimiento según el modelo propuesto.

X_1	X_2	X_3	X_4	Rendimiento
1.00	1.00	0.98	-0.82	2,7
1.00	1.00	1.00	-0.86	2,7

Luego de verificar que no existe un efecto de bloque (3 últimos ensayos **tabla 28**), el modelo del diseño se testeó a partir de la gráfica de los residuales (ver **figura 26**), los cuales se mantuvieron dentro del rango de ± 2 SD ($2 \cdot 0,37 = 0,74$) y no mostraron un patrón definido; lo anterior permitió concluir que el modelo es apropiado para el análisis de los resultados del diseño experimental.

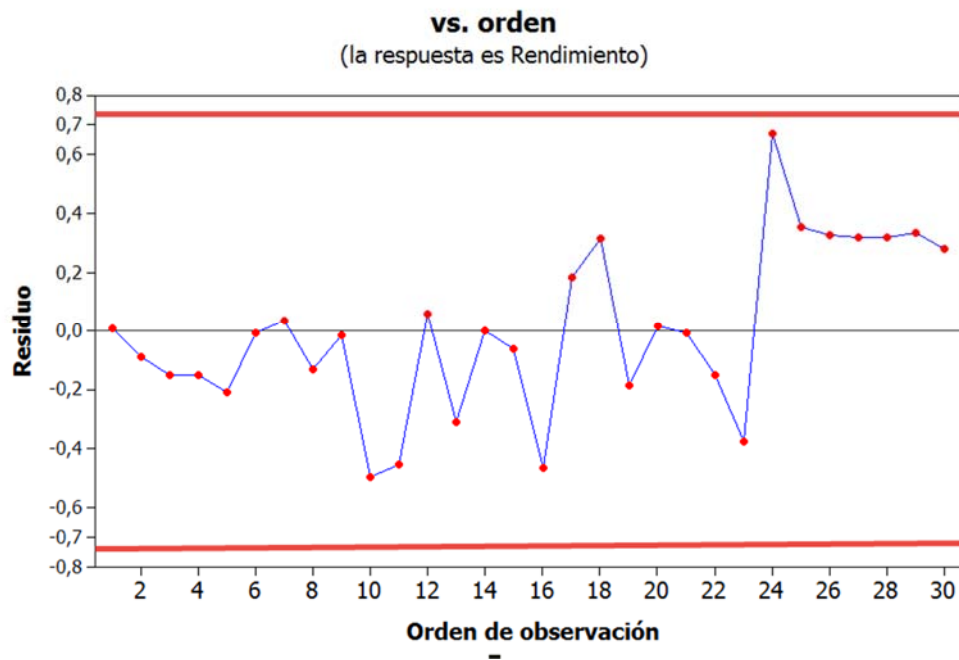


Figura 26. Residuales para cada uno de los ensayos.

En la **figura 27** y **28** se muestran los diagramas de nivel y la gráfica de superficie para el rendimiento de extracción en función de la presión y la temperatura, que fueron las variables determinantes sobre el rendimiento de extracción según el análisis previo, donde se observa con claridad que a menor temperatura y mayor presión se obtienen mayores rendimientos para la obtención de extractos de la semilla de aguacate empleando EFSc con cosolvente.

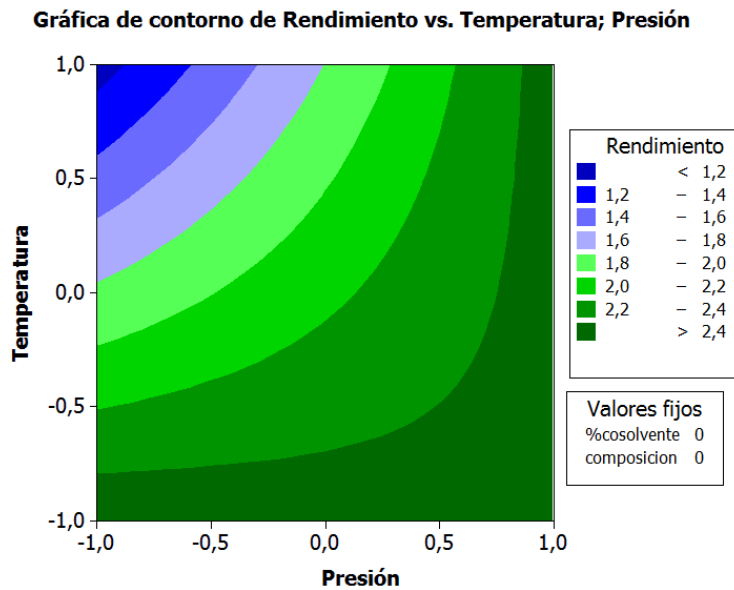


Figura 27. Gráfica de curvas de nivel del rendimiento en función de la presión y la temperatura.

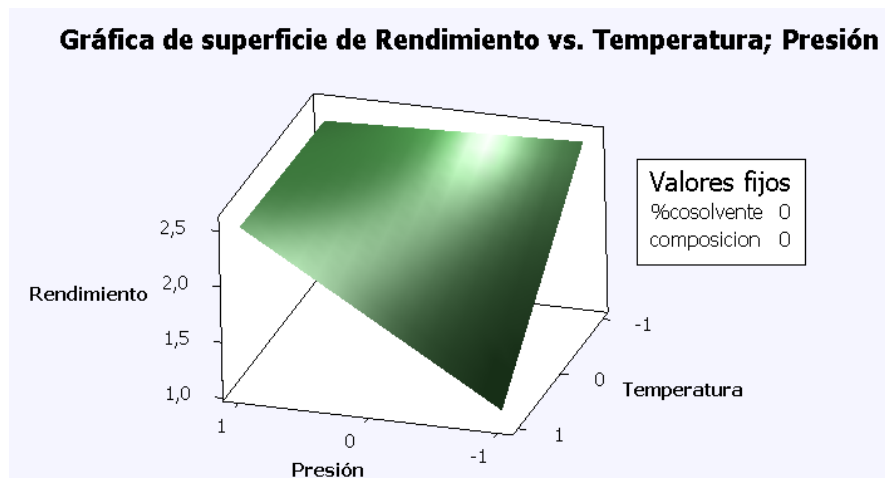


Figura 28. Gráfica de superficie del rendimiento de extracción en función de la temperatura y la presión de extracción.

En términos de rendimiento, la extracción con fluidos supercríticos permitió obtener extractos a partir de la semilla del aguacate Hass con rendimientos similares a los obtenidos por técnicas de extracción convencionales (soxhlet a presión reducida). En el diseño propuesto, se observó que la temperatura y la presión son las variables que afectan principalmente el rendimiento

de extracción en semilla, donde para obtener un mayor rendimiento de extracción, se debe trabajar a mayores presiones y menores temperaturas.

3.2.2 Contenido total de fenoles

En la tabla 32 se muestran los valores del CTF para los extractos obtenidos a partir de la semilla del aguacate Hass por EFSc, en el mismo orden del diseño experimental descrito anteriormente (sección 3.2.1). En las dos últimas filas se encuentran los extractos a presión reducida más activos para carne de morrillo (**2S**) y para oleina de palma (**5S**).

Tabla 32. CTF para los extractos obtenidos por EFSc.

Extracto	Contenido total de fenoles	
	mg EAG/100 g muestra seca	mg EAG/mg extracto
1	76,3 ± 15,8 g	0,034 ± 0,007 d
2	87,4 ± 12,6 fg	0,037 ± 0,005 d
3	78,8 ± 17,6 g	0,031 ± 0,007 d
4	25,0 ± 15,4 g	0,011 ± 0,007 d
5	1690,8 ± 15,2 e	0,792 ± 0,007 c
6	2443,7 ± 22,3 b	1,046 ± 0,010 a
7	3251,0 ± 14,2 a	1,095 ± 0,005 a
8	2384,9 ± 10,8 b	0,985 ± 0,005 a
9	42,9 ± 1,9 g	0,080 ± 0,003 d
10	72,6 ± 8,4 g	0,042 ± 0,005 d
11	25,1 ± 2,6 g	0,036 ± 0,003 d
12	116,7 ± 12,2 fg	0,047 ± 0,005 d
13	620,9 ± 5,4 f	0,907 ± 0,007 ab
14	2362,0 ± 16,6 b	0,962 ± 0,007 ab
15	1721,1 ± 11,8 de	1,004 ± 0,007 a
16	2278,4 ± 27,9 bc	0,953 ± 0,012 ab
17	289,0 ± 18,3 fg	0,143 ± 0,009 d
23	99,4 ± 10,6 fg	0,047 ± 0,005 d
24	138,4 ± 20,2 fg	0,056 ± 0,008 d
25	304,2 ± 28,6 fg	0,121 ± 0,012 d
26	346,5 ± 24,5 fg	0,139 ± 0,010 d
27	56,8 ± 16,6 g	0,023 ± 0,007 d
28	1761,0 ± 10,8 cd	0,711 ± 0,005 bc
29	290,3 ± 23,9 fg	0,116 ± 0,010 d
30	282,0 ± 10,8 fg	0,116 ± 0,005 d
2S	116,5 ± 43,2 fg	0,259 ± 0,096 d
5S	2512,7 ± 18,1 bcd	0,985 ± 0,007 a

En los resultados de CTF se observó que el solvente es decisivo en el momento de extraer compuestos tipo fenólicos, debido a que en los ensayo donde se empleó etanol como cosolvente, se muestra una elevación significativa del CTF. Algunos extractos obtenidos por EFSc presentaron valores de CTF comparables al extracto 5S.

3.2.3 Contenido total de flavonoides

A continuación se resumen los resultados de la cuantificación del CTFI en los extractos obtenidos por EFSc.

Tabla 33. CTFI para los extractos obtenidos por EFSc

Contenido total de flavonoides		
Extracto	mg Q/100g muestra seca	mg Q/mg extracto
1	112,8 ± 2,3 o	0,050 ± 0,001 g
2	242,9 ± 2,1 k	0,102 ± 0,001 fg
3	341,9 ± 2,2 h	0,136 ± 0,001 g
4	188,9 ± 3,1 m	0,081 ± 0,001 g
5	179,6 ± 3,7 m	0,084 ± 0,002 e
6	456,7 ± 2,0 d	0,195 ± 0,001 b
7	590,7 ± 1,6 cd	0,199 ± 0,002 a
8	364,0 ± 2,1 g	0,150 ± 0,001 b
9	115,8 ± 0,8 b	0,215 ± 0,002 g
10	116,6 ± 2,3 n	0,068 ± 0,001 g
11	44,1 ± 0,6 n	0,063 ± 0,001 g
12	170,3 ± 2,2 n	0,068 ± 0,001 fg
13	111,4 ± 0,9 ef	0,163 ± 0,001 f
14	678,3 ± 2,1 a	0,276 ± 0,001 b
15	271,3 ± 2,3 f	0,158 ± 0,001 de
16	283,0 ± 3,2 j	0,118 ± 0,001 bc
17	194,7 ± 1,0 kl	0,096 ± 0,001 fg
23	246,1 ± 1,9 j	0,115 ± 0,001 fg
24	312,4 ± 2,5 i	0,126 ± 0,001 fg
25	202,2 ± 2,5 m	0,080 ± 0,001 fg
26	323,8 ± 2,2 i	0,130 ± 0,001 fg
27	230,4 ± 5,4 l	0,093 ± 0,002 g
28	366,8 ± 2,2 g	0,148 ± 0,001 cd
29	402,6 ± 3,3 ef	0,161 ± 0,001 fg
30	400,0 ± 1,2 e	0,164 ± 0,001 fg
2S	30,2 ± 0,7 o	0,054 ± 0,001 fg
5S	516,6 ± 1,3 c	0,203 ± 0,001 bcd

En cuanto al CTFI no se observa una tendencia clara entre los factores del diseño experimental y la variable respuesta. Algunos extractos obtenidos por EFSc mostraron valores comparables en cuanto al CTFI en comparación a los extractos obtenidos por soxhlet a presión reducida.

3.2.4 Actividad antioxidante

- **Actividad antioxidante en oleína de palma**

El seguimiento de los productos de oxidación HPL y TBARS para los extractos obtenidos empleando fluidos supercríticos, se muestra en las **tablas 34 y 35**, respectivamente. La evaluación de la AA para los extractos **18 a 22** no fue realizada debido a que ellos son réplicas del extracto 17, igualmente los extractos **31 a 33**, tampoco se realizó debido a que son réplicas del punto medio del diseño, adicionalmente se realizó la medida de la AA del blanco, del GA y del extracto 5S. Para el día cero los valores fueron $6,65 \pm 0,58$ mmol HPL/kg oleína; $0,01 \pm 0,01$ mg MDA/kg oleína.

El ACP logró explicar el *81,1%* de los resultados del experimento con dos componentes (**tabla 36**). El **CP1** correlaciona principalmente con TBARS y el **CP2** con HPL (loadings entre *0,776* y *0,910* para CP1 y loadings entre *0,686* y *0,875* para CP2), (ver **tabla 37**), encontrándose la mayor variabilidad del experimento en la cuantificación de los TBARS.

Al representar los puntajes de cada extracto en el sistema de coordenadas, teniendo en cuenta dos componentes principales, se puede concluir que todos los extractos presentaron protección frente a la formación de HPL, debido a que se encuentran ubicados a valores más negativos respecto al blanco, siendo los más activos **4, 7, 13, 15, 16 y 28** (ver rectángulo de **figura 29**). Los extractos **8, 9, 14, 17 y 25** no presentaron protección frente a la formación de TBARS (véase que la mayoría de los extractos en la **figura 29** se encuentran ubicados al lado izquierdo de la línea vertical).

Tabla 34. Cinética de oxidación de los HPL para los extractos obtenidos por FSc evaluados en oleína por el método de oxidación acelerado.

Aditivo	mmol hidroperóxidos de ácido linoleico/kg oleína (mmol HPL/kg oleína)					
	Día 1		Día 2		Día 3	
1	18,63 ± 0,06	kl	21,51 ± 0,18	u	66,22 ± 1,38	ef
2	18,26 ± 0,06	l	36,34 ± 0,01	o	68,64 ± 0,93	de
3	24,46 ± 0,01	f	31,05 ± 0,04	r	62,36 ± 1,17	fg
4	20,25 ± 0,01	j	21,70 ± 0,02	u	25,86 ± 0,26	mn
5	21,38 ± 0,04	hi	33,94 ± 0,09	q	84,75 ± 4,22	b
6	14,92 ± 0,06	p	47,46 ± 0,02	f	61,49 ± 0,50	fg
7	23,25 ± 0,04	g	39,26 ± 0,02	m	49,36 ± 0,05	k
8	28,02 ± 0,07	d	76,33 ± 0,03	b	79,56 ± 4,94	b
9	19,37 ± 0,03	jkl	45,98 ± 0,17	h	78,34 ± 2,69	b
10	23,40 ± 0,03	fg	55,48 ± 0,03	c	71,12 ± 0,86	cde
11	33,42 ± 0,01	c	38,61 ± 0,01	n	53,65 ± 0,42	ijk
12	37,00 ± 0,08	b	42,53 ± 0,01	l	50,20 ± 1,26	jk
13	11,50 ± 0,08	q	20,87 ± 0,02	v	24,51 ± 0,13	mn
14	23,12 ± 0,05	g	23,13 ± 0,04	t	28,84 ± 0,21	mn
15	16,84 ± 0,03	mn	18,84 ± 0,03	w	20,56 ± 0,16	n
16	15,18 ± 0,02	op	17,23 ± 0,02	x	39,20 ± 0,18	l
17	34,33 ± 0,02	c	48,18 ± 0,03	e	77,07 ± 1,63	bc
23	20,26 ± 0,02	j	35,45 ± 0,03	p	53,03 ± 0,13	ijk
24	16,04 ± 0,05	no	17,43 ± 0,05	x	20,60 ± 0,28	n
25	20,27 ± 0,01	ij	45,64 ± 0,02	hi	76,16 ± 5,44	bcd
26	18,90 ± 0,06	kl	46,34 ± 0,02	i	76,56 ± 2,80	bcd
27	26,47 ± 0,06	e	30,06 ± 0,04	s	53,80 ± 0,52	hijk
28	19,41 ± 0,06	jk	20,66 ± 0,01	v	22,43 ± 0,14	n
29	21,58 ± 0,02	h	46,76 ± 0,01	g	57,21 ± 0,27	ghi
30	23,94 ± 0,02	fg	51,21 ± 0,03	d	56,46 ± 0,03	ghij
Blanco	59,90 ± 0,03	a	87,25 ± 0,59	a	93,34 ± 3,82	a
5S	21,57 ± 0,02	h	43,73 ± 0,02	j	59,27 ± 0,88	fgh
GA	17,214 ± 0,020	m	43,013 ± 0,053	k	65,06 ± 0,491	ef

Tabla 35. Cinética de oxidación de los TBARS para los extractos obtenidos por FS evaluados en oleína por el método de oxidación acelerado.

Aditivo	mg malondialdehído/kg oleína (mg MDA/kg oleína)											
	Día 1			Día 2			Día 3					
1	0,05	±	0,01	hij	0,08	±	0,01	klm	0,19	±	0,01	k
2	0,04	±	0,01	ijkl	0,12	±	0,01	ij	0,25	±	0,01	i
3	0,04	±	0,01	jkl	0,29	±	0,01	de	0,31	±	0,02	h
4	0,04	±	0,01	ijkl	0,06	±	0,02	lmn	0,13	±	0,01	mn
5	0,03	±	0,01	jkl	0,03	±	0,01	n	0,18	±	0,02	kl
6	0,04	±	0,01	jkl	0,09	±	0,01	jkl	0,11	±	0,01	no
7	0,06	±	0,01	ghi	0,28	±	0,01	ef	0,41	±	0,01	e
8	0,16	±	0,01	b	0,33	±	0,01	c	0,79	±	0,01	bc
9	0,14	±	0,01	c	0,17	±	0,01	gh	0,74	±	0,01	d
10	0,06	±	0,01	ghi	0,31	±	0,01	cde	0,77	±	0,01	cd
11	0,07	±	0,01	fgh	0,15	±	0,01	hi	0,36	±	0,01	fg
12	0,08	±	0,01	efg	0,11	±	0,01	jk	0,15	±	0,01	lm
13	0,02	±	0,01	l	0,05	±	0,02	mn	0,11	±	0,01	no
14	0,12	±	0,01	c	0,15	±	0,01	hi	0,24	±	0,01	ij
15	0,03	±	0,01	kl	0,05	±	0,01	mn	0,09	±	0,01	o
16	0,04	±	0,01	ijkl	0,05	±	0,01	mn	0,16	±	0,01	klm
17	0,26	±	0,01	a	0,48	±	0,01	a	0,80	±	0,01	b
23	0,06	±	0,01	fgh	0,08	±	0,01	klm	0,18	±	0,01	kl
24	0,04	±	0,02	hijk	0,08	±	0,01	klm	0,09	±	0,01	o
25	0,15	±	0,01	b	0,41	±	0,01	b	0,85	±	0,01	a
26	0,06	±	0,01	ghi	0,32	±	0,01	cd	0,33	±	0,01	gh
27	0,09	±	0,02	cd	0,12	±	0,05	ijk	0,20	±	0,01	jk
28	0,06	±	0,01	ghi	0,08	±	0,01	klm	0,18	±	0,01	kl
29	0,08	±	0,01	def	0,33	±	0,01	c	0,38	±	0,01	ef
30	0,09	±	0,01	cde	0,19	±	0,01	gh	0,23	±	0,02	ij
Blanco	0,14	±	0,01	b	0,51	±	0,01	f	0,67	±	0,01	fgh
5S	0,03	±	0,01	jkl	0,07	±	0,01	klm	0,08	±	0,01	o
GA	0,03	±	0,01	jkl	0,04	±	0,01	n	0,08	±	0,006	o

Tabla 36. Varianza total y varianza acumulada para el ACP.

componente	% varianza	% varianza acumulada
1	69,03	69,03
2	12,04	81,08
3	10,20	91,28
4	4,11	95,38
5	2,77	98,16
6	1,84	100,00

Tabla 37. Loadings para los dos primeros componentes del ACP.

Ensayo	Días de oxidación	CP1	CP2
TBARS	1	0,910	0,236
	2	0,776	0,500
	3	0,846	0,402
HPL	1	0,344	0,686
	2	0,356	0,875
	3	0,260	0,837

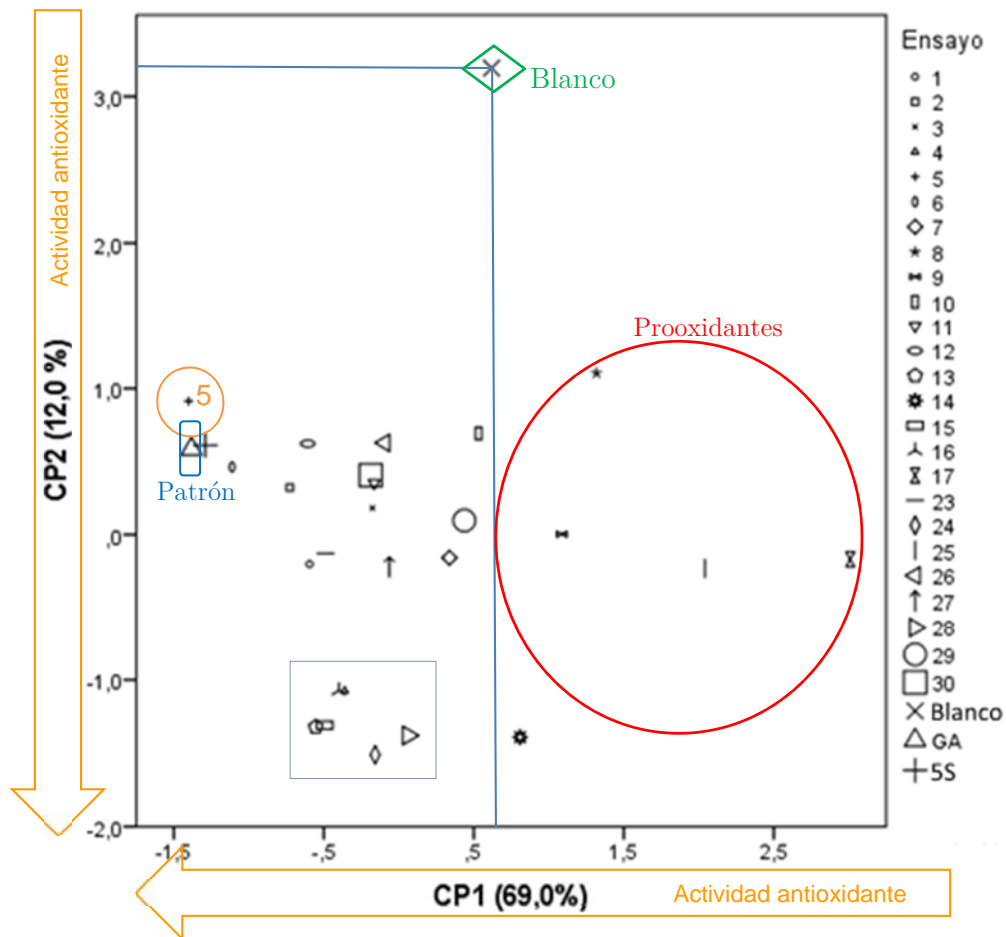


Figura 29. ACP para el ensayo de oxidación lipídica en oleína para los extractos obtenidos por EFSc.

Del ACP se deduce que el extracto 5 presentó una AA similar al G.A. y al extracto 5S. Siendo ligeramente mayor la AA de 5 que la de 5S.

▪ **Actividad antioxidante en carne de morrillo**

En las tablas 38 y 39 se relacionan los productos de oxidación (HPL y TBARS) generados en carne de morrillo durante el ensayo. Día cero: $0,18 \pm 0,01$ mmol HPL/kg carne; $0,02 \pm 0,01$ mg MDA/kg carne.

Tabla 38. Hidroperóxidos formados durante la oxidación de carne de morrillo adicionado con antioxidantes comerciales y con extractos obtenidos por EFSc.

Aditivo	mmol hidroperóxidos de ácido linoleico/kg oleina (mmol HPL/kg oleina)								
	Día 1		Día 2		Día 3				
1	0,66	± 0,09	h	1,37	± 0,01	c	1,94	± 0,01	i
2	0,68	± 0,01	f	1,08	± 0,01	h	1,87	± 0,01	l
3	0,71	± 0,01	c	1,43	± 0,02	b	1,99	± 0,01	g
4	0,78	± 0,02	b	1,23	± 0,01	f	1,81	± 0,01	m
5	0,79	± 0,01	a	0,84	± 0,02	r	1,91	± 0,01	k
6	0,71	± 0,01	c	0,86	± 0,01	p	1,79	± 0,01	o
7	0,69	± 0,01	d	0,94	± 0,01	k	1,79	± 0,01	n
8	0,36	± 0,01	u	0,57	± 0,01	z	1,38	± 0,01	AA
9	0,61	± 0,01	l	0,75	± 0,01	m	1,70	± 0,01	v
10	0,59	± 0,01	n	0,70	± 0,01	v	1,42	± 0,01	z
11	0,60	± 0,01	m	0,90	± 0,01	l	1,71	± 0,01	q
12	0,62	± 0,01	j	0,87	± 0,01	n	1,93	± 0,01	u
13	0,32	± 0,01	w	0,69	± 0,01	w	1,52	± 0,01	w
14	0,29	± 0,01	x	0,65	± 0,01	x	1,53	± 0,01	w
15	0,49	± 0,01	p	0,62	± 0,01	y	1,45	± 0,09	y
16	0,44	± 0,01	r	1,12	± 0,01	g	2,07	± 0,01	c
17	0,49	± 0,01	q	1,02	± 0,01	i	1,94	± 0,06	h
23	0,62	± 0,01	j	0,85	± 0,01	q	1,61	± 0,01	u
24	0,57	± 0,01	o	1,29	± 0,01	d	1,74	± 0,08	p
25	0,66	± 0,01	i	0,79	± 0,01	t	1,51	± 0,01	x
26	0,67	± 0,01	g	1,25	± 0,01	e	2,01	± 0,08	e
27	0,66	± 0,01	i	0,89	± 0,01	m	2,00	± 0,01	f
28	0,33	± 0,01	v	0,86	± 0,01	o	1,62	± 0,01	t
29	0,69	± 0,01	e	0,96	± 0,01	j	2,29	± 0,01	b
30	0,62	± 0,01	k	0,81	± 0,01	s	2,02	± 0,08	d
2S	0,43	± 0,01	s	0,52	± 0,01	AA	1,60	± 0,01	v
BHT	0,36	± 0,01	t	0,50	± 0,08	AB	1,65	± 0,08	s
Blanco	0,59	± 0,02	n	1,54	± 0,01	a	2,37	± 0,01	a

Tabla 39. TBARS formados durante la oxidación de carne de morrillo adicionado con antioxidantes comerciales y con extractos obtenidos por EFSc.

Aditivo	mg malondialdehído/kg carne (mg MDA/kg carne)											
	Día 3			Día 6			Día 9					
1	0,01	±	0,01	efgh	0,02	±	0,01	ijkl	0,03	±	0,01	ij
2	0,01	±	0,01	ghi	0,02	±	0,01	m	0,05	±	0,01	b
3	0,01	±	0,01	efg	0,02	±	0,01	klm	0,05	±	0,01	de
4	0,02	±	0,01	de	0,02	±	0,01	fghi	0,04	±	0,01	gh
5	0,01	±	0,01	def	0,03	±	0,01	bc	0,05	±	0,01	b
6	0,02	±	0,01	de	0,03	±	0,01	bc	0,05	±	0,01	bc
7	0,01	±	0,01	l	0,02	±	0,01	de	0,03	±	0,01	l
8	0,01	±	0,01	efg	0,02	±	0,01	lm	0,04	±	0,01	gh
9	0,01	±	0,01	l	0,01	±	0,01	n	0,03	±	0,01	mn
10	0,01	±	0,01	kl	0,03	±	0,01	de	0,05	±	0,01	cde
11	0,01	±	0,01	hij	0,02	±	0,01	ghi	0,04	±	0,01	f
12	0,01	±	0,01	fghi	0,02	±	0,01	hijk	0,04	±	0,01	fgh
13	0,01	±	0,01	fgh	0,02	±	0,01	fgh	0,02	±	0,01	o
14	0,01	±	0,01	kl	0,03	±	0,01	de	0,04	±	0,01	e
15	0,02	±	0,01	bc	0,02	±	0,01	efg	0,05	±	0,01	bcd
16	0,02	±	0,01	b	0,02	±	0,01	fg	0,04	±	0,01	fg
17	0,01	±	0,01	ghi	0,02	±	0,01	fgh	0,03	±	0,01	kl
23	0,01	±	0,01	hij	0,02	±	0,01	ijkl	0,04	±	0,01	fgh
24	0,01	±	0,01	efg	0,02	±	0,01	klm	0,03	±	0,01	m
25	0,01	±	0,01	jkl	0,03	±	0,01	cd	0,03	±	0,01	kl
26	0,01	±	0,01	jk	0,02	±	0,01	lm	0,04	±	0,01	fg
27	0,01	±	0,01	def	0,02	±	0,01	klm	0,03	±	0,01	mn
28	0,02	±	0,01	b	0,02	±	0,01	ghij	0,04	±	0,01	fg
29	0,02	±	0,01	cd	0,02	±	0,01	klm	0,05	±	0,01	cde
30	0,01	±	0,01	ij	0,02	±	0,01	ijkl	0,04	±	0,01	hi
PR4	0,01	±	0,01	jk	0,02	±	0,01	klm	0,02	±	0,01	no
BHT	0,01	±	0,01	jkl	0,02	±	0,01	ijkl	0,03	±	0,01	jkl
CTRL	0,03	±	0,01	a	0,04	±	0,01	a	0,06	±	0,01	a

El ACP explicó el 71,7% del experimento con dos componentes (tabla 40); el CP1 explicó aproximadamente el doble de la variabilidad que el CP2. En la **tabla 41** se presentan los valores de los loadings para los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2). Su elección fue llevada a cabo tomando como referencia sus valores propios (>1). Se observó que el CP1 correlaciona con TBARS (loadings entre 0,800 y 0,848), mientras que el CP2 correlaciona con HPL (loadings entre 0,814 y 0,829).

Tabla 40. Varianza explicada y varianza acumulada para el ACP.

componente	% varianza	% varianza acumulada
1	48,60	48,60
2	23,05	71,65
3	12,52	84,17
4	6,40	90,57
5	4,99	95,56
6	4,44	100,00

Tabla 41. Loadings para los dos primeros componentes principales.

Ensayo	Días de oxidación	CP1	CP2
TBARS	1	0,800	0,199
	2	0,848	0,007
	3	0,803	0,224
HPL	1	-0,074	0,823
	2	0,290	0,829
	3	0,296	0,814

La **figura 30** permite observar que todos los extractos presentan actividad antioxidante frente a TBARS, mientras que algunos pocos presentan actividad prooxidante en cuanto a la formación de HPL (ver elipse **figura 30**).

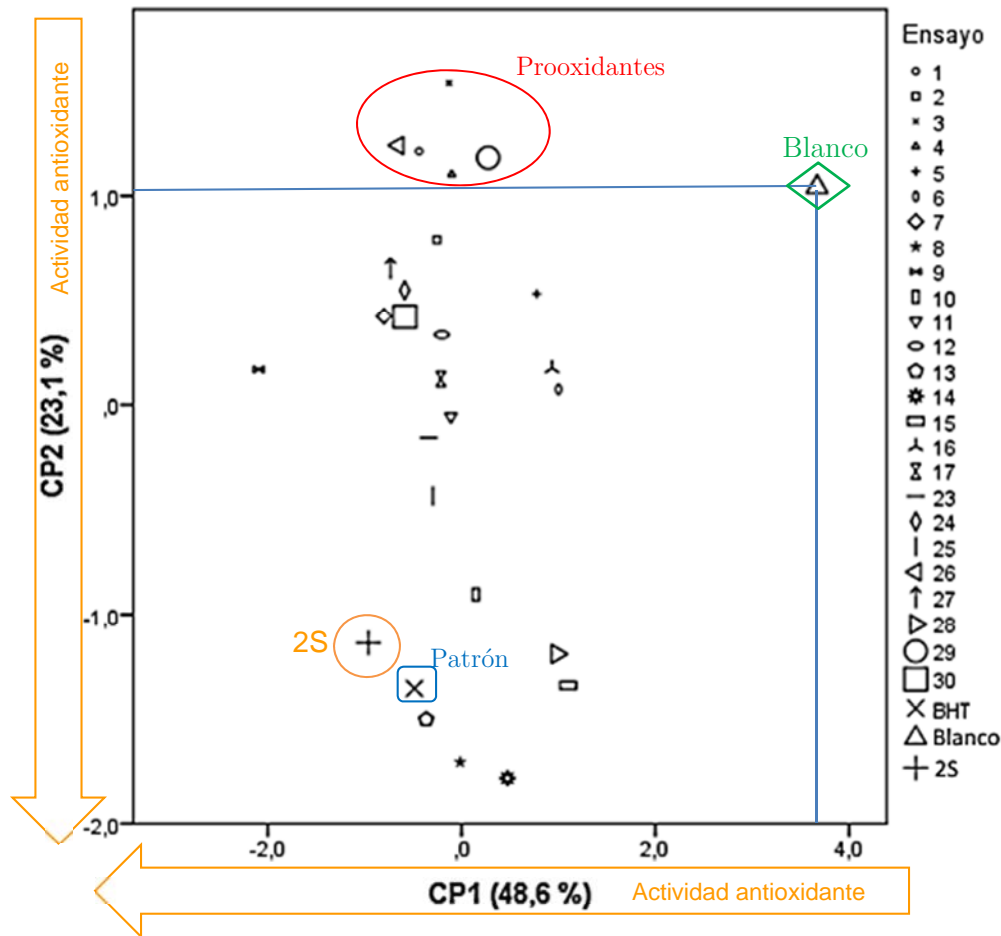


Figura 30. Diagrama de dispersión para el ACP de los extractos obtenidos por EFSc adicionados a carne de morrillo.

El extracto **2S** obtenido a presión reducida se mostró como el más promisorio en cuanto a la protección de la carne de morrillo, debido a la posición que ocupa en la **figura 30**, ver círculo. Los extractos **8**, **3** y **14** mostraron ser eficientes en inhibir la formación de HPL en grado superior al antioxidante comercial, no obstante, no son muy eficientes en cuanto a TBARS. El extracto **2S** se prefirió sobre el **9** debido a que este último no presentó una protección apreciable frente a HPL, siendo significativa (23,1 %) en el proceso oxidativo.

3.3 Fraccionamiento y análisis por HPLC-MS

3.3.1 Fraccionamiento

El extracto más promisorio para oleína de palma (extracto 5 obtenido por EFSc) y para carne de morrillo (extracto 2S obtenido por extracción soxhlet a presión reducida), fueron fraccionados empleando una resina Diaion HP-20 (250–850 μm). Para el primer caso se fraccionaron 236 mg y para el segundo 400 mg. Luego se rotavaporó cada una de las fracciones, se determinó la cantidad de extracto recuperado (ver **tabla 42**) y la AA.

Entre los conjuntos de fracciones se observaron diferencias; por ejemplo, el extracto 5 mostró mayor enriquecimiento de compuestos solubles en la fracción metanólica (17,0%) que el extracto 2S (1,7%) y éste presentó un mayor contenido de compuestos de baja polaridad (45,3%) respecto al extracto 5 (23,2%).

Tabla 42. Rendimiento de las fracciones para cada uno de los extractos más activos.

Fracción	Composición	Extracto 2S		Extracto 5	
		mg	%	mg	%
1	Agua (100%)	2,0	0,85	2,5	0,62
2	Agua – Metanol (8:2)	2,0	0,85	1,0	0,25
3	Agua – Metanol (6:4)	2,0	0,85	1,0	0,25
4	Agua – Metanol (4:6)	3,0	1,27	1,5	0,37
5	Agua – Metanol (2:8)	3,0	1,27	4,5	1,12
6	Metanol (100%)	4,0	1,69	68,0	16,96
7	Acetato de etilo (100%)	113,0	47,88	229,5	57,24
8	Hexano (100%)	107,0	45,34	93,0	23,19
Total		236,0	100,00	401,0	100,00

3.3.2 Actividad antioxidante en oleína de palma

A cada una de las fracciones de interés se le realizó ensayo de AA en oleína, ver **tablas 43** y **44** (HPL día cero $6,80 \pm 0,04$ mmol HPL/kg oleína; TBARS día cero $0,02 \pm 0,01$ mg MDA/kg oleína). El ACP mostró que con dos componentes se logró describir el 94,3% de los resultados; el CP1 correlacionó con TBARS y el CP2 con HPL (ver **tablas 45** y **46**)

Tabla 43. Cuantificación de los HPL generados en oleína.

mmol hidropéroxidos de ácido linoleico/kg oleína (mmol HPL/kg oleína)			
Aditivo	Día 1	Día 2	Día 3
Fracción 1	18,02 ± 0,08 f	25,90 ± 1,61 ef	26,58 ± 0,22 e
Fracción 2	32,14 ± 0,38 e	34,76 ± 1,08 b	38,31 ± 0,76 bc
Fracción 3	40,34 ± 0,26 a	42,90 ± 0,56 a	45,81 ± 1,54 a
Fracción 4	27,58 ± 0,14 d	30,40 ± 0,17 cd	36,36 ± 1,04 c
Fracción 5	27,54 ± 0,13 d	32,03 ± 0,74 bc	37,40 ± 1,01 bc
Fracción 6	22,16 ± 0,42 e	27,73 ± 0,83 de	40,25 ± 0,61 b
Fracción 7	22,21 ± 0,17 e	29,63 ± 1,42 cd	46,41 ± 0,21 a
Fracción 8	38,96 ± 0,68 b	41,69 ± 1,53 a	45,56 ± 2,45 a
Extracto 5	17,84 ± 0,08 f	24,24 ± 0,59 f	30,58 ± 0,55 d
GA	17,40 ± 0,07 f	24,63 ± 1,00 ef	31,51 ± 0,22 d
Blanco	39,46 ± 0,17 b	42,36 ± 1,37 a	46,51 ± 0,25 a

Tabla 44. Cuantificación de los TBARS generados en oleína.

mg malondialdehído/kg oleína (mg MDA/kg oleína)			
Aditivo	Día 1	Día 2	Día 3
Fracción 1	0,08 ± 0,01 f	0,24 ± 0,01 g	0,86 ± 0,03 e
Fracción 2	0,14 ± 0,01 d	0,31 ± 0,01 e	1,10 ± 0,02 d
Fracción 3	0,11 ± 0,01 e	0,24 ± 0,01 g	1,29 ± 0,03 c
Fracción 4	0,17 ± 0,01 c	0,52 ± 0,01 d	1,69 ± 0,02 b
Fracción 5	0,19 ± 0,01 b	0,53 ± 0,01 d	1,72 ± 0,01 b
Fracción 6	0,20 ± 0,01 b	0,62 ± 0,01 b	1,45 ± 0,18 c
Fracción 7	0,24 ± 0,01 a	0,53 ± 0,01 d	1,77 ± 0,04 b
Fracción 8	0,16 ± 0,01 c	0,58 ± 0,01 c	1,65 ± 0,01 b
Extracto 5	0,11 ± 0,01 e	0,29 ± 0,02 ef	0,89 ± 0,02 e
GA	0,10 ± 0,01 ef	0,29 ± 0,01 f	0,93 ± 0,02 de
Blanco	0,25 ± 0,01 a	0,74 ± 0,01 a	2,47 ± 0,01 a

Para el ACP se procedió de igual forma que para cuando se evaluó la AA en oleína de palma para los extractos soxhlet (sección 3.1). En la tabla 45 se mostró la varianza (%) y la varianza acumulada (%) para cada uno de los componentes. Al trabajar con dos componentes principales, se logra describir un 94,3% de los resultados de las **tablas 43 y 44**.

Tabla 45. Valores de varianza explicada y varianza acumulada para el ACP.

componente	% Varianza	% Varianza acumulada
1	58,84	71,14
2	15,53	94,29
3	8,37	98,22
4	6,65	99,54
5	4,18	99,88
6	2,28	100,00

En la **tabla 46**, se encuentra la matriz de componente rotada, la cual nos permite identificar el peso que tiene cada una de las variables originales sobre cada uno de los componentes. Se observa que el CP1 correlaciona principalmente con TBARS (loadings de 0,87 a 0,97) y el CP2 correlaciona principalmente con HPL (loadings de 0,74 a 0,98).

Tabla 46. Matriz de componentes rotada.

Ensayo	Días de oxidación	CP1	CP2
TBARS	1	0,972	0,156
	2	0,949	0,165
	3	0,873	0,429
HPL	1	0,170	0,973
	2	0,180	0,978
	3	0,554	0,737

Nuevamente se observó que existe ortogonalidad marcada entre las variables HPL y TBARS, por lo que se hace necesario hacer seguimiento a las especies intermediarias y finales de la oxidación para tener una idea más clara sobre el proceso oxidativo que se lleva a cabo en la oleína.

Al calcular las puntuaciones para cada una de las fracciones y/o extractos a partir del reemplazo de los valores de cada variable tipificada y representarlos gráficamente en un sistema de coordenadas, se obtiene la **figura 31**.

En la **figura 31** se observa que todas las fracciones inhibieron la formación de TBARS, mientras que para HPL, las fracciones **3** y **8** mostraron actividad prooxidante al compararse (ver elipse **figura 31**). La fracción más activa corresponde a la más polar, es decir a la obtenida

empleando agua desionizada (ver círculo, **figura 31**); considerando la masa recuperada de la fracción 1 por masa de extracto, así como la AA similar entre ésta y el extracto 5, no se considera práctico realizar el fraccionamiento respectivo. Con la información anterior se concluye que la fracción 1 aporta de manera significativa a la AA que presentó el extracto 5, por tanto dicha fracción se sometió a estudio de HPLC-MS.

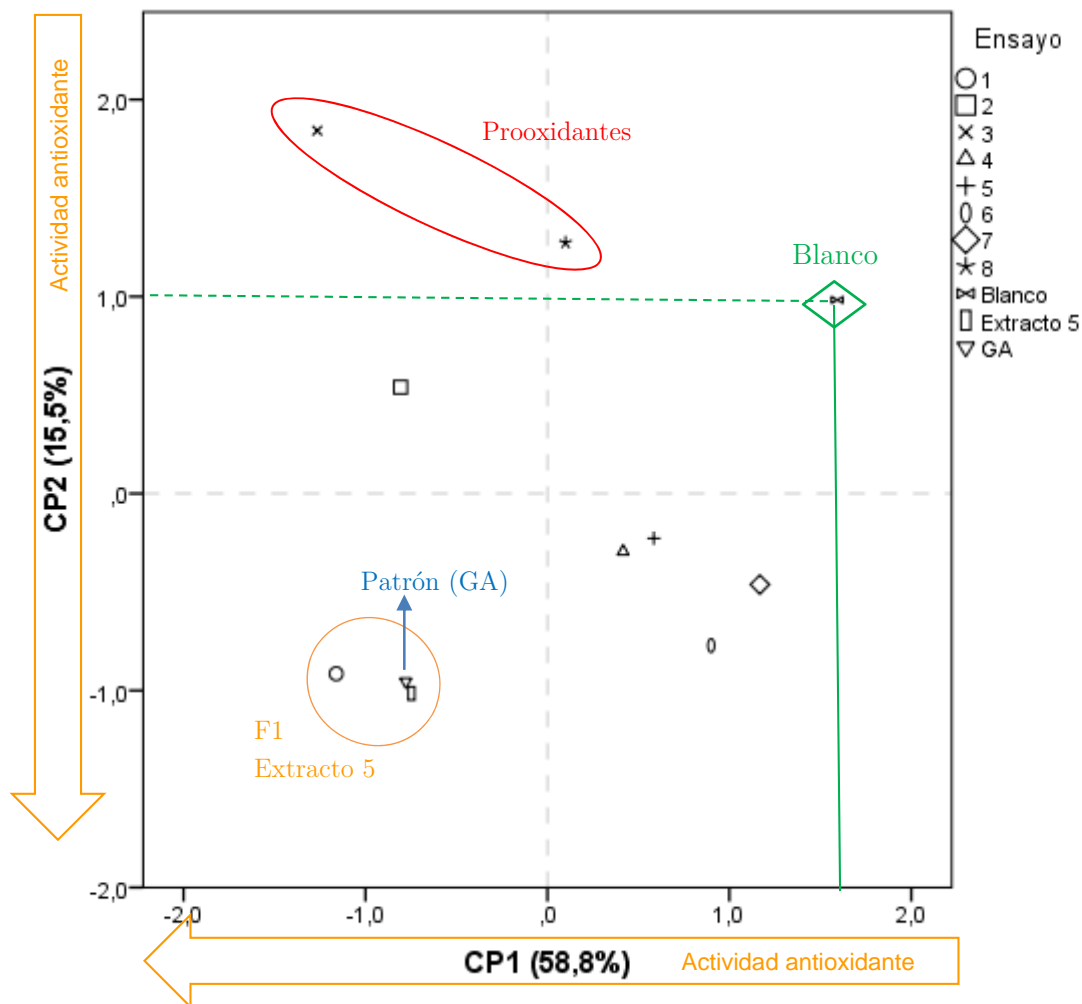


Figura 31. Diagrama de dispersión para la AA en oleína para las fracciones del extracto más activo.

3.3.3 Actividad antioxidante en carne de morrillo

Los resultados de oxidación lipídica en carne de morrillo se relacionan en las **tablas 47 y 48**. Para el día cero se tiene HPL $0,36 \pm 0,01$ mmol HPL/kg carne, TBARS $0,01 \pm 0,01$ mg MDA/kg carne.

Tabla 47. Cuantificación de los HPL en carne de morrillo.

mmol hidroperóxidos de ácido linoleico/kg oleína (mmol HPL/kg oleína)						
Aditivo	Día 3		Día 6		Día 9	
Fracción 1	0,56	$\pm 0,01$ i	1,15	$\pm 0,01$ h	2,89	$\pm 0,03$ b
Fracción 2	0,96	$\pm 0,01$ g	1,23	$\pm 0,02$ fg	2,82	$\pm 0,01$ b
Fracción 3	1,07	$\pm 0,00$ f	1,23	$\pm 0,01$ fg	2,81	$\pm 0,02$ b
Fracción 4	1,17	$\pm 0,01$ d	1,19	$\pm 0,01$ gh	2,90	$\pm 0,02$ b
Fracción 5	1,77	$\pm 0,01$ a	2,73	$\pm 0,02$ b	4,10	$\pm 0,50$ a
Fracción 6	1,11	$\pm 0,01$ e	1,87	$\pm 0,01$ d	3,95	$\pm 0,07$ a
Fracción 7	0,49	$\pm 0,01$ j	1,29	$\pm 0,02$ f	2,81	$\pm 0,04$ b
Fracción 8	1,29	$\pm 0,02$ c	1,95	$\pm 0,03$ c	4,29	$\pm 0,01$ a
Extracto 2S	0,71	$\pm 0,01$ h	1,52	$\pm 0,03$ e	2,89	$\pm 0,04$ b
BHT	1,19	$\pm 0,01$ d	1,09	$\pm 0,02$ i	2,90	$\pm 0,03$ b
Blanco	1,47	$\pm 0,01$ b	3,89	$\pm 0,03$ a	4,18	$\pm 0,02$ a

Tabla 48. Cuantificación de los TBARS en carne de morrillo.

mg malondialdehído/kg oleína (mg MDA/kg oleína)						
Aditivo	TBARS_1		TBARS_2		TBARS_3	
Fracción 1	0,01	$\pm 0,01$ bc	0,02	$\pm 0,01$ e	0,04	$\pm 0,01$ ef
Fracción 2	0,01	$\pm 0,01$ bc	0,02	$\pm 0,01$ e	0,04	$\pm 0,01$ de
Fracción 3	0,02	$\pm 0,01$ a	0,02	$\pm 0,01$ b	0,05	$\pm 0,01$ c
Fracción 4	0,01	$\pm 0,01$ c	0,02	$\pm 0,01$ bc	0,06	$\pm 0,01$ b
Fracción 5	0,01	$\pm 0,01$ bc	0,02	$\pm 0,01$ cde	0,05	$\pm 0,01$ cd
Fracción 6	0,01	$\pm 0,01$ bc	0,01	$\pm 0,01$ f	0,04	$\pm 0,01$ f
Fracción 7	0,01	$\pm 0,01$ c	0,02	$\pm 0,01$ e	0,05	$\pm 0,01$ cd
Fracción 8	0,01	$\pm 0,01$ c	0,02	$\pm 0,01$ bcd	0,05	$\pm 0,01$ c
Extracto 2S	0,01	$\pm 0,01$ bc	0,02	$\pm 0,01$ de	0,04	$\pm 0,01$ ef
BHT	0,01	$\pm 0,01$ b	0,02	$\pm 0,01$ bc	0,05	$\pm 0,01$ cd
Blanco	0,02	$\pm 0,01$ a	0,03	$\pm 0,01$ a	0,07	$\pm 0,01$ a

El ACP mostró una varianza del 83,54% (**tabla 49**) al trabajar con dos componentes principales, donde el **CP1** correlaciona con TBARS y el **CP2** con HPL, (ver **tabla 50**). Nuevamente se observó que existe ortogonalidad marcada entre las variables HPL y TBARS, por lo que se hace necesario hacer seguimiento a las especies intermediarias y finales de la oxidación para tener una idea más clara sobre el proceso oxidativo que se lleva a cabo en la oleína.

Tabla 49. Valores de varianza explicada y varianza acumulada para cada componente del ACP.

componente	% Varianza	% Varianza acumulada
1	60,54	60,54
2	23,00	83,54
3	8,49	92,03
4	5,97	98,00
5	1,42	99,42
6	0,58	100,00

Tabla 50. Matriz de componentes rotada ACP.

Ensayo	Días de oxidación	CP1	CP2
TBARS	1	,852	,018
	2	,930	,310
	3	,831	,299
HPL	1	,257	,830
	2	,442	,813
	3	,001	,966

Al calcular las puntuaciones para cada una de las fracciones y/o extractos a partir del reemplazo de los valores de cada variable tipificada y representarlos gráficamente en un sistema de coordenadas, se obtiene la **figura 32**.

Se observa que todos los extractos presentan actividad antioxidante para la formación de TBARS. Para HPL solamente la fracción **5** presenta actividad prooxidante (elipse, **figura 32**). La fracción más promisoría para la protección de la carne de morrillo frente a la oxidación resultó ser la fracción más polar, la primera fracción, obtenida con agua desionizada (círculo, **figura 32**) que se prefirió sobre el fracción 7, debido a la diferencia de protección que presentaron en **CP1**. Considerando la masa recuperada en la fracción 1 por masa de extracto y la AA similar entre ésta fracción y el extracto, no se considera práctico realizar el fraccionamiento.

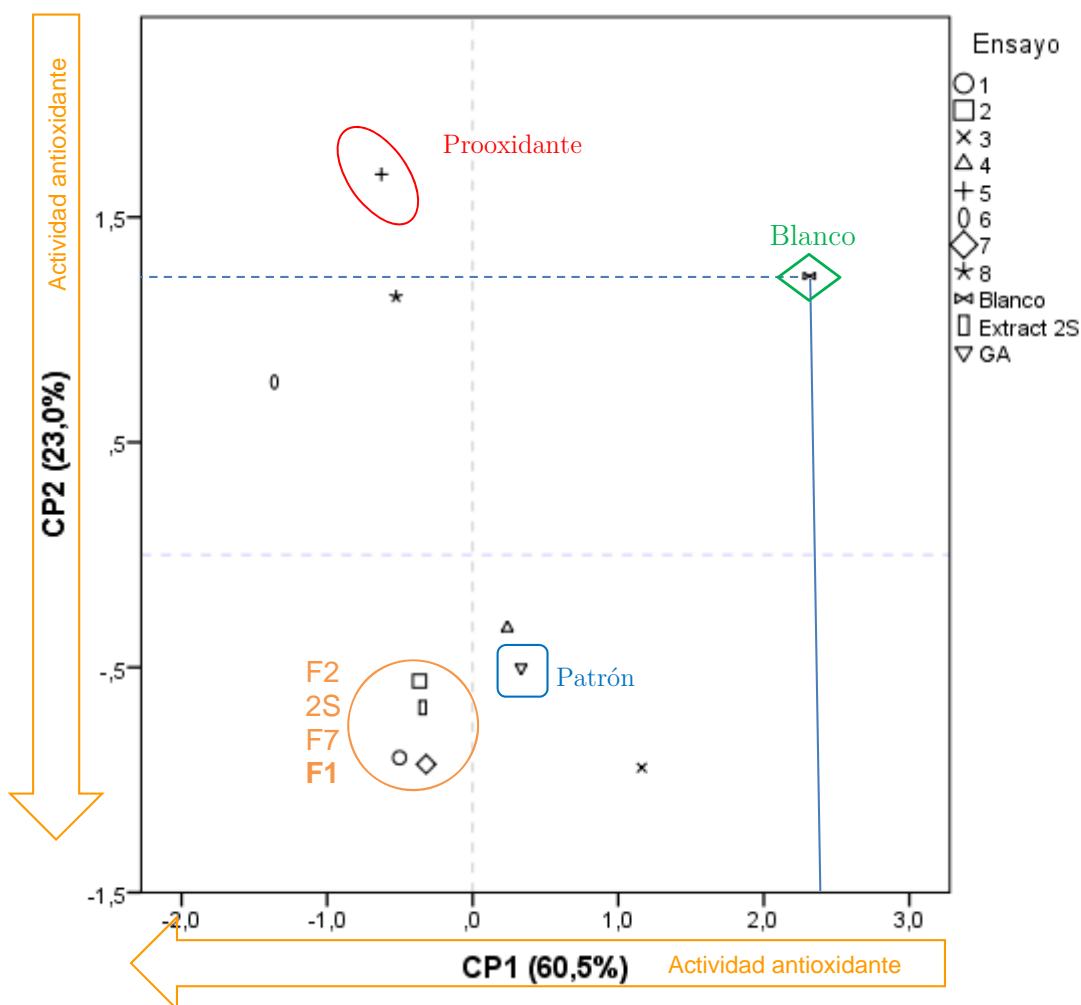


Figura 32. ACP para las fracciones del extracto más activo para carne de morrillo cruda.

Con la información anterior, se decidió efectuar el análisis por HPLC-MS de la fracción 1 procedente del extracto **5** y de la fracción 1 procedente del extracto **2S**, con el fin de identificar de forma preliminar los compuestos responsables de la AA.

3.3.4 Análisis por HPLC-MS

Teniendo en cuenta que las fracciones 1 (F1) provenientes de los extractos **5** (F1-5) y **2S** (F1-2S) fueron las más activas, tanto para OP como para CR, respectivamente, dichas fracciones se sometieron a análisis por HPLC-MS. Los cromatogramas obtenidos presentaron gran similitud, **figuras 33** y **34**, en cada uno se observaron tres señales claramente diferenciadas en 38,8, 50,3, 55,0 min, aproximadamente. Al examinar los espectros de masas de las señales mencionadas se observó total coincidencia entre las correspondientes de F1-5 y F1-2S, ver **figuras 35 a 37**.

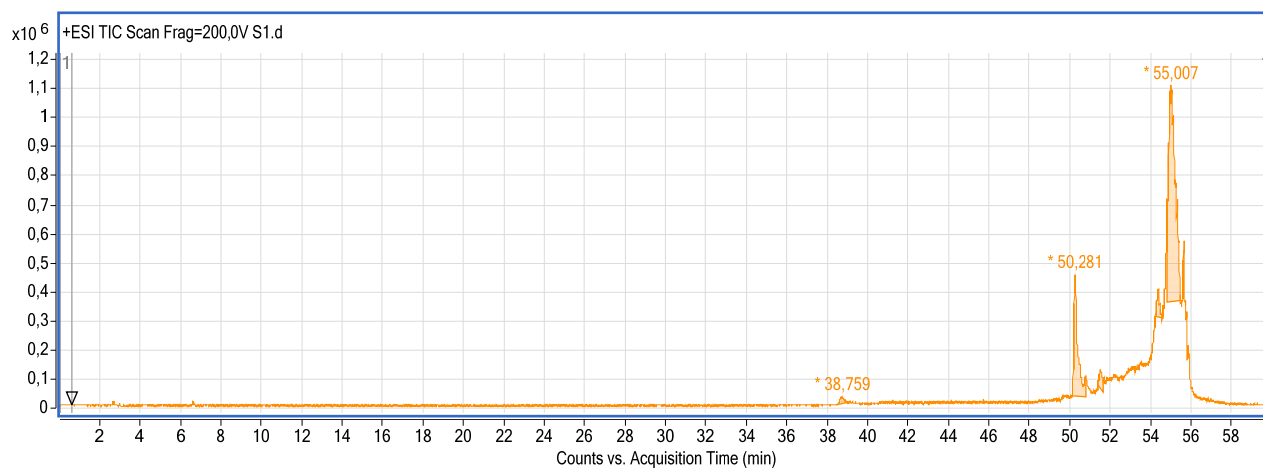


Figura 33. Cromatograma de F1-5.

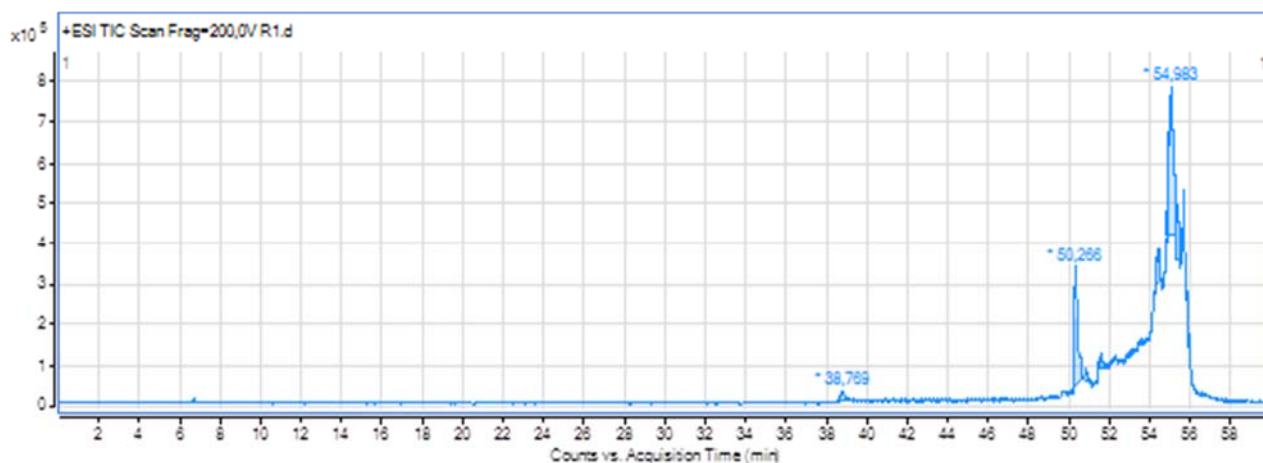


Figura 34. Cromatograma de F1-2S.

El espectro de masas para el compuesto que eluye a 38,8 min presentó tres señales m/z (242,2853, pico base; 131,0024; 186,2203), ver **figura 35**. En la **tabla 51** se resume lo observado: el pico base podría corresponder a la molécula protonada $[M+H]^+$, el pico con m/z 186,2203 podría corresponder a una pérdida de $CH_2CH=CHCH_3$ (cuya masa exacta es 55,0546) a partir de M $[M-55,0572]^+$. Hasta donde se tiene conocimiento, en semillas de aguacate no se ha reportado compuestos con peso molecular de 241,2775 Da, por lo tanto, con ayuda del software **mMass V.5.0** se propone como fórmula molecular $C_{16}H_{35}N$ que corresponde con una masa exacta 241,2770 Da.

Tabla 51. Análisis del espectro de masas del compuesto con t_r 38,8 min.

t_r (min)	ESI(+)	Diagnóstico	Peso molecular	Fórmula propuesta	Peso molecular propuesto	Error (ppm)
38,8	131,0024	$[M-110,2751]^+$	241,2775	$C_{16}H_{35}N$	241,2770	0,5
	186,2203	$[M-55,0572]^+$				
	242,2853	$[M+H]^+$				
		M				

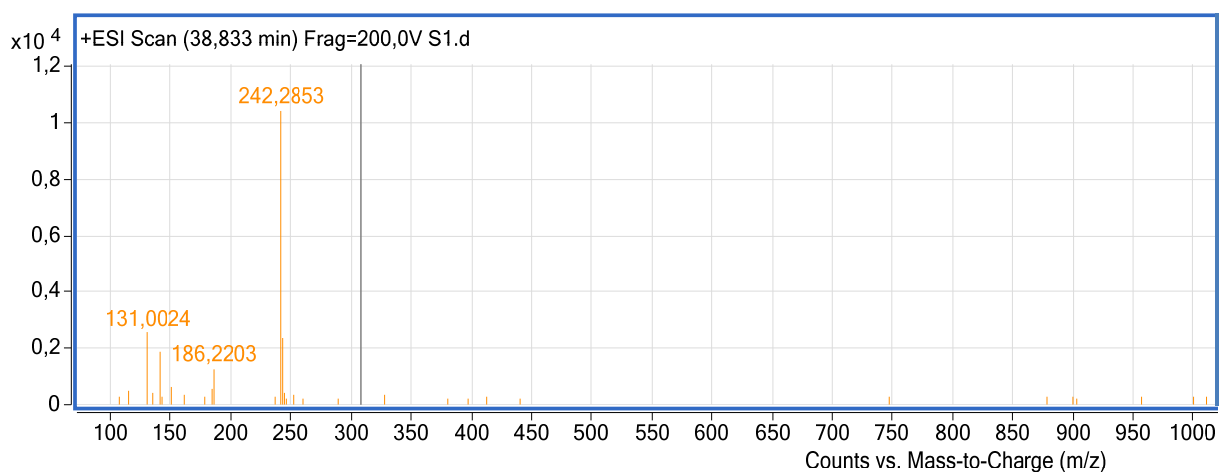


Figura 35. Espectro de masas del compuesto con t_r 38,8 min.

Para el siguiente compuesto ($t_r = 50,3$ min) el espectro de masas mostró cuatro señales m/z (203,1242; 284,3306; 372,3505; 412,3226), ver **figura 36**. El análisis de las pérdidas en masa de los picos, mostró que probablemente el pico base se deba a la protonación de la molécula $[M+H]^+$; hasta donde se tiene conocimiento, en semillas de aguacate Hass no se ha reportado compuestos con peso molecular de 411,3148 Da. Con ayuda del software **mMass V.5.0** se propone la fórmula molecular $C_{27}H_{41}NO_2$, la cual corresponde a una masa exacta de 411,3137 Da, ver **tabla 52**.

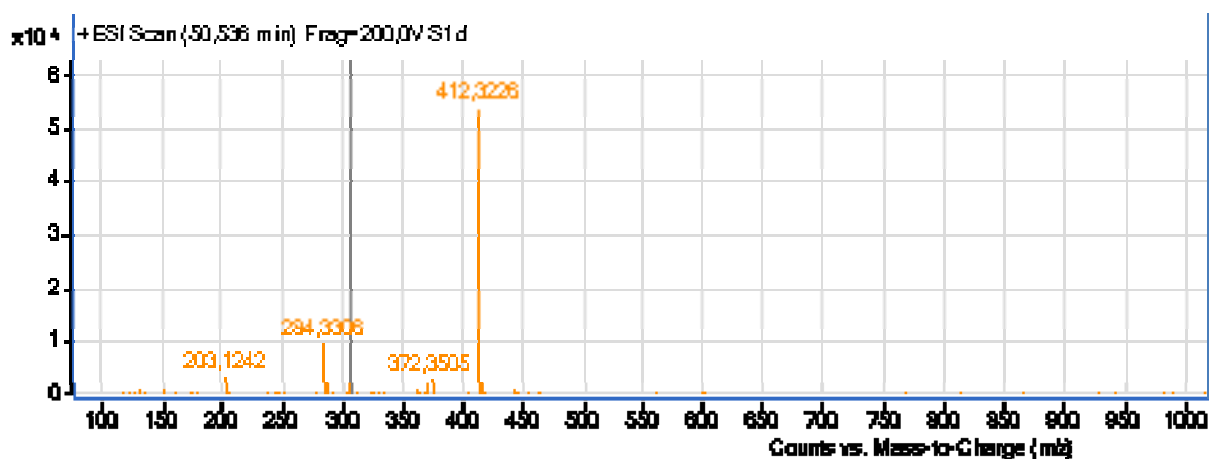


Figura 36. Espectro de masas del compuesto con t_r 50,4 min.

Tabla 52. Análisis del espectro de masas del compuesto con t_r 50,4 min.

t_r (min)	ESI(+)	Diagnóstico	Peso molecular	Fórmula propuesta	Peso molecular propuesto	Error (ppm)
50,4	372,3505	[M-38,9643] ⁺				
	412,3226	[M+H] ⁺	411,3148	C ₂₇ H ₄₁ NO ₂	411,3137	1,1

El compuesto con t_r 54,4 min presentó un alto grado de fragmentación, **figura 38**. Al corresponder la señal m/z 399,2524 a la molécula protonada [M+H]⁺, la señal m/z 421,2337 correspondría al aducto [M+Na]⁺. No se han encontrado reportes en literatura ([Hurtado *et al.*, 2011](#)) para compuestos de masa molecular 398.2446; por lo tanto, con ayuda del software mMass v5.0 se propusieron dos fórmulas moleculares, las cuales se encuentran en la **tabla 53**.

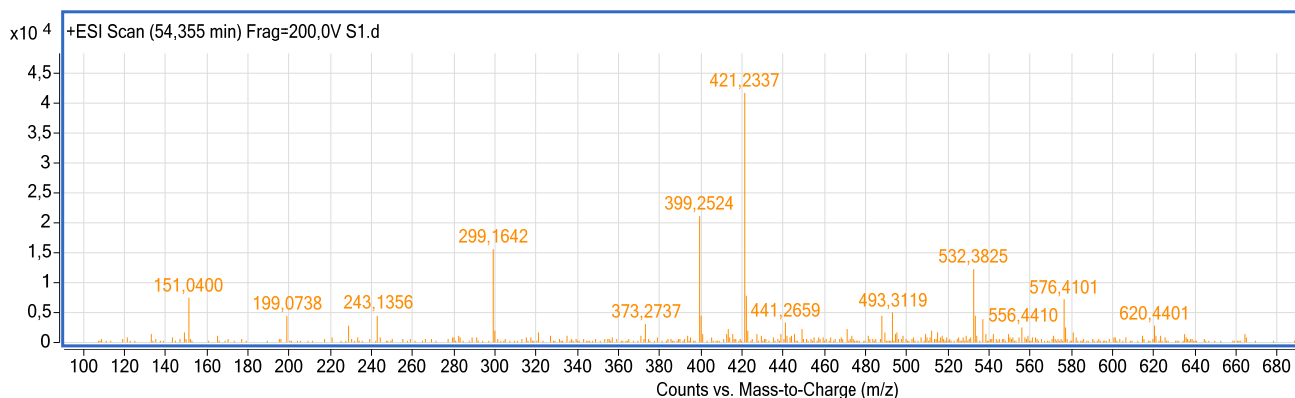


Figura 37. Espectro de masas del compuesto con t_r 54,4 min.

Tabla 53. Análisis del espectro de masas $t_r=54,4$ min.

t_r (min)	ESI(+)	Diagnóstico	Peso molecular	Fórmula propuesta	Peso molecular propuesto	Error (ppm)
54,4	421,2337	[M+Na] ⁺	398,2446	C ₂₀ H ₃₄ N ₂ O ₆	398,2417	2,9
	399,2524	[M+H] ⁺				
				C ₂₅ H ₃₄ O ₄	398,2457	1,1

Teniendo en cuenta que lo presentado en torno al análisis y determinación estructural de los componentes de las fracciones más activas es un estudio preliminar, se sugiere realizar trabajos futuros encaminados a mejorar la separación cromatográfica de las fracciones más activas, así como continuar y profundizar con la elucidación estructural de componentes de dichas fracciones y de los respectivos extractos.

4. Conclusiones

1. A partir tanto del epicarpio como de las semillas del aguacate Hass (*Persea americana* Mill. var. Hass) es posible obtener extractos que inhiben o retardan la oxidación lipídica de oleína de palma-OP y de carne de res cruda-CR.
2. El extracto obtenido de las semillas del aguacate Hass empleando EFSc (100 MPa, 3% EtOH, 40°C – Extracto **5**) presentó mayor protección contra la oxidación lipídica de OP; dicho extracto tuvo un mejor comportamiento que el BHT, BHA y GA, antioxidantes comúnmente empleados en la industria de grasas y aceites.
3. El extracto obtenido de las semillas del aguacate Hass empleando acetato de etilo posterior a una extracción con hexano (extracto **2S**) presentó mayor protección frente a la oxidación de CR, superior a la obtenida empleando BHT.
4. Algunas fracciones obtenidas a partir de los extractos 5 y 2S presentaron una AA similar a la de los extractos de origen sobre OP y CR, respectivamente; por tanto es recomendable emplear en cada caso los respectivos extractos crudos.
5. El análisis por HPLC-MS de las fracciones más activas de los correspondientes extractos permitió, de forma preliminar, proponer las fórmulas moleculares condensadas: $C_{16}H_{35}N$, $C_{27}H_{41}NO_2$, $C_{20}H_{34}N_2O_6$ ó, $C_{25}H_{34}O_4$

Recomendaciones

Una vez alcanzados los objetivos planteados en el proyecto de tesis de maestría, surgen una serie de sugerencias que amplían la temática abordada para llegar a conclusiones más profundo; por lo tanto se recomienda a futuros interesados en el tema:

1. Efectuar un estudio estructural de los compuestos, de forma que se pueda afirmar con plena seguridad la composición química de la fracción más activa, además se requiere evaluar la actividad antioxidante en oleína y carne de res de los compuestos identificados, con el fin de determinar su aporte.
2. Determinar la inocuidad de los extractos activos sobre los alimentos, lo cual es una directriz a seguir para aditivos alimentarios.
3. Evaluar la factibilidad económica del proceso a escala piloto e industrial, para conocer las ventajas de emplear dichas clases de extractos como aditivos en alimentos.
4. Realizar un estudio similar sobre otras variedades de aguacate (*P. americana*) con el fin de identificar similitudes y diferencias en cuanto a composición y/o concentración de ciertos metabolitos secundarios con actividad antioxidante; además se requiere un estudio en iguales variedades pero con diferentes puntos geográficos de siembra de las plantas, debido a que las variables medio ambientales influyen en la biosíntesis de tales metabolitos, y finalmente es importante realizar un estudio sobre los excedentes industriales, con el fin de reducir el impacto ambiental que producen dichos residuos.
5. Realizar un estudio sensorial sobre la OP y la CR con los extractos adicionados con el fin de determinar en qué medida se afecta el gusto por parte del consumidor.