



**Evaluación de potencial antioxidante de extractos
obtenidos con CO₂ supercrítico a partir de frutas nativas de
Uruguay en la protección de aceites comestibles.**

Tesina de graduación
Licenciatura en Bioquímica

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL)
Facultad de Química. Universidad de la República.

TUTOR

Dr. Ing. Alim. Ignacio Vieitez

ESTUDIANTE

Amelia Rosso

Marzo 2018

Índice

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 Oxidación, Antioxidantes y Polifenoles	4
2.2 Especies frutícolas nativas del Uruguay	6
2.2.1. Guayabo del País.....	6
2.2.2. Arazá rojo y Arazá amarillo	7
2.3. Extracción con fluido supercríticos (SFE)	8
2.4. Método DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)	10
2.5. Método ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))	12
2.6. Método Rancimat.....	13
2.7. Método de Folin-Ciocalteu	15
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Frutos nativos y reactivos.....	16
4.2. Liofilización y molido	16
4.3. Extracción supercrítica con CO ₂	17
4.4. Extracción con Etanol/Agua 75:25 (v/v)	19
4.5. Método DPPH	19

4.6. Método ABTS	20
4.7. Método Rancimat	21
4.8. Método de Folin-Ciocalteu.....	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1 Rendimiento de las extracciones	22
5.2. DPPH (Poder antirradicalario ARP)	23
5.3 ABTS (Capacidad antioxidante)	28
5.4 Rancimat (Período de inducción)	30
5.5. Folin-Ciocalteu (Polifenoles totales)	34
6. CONCLUSIONES.....	36
7. BIBLIOGRAFÍA	38
8. ANEXO	42

1. Resumen

Producir alimentos de prolongada vida útil y que sean seguros para el consumo ha sido una de las áreas de mayor interés para la industria alimentaria. En este ámbito sustituir antioxidantes sintéticos potencialmente carcinogénicos por antioxidantes naturales resulta de interés y permitiría generar productos estables frente a los procesos de oxidación sin potenciales efectos perjudiciales para la salud. En este sentido, muchas de las hierbas y frutos que ya tradicionalmente se utilizan en la industria para añadir sabor o con usos en la medicina folklórica resultan una matriz rica en antioxidantes naturales.

Los métodos tradicionales de extracción de productos naturales suelen involucrar la utilización de solventes orgánicos inflamables o tóxicos y altas temperaturas que aceleran la degradación de los productos de interés y la formación de impurezas. En cambio la sustitución de estos solventes por fluidos supercríticos, particularmente con dióxido de Carbono (CO₂), que ha sido propuesto como una alternativa muy atractiva que presenta numerosas ventajas. El CO₂ posee una temperatura crítica moderada, lo que se asegura la preservación de los productos termolábiles de interés, además no es tóxico ni inflamable y es considerado una sustancia GRAS (Generally Recognized as Safe) para la industria alimentaria. En esta propuesta se determinó la eficiencia de la extracción con CO₂ supercrítico del fruto Guayabo del País y Arazá rojo y amarillo (frutos nativos de Uruguay), a los efectos de obtener extractos con potencial antioxidante en comparación con la extracciones tradicionales.

Los extractos obtenidos presentaron actividad antirradicalaria, capacidad antioxidante, cierta cantidad de polifenoles totales, y en mayor o en menor medida fueron capaces de proteger al aceite de girasol purificado del enranciamiento. Se puede afirmar que el uso de etanol como co-solvente asistiendo la extracción con SC-CO₂ supercrítica permitió que los resultados obtenidos sean mejores comparativamente, tanto desde el punto de vista de los rendimientos, como desde el punto de vista de la capacidad antioxidante. Sin embargo, los valores obtenidos con las extracciones supercríticas fueron menores que con la mezcla EtOH/H₂O 75:25, en la cual el fruto Guayabo del País presentó los mayores, con un ARP de 0,48, capacidad antioxidante de 0,93 mg de equivalente de ác. Ascórbico/L sal y polifenoles totales de 92,6 mg de ác. Gálico / g de extracto. Los resultados obtenidos indican que es

promisoria la utilización de los extractos supercríticos como antioxidantes alternativos en aceites vegetales ya que, utilizados a la concentración adecuada, permiten conferirle al aceite una adecuada protección, pero es necesario profundizar los estudios con estos frutos nativos del Uruguay.

Palabras clave: Frutos nativos; extracciones; antioxidantes naturales; fluidos supercríticos.

2. Introducción

2.1 Oxidación, Antioxidantes y Polifenoles

La oxidación, transferencia de electrones entre átomos, es esencial para la vida aeróbica y nuestro metabolismo, el oxígeno es el último aceptor en el flujo de electrones que produce energía en forma de ATP. Cuando el flujo de electrones se desacopla, genera radicales libres conocidos como especies reactivas del oxígeno (ROS). Los ROS contienen al menos un electrón desapareado, y son capaces de oxidar biomoléculas [1].

En la actualidad existe un creciente interés por los antioxidantes con el objetivo de prevenir los posibles efectos adversos de los radicales libres en el organismo humano. También, para prevenir el deterioro de las grasas, aceites y otros componentes de los alimentos, causantes de la generación de off-flavors.

Un compuesto con propiedades antioxidantes puede tener la capacidad de neutralizar radicales libres, depurar especies del oxígeno, atrapar electrófilos y quelar iones metálicos [2].

Los polifenoles, provienen del metabolismo de las plantas y se encuentran naturalmente en alimentos y bebidas de origen vegetal. Desde el punto de vista químico se caracterizan por la presencia de uno o más grupo fenol por molécula. Ellos se relacionan con características como el sabor, color, y el valor nutricional de los alimentos. Entre estos compuestos se encuentran los ácidos fenólicos y flavonoides [3]. Existen varias clases de polifenoles en frutas y verduras que contribuyen al efecto antioxidante y tienen potenciales efectos saludables [4]. Los compuestos fenólicos encontrados en las plantas, exhiben una amplia gama de efectos biológicos incluyendo antibacterianos, anti-inflamatorio, antialérgico, hepatoprotector, antitrombóticos, antivirales, anticancerígenos y vasodilatadores [2].

Los antioxidantes sintéticos más utilizados para prevenir la oxidación en la industria alimentaria son: Tertbutilhidroxiquinona (TBHQ), Butilhidroxitolueno (BHT) y Butilhidroxianisol (BHA), lo cuales presentan una posible toxicidad y pueden actuar como promotores de la carcinogénesis. Por este motivo es que se intenta cada vez más remplazarlos por antioxidantes obtenidos de fuentes naturales [5]. En nuestro país se permite el uso de ciertas cantidades de TBHQ, BHT y BHA como aditivos en algunos alimentos, ejerciendo la función de antioxidantes. Los límites en grasas y aceites son de 100 mg/Kg para el BHA, y 200 mg/Kg para BHT y TBHQ respectivamente. En el resto de los alimentos los límites son variables estando definido en muchos de ellos en base a su contenido graso [6]. Estos antioxidantes se usan ampliamente en grasas y aceites.

Los lípidos son productos naturales que tienen características en común, como ser su hidrofobicidad y afinidad por solventes orgánicos. Son un grupo de compuestos constituido por carbono, hidrógeno y oxígeno, que integran cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas, aunque ocasionalmente también contienen fósforo y nitrógeno. Incluyen ácidos grasos y sus derivados, esteroides, terpenos y carotenoides, entre otros; siendo los triglicéridos los compuestos mayoritarios en grasas y aceites. Debido a que el enlace éster de los acilglicéridos es susceptible a la hidrólisis química y enzimática, y a que los ácidos grasos insaturados son sensibles a reacciones de oxidación, las grasas y los aceites pueden sufrir diferentes transformaciones que además de reducir el valor nutritivo de un alimento producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables [7]. Con el término rancidez se hace referencia a los mecanismos a través de los cuales se alteran los lípidos y se clasifican en lipólisis o rancidez hidrolítica y oxidación o rancidez oxidativa.

Dentro de la oxidación, la autooxidación, es uno de los mecanismos más importantes, la misma se da a temperatura ambiente en contacto con el aire. En un primer paso se forman hidroperóxidos, paso que es posible debido a la labilidad de los hidrógenos adyacentes a los dobles enlaces y a la presencia de oxígeno. Los peróxidos se forman entonces mediante una reacción radicalaria, en la cual los mismos compuestos producidos mantienen y aceleran la reacción que luego se termina con la generación de monómeros oxidados, dímeros, polímeros y compuestos volátiles. La oxidación también puede ser catalizada enzimáticamente (lipoxigenación), puede ser inducida por compuestos fotosensibles (foto -

oxigenación) o tener lugar debido a altas temperaturas (termo-oxidación), involucrando cada una de ellas mecanismos diferentes [7, 8]. Nutricionalmente la función básica de los lípidos es de contribución energética (8,5 cal/g) y de aporte de ácidos grasos esenciales, viéndose ambas disminuidas tras el enranciamiento [8]. Además, se generan compuestos que no sólo son contraproducentes organolépticamente sino que pueden ser dañinos para el organismo, siendo compuestos como los peróxidos pro-oxidantes que al ingresar al organismo generan estrés oxidativo.

2.2 Especies Frutícolas nativas del Uruguay

Actualmente es aceptado que el valor de muchos frutos, hierbas y especias radica en su contenido de antioxidantes naturales, que proporcionan protección contra los radicales libres. Sin embargo, si bien existen estudios científicos que indican los posibles efectos antioxidantes de gran cantidad de frutos nativos de nuestra región, sólo algunos de ellos han sido estudiados. Por ejemplo, especies frutícolas nativas del Uruguay, pertenecientes a la familia de las Mirtáceas, tales como el guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret), la pitanga (*Eugenia uniflora* L.), el arazá (*Psidium cattleianum* Sab.), y el guabiyú (*Myrcianthes pungens* (Berg.) Legr.), presentan características propias que los diferencian de otras especies, y por lo tanto pueden ser una interesante fuente de antioxidantes naturales.

2.2.1 Guayabo del país (Acca sellowiana (Berg.) Burret).

El “Guayabo del País”, (Figura 1.), conocido también como Guayabo en Uruguay y a nivel internacional como pineapple guava [9]. Es una especie frutícola nativa de América del Sur. Se distribuye en el sur de Brasil, en el sur de Misiones Argentina, sur de Paraguay y en todo el territorio de nuestro país [10].



Figura 1. Guayabo del País, Rio Negro – Isla de los Naranjos, Revista INIA [11].

Es un árbol de 2 a 4 metros de altura. La fruta es una baya de forma variable, de color verde, cáscara lisa o rugosa, y con un peso de 25-60 g, aunque algunos a llegan a 130 g o más [9]. La pulpa del fruto maduro es gelatinosa y de color hielo, con aroma penetrante y peculiar [12]. Es un fruto con un valor nutricional muy importante por su alto contenido en vitamina C y en iodo [12]. Muy apreciado por su contenido de vitaminas y minerales y por sus propiedades antibacterianas, antialérgicas y antioxidantes [10]. Se consumen tanto en fresco como en productos elaborados (como por ejemplo: mermeladas, jugos, etc.) [9]. Presenta una amplia adaptabilidad a condiciones climáticas, buena resistencia a heladas y precocidad productiva [9]. El período de floración de esta especie se extiende desde octubre a mediados de noviembre, y dependiendo de los materiales y de la zona del país donde se ubique el cultivo, la fecha de cosecha va desde fines de febrero en el Norte hasta mediados de mayo para plantas cultivadas en el Sur del país [12]. Se explota de manera comercial en países como Estados Unidos, Nueva Zelanda, Australia, Italia, Colombia e Israel entre otros. Estas explotaciones comerciales emplean materiales genéticos colectados en Uruguay y sur de Brasil [10].

2.2.2 Arazá (*Psidium cattleianum* Sab.)

El Arazá, (Figura 2 y 3.) es otro de los frutos nativos de Uruguay, Argentina y Sur de Brasil [12]. Crece en forma silvestre en sierras, orillas de bañados y arenales [13]. Es perenne, llega a 4 metros de altura y se adapta muy bien a nuestras condiciones climáticas [12].



Figura 2. a) Arazá rojo y flor [14].

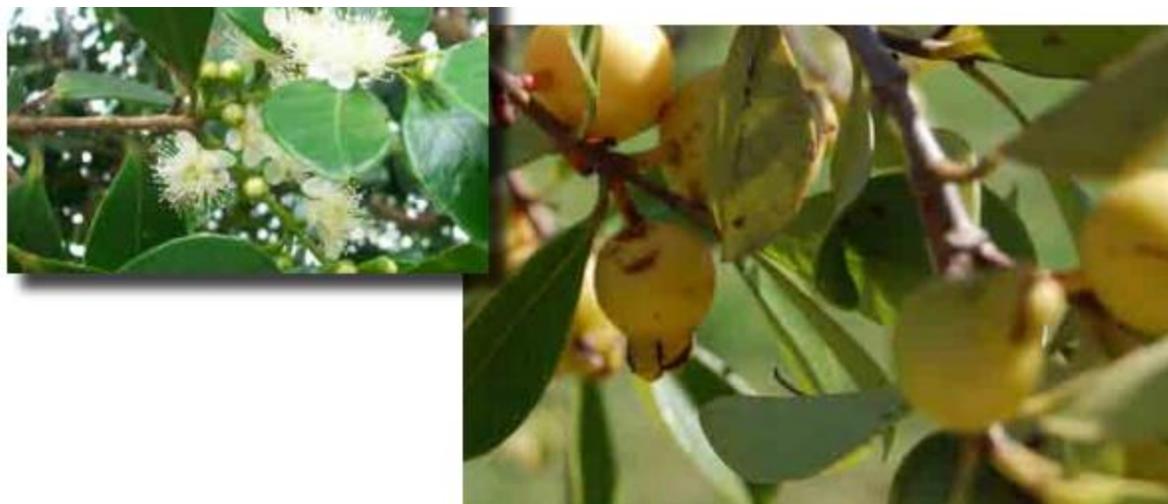


Figura 3. Arazá amarillo y flor [14].

Es una especie de variabilidad baja. La floración se da durante octubre hasta principios de noviembre, pudiendo existir una segunda floración en diciembre. La cosecha se obtiene en febrero y marzo dependiendo de la fecha de floración, pudiéndose cosechar en varias pasadas a medida que van madurando [12]. Sus frutos son de 3 a 4 cm de diámetro, pielcolor

rojizo o amarillo y forma redondeada. En estado maduro, desarrollan un alto nivel de aroma, especial y característico [13]. Presentan un alto contenido de azúcares y baja acidez [12]. Se consume la pulpa, de color blanquecina con pequeñas semillas [13]. También se preparan mermeladas, licores y aromatizantes [12].

El Arazá posee un sabor agrídulce agradable y buenas propiedades nutricionales, con alto contenido de minerales, antioxidantes y vitaminas A, B1 y C, los cuales inciden en la disminución del riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares [12 y 13]. Estudios preliminares mostraron un buen potencial antioxidante y alto contenido fenólico que difieren entre genotipos de arazá [15].

2.3 Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)

La extracción de antioxidantes a partir de tejidos vegetales se ha logrado tradicionalmente mediante la extracción sólido-líquido, utilizando disolventes orgánicos, tales como metanol, etanol y acetona, y también por destilación con vapor [5].

Sin embargo, existe la búsqueda de métodos más eficientes, de mayor rendimiento, que requieran menor cantidad de muestra y solvente, que extraigan selectivamente una variedad de compuestos y que tengan la menor cantidad de residuos posible. En este marco de búsqueda de nuevas metodologías de extracción, en los últimos años surgen las extracciones supercríticas (SFE), las cuales utilizan solventes a temperaturas y presiones por encima de su punto crítico.

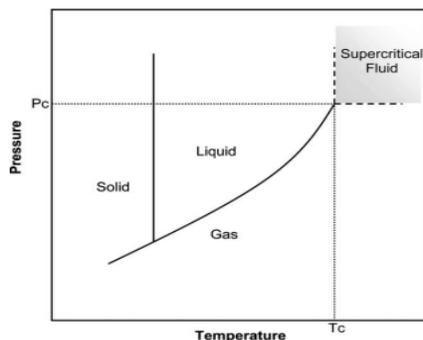


Figura 4. Diagrama de equilibrio de fases. Por encima de la temperatura y presión crítica el fluido se encuentra en estado supercrítico.

Como se observa en la Figura 4, a una presión y temperatura dada un componente se encuentra en estado supercrítico si la temperatura y presión son más elevadas que las de sus respectivos valores críticos. En este estado, varias propiedades de éste están entre las de un gas y las de un líquido; por ejemplo, densidad similar a un líquido, viscosidad similar a un gas y difusividad intermedia entre ambos estados. En estado supercrítico un fluido ofrece propiedades fisicoquímicas ventajosas en los métodos de extracción. Los fluidos tienen mejores propiedades de transporte que los líquidos, debido a su baja viscosidad y alta difusividad, así éstos pueden difundirse fácilmente a través de materiales sólidos y de ésta manera la extracción es más rápida [16]. A su vez, la densidad y difusividad de estos fluidos se puede ajustar mediante variaciones de temperatura y de presión (Figura 4). Este hecho permite ajustar sus propiedades de selectividad frente a varios compuestos. En forma adicional, dado que el solvente supercrítico opera a altas presiones, la separación entre soluto y solvente se realiza en forma muy simple y eficiente por la simple descompresión del sistema.

Existe una amplia gama de compuestos que se pueden utilizar como fluidos supercríticos. El más comúnmente usado para la extracción de productos naturales es el dióxido de carbono (CO_2) [6]; cuya presión y temperatura supercrítica es fácilmente alcanzada dado que los valores son 7,38 MPa y 31,06 °C [17].

Recientemente, ha habido un creciente interés en el uso de CO_2 , para extraer componentes de una materia prima [18]. Siendo esta una opción para la obtención de extractos que contengan sustancias como antioxidantes, aceites esenciales, carotenoides, compuestos fenólicos, entre otros [19].

El dióxido de carbono es un solvente ideal para la extracción de productos en el rubro de la alimentación y farmacia entre sus ventajas están: baja toxicidad, no es explosivo ni inflamable, está fácilmente disponible, tiene bajo costo, se elimina fácil del extracto obtenido, la temperatura crítica es baja y por lo tanto los compuestos naturales termo-sensibles pueden ser recuperados con mínimo daño, presenta mayor selectividad, tiempos de extracción más cortos [18], y tiene una buena capacidad de extracción debido a su mayor poder de penetración [19].

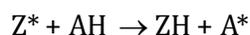
Una desventaja en el uso de CO₂ como fluido supercrítico es que no es muy eficiente en la extracción de compuestos polares. Para contrarrestar esta dificultad se utilizan modificadores (también llamados co-solventes), éstos son compuestos polares que, añadidos en pequeñas cantidades, producen cambios en las propiedades del fluido puro [16].

Básicamente, un sistema de extracción con CO₂ supercrítico consiste en un reservorio de solvente. Este se bombea a elevada presión mediante el uso de una bomba hacia la celda de extracción que está dentro de un horno de temperatura regulable y el extracto, finalmente, se junta en el recipiente colector. Por lo tanto, el proceso de extracción con fluidos supercríticos básicamente consiste en elevar la presión del gas a utilizar como solvente a un valor por encima de la presión crítica del mismo, conducirlo luego a un extractor que se encuentra a una temperatura por encima de la temperatura crítica del gas y donde se encuentra la muestra o materia prima que contiene el soluto de interés. Posteriormente, el gas se descomprime a una presión inferior a la presión crítica, liberándose el soluto en un recipiente separador.

2.4 Método DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Se utiliza para determinar la actividad antirradicalaria de numerosos tipos de compuestos. Se utiliza DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), molécula caracterizada como un radical libre estable, debido a la dislocación del electrón libre sobre la molécula lo que impide la dimerización, como sucede con la mayoría de los radicales libres [20]. Esta dislocación da lugar al color violeta oscuro que posee el DPPH, caracterizado por una banda de absorción en solución de etanol o metanol centrada alrededor de los 515-520 nm.

Al mezclar la solución de DPPH con la de una sustancia donante de hidrógenos (antioxidante) se produce la reducción del DPPH, con la subsiguiente pérdida del color violeta. La reacción que tiene lugar entre el DPPH y la sustancia antioxidante se representa de la siguiente forma:



Donde Z* representa al DPPH y a los radicales formados en las reacciones de autooxidación de lípidos, y AH, sustancia antioxidante donante de H. El radical A* formado continuará

reaccionando, estas reacciones son las que controlan la estequiometría global, es decir el número de moléculas de DPPH reducidas por cada molécula de antioxidante.

Por lo tanto, el método consiste en el seguimiento espectrofotométrico de la desaparición del color violeta en presencia del antioxidante (Figura 5).

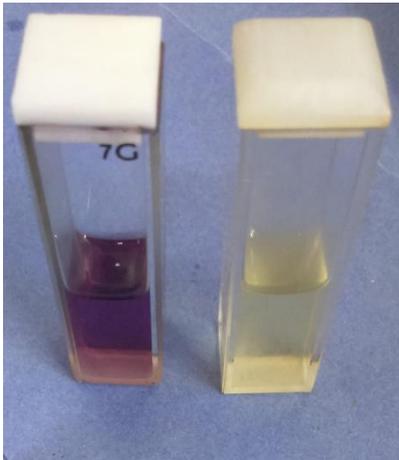


Figura 5. Cambio del color de violeta a amarillo debido a la reducción del DPPH.

A partir de los datos registrados de absorbancia, se determina el porcentaje de DPPH remanente al alcanzar el estado estacionario para cada concentración de antioxidante.

Posteriormente, se grafica el valor de DPPH remanente contra la concentración de antioxidante de donde se obtiene el parámetro EC_{50} para cada antioxidante en estudio. Dicho parámetro es útil para la interpretación de los resultados obtenidos por este método, y se define como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH. Por razones de claridad se habla en términos de $1/EC_{50}$, poder antirradicalario o “anti radical power” (ARP), ya que cuanto mayor es el valor del mismo más eficiente el antioxidante [21].

2.5 Método ABTS (2,2' -azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

Se utiliza para la determinación de la capacidad antioxidante. Se basa en la reactividad del radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$, que absorbe luz dando un color verdoso intenso. Y luego de reaccionar con sustancias antioxidantes la absorción decrece notoriamente. La técnica para la generación de $ABTS^{\bullet+}$ implica la producción directa del cromóforo $ABTS^{\bullet+}$ azul / verde a través de la reacción entre ABTS y persulfato de potasio. Esto tiene máximos de absorción

a longitudes de onda de 415 nm, 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de antioxidantes reduce al catión radical preformado, según la actividad antioxidante, la concentración del antioxidante y la duración de la reacción. Por lo tanto, el alcance de decoloración como porcentaje de inhibición de $ABTS \bullet +$, se determina en función de la concentración y tiempo, y se calcula en relación con la reactividad de un antioxidante estándar bajo las mismas condiciones. El antioxidante sintético de referencia (Trolox o ácido ascórbico si se trata de alimentos) se utiliza a una concentración de 0-15 μM , o (0-20 mg/100 mL) respectivamente en las mismas condiciones. Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C). El método es aplicable al estudio de antioxidantes solubles en agua y en lípidos, compuestos puros y extractos de alimentos [22, 23].

2.6 Método Rancimat

Este método implica exponer a un aceite a condiciones extremas (alta temperatura y aireación) y así lograr el enranciamiento acelerado del mismo. Se determina el período de inducción (PI) de la oxidación en forma indirecta mediante la determinación de la cantidad de compuestos volátiles generados.

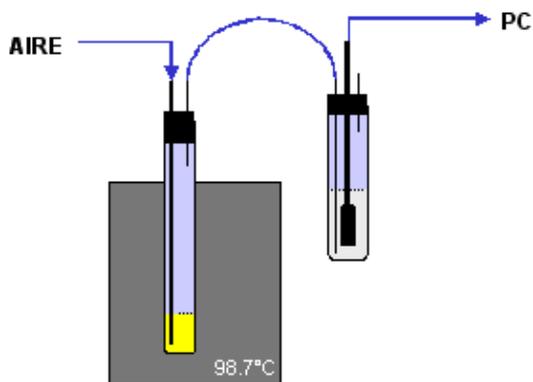


Figura 6. Esquema del equipo Rancimat

En la Figura 6 vemos un esquema de la operación de éste método. La muestra se coloca en un tubo ubicado dentro de un bloque termostático a la temperatura deseada y se hace

burbujear una corriente de aire a través de la misma. Los ácidos orgánicos volátiles, formados en el proceso de oxidación son arrastrados hacia otro tubo conteniendo agua desionizada, provisto de una celda de conductividad que trasmite su señal a una computadora (PC) donde se procesan los datos.



Figura 7. Equipo Rancimat utilizado en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, UdelAR.

Los compuestos volátiles generados en el proceso de oxidación del aceite se disuelven en el agua desionizada generando un incremento en la conductividad de la misma, el cual es proporcional a la cantidad de dichos compuestos. Como es habitual en los aceites, luego de un período inicial en el que la velocidad de oxidación es muy baja, la misma aumenta drásticamente, registrándose en el equipo como un marcado aumento en la pendiente de la curva de conductividad del agua. El tiempo Rancimat (correspondiente al período de inducción: PI) se calcula como la intersección de las tangentes a la curva de conductividad antes y después del cambio de pendiente (figura 8).

- Caracterizar los extractos obtenidos por su capacidad antioxidante (método ABTS), su efecto antirradicalario (método DPPH) y por su contenido de fenoles totales (método de Folin-Cicalteu).
- Evaluar el poder antioxidante de los extractos mediante la determinación del efecto de los mismos sobre el periodo de inducción del aceite de girasol (previamente purificado, y por lo tanto libre de antioxidantes naturales o sintéticos), sometido al método de enranciamiento acelerado Rancimat. Se compararan los resultados obtenidos con los extractos respecto a aquellos que se obtienen con los antioxidantes sintéticos tradicionales utilizados en la industria alimentaria (BHT y BHA).
- Obtención de extractos por los métodos tradicionales de maceración con solventes orgánicos.
- Comparar los resultados obtenidos en las condiciones óptimas de la extracción supercrítica con los obtenidos por los métodos tradicionales de maceración con solventes orgánicos.

4. Materiales y métodos

4.1 Frutos y reactivos

Los frutos Guayabo del País (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret), Arazá rojo y Arazá amarillo (*Psidium cattleianum* Sab) fueron gentilmente proporcionados de cultivos de INIA Las Brujas, Ruta 48 km 10, Rincón del Colorado, Departamento de Canelones.

Los antioxidantes sintéticos utilizados fueron el Butilhidroxitolueno (BHT) y Butilhidroxianisol (BHA), de pureza 100%.

Las soluciones de los extractos fueron preparadas con los siguientes solventes: Metanol (solvente de alta calidad HPLC, Sigma), Isopropanol (MACRON FINE CHEMICALS), Etanol (PPA, DEXIN).

El aceite utilizado como reactivo en el método Rancimat fue el aceite genuino de girasol Uruguay, marca COUSA.

Se utilizó DPPH (Sigma), reactivo de Folin-Cicalteu's phenol reagent, 2N (Sigma-Aldrich).

El material de vidrio, al igual que los equipos (Liofilizador Labotecgroup 01.JLG (12FD) con bomba de vacío a -58,5 ° C y 0,00001 pa de presión (Figura 9); Espectrofotómetro Shimadzu

UV-1203, 873; Biodisel Rancimat y el equipo de extracción supercrítica (Figura 11)) fueron proporcionados por el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, UdelaR.

4.2 Liofilización y molido

Para realizar las extracciones, primero se procedió a secar y determinar la humedad de los frutos. El secado se hizo por liofilización hasta peso constante. Posteriormente, al tener las muestras secas se muelen y se almacenan en freezer a -18°C .

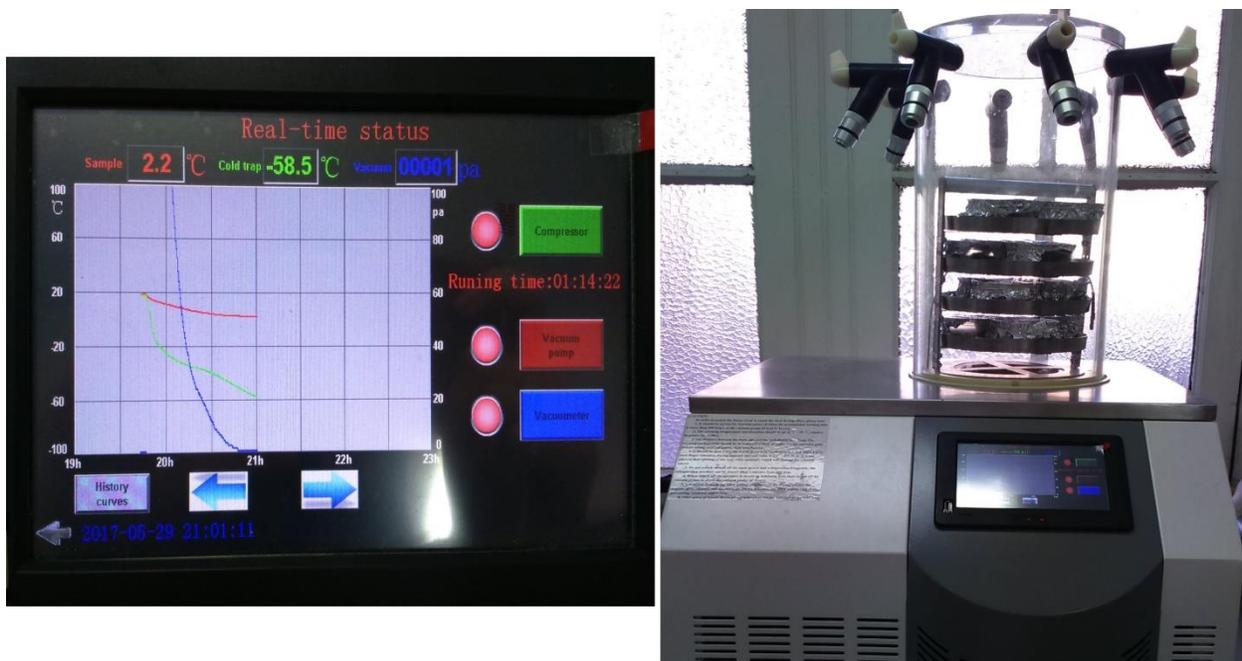


Figura 9. Liofilizador Labotecgroup 01.JLG (12FD), funcionando a $-58,5^{\circ}\text{C}$ de temperatura y a $0,0001\text{ pa}$ de presión.

4.3 Extracción supercrítica con CO₂

Las extracciones supercríticas fueron realizadas en el equipo esquematizado en la Figura 10. La celda de extracción (E) de acero inoxidable (TharTech Inc., USA), de una capacidad de volumen de 25 mL, (soporta una presión máxima de 10.000 psi), fue llenada con la muestra seca y molida.

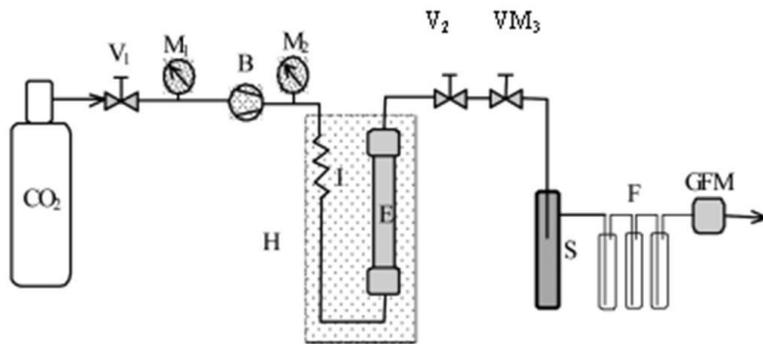


Figura 10. Esquema del equipo de extracción supercrítica.

Luego de esto, la bomba (B), (compresor tipo pistón con regulación de flujo volumétrico automático y fijación de presión y flujo másico manual), eleva la presión de CO₂ y con la válvula V₂ cerrada, se deja que el fluido entre a la celda de extracción. Ésta última se encuentra a temperatura constante de 40 °C (condición supercrítica del fluido) y permanece el fluido dentro de la misma por 15 minutos para que entre en contacto con la matriz sólida. Una vez pasado ese tiempo, con la válvula micrométrica VM₃ moderadamente abierta, se comienza a abrir la válvula V₂. En este momento, toda la humedad y parte del aceite esencial de la muestra que se encuentran solubilizados en el CO₂, es separado en el momento que atraviesa VM₃. La separación se da, debido a la despresurización de la mezcla fluido-extracto, el CO₂, pasa a estado gaseoso y el extracto al estado líquido. El extracto se recoge en un vial de vidrio que se encuentra dentro del separador (S). El separador está constituido por un caño capilar de acero inoxidable con su extremo dentro de un vial de vidrio de 7 mL. Tanto el caño como el vial están contenidos en una celda de vidrio. El caño capilar está unido a la válvula VM₃ y ésta última está termostatazada por una resistencia a la cual se le aplica un voltaje. La función de ésta resistencia es la de evitar la solidificación del fluido a la salida del dispositivo de extracción.

Posteriormente, el CO₂ despresurizado y exento de la esencia, pasa a través de una batería de filtros para así ser liberado al ambiente. El flujo volumétrico es registrado por un medidor que se encuentra al final del sistema (GFM).

Las primeras extracciones fueron realizadas utilizando distintos valores de presión: 200 y 400 bar. Las extracciones en las que se utilizó co-solvente (en un 10 % (m/m) respecto al flujo de CO₂) se hicieron a 200 bar de presión. Todas las extracciones se realizaron a una temperatura de 40 °C.

Los resultados alcanzados con los extractos obtenidos mediante las extracciones con SCCO₂ y con Etanol como co-solvente (SCCO₂-EtOH-200bar), se presentaran en comparación a los obtenidos sin el uso de co-solvente durante el desarrollo del informe.



Figura 11. Equipo de extracción supercrítica del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química

4.4 Extracción con Etanol (maceración tradicional)

Se partió de 2 gramos de muestra seca y molida, a la cual se le agregó 30 ml de solvente (EtOH/H₂O 75:25). Posteriormente, se agitó constantemente durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 15 minutos a 4000 rpm y se separó el sobrenadante. Se realizó un lavado con 15 mL de solvente, el cual se agitó durante dos horas. Se procedió nuevamente a separar y luego se evaporó todo el solvente en baño de agua a 40 °C bajo flujo de Nitrógeno. Los extractos se almacenaron en freezer a -18°C y al resguardo de la luz.

Para realizar las maceraciones con la mezcla EtOH/H₂O 75:25, se adaptó y escaló el método descrito en bibliografía [25].

4.5 Método de DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Para determinar el poder anti-radicalario se utilizó el método DPPH, como se detalla a continuación.

Se disuelve 0,016 g de DPPH en 50 mL de metanol, y luego se realizó una dilución 1:10 de esa solución.

La solución del extracto se preparó de tal manera que sus alícuotas permitan llegar a relaciones en los rangos reportados en bibliografía. Se utilizan de 20 µL a 400 µL.

Para realizar en ensayo se mezcló 1,6 mL de la solución de DPPH con 400 µL de extracto en solución (o parte de la solución de extracto y parte de metanol para llegar a los 2 mL), soluciones con diferentes relaciones másicas (R, mg de extracto/mg DPPH) entre el extracto y el DPPH).

Se midió la absorbancia de la mezcla reaccionando cada 5 minutos a 515 nm, hasta que la reacción sea completa, (se midió hasta obtener una absorbancia constante).

Junto con la muestra se midió la absorbancia de un blanco en el tiempo (en ausencia de extracto, compuesto únicamente por DPPH y Metanol).

A partir de los datos obtenidos se graficó la curva de absorbancia en función del tiempo y se determinó el DPPH remanente para cada R dado por el porcentaje correspondiente al tramo final horizontal de la curva (en donde la absorbancia se mantuvo constante).

Una vez obtenidos los valores de DPPH remanente para los diferentes valores de R, se graficó dicho valor en función de R y se determinó por interpolación en valor de R correspondiente

a un 50 % de DPPH remanente. Dicho valor es conocido también como EC_{50} . Éste parámetro es característico de cada antioxidante y es utilizado para comparar la eficacia entre distintos compuestos.

En resumen el EC_{50} es la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50 % la concentración inicial del DPPH. Por lo tanto, cuanto más pequeño sea el valor de EC_{50} para determinado compuesto, más eficientes serán sus capacidades antioxidantes.

A la hora de comparar antioxidantes se suele utilizar el término $1/EC_{50}$ o poder antirradicalario o "Anti Radical Power (ARP), a los efectos de expresar el resultado en base a un parámetro que sea mayor cuanto más eficiente sea el antioxidante.

4.6 Método de ABTS

El radical se forma por la reacción entre el ABTS (38,4 mg de sal diamónica) y $K_2S_2O_8$ (6,6 mg) al incubar en la oscuridad a temperatura ambiente por 16 horas.

Se diluyó la solución 50 veces con EtOH absoluto hasta una absorbancia entre 0,6 y 0,8 a 734 nm. Para cuantificar las muestras se construyó una curva de calibración de ácido ascórbico. Los resultados se expresaron cómo miligramos de ácido ascórbico/gramos de muestra. La reacción entre ABTS y ácido ascórbico finaliza entre 4 a 6 minutos, llegando a una absorbancia constante, mientras que para los polifenoles se estabiliza luego de los 40 minutos. Trabajando con poca luz, se mezcló 10 μ L de muestra, 990 μ L de ABTS diluido y se midió la absorbancia a 734 nm a los 15 minutos a temperatura ambiente contra un blanco de celda vacía.

4.7 Método Rancimat y purificación del aceite.

El poder antioxidante se evaluó por el método de enranciamiento acelerado (Rancimat).

Para éste método se dispuso de un equipo 873 Biodisel Rancimat. Se utilizó como matriz aceite de girasol purificado, de ésta manera se retiran antioxidantes naturales (tocoferoles) sintéticos u otros compuestos que puedan interferir con este estudio. El aceite de girasol fue purificado mediante su paso a través de una columna de alúmina, sin solventes [24, 26].

La purificación consistió en pasar el aceite comercial a través de una columna cargada con alúmina activada a 180°C durante 3 horas. Se utilizó una relación alúmina-aceite 1:1 y se

aplicó vacío en la descarga para facilitar el flujo. Durante y después de ésta etapa es importante que el aceite no entre en contacto con la luz, por lo que la columna se mantiene cubierta con papel aluminio.

Para la adición de antioxidantes al aceite de girasol se prepararon soluciones de isopropanol de concentración exactamente conocida de cada uno de ellos (antioxidantes sintéticos y extractos) las cuales se conservaron en freezer a -18°C .

Se pesaron 5 g de aceite de girasol (purificado) en el tubo del Rancimat.

Se adicionó con micro-jeringa, directamente sobre el aceite el volumen de solución de antioxidante 60 μL y 150 μL para tener una concentración final de 200 ppm y 500 ppm respectivamente. Posteriormente, la muestra se colocó en un baño de ultrasonido durante 10 minutos para asegurar su homogenización.

Todas las medidas para obtener el PI se realizaron por duplicado, a una temperatura de 100°C . Los resultados se compararon con un blanco realizado con el aceite de girasol original (purificado, sin el agregado de antioxidantes).

4.8 Método de Folin-Ciocalteu

Éste método se utilizó para la determinación de fenoles totales, tomando como referencia las técnicas de Cicco (2009) y Baiano (2009) [22, 2]. Como primer paso se agregó a un tubo 100 μL de muestra diluida, soluciones de calibración o blanco. Luego se adicionó 100 μL de reactivo de Folin (2M), se mezcló bien y se deja actuar por exactamente 4 minutos.

Posteriormente, se agregó 800 μL de carbonato de Sodio (5%), se mezcló y se dejó actuar por 20 minutos a 40°C . Luego se enfría rápidamente en un baño de agua de hielo, y por último se midió la absorbancia a 750 nm.

La curva de calibración se realizó con ácido Gálico a concentraciones entre 0-80 mg/L, (el patrón de ácido Gálico se disuelve en Metanol acuoso 70%).

5. Resultados y discusión

5.1 Porcentaje de humedad de los frutos nativos

Tabla 1 Porcentaje de humedad de los frutos.

	Porcentaje de humedad (%)	Desviación estándar
Guayabo del País	80,3	0,7
Arazá Amarillo	75,0	0,3
Arazá Rojo	77,8	0,7

En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de humedad de los frutos obtenido luego del proceso de liofilización.

El fruto del Guayabo del País fue el que presentó mayor humedad, 80,3 %, luego el Arazá rojo con 77,8 % y finalmente el Arazá Amarillo con 75,0 %. Estos valores de humedad son esperables y se corresponden con la humedad determinada para dichos frutos en estudios realizados en INIA Las Brujas, de donde fue obtenido el material.

5.2 Rendimiento de las extracciones

En la Tabla 2 se detallan los rendimientos de las extracciones realizadas. En la misma se puede observar las diferencias entre los distintos tipos de extracciones.

Tabla 2 Rendimiento másico de extracciones supercríticas

	Guayabo de País				Arazá Rojo				Arazá Amarillo			
	SCCO ₂ 200b ar	SCCO ₂ 400b ar	SCC O ₂ EtOH 200 bar	EtOH/H ₂ O 75:25	SCCO ₂ 200b ar	SCCO ₂ 400b ar	SCC O ₂ EtOH 200 bar	EtOH/H ₂ O 75:25	SCCO ₂ 200b ar	SCCO ₂ 400b ar	SCC O ₂ EtOH 200 bar	EtOH/H ₂ O 75:25
Rendimiento másico %	1,0	1,1	1,1	65,7	1,4	1,8	1,8	59,1	2,7	3,7	4,2	45,3
(masa g Extracto)/masa g CO₂	0,04	0,05	0,05	-	0,07	0,1	0,08	-	0,1	0,2	0,2	-
(masa g Extracto)/masa g CO₂)/(g de muestra)	0,003	0,004	0,004	-	0,004	0,005	0,005	-	0,008	0,01	0,01	-

Para las extracciones supercríticas vemos que al aumentar la presión de 200 a 400 bar el rendimiento aumenta para todos los frutos estudiados. A su vez utilizando etanol como co-solvente (10% (m/m) respecto al CO₂) y 200 bar de presión el rendimiento obtenido es similar, al alcanzado utilizando 400 bar de presión (sin co-solvente). Por lo tanto, la utilización de un co-solvente permite obtener rendimientos más elevados sin tener que trabajar a presiones muy altas, lo cual es ventaja a la hora de realizar un escalado del equipamiento.

Al comparar las extracciones supercríticas con las con las extracciones con EtOH/H₂O 75:25, como se esperaba, se obtuvieron rendimientos considerablemente mayores para las extracciones con EtOH/H₂O 75:25. Esto surge que la gran selectividad que presenta el CO₂

supercrítico frente a la mezcla etanol/agua, así como la mayor solubilidad de los compuestos de interés en esta mezcla condujo a diferencias importantes en los rendimientos obtenidos.

Para los frutos, en las extracciones supercríticas (independientemente de las condiciones realizadas) se mantuvo una tendencia en la cual el mayor rendimiento corresponde al arazá amarillo, seguido del arazá rojo, y finalmente con el Guayabo del País se obtuvo el menor rendimiento. Por el contrario, lo opuesto ocurrió en el caso de las extracciones con EtOH/H₂O 75:25 donde el mayor rendimiento fue para el Guayabo del País, seguido por el Arazá rojo y por último el Arazá amarillo.

Con el Arazá amarillo se obtuvo un mayor rendimiento para las extracciones supercríticas – con o sin la utilización de un co-solvente- siendo además, el que se extrajo con menor gasto de CO₂.

Estos resultados en donde los mayores rendimientos globales fueron para la extracción con EtOH/H₂O 75:25 (45,3%-65,7%) seguido de la extracción SCCO₂-EtOH-200 bar (1,1%-4,2%), seguido de la extracción SCO₂ 200 bar y SCO₂ 400 bar (1,0% a 2,7% y 1,1% a 3,7% respectivamente), concuerdan con los resultados obtenidos en la bibliografía [19], en los que el rendimiento de la extracción en el fruto Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) acrecentó al aumentar la polaridad del solvente utilizado. Por ejemplo, los extractos acuosos mostraron rendimientos más altos (22% para extracciones supercríticas utilizando agua como co-solvente), seguidos de los extractos etanólicos (16% para extracciones supercríticas con EtOH como co-solvente) y por último los supercríticos sin co-solvente (5%). Dado que el agua presenta mayor polaridad que el etanol (9.0 vs. 5.2), y además que CO₂ es apolar [19].

5.3 DPPH (Poder antirradicalario ARP)

Para la obtención del poder anti-radicalario de los diferentes extractos, las relaciones másicas utilizadas en todos los casos presentaron valores de DPPH remanente mayores y menores al 50%, lo que permitió interpolar el valor correspondiente al EC₅₀ en cada caso. En la Figura 12, se puede observar como ejemplo, los gráficos obtenidos de %DPPH Remanente vs.

Tiempo (en minutos) y el gráfico de %DPPH Remanente vs. los distintos R (mg Extracto/mg DPPH) utilizados, del extracto de Arazá Amarillo obtenido con CO₂ a 400 bar de presión y 40 °C. De esta forma se obtuvo los valores de la recta de la cual se despejan los distintos valores de EC₅₀ y a partir de los cuales se obtienen los valores de ARP que se muestran en la Tabla 2 para todos los extractos obtenidos por SFC y los EtOH/H₂O 75:25.

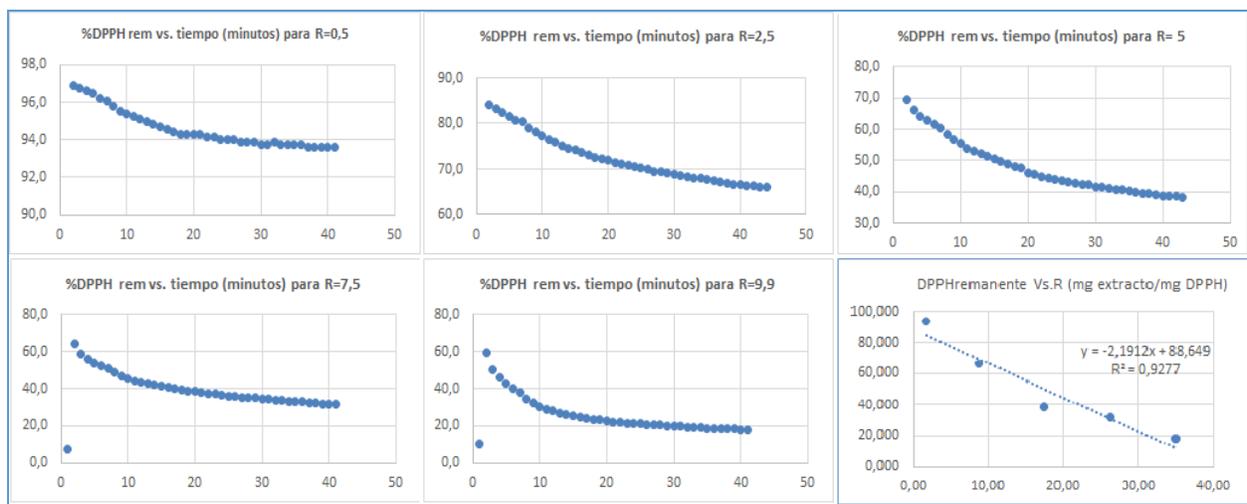


Figura 12. Porcentaje de DPPH remanente en función de la relación (R, mg Extracto/mg DPPH) para el extracto supercrítico de Arazá Amarillo obtenido con CO₂ supercrítico a 400 bar de presión y 40 °C

Tabla 3 Resultados DPPH

	Guayabo del País				Arazá Rojo				Arazá Amarillo			
	SCCO ₂ 200ba r	SCCO ₂ 400ba r	SCCO 2 EtOH 200 bar	EtOH/H ₂ O 75:25	SCCO ₂ 200ba r	SCCO ₂ 400ba r	SCCO 2 EtOH 200 bar	EtOH/H ₂ O 75:25	SCCO ₂ 200ba r	SCCO ₂ 400ba r	SCCO 2 EtOH 200 bar	EtOH/H ₂ O 75:25
EC ₅₀ (mg Extracto/ mg DPPH)	27,46	18,80	20,2 4	2,08	8,22	17,19	13,1 6	7,30	12,71	17,64	9,67	2,37
ARP	0,04	0,05	0,05	0,48	0,12	0,06	0,08	0,22	0,08	0,06	0,10	0,42

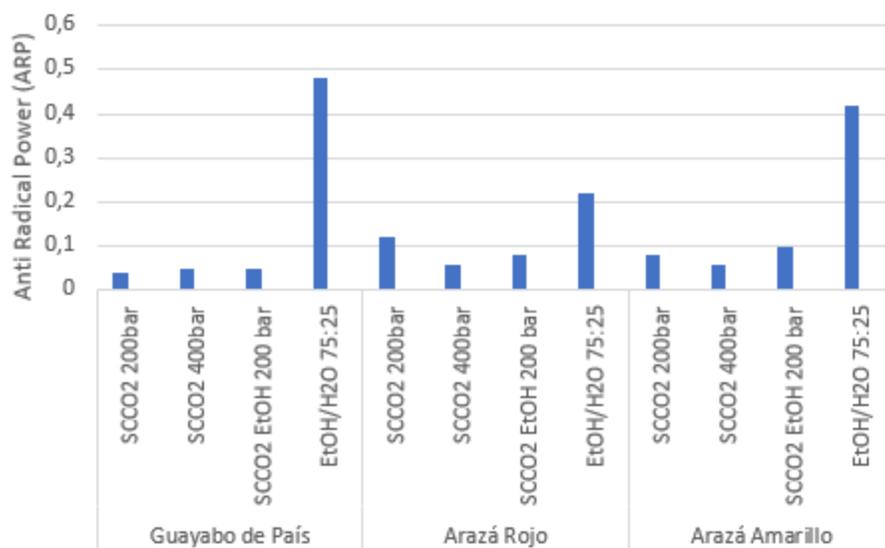


Figura 13. Comparación del poder antirradicalario (ARP, [mg DPPH/mg Extracto]) obtenido para los distintos tipos de extractos.

En la Figura 13 se muestra la comparación del ARP obtenido para los distintos tipos de extractos. En la misma se observa que los valores de ARP obtenidos para las extracciones

supercríticas son considerablemente menores que los obtenidos en las extracciones con EtOH/H₂O 75:25.

Por otro lado, la capacidad antioxidante mostró variaciones entre las diferentes frutas, que puede estar asociado en este caso con diferencias en el perfil de compuestos fenólicos entre los frutos estudiados.

Para el caso del Guayabo del País, en las extracciones SCCO₂ 200 bar, SCCO₂ 400 bar y SCCO₂-EtOH-200 bar, se obtuvo valores de ARP similares y los menores en comparación con los frutos de Arazá rojo y amarillo. En el caso del extracto EtOH/H₂O 75:25 se obtuvo para éste extracto el valor más elevado de ARP (0,48).

Para el Arazá Rojo, se obtuvo el valor de ARP más elevado en las extracciones SCCO₂ 200 bar; incluso mayor que el extracto SCCO₂-EtOH. De los extractos EtOH/H₂O 75:25 es éste el de menor valor de ARP.

Para el Arazá Amarillo el mayor poder anti-radicalario es el SCCO₂-EtOH 200 bar, para los extractos supercríticos seguido del SCCO₂ 200 bar; seguido del SCCO₂ 400 bar. Para los extractos obtenidos por EtOH/H₂O 75:25 es el valor intermedio entre los frutos, como se puede ver en la Tabla 3 y Figura 13.

Los valores de ARP obtenidos para los extractos supercríticos fueron menores que los que se obtuvieron con los extractos obtenidos con EtOH/H₂O 75:25. Sin embargo, estas diferencias no resultan sorprendentes considerando la diferente selectividad y eficiencia de cada uno de los métodos de extracción utilizados. Es de esperar que extractos de un mismo material obtenidos por métodos diferentes presenten distinto porcentaje de cada tipo de compuesto constituyente. Por lo tanto, los valores de ARP superiores para los extractos etanólicos sugiere que el etanol debió ser más eficiente que el CO₂ para extraer compuestos con actividad antirradicalaria.

La determinación del EC₅₀ proporciona una relación directa de la capacidad antioxidante entre diferentes sustancias ya que es independiente de la concentración de la muestra. [23] Comparando con resultados obtenidos en bibliografía se observó que también ocurre que

todos los extractos obtenidos con procesos de extracción con etanol exhibían una mayor capacidad antioxidante [23].

En diferentes estudios se ha visto como frutos que pertenecen a la misma familia de las mirtáceas como el aracá boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) presenta un EC_{50} de 0,69 +/- 0,23 $\mu\text{g/mL}$ [17]. Para el Arazá se encontró una EC_{50} de 48,05 mg/L en extractos obtenidos por maceración con solventes orgánicos, valor aproximado a los que se obtuvieron con los extractos SCCO_2 200 bar y SCCO_2 400 bar [4].

A modo comparativo en la Tabla 4 se informan los resultados de EC_{50} y ARP obtenidos para los antioxidantes sintéticos BHT y BHA. Como se puede observar los valores de ARP para estos antioxidantes sintéticos son muy superiores que los valores obtenidos con los extractos generados a partir de los frutos nativos.

Tabla 4 Resultados DPPH para los antioxidantes sintéticos BHT y BHA.

	EC50	ARP
BHT	0,0913	10,96
BHA	0,1055	9,48

5.4 ABTS (Capacidad Antioxidante)

Como ya se mencionó, el método ABTS fue utilizado para determinar la capacidad antioxidante de los extractos la cual se expresa como equivalente de ácido ascórbico por litro de sal. El ensayo ABTS se basa en la generación de un azul / verde $\text{ABTS}^{\bullet+}$, que es aplicable en sistemas antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos; mientras que en el DPPH como ya se mencionó usa un radical disuelto en medios orgánicos y, por lo tanto, es aplicable en sistemas antioxidantes hidrofóbicos.

En estudios realizados en los que comparan ambos métodos la diferencia entre las capacidades antioxidantes determinadas fue mayor en alimentos altamente pigmentados. Por lo tanto, el ensayo ABTS mide la capacidad antioxidante de una gama de carotenoides y

compuestos fenólicos, mientras que los carotenos y xantofilas no reaccionan contra el radical libre DPPH [22].

Tabla 5. Resultados del ensayo de ABTS para todos los extractos

Extracto	Promedio de valores de Absorbancia	Desviación Estándar	mg de equivalente ác. Ascórbico/L sal	
SCCO₂ 200bar	Arazá Rojo	0,618	0,02	0,29
	Arazá Amarillo	0,560	0,01	0,59
	Guayabo del País	0,641	0,01	0,17
SCCO₂ 400 bar	Arazá Rojo	0,550	0,01	0,65
	Arazá Amarillo	0,512	0,01	0,84
	Guayabo del País	0,642	0,03	0,16
SCCO₂ EtOH/H₂O	Arazá Rojo	0,611	0,02	0,33
	Arazá Amarillo	0,614	0,01	0,31
	Guayabo del País	0,641	0,01	0,17
H₂O/EtOH 75:25	Arazá Rojo	0,604	0,02	0,36
	Arazá Amarillo	0,507	0,03	0,87
	Guayabo del País	0,495	0,01	0,93

El extracto de Guayabo del País obtenido mediante la extracción tradicional con EtOH/H₂O 75:25, es el que presenta mayor capacidad antioxidante (0,93 mg de equivalente ácido Ascórbico/L sal), en concordancia con el resultado obtenido mediante el ensayo de DPPH, en el cual, como ya se mencionó antes fue el de mayor valor de ARP.

En esta determinación se puede ver que para los extractos SCCO₂ 200 bar y SCCO₂ 400 bar, el Arazá amarillo es el que presenta mayor capacidad antioxidante y el Guayabo del País la menor.

Por último, la extracción SCCO₂-EtOH 200 bar, el guayabo del País continua siendo la que presenta menor capacidad antioxidante y los extractos obtenidos a partir de los frutos de Arazá presentan capacidades similares, destacándose levemente el Arazá rojo, a diferencia del resultados de ARP en el que se destaca el Arazá amarillo, aunque esto no resulta significativo.

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS, encontrado en bibliografía es de $120,0 \pm 4,5$ mg/100 g para el fruto Guayaba, $54,0 \pm 1,9$ mg/100 g para el Maracuyá y $163,4 \pm 4,0$ mg/100 g para el Açaí. Estos valores son similares a los obtenidos en el presente trabajo y están expresados en referencia a la actividad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (mg/100 g peso muestra).

5.5 Rancimat (período de inducción)

Con éste método se determinó la capacidad de protección a un aceite purificado por parte de los distintos extractos. El siguiente estudio se realizó para el aceite de girasol purificado así como también para el aceite purificado aditivado con los extractos supercríticos y etanólicos y con algunos antioxidantes sintéticos y naturales. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 6, donde se indica el período de inducción obtenido con la adición de cada extracto a 200 y 500 ppm.

El aceite de girasol utilizado para todos los ensayos de Rancimat, luego de purificar, sin antioxidantes naturales o artificiales, presenta un período de inducción de $1,5 \pm 0,1$. Éste

aceite purificado se aditivo con las soluciones de los extractos, los antioxidantes sintéticos BHT y BHA, y los tocoferoles (antioxidantes naturales) para obtener los diferentes períodos de inducción que se detallan en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Resultados del ensayo de Rancimat para todos los extractos a 200 y 500 ppm.

Extracto	ppm	Período de Inducción (horas)	
Guayabo del País	SCCO ₂ 200 bar	200	1,6
		500	1,7
	SCCO ₂ 400 bar	200	1,6
		500	1,7
	SC-EtOH 200 bar	200	3,6
		500	3,9
	EtOH/H ₂ O 75:25	200	2,9
		500	3,8
Arazá Amarillo	SCCO ₂ 200 bar	200	---
		500	1,9
	SCCO ₂ 400 bar	200	----
		500	1,8
	SCCO ₂ -EtOH 200 bar	200	3,1
		500	3,3
	EtOH/H ₂ O 75:25	200	2,8
		500	3,6
Arazá Rojo	SCCO ₂ 200 bar	200	---
		500	1,6
	SCCO ₂ 400 bar	200	--
		500	1,6
	SCCO ₂ -EtOH 200 bar	200	3,1
		500	3,3
	EtOH/H ₂ O 75:25	200	3,3
		500	3,8

Tabla 7. Resultados del ensayo de Rancimat para los antioxidantes sintéticos BHT y BHA.

	Ppm	Período de Inducción (horas)
BHT	200	9,7
	500	15,2
BHA	200	11,8
	500	16,7
Tocoferoles	500	8,8

Vemos que los resultados del Rancimat utilizando los extractos, están todos por encima del período de inducción de 1,5 hs. que se obtuvo para el aceite purificado sin la adición de ningún extracto o antioxidante. También, se puede observar que al aumentar de 200 ppm a 500 ppm la cantidad del extracto incorporada en el aceite la protección aumenta entre un 6 a 13 %, dependiendo del fruto y del tipo de extracción.

De los extractos SCCO₂ 200 bar y SCCO₂ 400 bar el que le otorgó mayor estabilidad al aceite de girasol purificado fue el extracto de Arazá amarillo con valores de período de inducción de 1,9 y 1,8 horas respectivamente con una concentración del extracto de 500 ppm.

Para la extracción SCCO₂-EtOH 200 bar a 200 ppm y 500 ppm, fue con los extractos obtenidos a partir del Guayabo del País con el que se obtuvo mayor protección (3,6 y 3,9 horas respectivamente). En este caso para los extractos obtenidos del Arazá rojo y Arazá amarillo aunque fueron menores que para el extracto obtenido del Guayabo del País también se obtuvieron adecuados resultados, con periodos de inducción de 3,1 y 3,3 horas, para 200 ppm y 500 ppm respectivamente.

Si bien el CO₂ es buen solvente para la extracción tiene ciertas limitaciones para extraer compuestos polares de estas matrices. Por lo cual, se utilizó un co-solvente, como el etanol. Como se observa en la Tabla 2, el uso de etanol como co-solvente en la extracción supercrítica otorga un aumento en el rendimiento, y también se obtienen mayores valores mediante las técnicas de DPPH y ABTS para algunas condiciones de extracción, lo cual es coherente con el

aumento de la polaridad del solvente de extracción. También, en la Tabla 6 se observa que el uso de etanol como co-solvente aumentó el período de inducción del aceite de girasol purificado en comparación con los extractos supercríticos obtenidos sin el empleo del co-solvente. Por lo tanto, se puede afirmar que el uso de etanol como co-solvente asistiendo la extracción con SC-CO₂ supercrítica permitió que los resultados obtenidos sean mejores comparativamente, tanto desde el punto de vista de los rendimientos, como desde el punto de vista de la capacidad antioxidante.

Por último, para el caso de los extractos obtenidos con EtOH/H₂O 75:25, el que le otorgó mayor estabilidad al aceite de girasol purificado fue el Guayabo del País y el Arazá rojo con valores de PI para ambos de 3,8 horas.

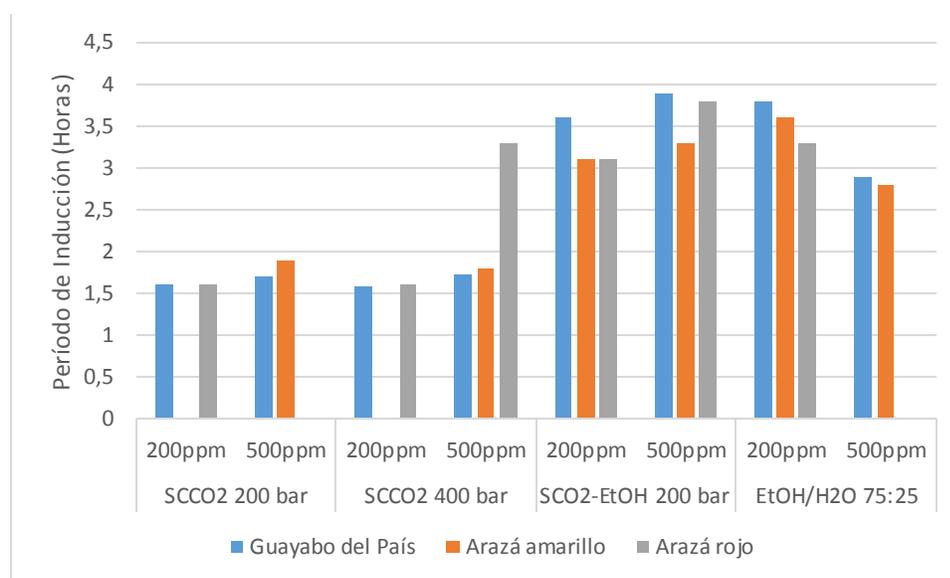


Figura 14. Comparación de los resultados del ensayo de Rancimat para los extractos del Guayabo del País, Arazá amarillo y Arazá rojo para todas las condiciones de extracción.

Cuando comparamos los resultados de los PI para los extractos SCCO₂ 200 bar, SCCO₂ 400 bar, SCCO₂-EtOH 200 bar y con EtOH/H₂O 75:25, vemos que en todos ellos hubo un efecto protector sobre el aceite. Siendo los extractos SCCO₂-EtOH 200 bar y los obtenidos con EtOH/H₂O 75:25 los que presentaron un efecto protector más importante. A su vez el extracto SCCO₂-EtOH 200 bar fue el de mayor PI, esto se podría deber a la mayor selectividad

de la extracción con CO₂ supercrítico y además a que los componentes con efectos antioxidantes fueron más afines a extraerse con EtOH, por ende más polares.

Los solventes menos polares (como el CO₂) permitirían una mayor extracción de compuestos liposolubles mientras que los más polares (como el etanol acuoso) permitirían una mayor extracción de compuesto hidrosoluble. Además, los solventes más polares extraerían otros compuestos no activos de la matriz, disminuyendo la concentración de los compuestos de interés en dichos extractos y, por lo tanto, con un menor poder antioxidante.

No se encontraron en la bibliografía resultados del PI para este tipo de frutos, por lo cual los resultados presentados en el presente trabajo son novedosos y una primera etapa de este tipo de estudios de oxidación acelerada con los extractos obtenidos a partir de los frutos nativos estudiados.

5.5 Folin-Ciocalteu (Polifenoles totales)

En la Tabla 8 se puede observar los resultados del ensayo de Folin-Ciocalteu, realizado para determinar la cantidad de Polifenoles totales que contienen cada uno de los extractos obtenidos. Se puede observar que los extractos obtenidos mediante la mezcla de solventes EtOH/H₂O 75:25 contienen una cantidad mayor de polifenoles que el resto de los extractos, destacándose el Guayabo del País con 92,6 mg de ácido Gálico/g de extracto. Siendo luego los extractos obtenidos por SCCO₂-EtOH 200 bar, los que le siguen en relación al contenido de fenoles totales, destacándose en este caso el arazá rojo con 17,3 mg de ácido Gálico/g de extracto. Por último, las extracciones con SCCO₂ 200 bar y SCCO₂ 400 bar, no hubieron diferencias entre ellas, y coincidiendo con la extracción tradicional con EtOH/H₂O 75:25, el Guayabo del País es el fruto con más cantidad de polifenoles, en este caso 1,3 mg de ác. Gálico/g de extracto.

Estos resultados son consistentes con el hecho de que los fenoles son compuestos polares y se extraen mejor en solventes afines. Sin embargo, no importa únicamente el contenido total de fenoles sino la identidad de los mismos ya que se vincula a su actividad. Por lo cual, como ya se observó no necesariamente los extractos con mayor contenido de fenoles o mayor rendimiento resultan los de mayor poder antioxidante, sumado a esto se debe tener en cuenta otros compuestos antioxidantes no determinados por esta técnica.

En bibliografía se ha encontrado estudios en los que se ha clasificado el contenido fenólico total de varias frutas en tres categorías: bajo (menor a 100 mg GAE / 100 g), medio (100-500 mg GAE / 100 g) y alto (mayor a 500 mg GAE / 100 g) para muestras basadas en materia fresca. [15] De acuerdo con esta clasificación los extractos SCCO₂ 200 bar y SCCO₂ 400 bar de Arazá rojo y amarillo se ubicarían en la categoría de bajo contenido fenólico, los extractos SCCO₂ 200 bar y SCCO₂ 400 bar de Guayabo en la categoría de medio. Y por último los extractos SCCO₂-EtOH y los EtOH/H₂O 75:25 con un alto contenido fenólico.

Extractos de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) obtenidos mediante SCCO₂ a 60°C y 400 bar presentaron contenido de polifenoles totales de 32,7 mg GAE/g.

Por otro lado, en estudios realizados sobre extractos de frutos de Arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh), también perteneciente a la familia de las mirtáceas, obtenidos por métodos tradicionales de extracción con solventes orgánicos se obtuvieron contenidos de polifenoles totales de 184,08 mgGAE/g, un poco mayor a los resultados obtenidos para los extractos obtenidos por maceración con EtOH/H₂O 75:25.

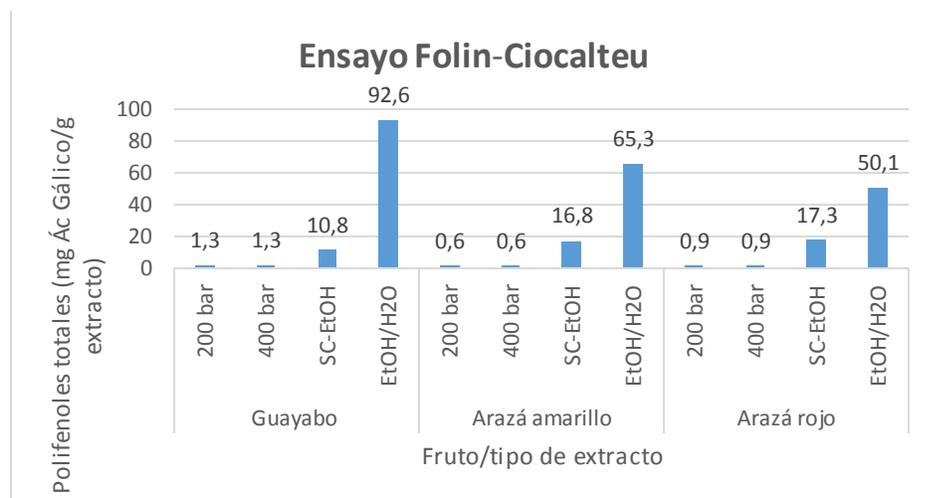


Figura 15. Comparación de los resultados del ensayo de Folin-Ciocalteu para todos los extractos

Tabla 8. Resultados del ensayo de Folin-Ciocalteu para todos los extractos

		Polifenoles totales (mg Ácido Gálico /g de extracto)
Guayabo del País	SCCO ₂ 200 bar	1,3
	SCCO ₂ 400 bar	1,3
	SCCO ₂ -EtOH	10,8
	EtOH/H ₂ O 75:25	92,6
Arazá amarillo	SCCO ₂ 200 bar	0,6
	SCCO ₂ 400 bar	0,6
	SCCO ₂ -EtOH	16,8
	EtOH/H ₂ O 75:25	65,3
Arazá rojo	SCCO ₂ 200 bar	0,9
	SCCO ₂ 400 bar	0,9
	SCCO ₂ -EtOH	17,3
	EtOH/H ₂ O 75:25	50,1

6. Conclusiones

Los extractos obtenidos a partir de los tres frutos presentaron cierta cantidad de polifenoles totales, actividad antirradicalaria, capacidad antioxidante, y en mayor o en menor medida fueron capaces de proteger al aceite de girasol purificado del enranciamiento.

Las mayores diferencias se pueden observar entre los extractos obtenidos por maceración con EtOH/H₂O 75:25 y los extractos supercríticos obtenidos sin co-solvente, manteniendo en todos los métodos valores mayores para los extractos etanólicos tanto utilizando EtOH como co-solvente en la extracción SCCO₂-EtOH como utilizado como solvente orgánico en la extracción tradicional por maceración. Estas diferencias se puede pensar que provienen de diferencias en la composición de los extractos debida a la diferente selectividad de cada método y de la mayor afinidad de los compuestos polares por el etanol.

En los extractos obtenidos mediante maceración con EtOH/H₂O 75:25 fue el guayabo del País el fruto a partir del cual se obtuvo extractos de valores más elevados en cuanto a cantidad de polifenoles, ARP, capacidad antioxidante y en concordancia con esto, fue el extracto de éste fruto el que pudo proteger al aceite de girasol purificado durante mayor cantidad de tiempo del enranciamiento.

No ocurrió lo mismo para los extractos obtenidos mediante SCCO₂ a 200 y 400 bar, de modo que fue el Arazá Amarillo el fruto a partir del cual se obtuvieron los extractos con los mayores resultados en cuanto a ARP y capacidad antioxidante. De todas maneras aunque si fue mayor la estabilidad de los extractos para el Arazá amarillo, fue también bastante similar con los demás frutos.

Por último, los extractos obtenidos mediante SCCO₂-EtOH, presentaron valores intermedios entre todos los métodos de extracción utilizados. Cabe destacar que éstos presentaron una cantidad considerablemente menor de polifenoles totales que los obtenidos mediante maceración con EtOH/H₂O 75:25, y pudieron proteger al aceite de manera similar, con lo cual se podría inferir que este método de extracción sería más específico para extraer polifenoles con capacidad antioxidante de éste tipo de frutos.

Los períodos de inducción del aceite de girasol aditivado con los diferentes extractos, fueron superiores al del aceite de girasol purificado, lo que indica que todos ellos presentaron algún efecto protector sobre dicho aceite, con este resultado podemos decir que estos frutos son posibles fuentes de antioxidantes naturales para la industria alimentaria.

En cuanto al rendimiento másico de las extracciones, si bien no fue el objetivo maximizar este parámetro, se obtuvieron valores muy diferentes. Las extracciones supercríticas arrojaron valores de un orden menor que los de las extracciones etanólicas, lo que se puede atribuir que es un método más selectivo y diferencias de solubilidad.

Los resultados obtenidos indican que es viable la utilización de los extractos supercríticos como antioxidantes alternativos en aceites vegetales ya que, utilizados a la concentración adecuada, permiten conferirle al aceite una adecuada protección.

Sería interesante en trabajos futuros evaluar si la adición de estos extractos en las concentraciones estudiadas ejerce algún efecto sensorial (sabor u olor) sobre los aceites en los que se los utiliza y sobre los productos alimenticios en los que dichos aceites sean posteriormente utilizados.

7. Bibliografía

1. I lhami, G. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 86, 345–391.
2. Baiano, A; Terracone, C; Gambacorta, G; La Notte, E. (2009). Changes in Quality Indices, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Flavored Olive Oils during Storage. *J Am Oil Chem Soc* 86, 1083–1092.
3. Padilla, F; Rincón, A; Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 58 (3), 303-308.
4. Denardin, C; Hirsch, G; da Rocha, R; Vizzotto, M; Henriques, A; Moreira, J; Guma, F; Emanuelli, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. (2015). *Journal of food and drug analysis* 23, 387-398.
5. Cavero, S; García-Risco, M; Marín, F; Jaime, L; Santoyo, S; Señoráns, J; Reglero, G; Ibañez, E. (2006). Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano Chemical and functional characterization via LC–MS and in vitro assays. *J. of Supercritical Fluids* 38, 62–69.
6. Ministerio de Salud Pública, Decreto N °315/994, Reglamento Bromatológico Nacional, 5ª edición, Ministerio de Salud Pública, Montevideo, 2012.
7. Baudi, S. (1990). *Química de los Alimentos, México DF, México: Alhambra Mexicana S.A. de C.V*
8. Cheftel, J. (1992) *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de Los Alimentos*, España: Acribia
9. Rivas, M; Vignale, B; Camussi, G; Puppo, M; y Pritsch, C. (2014). Los recursos genéticos de *Acca Sellowiana* (Berg.) Burret en Uruguay. *REGENSUR, Red de Recursos Genéticos*

del Cono Sur. Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur. 103-112

10. Silveira, A; Oyarzún, D; Rivas M; Zaccari, F. (2016). Evaluación de la calidad poscosecha en frutos de guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). *Agrociencia Uruguay*, 20 (2), 14-21.
11. Cabrera, D; Rodriguez, P; Gonzalez, J; Vignale, B. (2015). Frutos Nativos Propagación y manejo de cultivo, evaluación y selección. Extraído de:
http://www.inia.uy/Documentos/Privados/INIA%20LB/Programa%20Frut%C3%A9Dcola/7%C2%B0%20Encuentro%20Frutos%20Nativos/Manejo%20y%20evaluaci%C3%B3n%20Guayabo%20del%20país_DCabrera.pdf
12. Cabrera, D; Vignale B; Nebel; Feippe A; Zoppolo R; Castillo A. INIA y los frutos nativos de nuestra tierra. *Revista INIA* 14, 36-38.
13. INIA, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay, (2009) FICHA TEMÁTICA N°1 Nuestros Frutos Nativos.
14. Rosano, L; Rama, P; Vignale, B; Cabrera, D; Neves, F; Rodriguez, M; Arcaus, A. (2012). Recetario de frutos nativos del Uruguay. Extraído de:
<http://www.fagro.edu.uy/index.php/noticias-principales/711-recetario-de-frutos-nativos-del-uruguay>
15. Neri-Numa, I; Carvalho-Silva, L; Pinto, J; Gomes, L; Tiemi, M; Macêdo, J; de Carvalho, J; Tasca, A; Maróstica, M; Pastore, G. (2013). Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. *Food Research International* 50, 70–76.
16. Herrero, M; Cifuentes, A; Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food by-products, algae and microalgae a review. *Food Chemistry* 98, 136–148.
17. Esquivel, A; Vargas, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en marcha* 20 (4), 41-50.

18. Nascimento, D; Lima, L; Ferreira, N; Lopes, A. (2015). Study of supercritical extraction from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.) with bioactive compounds. *Food and bioproducts processing* 9 (4), 365–374.
19. Garmus, T; Paviani, L; Queiroga, C; Magalhães, P; Cabral, F. (2014). Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. *J. of Supercritical Fluids* 86, 4-14.
20. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrilhidrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of science and technology* 26 (2), 211-219.
21. Brand-Williams, W; Cuvelier, M.; Berset, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity *Lebensm. Wiss. u.-Technol.*, 28, 25-30.
22. Kuskoski E; Asuero A; Troncoso A; Mancini-filho J; Fett R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4), 726-732.
23. Pellegrini, R; Proteggente, N; Pannala, A; Rice-Evans, C. (1998). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
24. Cicco, N; Lanorte, M; Paraggio, M; Viggiano, M; Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91, 107–110.
25. Dinnies, R; Shetty, K; Lourenço, A; da, L. (2012). Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Semina. Ciências Agrárias*. 33 (2), 655-666.
26. Yoshida, H; Tatsumi, M.; Kajimoto, G. (1991) Relationship between oxidative stability of vitamin E and the production of fatty acids in oils during microwave heating. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 566–570.

27. Yoshida, H.; Kondo, I.; Kajimoto, G. (1992) Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 1136–1140.
28. Yoshida, H; Morales, A; Dobarganes, C; Márquez-Ruiz, G.; Velasco, J. (2010) Quantitation of hydroperoxy-, keto- and hydroxy-dienes during oxidation of FAMES from high-linoleic and high-oleic sunflower oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 1271–1279.
29. Dalla Nora, C; Dal-Ri Muller, C; Sbardelotto, G; De Olivera, A; Hertz, F; Jablonski, J; Vogt, E; Hickmann S. (2014). Effect of processing on the stability of bioactive compounds from red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju (*Myrcianthes pungens*). *Journal of Food Composition and Analysis* 34, 18-25.

8. Anexo

8.1 Rendimientos

Tabla 9. % de rendimientos para extractos SCCO₂ 200 y 400 bar

Muestra	masa muestra	masa extracto	% de rendimiento
<i>Guayabo SCCO₂ 200 bar</i>	12,365	0,125	1,011
<i>Guayabo SCCO₂ 400 bar</i>	13,43	0,1503	1,119
<i>Arazá rojo SCCO₂ 200bar</i>	17,691	0,2479	1,401
<i>Arazá rojo SCCO₂ 400 bar</i>	18,618	0,3325	1,786
<i>Arazá amarillo SCCO₂ 200 bar</i>	16,939	0,457	2,698
<i>Arazá amarillo SCCO₂ 400 bar</i>	17,771	0,6555	3,689

Tabla 10. % de rendimiento de extractos SCCO₂-EtOH 200 bar

Muestra	masa muestra	masa extracto	% de rendimiento
<i>Guayabo SCCO₂-EtOH 200 bar</i>	13,419	0,1509	1,125
<i>Arazá rojo SCCO₂-EtOH 200 bar</i>	18,618	0,3325	1,786
<i>Arazá amarillo SCCO₂-EtOH 200 bar</i>	15,06	0,652	4,329

Tabla 11. % de rendimiento de extractos EtOH/H2O 75:25

Muestra	Masa tubo	Masa muestra inicial	masa 1	masa 2	masa extracto	% de rendimiento	
Guayabo 1	10,095	2,031	11,521	11,5	1,405	69,2	65,7
Guayabo 2	10,103	2,042	11,376	11,375	1,272	62,3	
Arazá rojo 1	10,077	2,015	11,211	11,211	1,134	56,3	59,1
Arazá rojo 2	10,095	2,099	11,395	11,395	1,300	61,9	
Arazá amarillo 1	10,095	2,080	11,033	11,032	0,937	45,0	45,4
Arazá amarillo 2	10,084	2,199	11,089	11,089	1,005	45,7	

8.2. DPPH (Poder antirradicalario ARP)

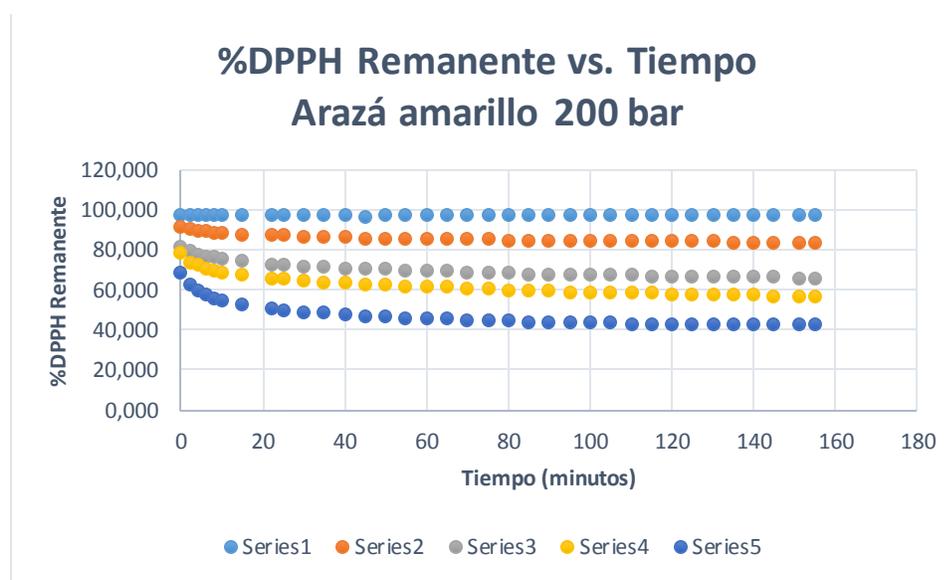


Figura 16. DPPH Remanente vs. Tiempo para el Arazá amarillo SCCO2 200 bar

Serie 1: R= 0,67 mg extracto/mg DPPH, Serie 2: R= 3,35 mg extracto/mg DPPH, Serie 3: R= 6,71 mg extracto/mg DPPH, Serie 4: R= 10,06 mg extracto/mg DPPH, Serie 5: R= 13,42 mg extracto/mg DPPH

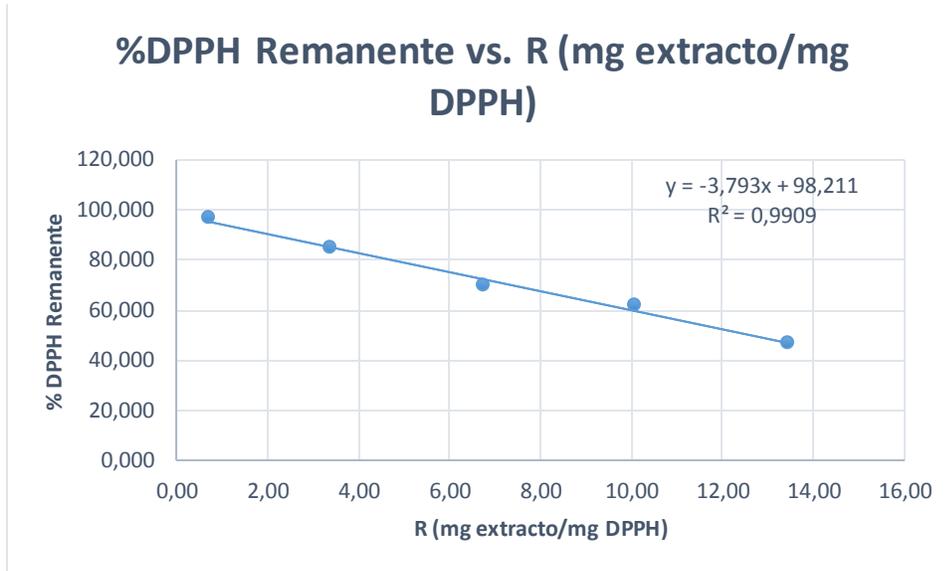


Figura 17. DPPH Remanente vs. R (mg extracto/mg DPPH), para el Arazá amarillo SCCO₂ 200 bar

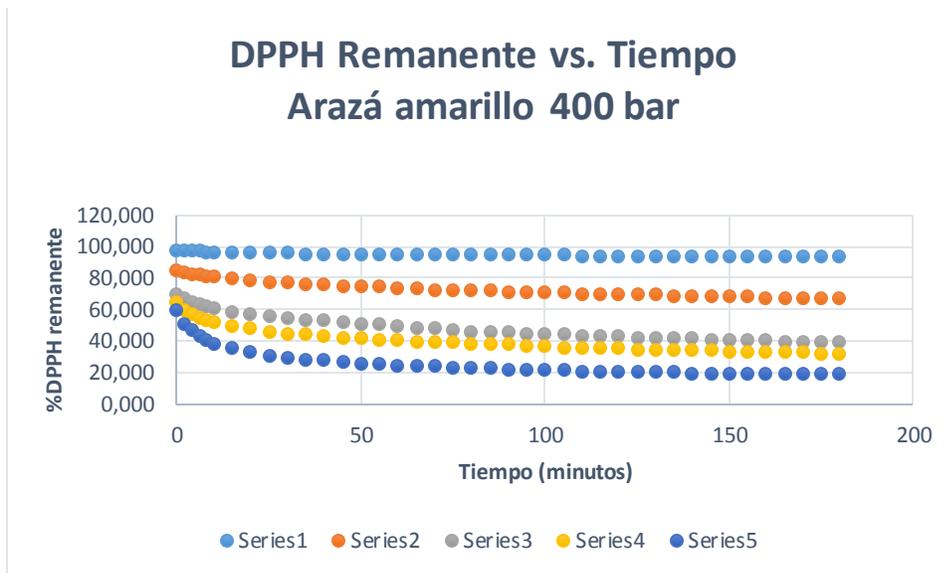


Figura 18. DPPH Remanente vs. Tiempo para el Arazá amarillo SCCO₂ 400 bar

Serie 1: R= 1,75 mg extracto/mg DPPH, Serie 2: R= 8,73 mg extracto/mg DPPH, Serie 3: R= 17,47 mg extracto/mg DPPH
Serie 4: R= 26,20 mg extracto/mg DPPH, Serie 5: R= 34,93 mg extracto/mg DPPH

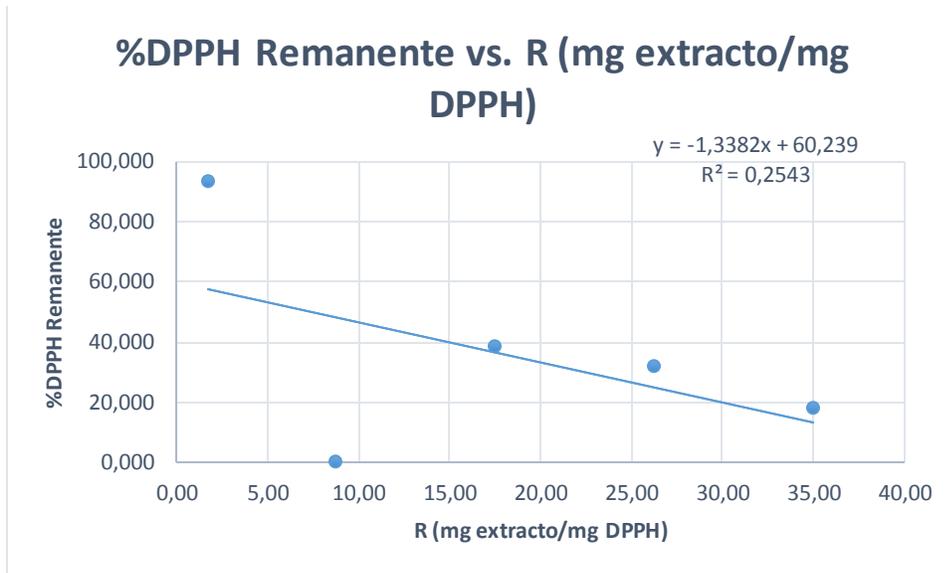


Figura 19. DPPH Remanente vs. R (mg extracto/mg DPPH), para el Arazá amarillo SCCO2 400 bar

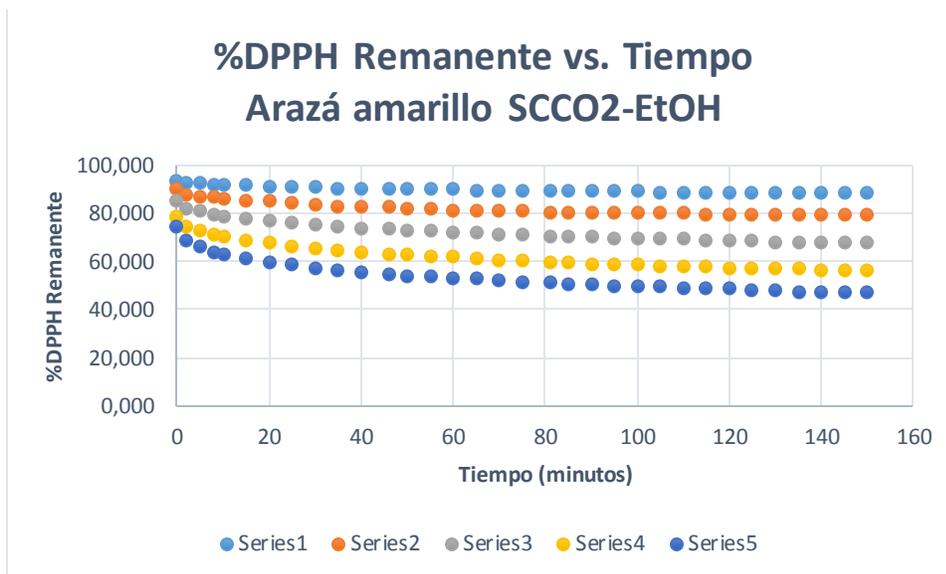


Figura 20. DPPH Remanente vs. Tiempo para el Arazá amarillo SCCO2-EtOH 200 bar

Serie 1: R= 0,53 mg extracto/mg DPPH, Serie 2: R= 2,64 mg extracto/mg DPPH, Serie 3: R= 5,29 mg extracto/mg DPPH
Serie 4: R= 7,93 mg extracto/mg DPPH, Serie 5: R= 10,57 mg extracto/mg DPPH

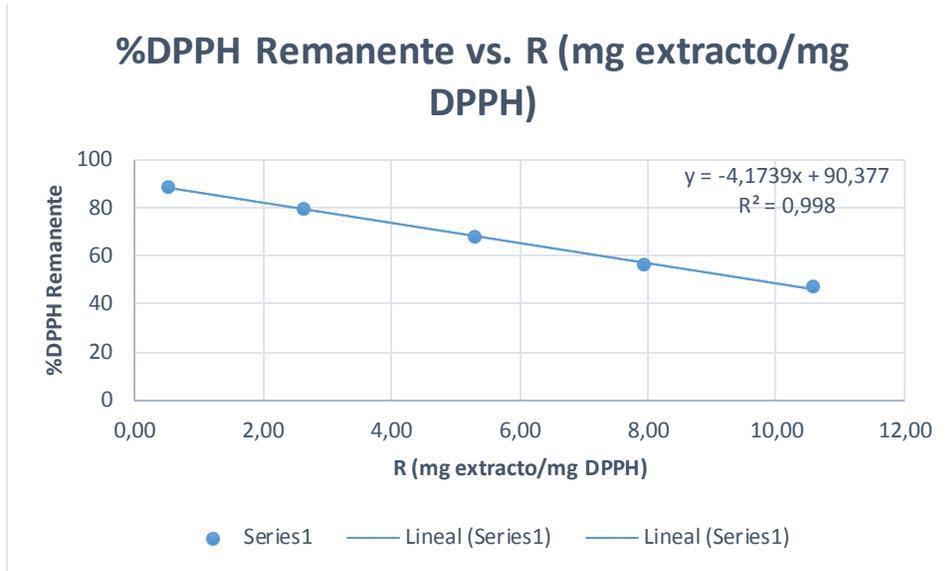


Figura 21. DPPH Remanente vs. R (mg extracto/mg DPPH), para el Arazá amarillo SCCO2-EtOH 200 bar

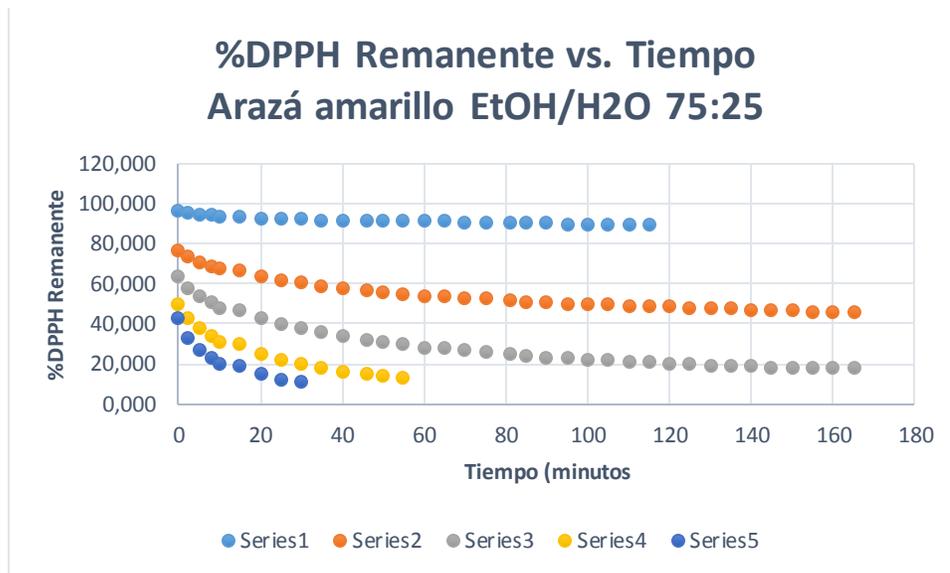


Figura 22. DPPH Remanente vs. Tiempo para el Arazá amarillo EtOH/H₂O 75:25

Serie 1: R= 0,44 mg extracto/mg DPPH, Serie 2: R= 2,19 mg extracto/mg DPPH, Serie 3: R= 4,38 mg extracto/mg DPPH
Serie 4: R= 6,56 mg extracto/mg DPPH, Serie 5: R= 8,75 mg extracto/mg DPPH

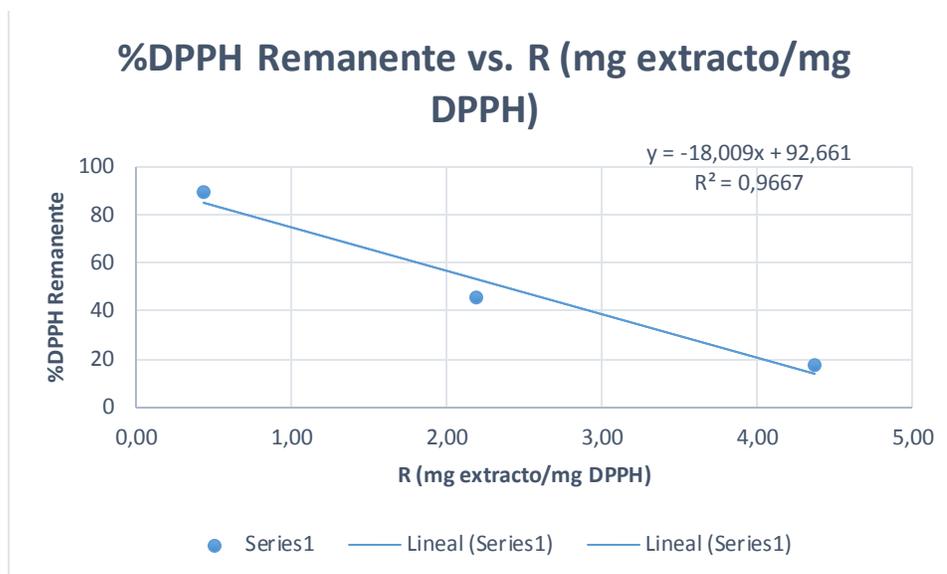


Figura 23. DPPH Remanente vs. R (mg extracto/mg DPPH), para el Arazá amarillo EtOH/H₂O 75:25

8.3. ABTS

Tabla 12. Curva de Calibración de ácido ascórbico como antioxidante de referencia.

	M mg/L			Promedio
C0	0,667			
C1	0,590	0,573	0,582	0,582
C2	0,484	0,431	0,473	0,479
C3	0,398	0,365	0,39	0,384
C4	0,311	0,28	0,295	0,295
C5	0,201	0,204	0,192	0,199

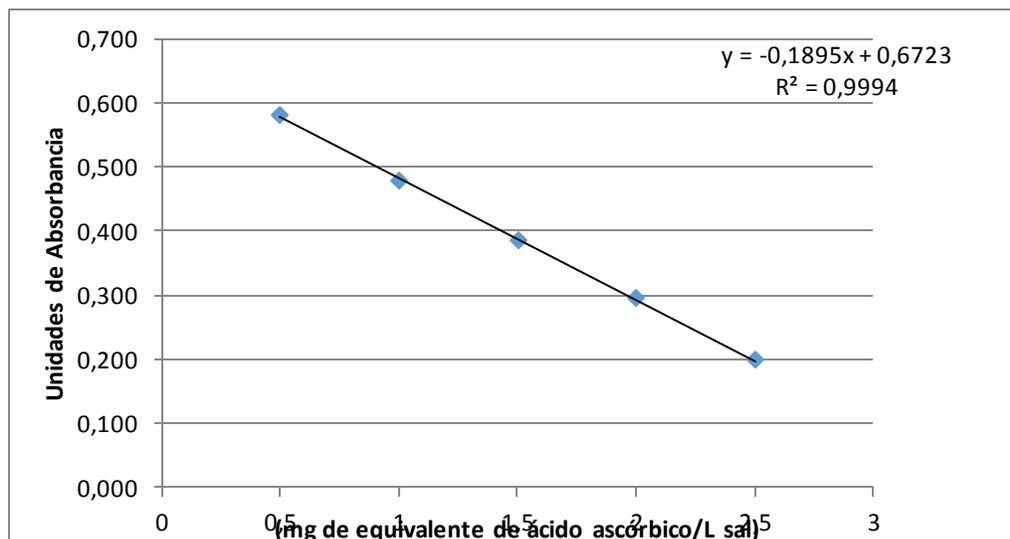


Figura 24. Curva de Calibración de ácido ascórbico como antioxidante de referencia.

Tabla 13. Resultados ABTS

					promedio	DS	mg de equivalente ácido ascórbico/L sal
SCCO ₂ 200 bar	Arazá rojo	0,566	0,601	0,634	0,618	0,023	0,289
	Arazá amarillo	0,555	0,549	0,576	0,560	0,014	0,593
	Guayabo	0,641	0,637	0,644	0,641	0,004	0,167
SCCO ₂ 400 bar	Arazá rojo	0,548	0,549	0,552	0,550	0,002	0,647
	Arazá amarillo	0,507	0,512	0,518	0,512	0,006	0,844
	Guayabo	0,612	0,658	0,656	0,642	0,026	0,160
EtOH/H ₂ O 75:25	Arazá rojo	0,621	0,609	0,583	0,604	0,019	0,359
	Arazá amarillo	0,532	0,510	0,479	0,507	0,027	0,872
	Guayabo	0,493	0,505	0,488	0,495	0,009	0,934
SCCO ₂ -EtOH 200 bar	Arazá rojo	0,617	0,585	0,604	0,611	0,016	0,326
	Arazá amarillo	0,615	0,613	0,545	0,614	0,001	0,308
	Guayabo	0,632	0,645	0,645	0,641	0,008	0,167

8.4. Resultados Rancimat (Períodos de Inducción)

Tabla 14. Resultados Rancimat (Período de inducción)

SCCO₂ 200 bar								
	200 PPM				500 PPM			
	1	2	Promedio	DS	1	2	promedio	DS
	<i>Guayabo del País</i>	1,46	1,65	1,6	0,134	1,64	1,69	1,7
<i>Arazá amarillo</i>					2,00	1,78	1,9	0,156
<i>Arazá rojo</i>					1,68	1,61	1,6	0,049
SCCO₂ 400 bar								
	200 PPM				500 PPM			
	1	2	Promedio	DS	1	2	promedio	DS
	<i>Guayabo del País</i>	1,58	1,6	1,6	0,014	1,66	1,65	1,7
<i>Arazá amarillo</i>	0				1,75	1,80	1,8	0,035
<i>Arazá rojo</i>					1,55	1,74	1,6	0,134
SCCO₂-EtOH								
	200 PPM				500 PPM			
	1	2	Promedio	DS	1	2	Promedio	DS
	<i>Guayabo del País</i>	3,37	3,88	3,6	0,361	3,84	3,88	3,9
<i>Arazá amarillo</i>	3,03	3,13	3,1	0,071	3,19	3,38	3,3	0,134
<i>Arazá rojo</i>	3,18	3,08	3,1	0,071	3,31	3,30	3,3	0,007
EtOH/H₂O 75:25								
	500 PPM				200 PPM			
	1	2	Promedio	DS	1	2	Promedio	DS
	<i>Guayabo del País</i>	3,82	3,85	3,8	0,021	2,76	3,05	2,9
<i>Arazá amarillo</i>	3,59	3,61	3,6	0,014	2,79	2,79	2,8	0,000
<i>Arazá rojo</i>	3,75	3,82	3,8	0,049	3,36	3,20	3,3	0,113

8.5. Folin-Ciocalteu (Polifenoles totales)

Tabla 15. Curva de calibración: Concentración ácido Gálico (mg/L) vs. Unidades de Absorbancia.

Concentración ácido gálico (mg/L)	Absorbancia
0	0,020
5	0,089
10	0,161
15	0,224
25	0,357
50	0,651

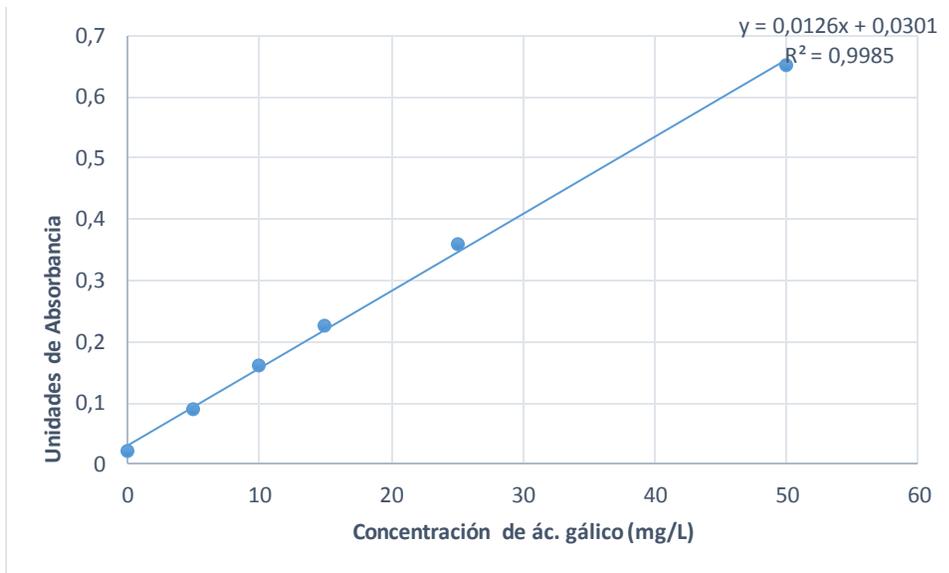


Figura 25. Curva de calibración: Concentración ácido Gálico (mg/L) vs. Unidades de Absorbancia.