

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A.C.**

Identificación, cuantificación y capacidad antioxidante de compuestos  
fenólicos extraídos con CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de residuos de  
berenjena

PRESENTADA POR:

**GILDA JOANA GIL CHÁVEZ**

TESIS APROBADA POR LA:

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN  
VEGETAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

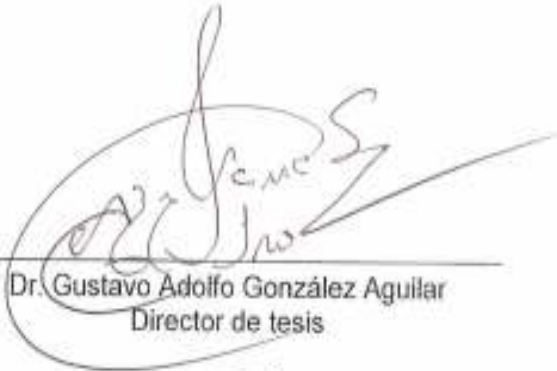
HERMOSILLO, SONORA

SEPTIEMBRE DEL 2012




## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Ingeniero Biotecnólogo Gilda Joana Gil Chávez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.




---

Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar  
Director de tesis



---

Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala  
Asesor



---

Dr. José Basilio Heredia  
Asesor

Sañudo Barajas J. Adriana

---

Dra. J. Adriana Sañudo Barajas  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

**Al centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.**, por permitirme formar parte de su programa de posgrado de maestría.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico otorgado durante estos dos años.

**Al centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Culiacán**, por brindarme sus instalaciones y apoyo fundamental para la realización de mi trabajo de tesis.

A mi **Director de Tesis, Dr. Gustavo A. González Aguilar** por haberme permitido ser parte de su grupo, por su contribución al trabajo de investigación, por sus consejos, su amistad y por todo el apoyo brindado para la culminación de este trabajo. Gracias por abrirme un panorama diferente del mundo de la ciencia donde con trabajo y esfuerzo, cualquier meta se puede alcanzar. Muchas gracias doctor.

A mi asesor, **Dr. José Basilio Heredia** por brindarme su apoyo, buenos consejos y confianza en todo momento para la realización de este trabajo de tesis. Le agradezco de verdad por escuchar mis ideas y confiar en mí para otros proyectos, pero sobre todo le agradezco su paciencia por recibirme siempre con mis dudas todos los días a todas horas. Muchísimas gracias por todo.

A mi **comité de Tesis, Dr. J. Fernando Ayala Zavala, Dra. Adriana Sañudo Barajas** por todo su apoyo, consejos y contribución a este trabajo de Investigación.

A los miembros del **Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales, Q.B. Mónica Alejandra Villegas Ochoa** y al **M.C Reynaldo Cruz Valenzuela**, por la capacitación y apoyo técnico otorgado durante estos dos años. Y a mis compañeros Tavito, Mayra y Ana.

A la M.C. **Laura Contreras Angulo** por todo su apoyo, su amistad y sus consejos durante mi estancia. Muchas gracias por no dejarme caer en mis malos momentos y enseñarme que lo importante es seguir intentando y aprender de los errores. Si hubiera una Laura en todos los laboratorios todo sería diferente.

A mis amigos y compañeros del **Laboratorio de Nutracéuticos**, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por brindarme su amistad y apoyo incondicional. Gracias a **Emus, Laurita, Nayely, Rubén, Diana, Olga, Rosabel, Erick, Nancy, Gisela y Rosalba**. Los quiero mucho.

A mi amiga **Gemichulis**, gracias por tus consejos y por ser como mi familia, gracias porque nunca me sentí sola. Porque tener tu amistad fue lo mejor que me pudo haber pasado este tiempo, te quiero mucho.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, **Pepe Villa, Cyndi Rosas, Violeta Vega, Hugo Palafox, Jorge Esteban y Juan Manuel** con quienes compartí momentos maravillosos durante este tiempo. Gracias amigos.

*A **Pepe** mi compañero en la vida, porque siempre me has brindado tu apoyo en todo momento. Porque eres con quien comparto todas mis alegrías y tristezas, mis logros y fracasos y con quien he pasado los mejores momentos de mi vida. Gracias por tu apoyo, comprensión y por todo tu amor. Gracias por todo Pepe, TE ADORO.*

## **DEDICATORIA**

*No puedo expresar con palabras el sentimiento de plenitud por tenerlos a mi lado.*

*Gracias por dejarme volar y tomar mi propio camino, por apoyarme siempre en mis decisiones y en cada paso que he dado. Porque aunque no estemos en el mismo lugar sabemos que nunca nos separamos y contamos unos con otros.*

*Ustedes son mi tesoro más grande, mi mayor ejemplo, mi motivación y los pilares de mi vida, porque tenerlos conmigo hace que los problemas cotidianos se hagan nada.*

*Gracias por ser mi **FAMILIA**.*

*Con amor para mis **PADRES** y **HERMANOS**.*



## ÍNDICE

|   |     |
|---|-----|
| LISTA DE FIGURAS.....   | vii |
| LISTA DE CUADROS .....  | ix  |
| RESUMEN.....  | xi  |
| 1. Introducción.....  | 1   |
| 2. Antecedentes y Justificación .....   | 4   |
| 2.1. Residuos agrícolas como fuente de compuestos bioactivos.....                   | 4   |
| 2.1.1. Residuos generados .....   | 4   |
| 2.1.2. Usos actuales de los residuos vegetales .....                                | 5   |
| 2.1.3. Contenido de compuestos bioactivos en los residuos de<br>berenjena.....      | 6   |
| 2.2. Los compuestos fenólicos, principales antioxidantes.....                       | 8   |
| 2.2.1. Aspectos generales.....  | 8   |
| 2.2.2. Propiedades bioactivas .....   | 10  |
| 2.2.3. Posibles usos en la industria.....   | 10  |
| 2.3. Métodos de extracción de compuestos bioactivos.....                            | 11  |
| 2.4. Métodos convencionales para la extracción de compuestos<br>fenólicos .....     | 12  |
| 2.5. Extracción con fluidos supercríticos.....                                      | 12  |
| 2.5.1. Propiedades de los fluidos supercríticos para la extracción.....             | 15  |
| 2.5.2. Utilización de CO <sub>2</sub> como fluido supercrítico.....                 | 20  |
| 2.5.3. Utilización de co-solventes en la extracción de compuestos<br>fenólicos..... | 21  |
| 2.6. Avances y aplicaciones de la extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico.....  | 22  |
| 3. Hipótesis .....  | 23  |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 4.     | Objetivos .....  | 23 |
| 4.1.   | Objetivo general.....  | 23 |
| 4.2.   | Objetivos específicos .....  | 23 |
| 5.     | Materiales y métodos .....   | 24 |
| 5.1.   | Materiales .....   | 24 |
| 5.2.   | Preparación de la muestra .....  | 24 |
| 5.3.   | Extracción con solventes .....   | 25 |
| 5.4.   | Extracción con fluidos supercríticos.....  | 25 |
| 5.4.2. | Evaluación de compuestos fenólicos .....   | 26 |
| 5.4.3. | Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos.....   | 26 |
| 5.4.4. | Medición de capacidad antioxidante .....   | 27 |
| 5.5.   | Diseño experimental .....  | 28 |
| 5.6.   | Análisis estadístico .....   | 29 |
| 6.     | Resultados y discusión.....  | 30 |
| 6.1.   | Análisis del modelo .....  | 30 |
| 6.2    | Condiciones óptimas de extracción.....   | 38 |
| 6.2.   | Efecto de los factores de extracción sobre la variable de<br>respuesta contenido total de fenoles..... | 41 |
| 6.3.   | Efecto de los factores de extracción sobre la variable de<br>respuesta capacidad antioxidante .....    | 47 |
| 6.4.   | Fenoles totales y capacidad antioxidante en la extracción<br>supercrítica y con metanol 80.....        | 53 |

|  |    |
|--|----|
| 6.5. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por<br>HPLC-DAD ..... | 56 |
| 7. Conclusiones.....   | 62 |
| 8. Referencias .....   | 67 |

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Fig 1. Pasos del proceso de extracción con fluidos supercríticos.....  | 14            |
| Fig 2. Diagrama de fases típico para un compuesto puro.....  | 17            |
| Fig 3. Condiciones de extracción para la región óptima de TPC y ORAC. ....   | 40            |
| Fig 4. Función de deseabilidad para TPC y ORAC.....  | 40            |
| Fig 5. Gráfica de contornos y superficie de respuesta para el efecto<br>combinado de co-solvente y temperatura sobre el contenido total de<br>fenoles en el extracto de pulpa de berenjena. .... | 44            |
| Fig 6. Gráfica de superficie de respuesta para el efecto combinado de<br>presión y temperatura sobre el contenido total de fenoles en el extracto<br>de pulpa de berenjena. ....                 | 45            |
| Fig 7. Gráfica de superficie de respuesta para el efecto combinado de<br>presión y co-solvente sobre el contenido total de fenoles en el extracto<br>de pulpa de berenjena. ....                 | 46            |

|  |    |
|--|----|
| Fig 8. Gráfica de superficie de respuesta para el efecto combinado de temperatura y co-solvente sobre la capacidad antioxidante en el extracto de pulpa de berenjena. .... | 50 |
| Fig 9. Gráfica de superficie de respuesta para el efecto combinado de temperatura y presión sobre la capacidad antioxidante en el extracto de pulpa de berenjena. ....     | 51 |
| Fig 10. Gráfica superficie de respuesta para el efecto combinado de co-solvente y presión sobre la capacidad antioxidante en el extracto de pulpa de berenjena. ....       | 52 |
| Fig 11. Cromatograma de separación e identificación de los principales ácidos fenólicos por HPLC-DAD en extractos supercríticos de pulpa de berenjena. ....                | 61 |
| Fig 12. Cromatograma de separación e identificación de los principales ácidos fenólicos por HPLC-DAD en extractos metanólicos de pulpa de berenjena. ....                  | 63 |

## LISTA DE CUADROS

| <b>Cuadro</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Cuadro 1. Clasificación de los compuestos fenólicos en plantas. ....   | 9             |
| Cuadro 2. Propiedades de los fluidos para su uso en extracción<br>supercrítica.....  | 19            |
| Cuadro 3. Valores reales y codificados para las variables<br>independientes en el diseño experimental. ....  | 33            |
| Cuadro 4. Diseño compuesto central rotatorio para el proceso<br>de extracción supercrítica de fenoles y capacidad antioxidante<br>en pulpa de berenjena..... | 34            |
| Cuadro 5. Estimación y significancia de los coeficientes de regresión<br>para contenido total de fenoles y capacidad antioxidante. ....                      | 35            |
| Cuadro 6. Análisis de varianza para el contenido total de fenoles. ....  | 36            |
| Cuadro 7. Análisis de varianza para la capacidad antioxidante. ....  | 37            |

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 8. Comparación de métodos de extracción en las respuestas TPC y ORAC.....  | 55 |
| Cuadro 9. Compuestos fenólicos identificados en extractos de pulpa de berenjena obtenidos por CO <sub>2</sub> supercrítico y metanol al 80%. .... | 59 |
| Cuadro 10. Estructura química de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos supercríticos y metanólicos.....             | 65 |

## RESUMEN

Los compuestos fenólicos antioxidantes (nutracéuticos), son moléculas de origen natural que han mostrado diversos efectos benéficos en la salud, principalmente disminuyendo la aparición de enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer. El fruto de berenjena contiene altas cantidades de dichos compuestos, ubicándose dentro de los 10 frutos con mayor capacidad antioxidante. En este trabajo se obtuvieron compuestos fenólicos a partir de residuos de berenjena mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>), un método ecológicamente "limpio". Se optimizó el proceso de extracción usando la metodología de superficie de respuesta para obtener la máxima cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante en los extractos. Se evaluó el efecto de los parámetros de extracción presión (250-300 Bar), temperatura (30-50 °C) y porcentaje de co-solvente (6-20 %). El contenido total de fenoles se midió por el método de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante se evaluó por el método de ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity, por sus siglas en inglés). Las condiciones óptimas de extracción se encontraron a 56.81°C, 317 Bar y 13% de co-solvente con valores óptimos de 4781.92 mg CAE/ g para fenoles totales (TPC) y 6027.49 μMTE/g para la capacidad antioxidante (ORAC). La temperatura y presión afectaron la variable TPC, mientras que ORAC se afectó por la presión y co-solvente. Los resultados de los extractos óptimos fueron comparados con los obtenidos con metanol al 80% (extracción convencional), el contenido de fenoles fue 3 veces mayor en los extractos supercríticos y presentó 40 veces mayor capacidad antioxidante que los obtenidos con metanol 80%. Este trabajo muestra el potencial de aplicación de la extracción con SC-CO<sub>2</sub> para la obtención de compuestos fenólicos para su uso en la industria alimentaria y farmacéutica; ya sea como aditivos alimentarios, suplementos o en la formulación de alimentos funcionales. Además, fue posible obtener extractos ricos en estos antioxidantes a partir de un material vegetal cuyo valor comercial es prácticamente nulo.



## 1. Introducción

Los compuestos fenólicos (CF) son metabolitos secundarios producidos por las plantas, para su defensa y supervivencia. Estos compuestos, son los fitoquímicos que se encuentran en mayor proporción en las plantas donde cumplen funciones morfológicas y fisiológicas (Randhir *et al.*, 2004). Se ha demostrado que los CF poseen un amplio rango de propiedades fisiológicas ya que pueden actuar como agentes antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos y antioxidantes, entre otros (Randhir *et al.*, 2004). Es por esto, que se ha asociado el consumo de frutas y vegetales ricos en CF con diferentes efectos benéficos en la salud debido principalmente a su potencial antioxidante (Balasundram *et al.*, 2006).

El cultivo y procesamiento de frutas y vegetales genera volúmenes considerables de residuos o subproductos, los cuales son utilizados generalmente en la formulación de alimentos para animales. Sin embargo, los estudios recientes sobre la caracterización de dichos residuos han mostrado que son ricos en CF por lo que pueden tener propiedades bioactivas. De esta manera, los subproductos o residuos pueden ser considerados como una fuente potencial de compuestos con posible uso como farmacéuticos y nutracéuticos, entre otros (Yilmaz *et al.*, 2011). Debido a esto, se ha destinado considerable investigación a la búsqueda de fuentes alternativas de CF como lo son los residuos agroindustriales, ya que el uso de estas fuentes permite darle valor agregado a un material vegetal cuyo precio es usualmente nulo.

Diversos autores han estudiado la composición de antioxidantes en el fruto de berenjena y sus partes (Noda *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2009; Todaro *et al.*, 2009). Todaro *et al.* (2009), encontraron que este fruto contiene ácido ascórbico y CF; ambos potentes antioxidantes. Además, se ha encontrado que los extractos de berenjena suprimen la formación de coágulos necesarios para el desarrollo de tumores y metástasis. De la misma manera, inhiben los procesos de inflamación

que conllevan a la aterosclerosis. Debido a esto, se han llevado a cabo estudios sobre la caracterización de CF en pulpa de berenjena de 7 diferentes variedades, así como la optimización de la extracción de dichos compuestos (Luthria y Mukhopadhyay 2006; Stommel y Whitaker 2003).

En berenjena, los CF han sido extraídos principalmente mediante métodos convencionales como lo es la extracción con solventes orgánicos (Luthria y Mukhopadhyay 2006; Singh *et al.*, 2009). Sin embargo, esta tecnología presenta diversas desventajas ya que utiliza sustancias tóxicas, consume mucho tiempo en el proceso, presenta baja selectividad, etc. (Sporring *et al.*, 2005). Es por esto que en los últimos años se han evaluado diversas alternativas para la obtención de compuestos bioactivos que dejen atrás dichas desventajas y que sean amigables con el medio ambiente; entre ellas, las llamadas “tecnologías verdes” (Herrero *et al.*, 2006). Dentro de estas tecnologías podemos encontrar al método de extracción con fluidos supercríticos (FSC).

La extracción con FSC se caracteriza por no utilizar sustancias tóxicas, como es el caso del CO<sub>2</sub> en estado supercrítico. Dicho estado, se logra llevando al CO<sub>2</sub> a una temperatura y presión por encima de su punto crítico durante el proceso de extracción (Herrero *et al.*, 2006). Sin embargo, el CO<sub>2</sub> supercrítico presenta la desventaja de ser un compuesto no polar y presenta baja afinidad por compuestos polares como los CF. En este sentido, se ha hecho uso de modificadores o co-solventes que logran aumentar la polaridad del CO<sub>2</sub> supercrítico mejorando la afinidad por los CF presentes en la muestra de extracción (Vatai *et al.*, 2009). De manera general, estos co-solventes son utilizados en pequeñas cantidades durante el proceso ya que los cambios en la polaridad se logran desde 5% de co-solvente en el flujo de extracción (Yilmaz *et al.*, 2011). El co-solvente más utilizado es el etanol, debido a que es una sustancia GRAS (Generally Recognized As Safe, por sus siglas en inglés) aprobada por la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) para su uso en productos de consumo humano (Herrero *et al.*, 2010; Yilmaz *et al.*, 2011).

La extracción supercrítica modificada con etanol representa un avance en el campo de obtención de compuestos bioactivos como los CF ya que los extractos

obtenidos pueden ser utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica. Más aun, la posibilidad de extraer estos compuestos a partir de residuos agrícolas de muy bajo o nulo valor comercial. Por las razones mencionadas anteriormente, el objetivo del presente estudio fue evaluar la extracción supercrítica modificada con etanol como una alternativa a la extracción con solventes para la obtención de CF en residuos de berenjena.

## **2. Antecedentes y Justificación**

### **2.1. Residuos agrícolas como fuente de compuestos bioactivos**

Los empaques agrícolas y las industrias de los alimentos, producen grandes cantidades de subproductos y residuos que generalmente no tienen un uso comercial; dichos residuos, son utilizados principalmente en la formulación de alimentos para animales (Cerezal *et al.*, 1995). Sin embargo, la caracterización de estos desechos ha mostrado que son ricos en compuestos antioxidantes que pueden tener efectos benéficos para la salud (Herrero *et al.*, 2006; Machmudah *et al.*, 2012). Debido a esto, los subproductos representan una fuente de compuestos de interés que hasta hace algunos años no había sido explotada como tal.

#### **2.1.1. Residuos generados**

Diversas actividades industriales generan una gran variedad de subproductos y residuos derivados del procesamiento, empaques o cultivos y de manera general, no tienen alguna utilización comercial (Herrero *et al.*, 2010). En los últimos años, el sector hortícola ha tenido un crecimiento tanto en superficie como en producción para cumplir con los requerimientos de la demanda mundial de alimentos. Esta intensidad productiva genera una gran cantidad de residuos vegetales, que se estima alrededor de 800,000 ton/año de materia vegetal fresca, lo que representa un problema ambiental importante (Fernandez-Ginés *et al.*, 2008). Debido a estas implicaciones ambientales, hoy en día se tiene la preocupación por el

aprovechamiento integral de las materias primas. En este sentido, los países que desean implementar “tecnologías verdes” o “tecnologías ecológicas”, deben cumplir con el total aprovechamiento de los productos hortícolas con la finalidad de reducir esta contaminación (Cerezal y Duarte 2005).

Según la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), las pérdidas de cosecha y poscosecha de frutas y hortalizas son alrededor de un 50% de la producción total (FAO 1993). A esto se le suma que los productos hortofrutícolas poseen fracciones que no son aprovechadas para el consumo humano (Cerezal *et al.*, 1995). Materiales no comestibles de las frutas y hortalizas se componen de cáscaras y semillas (60% del peso del fruto) de diferentes formas y tamaños las cuales normalmente no tienen ningún uso posterior (Cerezal y Duarte 2005; Cerezal *et al.*, 1995; Larrauri 1994; Larrauri y Cerezal 1993). Por lo tanto, la explotación integral del fruto podría traer mayores beneficios económicos a los productores y tener un menor impacto ambiental, dando lugar a mayor diversidad de productos destinados al uso humano (Cerezal y Duarte 2005).

### **2.1.2. Usos actuales de los residuos vegetales**

Hoy en día, los procesos agroindustriales producen una gran cantidad de subproductos y residuos con un alto contenido de compuestos bioactivos. Sin embargo, estos no son utilizados y el valor potencial de los residuos se pierde (Fadel *et al.*, 2000). El principal problema que enfrentan las industrias es que no cuentan con la capacidad de darle un aprovechamiento integral a sus residuos, aun cuando el uso óptimo de estos materiales representa una forma de economía inteligente.

Uno de los mayores usos de los residuos agrícolas ha sido la formulación de alimentos para ganado y otros animales (Yilmaz *et al.*, 2011). Sin embargo, los estudios de caracterización e identificación de compuestos en estos han mostrado que son ricos en compuestos benéficos para la salud humana (Passos *et al.*,

2010). Debido a este contenido se le ha atribuido un valor agregado a los residuos y en los últimos años han crecido las investigaciones acerca del proceso de extracción y propiedades bioactivas de sus compuestos.

Hoy en día, las investigaciones acerca del aprovechamiento de residuos para la obtención de compuestos bioactivos han ido incrementándose. Una de las industrias con mayor generación de residuos es la del procesado de tomate, de la cual se obtiene alrededor del 40% de residuos con respecto al total de materia prima. Diversas investigaciones se han llevado a cabo sobre la obtención de licopeno de piel de tomate (Kassama *et al.*, 2008), piel y semillas de tomate (Machmudah *et al.*, 2012) y residuos de pasta de tomate (Baysal *et al.*, 2000; Sabio *et al.*, 2003). De la misma manera, se han obtenido compuestos bioactivos de residuos de semillas de uva (Palma y Taylor 1999; Yilmaz *et al.*, 2011) y de cáscara (Ghafoor *et al.*, 2010), así como aceite de semillas de uva (Passos *et al.*, 2009). Además, debido a la demanda actual por los compuestos naturales ya se ha evaluado la producción de concentrados de antocianinas a partir de residuos de uva para su utilización como colorantes naturales (Vatai *et al.*, 2008). Debido a esto, la exploración de fuentes potenciales de compuestos bioactivos es de gran importancia en la actualidad debido a su gran campo de aplicación.

### **2.1.3. Contenido de compuestos bioactivos en los residuos de berenjena**

La berenjena, *Solanum melongena L.* (solanácea), es un vegetal que comúnmente crece en trópicos y subtrópicos y es consumida en muchos lugares por contener una gran variedad de fitoquímicos y compuestos benéficos a la salud (Akanitapichat *et al.*, 2010). Sin embargo, el cultivo de este fruto tiene grandes pérdidas debido a su corta vida de anaquel y sensibilidad al daño por frío (Concellon *et al.*, 2007). La calidad de berenjena se basa principalmente en la uniformidad de su forma ovalada y globosa, firmeza y color de piel púrpura oscuro.

Otros índices de calidad son tamaño, ausencia de defectos de formación y manejo, así como de pudriciones y un cáliz verde y de apariencia fresca (Cantwell y Suslow 1999). A consecuencia de los rigurosos índices de calidad por los que pasa el fruto de berenjena, una gran cantidad del cultivo no es aprovechado de manera comercial. Según la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), las pérdidas de cosecha y postcosecha de frutas y hortalizas son alrededor de un 50% de la producción total (FAO 1993). En este sentido, la berenjena representa una fuente potencial para la obtención de compuestos bioactivos que podrían tener aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.

Diversos estudios han enfocado sus investigaciones en las propiedades bioactivas de los CF encontrados en berenjena. Akanitapichat *et al.* (2010) mostró que los extractos de berenjena tienen actividad hipolipidémica en ratas alimentadas normalmente y algunas con dietas altas en grasas, suprimiendo la formación de coágulos de sangre que se forman para el crecimiento de tumores y metástasis e inhibiendo los procesos de inflamación. Además, el fruto contiene grandes cantidades de CF con actividad antioxidante y también cantidades relevantes de algunos minerales como fósforo, potasio, calcio y magnesio (Raigon *et al.*, 2008).

El fruto entero posee gran actividad antioxidante y está colocado dentro de los 10 primeros vegetales en términos de capacidad de atrapamiento de radicales libres (Akanitapichat *et al.*, 2010). Los CF de berenjena suprimen el desarrollo de vasos sanguíneos que se requieren para el desarrollo tumoral y metástasis en cáncer (Matsubara *et al.*, 2005), además; inhibe el receptor de inflamación PAR-2 que conlleva a aterosclerosis (Han *et al.*, 2003). Es bien conocido, que las propiedades benéficas en la salud que han mostrado los CF, son atribuidas principalmente a su capacidad antioxidante (Cao *et al.*, 1996). Debido a esto, algunos autores han evaluado el contenido total de CF en pulpa de berenjena, así como su capacidad antioxidante (Huang *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2009).

## **2.2. Los compuestos fenólicos, principales antioxidantes**

Los CF presentes en las plantas, son parte esencial de la dieta humana y son considerados moléculas de interés debido a sus propiedades antioxidantes (Randhir *et al.*, 2004). Las frutas y vegetales representan la mayor fuente de CF; debido a esto, las industrias agrícolas que generan una gran cantidad de subproductos representan una fuente rica en estos compuestos.

### **2.2.1. Aspectos generales**

Los CF son metabolitos secundarios derivados de la ruta de las pentosas fosfato, chiquimato y de los fenilpropanoides en las plantas (Randhir *et al.*, 2004). Estos compuestos son un grupo mayoritario de fitoquímicos considerados fisiológica y morfológicamente importantes ya que tienen un papel importante en el crecimiento y reproducción (Li *et al.*, 2006). Además brindan protección contra insectos y patógenos y contribuyen con el color y las características sensoriales en las frutas y vegetales (Balasundram *et al.*, 2006).

Estructuralmente, los CF contienen un anillo aromático con uno o más hidroxilos sustituyentes que pueden variar desde moléculas simples hasta grandes compuestos polimerizados. Debido a esta diversidad estructural, el grupo de compuestos son llamados “polifenoles”. De manera natural estos compuestos se encuentran conjugados con mono y polisacáridos, unidos a uno o más de los grupos fenólicos (Kim *et al.*, 2005). Pensando en la gran diversidad estructural de los CF que ocurren en la naturaleza, estos pueden categorizarse en varias clases (Cuadro 1) (Balasundram *et al.*, 2006). De estos, los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos son los compuestos mayoritarios encontrados en la dieta.



**Cuadro 1.** Clasificación de los compuestos fenólicos en plantas.

| <b>Clases de compuestos fenólicos en plantas</b>                                 |                         |
|--|-------------------------|
| <b>Clasificación estructural</b>   |                         |
| Fenoles simples, benzoquinonas   | C6                      |
| Ácidos hidroxibenzoicos  | C6–C1                   |
| Acetofenonas, ácidos fenilacéticos   | C6–C2                   |
| Ácidos hidroxicinámicos, fenilpropanoides<br>(cumarinas, isocumarinas, cromonas) | C6–C3                   |
| Naptoquinonas  | C6–C4                   |
| Xantonas   | C6–C1–C6                |
| Flavonoides, isoflavonoides  | C6–C3–C6                |
| Lignanós, neolignanós  | (C6–C3) <sup>2</sup>    |
| Ligninas   | (C6–C3) <sup>n</sup>    |
| Taninos condensados (proantocianidinas y flavolanos)                             | (C6–C3–C6) <sup>n</sup> |

Tomado de Balasundram *et al.* 2006.

### **2.2.2. Propiedades bioactivas**

Se ha asociado a los CF con efectos benéficos a la salud ya que son consumidos en altos niveles en las frutas y vegetales en donde se encuentran de manera natural (Balasundram *et al.*, 2006; Onofrejová *et al.*, 2010). Se ha reportado que poseen un amplio rango de propiedades fisiológicas como: anti-alergénico, anti-aterogénico, anti-inflamatorio, anti-microbiano, antioxidante, anti-trombótico, cardio-protectivo, entre otros (Randhir *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010). Sin embargo, estos efectos benéficos han sido atribuidos principalmente a su actividad antioxidante y se cree que son los compuestos determinantes de dicho potencial en los alimentos.

La importancia de los compuestos antioxidantes reside en los efectos benéficos a la salud que les han sido encontrados. Debido a esto, en la última década los estudios se han enfocado en estudiar no solo los procesos de extracción de estos compuestos, sino también en evaluar dichos efectos benéficos en sistemas *In vitro* e *In vivo* (Nair *et al.*, 2010). Esto, con la finalidad de poder ser utilizados en aplicaciones industriales como alimentarias, farmacéuticas, entre otras.

### **2.2.3. Posibles usos en la industria**

Desde hace mucho tiempo en la industria alimentaria se han usado compuestos sintéticos como BHT (butil hidroxitolueno), TBHQ (Ter butil hidroxiquinona) y BHA (butil hidroxianisol) como agentes para prevenir la oxidación de los alimentos (Balasundram *et al.*, 2006). Sin embargo, las tendencias actuales se han estado enfocando en el uso de antioxidantes naturales ya que recientes investigaciones han demostrado efectos adversos a la salud de los compuestos sintéticos. Estos

antioxidantes sintéticos se han sustituido gradualmente por CF y por lo tanto se ha desencadenado la investigación de antioxidantes naturales, enfocándose en estos compuestos.

Otro de los campos de aplicación de los CF es en la industria farmacéutica, en donde los compuestos bioactivos del fruto de berenjena también tienen una posible aplicación. En los últimos años se han realizado varios estudios en donde comprueban que los CF de berenjena tienen propiedades hepato-protectivas, antioxidantes y antiinflamatorias (Akanitapichat *et al.*, 2010; Noda *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2009). Debido a la generación de conocimiento en este ámbito, diversas investigaciones se han enfocado en el desarrollo de tecnologías que permitan una extracción óptima de estos compuestos y una mínima alteración de sus propiedades bioactivas. Una de estas tecnologías es la extracción con FSC que ha estado siendo utilizada en los últimos años por sus importantes propiedades y notorias ventajas frente a otras técnicas de extracción.

### **2.3. Métodos de extracción de compuestos bioactivos**

Los métodos tradicionales usados para obtener compuestos bioactivos tienen muchas desventajas; por ejemplo, son laboriosos, consumen mucho tiempo y trabajan con sustancias tóxicas. Actualmente, se han desarrollado nuevas tecnologías como el uso de FSC que a diferencia de los métodos tradicionales tiene tiempos de extracción cortos, alta selectividad por los compuestos y no usan sustancias tóxicas (Herrero *et al.*, 2006). Debido a esto, es considerada una tecnología prometedora, amigable con el medio ambiente y con la posibilidad de ser aplicada en muchas áreas.

## **2.4. Métodos convencionales para la extracción de compuestos fenólicos**

Existen diversos métodos para la obtención de CF dentro de los que se encuentran la extracción con solventes, extracción con solventes presurizados, microondas y la extracción con fluidos subcríticos y supercríticos, por mencionar algunos. Sin embargo, la extracción con solventes ha sido por mucho la más utilizada y la que puede considerarse como la metodología convencional de extracción (Dunford *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006).

En berenjena, este método ya ha sido usado para la extracción de CF como ácidos fenólicos y antocianinas a partir de piel y pulpa del fruto. Por ejemplo, Todaro *et al.* (2009) extrajeron antocianinas de piel de berenjena utilizando etanol como solvente, así como ácido málico y tartárico. Del mismo modo, Singh *et al.* (2009), extrajeron ácidos fenólicos de la pulpa de este fruto utilizando metanol al 80%. Sin embargo, este solvente es considerado tóxico y su separación del extracto es difícil, por lo que no puede ser utilizado en aplicaciones alimentarias (Miron *et al.*, 2011; Starmans y Nijhuis 1996).

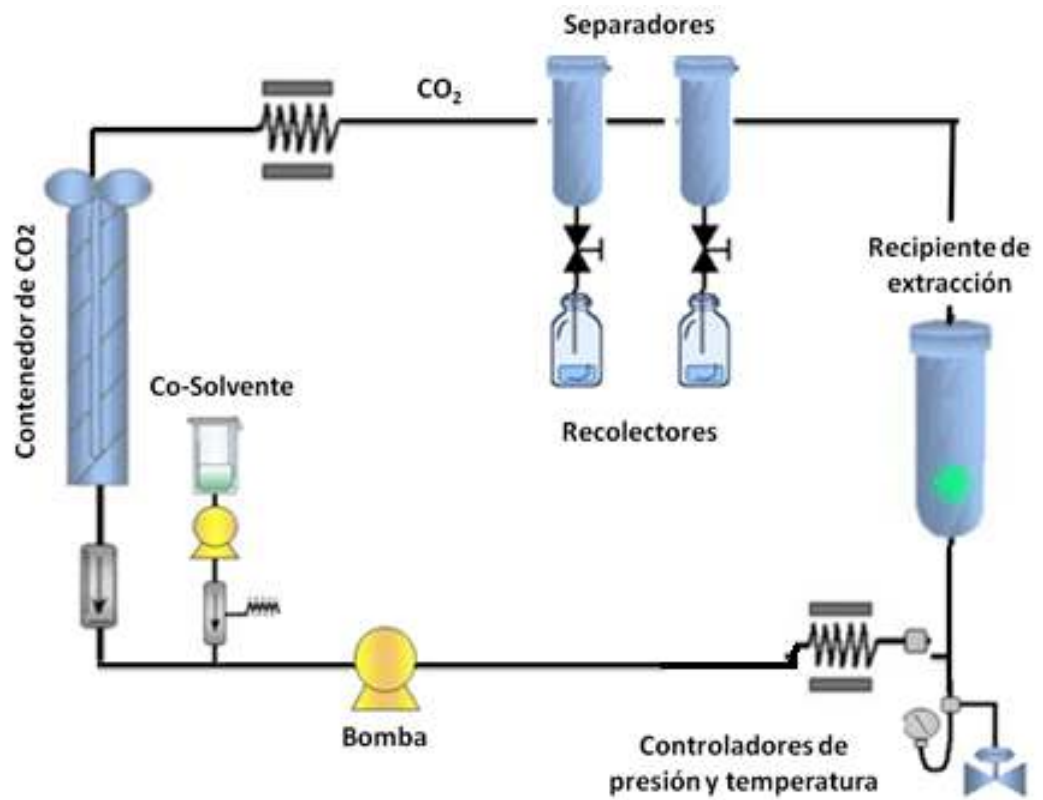
La extracción con solventes presenta ventajas sobre otros métodos debido a su bajo costo y fácil operación. Sin embargo, además de los solventes tóxicos utilizados, este método consume mucho tiempo, posee baja selectividad y bajos rendimientos de extracción (Luthria *et al.*, 2007; Sporrying *et al.*, 2005). Debido a esto, se ha despertado un gran interés en el desarrollo de nuevas tecnologías verdes que contrarresten estas desventajas, entre ellas podemos destacar a la extracción con FSC (Herrero *et al.*, 2006).

## **2.5. Extracción con fluidos supercríticos**

La extracción con FSC ha sido reconocida como una tecnología amigable con el medio ambiente y por lo tanto representa una alternativa atractiva a la extracción

con solventes orgánicos (Herrero *et al.*, 2006). Esta extracción utiliza solventes no tóxicos, no explosivos y baratos que pueden utilizarse en diversas matrices como plantas, sub-productos, algas, entre otros. Sin embargo, los mayores aciertos de esta técnica son su alta selectividad, tiempos cortos de extracción, disminución de la contaminación y el uso de solventes orgánicos no tóxicos (Wang y Weller 2006). Además, mediante este método se pueden extraer sustancias de diferente naturaleza como lipofílica e hidrofílica y el solvente puede ser removido fácilmente de los extractos obtenidos (Sahena *et al.*, 2009; Wang y Weller 2006; Wang *et al.*, 2008).

El proceso de extracción con FSC es bastante simple. Básicamente, la materia prima es colocada en un recipiente de extracción en el cual se pueden controlar la temperatura y la presión para mantener las condiciones de extracción deseadas. Luego, el recipiente es presurizado con el fluido por medio de una bomba para lograr el contacto del solvente con el material. El fluido y los compuestos solubilizados se transportan hacia los separadores y después los compuestos son recolectados mediante una válvula localizada en la parte inferior de los separadores. Por último, el fluido es recirculado o liberado en el ambiente (Figura 1) (Herrero *et al.*, 2006; Sihvonen *et al.*, 1999).



**Fig 1.** Pasos del proceso de extracción con fluidos supercríticos (Herrero et al., 2006).

Hoy en día la extracción con FSC es muy usada en un amplio rango de aplicaciones industriales como la extracción de aceites esenciales, nutracéuticos, contaminantes ambientales y en diversas aplicaciones analíticas (Herrero *et al.*, 2010). Por medio de esta técnica se han extraído compuestos lipofílicos (Passos *et al.*, 2010; Yopez *et al.*, 2002), carotenoides (Egydio *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2009) y sobre todo CF (Gelmez *et al.*, 2009; Martinez-Correa *et al.*, 2011). Las peculiares propiedades del estado supercrítico hacen que las características generales de esta nueva técnica se aproximen a las exigidas a un proceso de extracción ideal, el cual debe ser rápido, simple, barato, no contaminante, selectivo, aplicable a compuestos termolábiles y conducir a la obtención de extractos finales listos para el análisis (Herrero *et al.*, 2010).

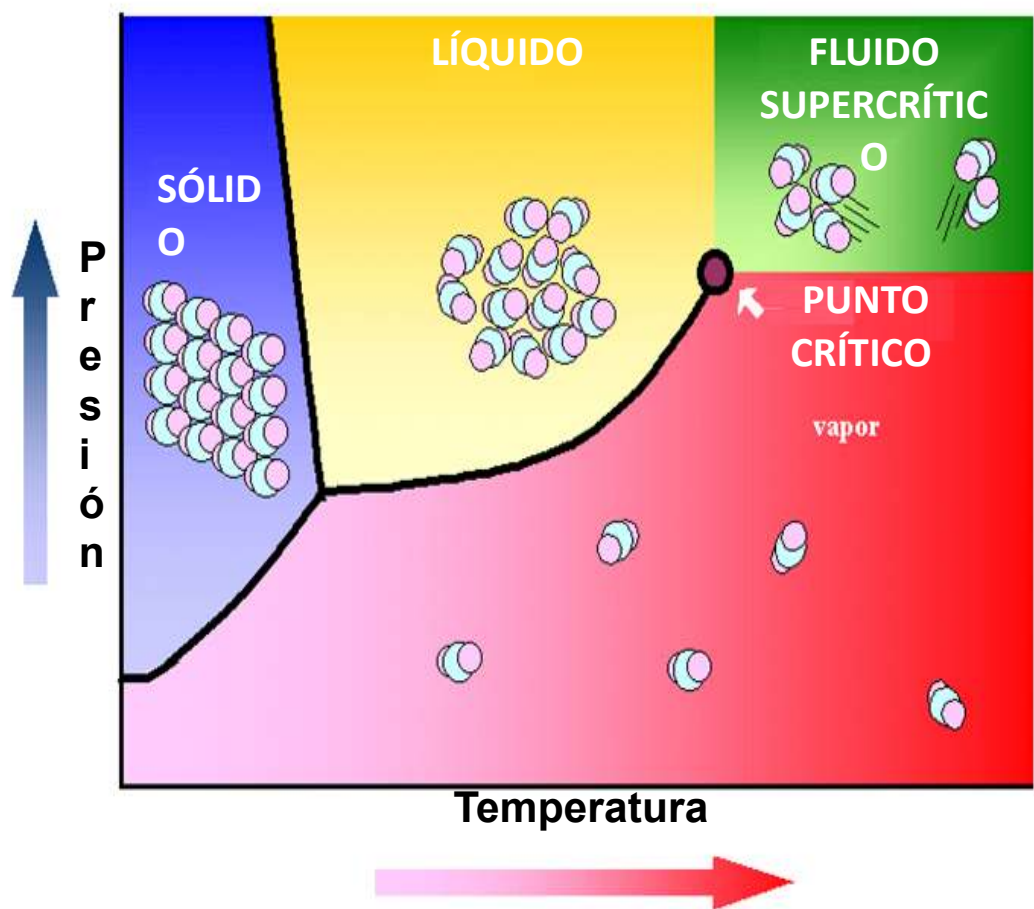
La extracción con FSC ya ha sido utilizada para la extracción de compuestos bioactivos a partir de residuos agroindustriales de semillas de uva (Yilmaz *et al.*, 2011), piel de tomate (Machmudah *et al.*, 2012), piel de uva (Ghafoor *et al.*, 2010), residuos de pasta de tomate (Baysal *et al.*, 2000) y germen de trigo tostado (Gelmez *et al.*, 2009), por mencionar algunos. Además, se ha comprobado que la extracción con FSC conserva las propiedades bioactivas o antioxidantes de los compuestos extraídos o las altera mínimamente (Herrero *et al.*, 2006; Wang y Weller 2006).

### **2.5.1. Propiedades de los fluidos supercríticos para la extracción**

La extracción con FSC está basada en ciertas propiedades de los fluidos como densidad, difusividad, constante dieléctrica y viscosidad (Sihvonen *et al.*, 1999). Cuando un fluido es llevado a una presión y temperatura por encima de su punto crítico este pasa a su estado supercrítico y esto puede ser observado en un diagrama de fases común (Fig 2) (Wang y Weller 2006). Bajo este estado, el fluido se encuentra entre un gas y un líquido porque su densidad es similar a un líquido y

su viscosidad es similar a un gas (Sihvonen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2008). De esta manera, en el estado supercrítico de un fluido no se puede distinguir el estado líquido del gaseoso (Wang y Weller 2006). Además, un FSC tiene mejores propiedades de transporte que los líquidos porque depende de su densidad que, a diferencia de los solventes líquidos puede ajustarse por la presión y temperatura (Herrero *et al.*, 2006).





**Fig 2.** Diagrama de fases típico para un compuesto puro.

El gran atractivo que presentan los FSC para utilizarse como agentes extractores radica en que poseen una densidad similar a la de los líquidos y su viscosidad mucho menor, lo que hace que la difusión de solutos en un FSC sea mucho mayor que en un solvente líquido (Sihvonen *et al.*, 1999). Así pues, puede esperarse que las extracciones con FSC sean mucho más rápidas y eficientes que las llevadas a cabo con solventes líquidos (Herrero *et al.*, 2006). Dicha eficiencia puede atribuirse a su baja viscosidad que favorece los fenómenos de transporte de masa y la penetrabilidad en los poros de la matriz de la muestra (Cavero *et al.*, 2006; Yilmaz *et al.*, 2011).

La matriz y la naturaleza de los compuestos deseados están estrechamente relacionadas con las condiciones del FSC, ya que algunas temperaturas pueden afectar la viabilidad estos compuestos. En el caso específico de los CF, se ha encontrado que a temperaturas de 55 °C o mayores estos empiezan a degradarse y a perder su funcionalidad (Yilmaz *et al.*, 2011). Es por esto que el solvente más utilizado es el CO<sub>2</sub>, ya que posee una temperatura y presión crítica moderada comparada con otros solventes (Cuadro 2), previniendo así la degradación de los CF (Herrero *et al.*, 2006; Yilmaz *et al.*, 2011). Por lo mencionado anteriormente, las condiciones de extracción supercrítica deben ser establecidas para cada matriz vegetal. Deben encontrarse las condiciones en las cuales se logre el mayor rendimiento de compuestos de interés sin afectar sus propiedades bioactivas como la capacidad antioxidante.

**Cuadro 2.** Propiedades de los fluidos para su uso en extracción supercrítica.

| Solvente               | Propiedad crítica |               |                 |
|------------------------|-------------------|---------------|-----------------|
|                        | Temperatura       | Presión (atm) | Densidad (g/ml) |
| Eteno                  | 10.1              | 50.5          | 0.2             |
| Agua                   | 101.1             | 217.6         | 0.322           |
| Metanol                | -134.4            | 79.9          | 0.272           |
| Dióxido de Carbono     | 31.2              | 72.9          | 0.47            |
| Etano                  | 32.4              | 48.2          | 0.2             |
| Óxido nitroso          | 36.7              | 71.7          | 0.46            |
| Hexafluoruro de Azufre | 45.8              | 37.7          | 0.73            |
| n-Buteno               | -139.9            | 36            | 0.221           |
| n-Pentano              | -75.5             | 33.3          | 0.237           |

Tomado de Herrero *et al.* 2006

### 2.5.2. Utilización de CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico

Muchas sustancias pueden ser usadas en su estado supercrítico como es el caso de etileno, metano, nitrógeno, etanol, entre otras. Sin embargo, para fines de aplicación en la industria alimentaria o farmacéutica deben utilizarse solventes aprobados por la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) y en el caso de estos su uso está restringido (Herrero *et al.*, 2006). El CO<sub>2</sub> es un compuesto amigable con el ambiente y es una sustancia GRAS (Generally Recognized As Safe, por sus siglas en inglés) por la FDA y por la EFSA (European Food Safety Authority, por sus siglas en inglés) (Herrero *et al.*, 2010). Además, este compuesto es no tóxico, no inflamable y tiene un bajo costo lo que hace que sea el solvente más utilizado en esta tecnología (Daintree *et al.*, 2008).

Como se mencionó en los párrafos anteriores, el CO<sub>2</sub> asegura la mínima alteración de los CF que se desean extraer y conserva sus propiedades curativas (antioxidante, antihipertensiva, etc.) debido a que su temperatura crítica es baja (32 °C) y previene la degradación (Cavero *et al.*, 2006). Otra ventaja del CO<sub>2</sub> es que a presión y temperatura ambiente se encuentra en estado gaseoso, lo que hace que la recuperación del compuesto sea fácil y el extracto se encuentre libre de solventes (Herrero *et al.*, 2006). Esto permite llevar a cabo las extracciones sin utilizar prácticamente solventes orgánicos, y obtener extractos finales listos para ser analizados sin necesidad de efectuar posteriores etapas de concentración (Cavero *et al.*, 2006).

Las ventajas del CO<sub>2</sub> hacen que este sea el fluido más utilizado en las aplicaciones descritas hasta ahora de la técnica de FSC (Herrero *et al.*, 2006; Yilmaz *et al.*, 2011). Sin embargo, la única desventaja que posee el CO<sub>2</sub> frente a otros FSC es su carácter apolar, lo que hace que este gas no sea muy efectivo para extraer compuestos polares de sus matrices (Herrero *et al.*, 2006). Es por esto que para lograr una extracción de este tipo se debe hacer uso de otras

sustancias que eleven la polaridad del solvente como es el caso de metanol, etanol y agua, por mencionar algunos (Cavero *et al.*, 2006; Vatai *et al.*, 2009).

### **2.5.3. Utilización de co-solventes en la extracción de compuestos fenólicos**

Muchos compuestos polares como los CF son pobremente solubles en CO<sub>2</sub> supercrítico y por lo tanto no extraíbles (Daintree *et al.*, 2008). Debido a esto, se deben usar otras sustancias para mejorar la solubilidad y selectividad del proceso las cuales deben ser añadidas en pequeñas cantidades (Sihvonen *et al.*, 1999).

Cuando existen componentes que pueden actuar como mejoradores de la solubilidad de compuestos polares se dice que existe un efecto de co-solvente (Daintree *et al.*, 2008). Los modificadores o co-solventes son sustancias polares que en pequeñas cantidades logran cambiar el poder de solvatación de los FSC. Existen varias razones que justifican el uso de modificadores en la extracción con FSC. Por una parte, su adición está relacionada con cambios en las propiedades críticas del fluido, en este caso el fluido presentará cierta polaridad que mejorará su poder disolvente (Vatai *et al.*, 2009). Además, el modificador puede ejercer efectos sobre la matriz de la muestra, como favorecer el desprendimiento de los compuestos bioactivos encontrados dentro de ella (García 1996). Dicho efecto ya ha sido observado por Yilmaz *et al.* (2011) al encontrar un incremento en el contenido de proantocianidinas en extractos de semillas de uva que fue atribuido al rompimiento de interacciones matriz-CF después de 50 °C en el proceso de extracción.

## 2.6. Avances y aplicaciones de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico

Probablemente, el mayor uso que se le ha dado a la extracción con FSC es en el campo de los alimentos. Herrero *et al.* (2010), hicieron una revisión recopilando información de los materiales usados en la extracción con FSC, cuyos compuestos son de interés en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas. Otro de los campos de aplicación de los FSC es la industria farmacéutica, purificación de materiales farmacéuticos, esterilización, remoción de solventes y por supuesto, la extracción y purificación de principios activos de sus fuentes primarias y de medios sintéticos (Bernal *et al.*, 2010; Nair *et al.*, 2010; Nobili *et al.*, 2009). En términos generales, el mayor uso de estos fluidos en los farmacéuticos tiene que ver con la extracción de compuestos bioactivos de sus matrices naturales (Balasundram *et al.*, 2006; Herrero *et al.*, 2010).

Actualmente, esta extracción es una opción para el desarrollo de productos, mayormente aquellos que son usados para consumo humano, como alimentos nuevos, ingredientes y aditivos alimentarios o productos (Plaza *et al.*, 2008). Además, esta extracción ha demostrado algunas ventajas en el campo ambiental; por ejemplo, reducir los desechos de solventes, remoción de compuestos tóxicos de suelos y obtener nuevos compuestos de subproductos industriales. Así, con esta metodología ecológicamente limpia, se puede tener un gran avance en el ámbito de extracción de compuestos bioactivos aplicables en la industria.

A pesar de las propiedades benéficas que se le han atribuido a los CF encontrados en la pulpa de berenjena, no se han evaluado métodos de extracción que permitan la utilización de dichos compuestos en aplicaciones alimentarias o farmacéuticas. En este estudio se evaluó la extracción con FSC como una alternativa a la extracción con solventes para la obtención de los CF encontrados en los residuos del fruto. La información derivada de este estudio puede ser de utilidad para la aplicación de los extractos ya que la efectividad de sus CF ya ha sido probada en sistemas *in vivo* e *in vitro*.

### **3. Hipótesis**

Los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de residuos de berenjena, presentan mayor rendimiento y capacidad antioxidante que los extraídos con solventes, debido al tipo de compuesto y su concentración en el extracto.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. Objetivo general**

Evaluar la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico como una alternativa a la extracción con solventes para la obtención de compuestos fenólicos a partir de residuos de berenjena.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- ✓ Optimizar el proceso de extracción supercrítica de compuestos fenólicos en pulpa de berenjena por metodología de superficie de respuesta.
- ✓ Obtener extractos ricos en compuestos fenólicos a partir de residuos de berenjena, mediante extracción supercrítica y metanol al 80%.
- ✓ Comparar los métodos de extracción en cuanto a concentración de fenoles y capacidad antioxidante.
- ✓ Identificar y cuantificar la concentración de compuestos fenólicos obtenidos por ambos métodos.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1. Materiales**

Las berenjenas fueron proporcionadas por Agrícola San Isidro de Culiacán S.P.R de R.L. en la ciudad de Culiacán, Sinaloa. Fueron seleccionados aquellos frutos que habían sido descartados para su uso posterior. Se lavaron y desinfectaron con agua clorada (250 ppm) durante 3 min y se secaron a temperatura ambiente. El dióxido de Carbono utilizado como solvente supercrítico fue adquirido en Praxair (México) y como co-solvente se utilizó etanol al 98%.

### **5.2. Preparación de la muestra**

Las muestras de berenjena fueron congeladas a -60 °C. Después de esto, el fruto entero fue liofilizado y pelado manualmente. La fracción de la pulpa de berenjena fue molida en un molino de café y el polvo se pasó por un tamiz de 425 µm para obtener un tamaño de partícula homogéneo en la muestra. Se prepararon bolsas de tela de organza para colocar el extracto en el recipiente de extracción, como se indica en el manual del equipo de extracción.



### **5.3. Extracción con solventes**

El método de extracción con solventes se llevó a cabo utilizando metanol al 80%. 15 g de pulpa de berenjena liofilizada fueron puestos a macerar con metanol al 80% durante 24 h en la oscuridad, de acuerdo con la metodología descrita por Singh *et al.* (2009). Los extractos obtenidos fueron evaluados en cuanto a su rendimiento de extracción, contenido de CF y capacidad antioxidante. Así mismo se les realizó un perfil de CF por HPLC-DAD. La extracción con solventes se realizó para evaluar su eficiencia en comparación con la extracción supercrítica.

### **5.4. Extracción con fluidos supercríticos**

La extracción de CF de pulpa de berenjena se llevó a cabo usando un equipo analítico de FSC (SFT-150 SF, Supercritical Fluid Technologies, Inc., Newark, Delaware). El instrumento se encuentra equipado con un regulador de presión automático, un recipiente de extracción de 100 mL, un recipiente de recolección de 250 mL, controlador de temperatura, un sistema de enfriamiento llenado con glicol y una bomba de co-solvente series II modelo A0025829. La bomba de co-solvente fue purgada antes de cada extracción para asegurar su entrada al sistema.

El flujo de CO<sub>2</sub> fue de 5 mL/ min para todos los experimentos. Se usó un flujo lento para asegurar el tiempo de residencia del fluido supercrítico en el recipiente de extracción. Debido a que los CF pueden no ser extraídos con CO<sub>2</sub>, por su naturaleza no polar, el CO<sub>2</sub> se modificó con etanol (6-20%). Se seleccionó etanol porque es un solvente polar permitido en la industria de alimentos. Además del porcentaje de etanol, se utilizaron diferentes presiones (250-300 bar) y temperaturas (30-50 °C). El tiempo de extracción fue de 1 h y se utilizaron 5 g de berenjena liofilizada. Después de la extracción, el recipiente de recolección fue

lavado con 10 mL de etanol para limpiar las paredes y minimizar las pérdidas de extracto.

#### **5.4.1. Evaluación de compuestos fenólicos**

Los fenoles totales se determinaron de acuerdo al método de Singleton & Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se tomó 15  $\mu\text{L}$  de extracto al cual se le adicionó 240  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 15  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se dejó reposar 3 min y se le agregaron 30  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Seguido, se agitó vigorosamente en un vórtex para dejarse reposar por 2 h en la oscuridad. Pasado el tiempo, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Synergy HT a una longitud de onda de 725 nm. Para la determinación de compuestos fenólicos se preparó una curva de calibración de ácido clorogénico (1mg/ mL), reportando los resultados como mg de equivalentes de ácido clorogénico/ g de extracto. Las mediciones se llevaron cabo por triplicado.

#### **5.4.2. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos**

El extracto optimizado con el mayor contenido de CF y capacidad antioxidante fue caracterizado en su composición. Se realizó la identificación de CF por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) a 250, 280 y 320 nm (Simirgiotis *et al.*, 2009). Las muestras utilizadas para la identificación y cuantificación en HPLC-DAD fueron obtenidas por extracción supercrítica y solventes. Las condiciones de extracción fueron 13% etanol, 56.8 °C y 317 bar con 15 g de muestra para SFE y metanol al 80% durante 24 h con 15 g de muestra para SE. Las muestras fueron preparadas a una

concentración de 15 µg/ mL para su inyección en el equipo cromatográfico. Antes de la inyección las muestras fueron hidrolizadas con HCl 4M durante 4 h a 80 °C. Se utilizó una columna C18 de fase reversa para compuestos polares de 4.6 mm × 250 mm con un tamaño de partícula esférica de 5 µm. Las fases móviles utilizadas fueron ácido fórmico al 1% (A) y acetonitrilo (B). Se utilizó un gradiente isocrático con 92% A y 8% B de 1 a 40 min, luego 100% B de 40 a 50 min para eliminar otros compuestos y luego 92% A y 8% B de 50 a 60 min para dejar la columna lista para la siguiente corrida experimental. El tiempo total de corrida fueron 60 min. La temperatura de la columna se fijó a 30 °C y se inyectó un volumen de 20 µl al HPLC.

#### **5.4.3. Medición de capacidad antioxidante**

ORAC (Oxygen radical antioxidant capacity). La capacidad antioxidante por el método de ORAC se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Robles-Sánchez *et al.* (2009). El reactivo AAPH fue utilizado como generador de radicales peroxilo, fluoresceína como prueba fluorescente y trolox como estándar. La mezcla de reacción contenía 25 µL del extracto, 25 µL de buffer de fosfatos 75 mM (pH 7.4), 75 µL del reactivo AAPH (0.8 M) y 200 µL de fluoresceína (0.106 µM). Se utilizó buffer de fosfato como muestra blanco. Enseguida, las muestras fueron pre-incubadas a 37 °C durante 15 min y se les adicionó el reactivo AAPH para iniciar la reacción (generación de radicales peroxilo). Se monitoreó la fluorescencia durante intervalos de 2 min. La longitud de onda de excitación y de emisión fue de 484 nm y 515 nm, respectivamente y cada extracto fue medido por triplicado. Los valores se calcularon utilizando una ecuación de regresión entre la concentración de trolox y el área bajo la curva de caída de fluoresceína. Los resultados se expresaron en µmol ET/ g de extracto.

## 5.5. Diseño experimental

Para poder evaluar la comparación de métodos se llevó a cabo un análisis de una vía en donde el único factor fue el método de extracción (Extracción supercrítica y con solventes), las variables de respuesta del experimento fueron el rendimiento total del extracto, contenido total de fenoles y capacidad antioxidante medida por ORAC.

El modelo experimental fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ij}$ = Observación de la variable de respuesta en el tratamiento  $i$  y la unidad experimental  $j$

$\mu$ = Efecto de la media general

$\tau_i$ = Efecto de los tratamientos

$\varepsilon_{ijk}$ = Error experimental

Se utilizó un diseño compuesto central rotatorio (DCCR), para conocer la relación entre las variables de respuesta y los factores del proceso, así como determinar los modelos de predicción de la extracción de CF y su capacidad antioxidante. Los factores estudiados fueron la concentración de etanol como co-solvente ( $X_1$ : 6-2%), temperatura ( $X_2$ : 30-50 °C) y la presión ( $X_3$ : 250-300 bar), mientras que las variables de respuesta fueron el contenido total de fenoles ( $Y_1$ ) y la capacidad antioxidante ( $Y_2$ ). Cada variable a ser optimizada fue codificada en 3 niveles, -1, 0 y +1, así como 1.68 y -1.68 para los niveles axiales (Cuadro 3). El diseño asignó 20 experimentos aleatorios incluyendo 6 réplicas en el punto central (Cuadro 4).

El software Minitab 15 fue usado para el diseño experimental y al análisis estadístico. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para determinar los coeficientes de regresión, significancia estadística de los términos

en los modelos y para ajustar los modelos matemáticos a los datos experimentales. Se aplicó un modelo de segundo orden para predecir las variables de respuesta como se muestra a continuación:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

Donde Y es la variable dependiente predicha,  $b_0$  es el coeficiente de la constante,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  son los coeficientes de los términos lineales,  $b_{11}$ ,  $b_{22}$ ,  $b_{33}$ , son los coeficientes cuadráticos,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$  son los coeficientes de interacción y  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son las variables independientes. La MSR es un procedimiento efectivo para determinación de condiciones óptimas que ya ha sido exitosamente aplicado en la obtención de extractos vegetales con FSC (Ghafoor *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2011).

## 5.6. Análisis estadístico

El análisis y la presentación de resultados de extracción supercrítica se realizaron utilizando el paquete estadístico Minitab 15.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Análisis del modelo

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un método estadístico muy efectivo para la optimización de procesos de extracción ya que reduce el número de corridas experimentales requeridas y brinda una amplia información de las variables del proceso (Domingos *et al.*, 2008). En este estudio se utilizó MSR para desarrollar modelos de predicción para optimizar las condiciones de extracción de fenoles con CO<sub>2</sub> supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC) y su capacidad antioxidante a partir de pulpa de berenjena. Las funciones polinomiales para la relación entre las variables dependientes y los valores de las variables independientes de co-solvente ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) y presión ( $X_3$ ) se muestran en las siguientes ecuaciones para TPC (Ecuación 1) y ORAC (Ecuación 2).

$$(Ec. 1) \quad Y_1 = 623.55 + 281.17X_1 + 184.45X_2 + 253.24X_3 + 157.91X_1^2 + 328.86X_2^2 + 62$$

$$(Ec. 2) \quad Y_2 = 1832.7 + 508.9X_1 - 400.3X_2 + 274.2X_3 + 437.1X_1^2 + 737.1X_2^2 - 166.3X_3^2 -$$

Donde:

$Y_1$ : Contenido total de fenoles

$Y_2$ : Capacidad antioxidante

$X_1$ : Etanol (%)

$X_2$ : Presión (bar)

$X_3$ : Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la significancia de los coeficientes de regresión en el modelo (Cuadro 5). Un coeficiente de regresión alto y un valor de p bajo nos indicaron una mayor influencia de los factores en las variables de respuesta (He *et al.*, 2010). Los resultados del ANOVA para el DCCR se muestran en los cuadros 6 y 7 e indican un modelo ajustado entre los coeficientes de los términos lineales, cuadráticos y de interacción del modelo. La adecuación de los modelos fue evaluada por el coeficiente de determinación  $R^2$ , el cual indica cuanta de la variación de los resultados está siendo explicado por el modelo de predicción y es una medida del grado de ajuste (Zarena *et al.*, 2012).

Para la variable de respuesta ORAC, la falta de ajuste fue no significativa ( $p=0.091$ ) y el modelo polinomial de segundo orden representa de manera adecuada los datos experimentales con una  $R^2$  de 0.888. Esto implica que el 88.8% de la variación de los datos es explicada por el modelo ajustado. De acuerdo con Joglekar y May (1987) y Guan y Yao (2008), la  $R^2$  debe ser al menos de 0.80 para que el modelo sea considerado ajustado. Por otro lado, cuando el valor de  $R^2$  disminuye, hay menos relevancia de las variables independientes en el modelo y este no es apropiado para explicar el comportamiento y las variaciones de las variables dependientes (Zarena *et al.*, 2012). En cuanto a la variable de respuesta TPC la falta de ajuste fue significativa ( $p=0.012$ ), sin embargo; la  $R^2$  fue de 0.898 cumpliendo con lo anteriormente mencionado. En este sentido, los modelos de regresión obtenidos en este trabajo son altamente significativos y se confirma que son adecuados para predecir las variables de respuesta.

La optimalidad del proceso de extracción supercrítica (ESC) se encontró en dos regiones experimentales, 25.76% etanol, 40 °C y 317 bar, (experimento 1) y 13% etanol, 56.8 °C y 317 bar, (experimento 2). Se evaluaron las variables de respuesta TPC y ORAC en ambos experimentos teniendo resultados de 2482.96 mg CAE/ 100 g y 2863.12  $\mu\text{mol TE/g}$  respectivamente para al experimento 1 y 4781.92 mg CAE/100 g y 6027.49  $\mu\text{mol TE/g}$  para el experimento 2. Los resultados muestran que el experimento 2 fue el más efectivo para la extracción de fenoles totales y capacidad antioxidante en los extractos de pulpa de berenjena, por lo tanto estas condiciones fueron seleccionadas como la región óptima para este proceso. Además, dicho experimento utiliza 50% menos cantidad de etanol durante la extracción, lo cual es una característica deseable en cuanto a costos del proceso e implicaciones ambientales (Herrero *et al.*, 2010).



**Cuadro 3.** Valores reales y codificados para las variables independientes en el diseño experimental.

| <b>Variables</b>   | <b>U</b>   | <b>Valores reales y codificados</b> |           |          |          |             |
|--------------------|------------|-------------------------------------|-----------|----------|----------|-------------|
|                    |            | <b>-1.68</b>                        | <b>-1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>1.68</b> |
| <b>Co-solvente</b> | <b>%</b>   | 1.24                                | 6         | 13       | 20       | 25.76       |
| <b>Temperatura</b> | <b>°C</b>  | 23.2                                | 30        | 40       | 50       | 56.8        |
| <b>Presión</b>     | <b>bar</b> | 233                                 | 250       | 275      | 300      | 317         |

**Cuadro 4.** Diseño compuesto central rotatorio para el proceso de extracción supercrítica de fenoles y capacidad antioxidante en pulpa de berenjena.

| Orden estándar  | Factores                         |                                |                                 | Respuestas  |   |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---|---|
|                 | Variables codificadas            |                                |                                 | Valor experimental                                |   |
|                 | X <sub>1</sub><br>Co-solv<br>(%) | X <sub>2</sub><br>Temp<br>(°C) | X <sub>3</sub><br>Pres<br>(bar) | Y <sub>1</sub><br>TPC<br>mg CAE/<br>100g extracto | Y <sub>2</sub><br>ORAC<br>μmol TE/g<br>extracto |
| 1               | -1                               | -1                             | -1                              | 942.479   | 2109.67   |
| 2               | 1                                | -1                             | -1                              | 164.426   | 928.883   |
| 3               | -1                               | 1                              | -1                              | 517.708   | 2362.184  |
| 4               | 1                                | 1                              | -1                              | 2016.550  | 3452.271  |
| 5               | -1                               | -1                             | 1                               | 2486.86   | 2921.295  |
| 6               | 1                                | -1                             | 1                               | 2046.030  | 3876.859  |
| 7               | -1                               | 1                              | 1                               | 204.101   | 1181.125  |
| 8               | 1                                | 1                              | 1                               | 2072.216  | 4173.575  |
| 9 <sup>a</sup>  | 0                                | 0                              | 0                               | 678.259   | 1322.230  |
| 10 <sup>a</sup> | 0                                | 0                              | 0                               | 490.828   | 1647.791  |
| 11 <sup>a</sup> | 0                                | 0                              | 0                               | 605.889   | 2072.121  |
| 12 <sup>a</sup> | 0                                | 0                              | 0                               | 566.660   | 1538.147  |
| 13              | -1.68                            | 0                              | 0                               | 378.011   | 2453.690  |
| 14              | 1.68                             | 0                              | 0                               | 1383.977  | 4292.530  |
| 15              | 0                                | -1.68                          | 0                               | 862.140   | 6450.632  |
| 16              | 0                                | 1.68                           | 0                               | 1866.881  | 2992.391  |
| 17              | 0                                | 0                              | -1.68                           | 523.911   | 1534.224  |
| 18              | 0                                | 0                              | 1.68                            | 696.580   | 1798.523  |
| 19 <sup>a</sup> | 0                                | 0                              | 0                               | 875.557   | 2209.616  |
| 20 <sup>a</sup> | 0                                | 0                              | 0                               | 589.035   | 2101.972  |

<sup>a</sup> Puntos centrales en el diseño experimental.

**Cuadro 5.** Estimación y significancia de los coeficientes de regresión para contenido total de fenoles y capacidad antioxidante.

| Intercepto | Coeficientes estimados |           |             |           |
|------------|------------------------|-----------|-------------|-----------|
|            | TPC                    |           | ORAC        |           |
|            | Coeficiente            | Valor $p$ | Coeficiente | Valor $p$ |
| $b_0$      | 623.55                 | 0.001     | 1832.7      | 0.000     |
| $b_1$      | 281.17                 | 0.008     | 508.9       | 0.007     |
| $b_2$      | 184.45                 | 0.053     | -400.3      | 0.023     |
| $b_3$      | 253.24                 | 0.013     | 274.2       | 0.095     |
| $b_{11}$   | 157.91                 | 0.083     | 437.1       | 0.013     |
| $b_{22}$   | 328.86                 | 0.002     | 737.1       | 0.000     |
| $b_{33}$   | 62.19                  | 0.466     | -166.3      | 0.278     |
| $b_{12}$   | -573.23                | 0.000     | -538.5      | 0.020     |
| $b_{13}$   | 88.31                  | 0.441     | 504.8       | 0.027     |
| $b_{23}$   | 460.49                 | 0.002     | 527.4       | 0.022     |

**Cuadro 6.** Análisis de varianza para el contenido total de fenoles.

| <b>Fuente</b>   | <b>GI</b> | <b>SC</b> | <b>MC</b> | <b>F</b> | <b>P</b> |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| Regresión       | 9         | 8599448   | 955494    | 9.85     | 0.001    |
| Lineal          | 3         | 2420097   | 806699    | 8.32     | 0.005    |
| Cuadrático      | 3         | 1791804   | 597268    | 6.16     | 0.012    |
| Interacción     | 3         | 4387547   | 1462516   | 15.08    | 0.000    |
| Error residual  | 10        | 969786    | 96979     |          |          |
| Falta de ajuste | 5         | 881633    | 176327    | 10.00    | 0.012    |
| Error puro      | 5         | 88153     | 17631     |          |          |
| Total           | 19        | 9569234   |           |          |          |

**R<sup>2</sup> = 0.8987**

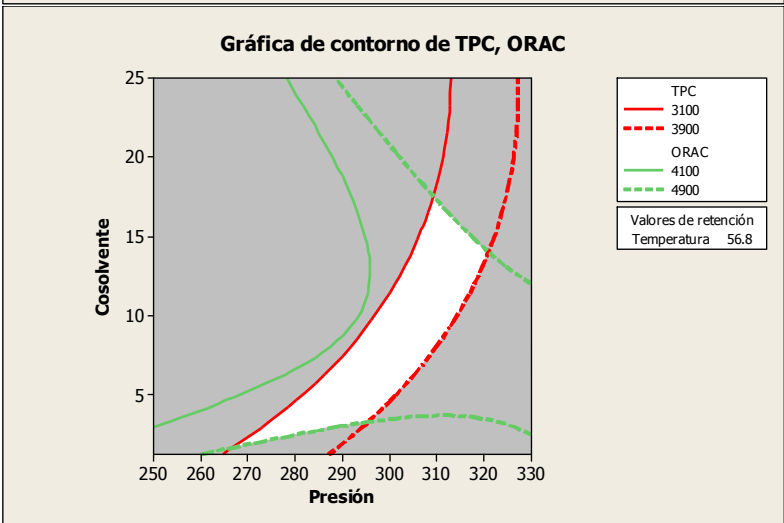
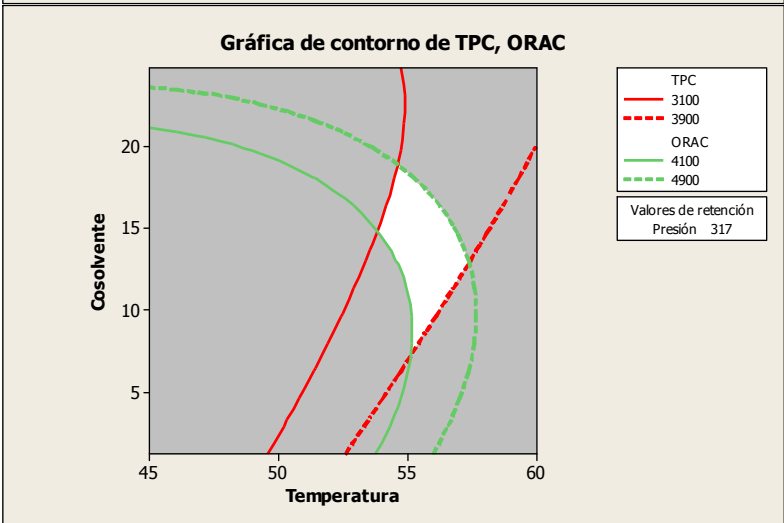
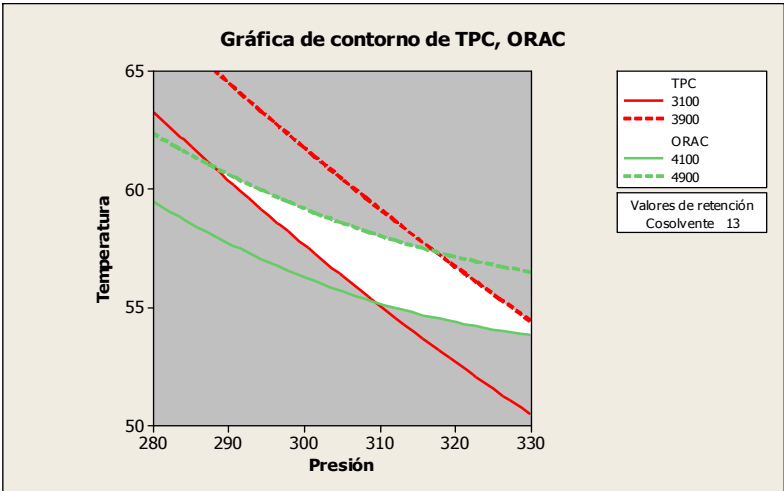
**Cuadro 7.** Análisis de varianza para la capacidad antioxidante.

| <b>Fuente</b>   | <b>GI</b> | <b>SC</b> | <b>MC</b> | <b>F</b> | <b>P</b> |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| Regresión       | 9         | 24181805  | 2686867   | 8.89     | 0.001    |
| Lineal          | 3         | 6751573   | 2250524   | 7.45     | 0.007    |
| Cuadrático      | 3         | 10846351  | 3615450   | 11.96    | 0.001    |
| Interacción     | 3         | 6583881   | 2194627   | 7.26     | 0.007    |
| Error residual  | 10        | 3022645   | 302265    |          |          |
| Falta de ajuste | 5         | 2371031   | 474206    | 3.64     | 0.091    |
| Error puro      | 5         | 651614    | 130323    |          |          |
| Total           | 19        | 27204450  |           |          |          |

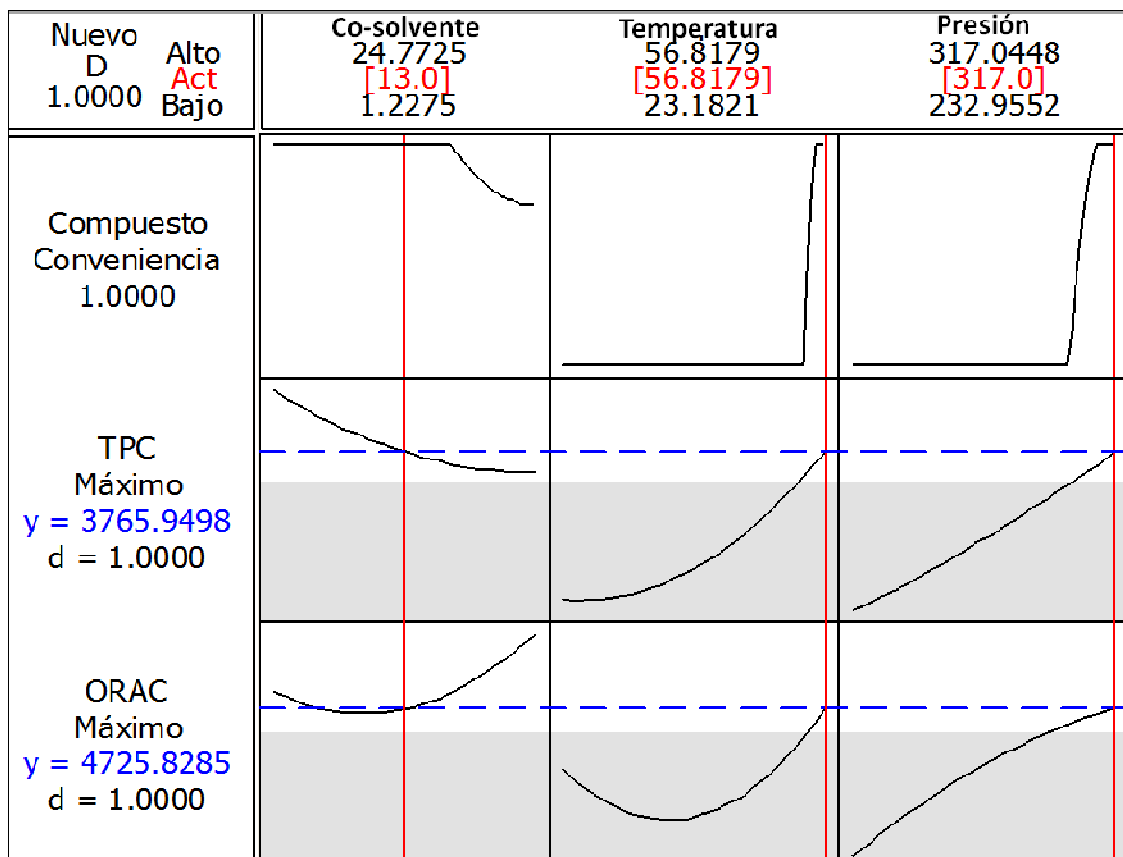
**R<sup>2</sup> = 0.8889**

## 6.2 Condiciones óptimas de extracción

Los CF son los compuestos bioactivos mayoritarios en la pulpa de berenjena. Debido a que los efectos benéficos a la salud de dichos compuestos han sido atribuidos a su capacidad antioxidante. El propósito de este estudio fue determinar las condiciones que optimizaran los parámetros de extracción, tanto para CF totales como para su capacidad antioxidante. Las condiciones óptimas de extracción se obtuvieron usando un DCCR y MSR por medio de la sobreposición de las gráficas de contorno de TPC y ORAC (**Fig 3**). Se identificó a la temperatura de 55-60 °C, presión de 310-320 bar y co-solvente de 10-15 % como las condiciones óptimas de extracción. La predicción de las condiciones óptimas para ambas respuesta se llevó a cabo por medio de la función de deseabilidad (**Fig 4**) en una escala del 0 al 1, en donde 0 representa una respuesta no deseable y 1 es la respuesta más deseable. Se obtuvo un valor de deseabilidad de 1 para TPC y ORAC (**Fig 4**). En las condiciones arriba mencionadas y con una deseabilidad de 1, las respuestas resultan en valores óptimos teóricos de TPC de 3765.9498 mg CAE/100g de extracto y de 4725.8285  $\mu\text{mol TE/g}$  de extracto para ORAC. Bajo condiciones reales de operación el experimento con 56.8°C, 317 bar y 13 % de co-solvente resultó en valores de 4781.92 mg CAE/100g extracto para TPC y 6027.49  $\mu\text{mol TE/g}$  de extracto para ORAC, las cuales fueron mayores.



**Fig 3.** Condiciones de extracción para la región óptima de TPC y ORAC.



**Fig 4.** Función de deseabilidad para TPC y ORAC.



## 6.2. Efecto de los factores de extracción sobre la variable de respuesta contenido total de fenoles

En los últimos años, se han estudiado ampliamente los efectos benéficos a la salud de los CF presentes en berenjena, entre los que podemos destacar su acción como agentes antihipolipidémicos, antiangiogénicos, hepatoprotectores y antioxidantes (Akanitapichat *et al.*, 2010; Luthria y Mukhopadhyay 2006; Matsubara *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2009; Todaro *et al.*, 2009). Debido a esto, es evidente el potencial que representa la aplicación de estos compuestos en la industria alimentaria y farmacéutica. En el presente estudio, se extrajeron los CF en pulpa de berenjena con CO<sub>2</sub>-SC bajo condiciones optimizadas. El modelo de predicción obtenido para el contenido total de fenoles (TPC) se muestra a continuación:

$$(Ec. 1) \quad Y_1 = 623.55 + 281.17X_1 + 184.45X_2 + 253.24X_3 + 157.91X_1^2 + 328.86X_2^2 + 62$$

Los resultados obtenidos para la variable de respuesta TPC se muestran en el cuadro 6, solo los términos etanol (p=0.008) y presión (p=0.013) fueron significativos de manera lineal, sin embargo; el término temperatura obtuvo un valor de p=0.053 por lo que también podría estar afectando el proceso en la extracción de fenoles. En la misma variable, solo la temperatura tuvo un efecto significativo de manera cuadrática con valor de p=0.002. Además las interacciones de etanol-temperatura (p≤0.001) y temperatura-presión (p=0.002) fueron significativas durante el proceso de extracción. Estos resultados indican un efecto sinérgico entre el co-solvente y temperatura y entre temperatura y presión en el contenido total de fenoles en los extractos.

Las superficies de respuesta (gráficas en tres dimensiones) para las interacciones que resultaron significativas se obtuvieron mediante la ecuación 1 para predicción de TPC, la respuesta se presentó en función a dos factores, manteniendo el tercer factor a un nivel medio constante.

En la Figura 6 se presenta la interacción de temperatura y presión cuando etanol se mantiene constante al 13%. En esta gráfica puede apreciarse que el contenido total de fenoles ( $Y_1$ ) aumenta cuando tenemos valores de temperatura de 56.8 °C y entre el rango de presión de 225-325 bar, presentando su valor más alto a 325 bar con un contenido de fenoles totales de 1798.53 mg CAE/100g. El aumento de fenoles por acción de la presión puede deberse a la modificación del parámetro de solubilidad del CO<sub>2</sub>-SC, el cual está íntimamente relacionado con la presión. Se sabe que al incrementar la presión se tienen mayores rendimientos de compuestos de interés cuando hablamos de extracción con FSC, ya que el aumento en este parámetro provoca una disminución de las distancias intermoleculares durante el proceso, favoreciendo el contacto del CO<sub>2</sub>-SC con el analito de interés y por ende, favoreciendo su solubilización. Un caso similar fue el encontrado por Yilmaz *et al.* (2011) quienes evaluaron los efectos de los parámetros de extracción sobre la obtención de proantocianidinas y ácidos fenólicos en semillas de uva. Sus resultados mostraron que a 300 bar, 50 °C y 20% de etanol tuvieron la mayor extracción de ácido gálico, epigallocatequina y epigallocatequina galato. Sin embargo, bajo estas condiciones la cantidad de epicatequina galato disminuyó, argumentando que puede deberse a la susceptibilidad de dicho compuesto a la degradación por la temperatura.

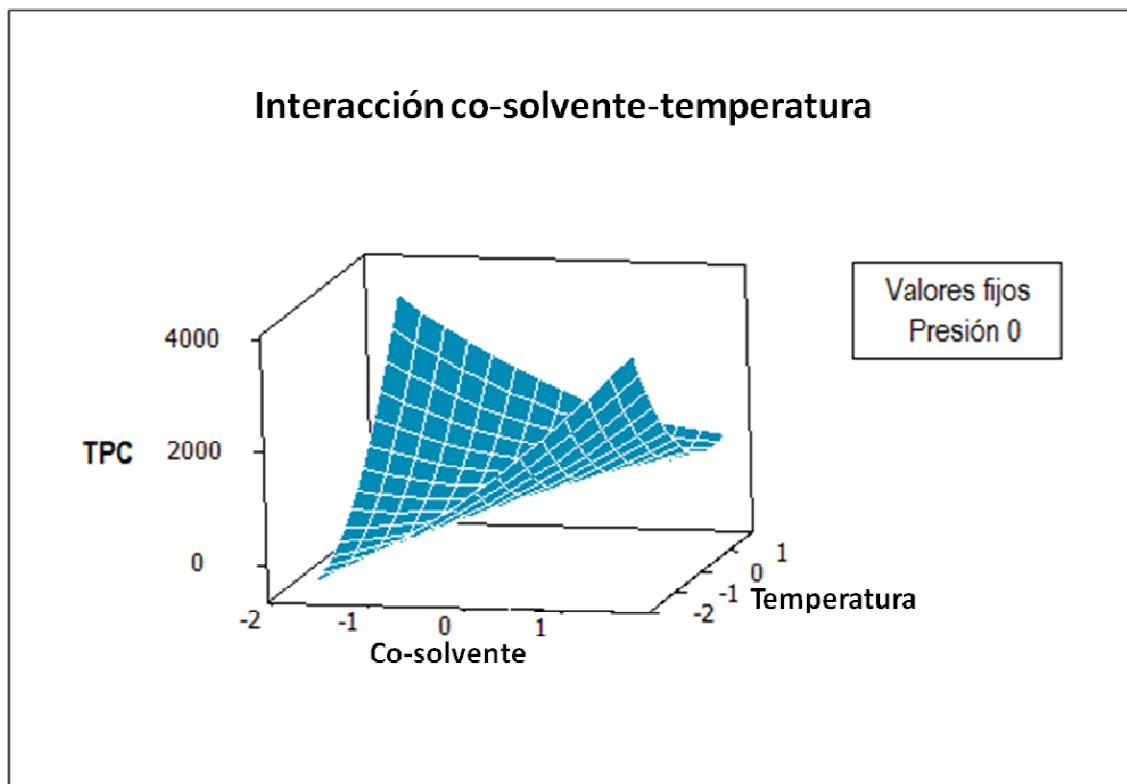
Un gran número de estudios mencionan que un aumento en la temperatura trae consigo una disminución en el contenido de fenoles extraídos. Usualmente, esta disminución es explicada por la degradación de los compuestos, y por la acción de la temperatura sobre la presión del FSC. Cuando la temperatura aumenta, se afecta la solubilidad de los compuestos de interés debido a una disminución en la densidad del CO<sub>2</sub>-SC que resulta en una separación espacial del analito y el solvente. Sin embargo, en las superficies de respuesta del efecto

combinado de temperatura con co-solvente y presión (Figura 5 y 6) pueden apreciarse las tendencias al aumento de TPC en niveles altos de temperatura.

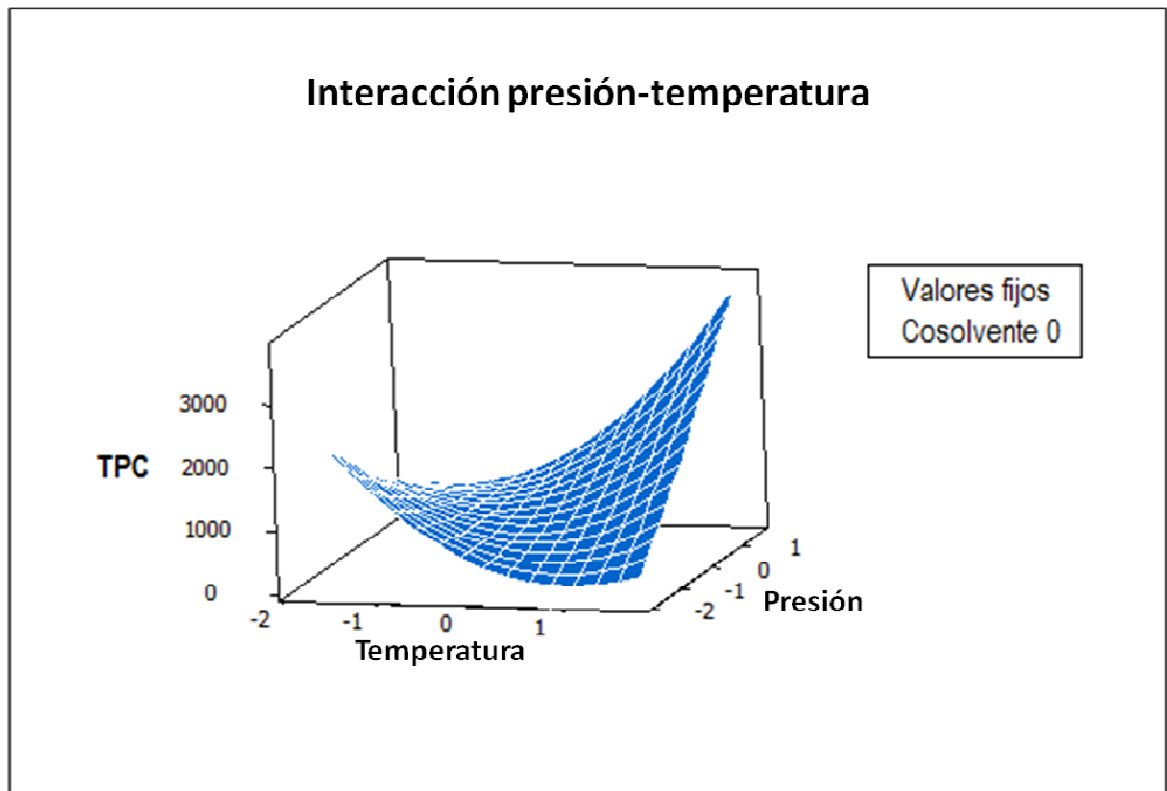
En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo son contradictorios con lo mencionado anteriormente, ya que el contenido total de fenoles tiende a aumentar cuando se aumenta la temperatura en sus efectos combinados. Dicho comportamiento puede deberse al rompimiento o debilitación de interacciones entre ácidos fenólicos y la matriz presente en la pulpa de berenjena causado por un aumento de la temperatura, ya que los mayores valores de fenoles totales se encuentran a 56.8 °C. Algunos autores mencionan que la temperatura tiene un efecto directo sobre este tipo de interacciones (puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, enlaces covalente, entre otros) y Palma y Taylor (1999) reportan que a partir de 50 °C dichas interacciones pueden empezar a debilitarse y romperse.

La extracción de fenoles totales también fue afectada significativamente por la interacción de presión y co-solvente (Figura 7). Los valores altos de TPC que incrementaron al aumentar el contenido de co-solvente eran esperados debido a que los CF son moléculas polares y pueden ser más fácilmente extraídos con solventes polares como el etanol (Bimakr *et al.*, 2011). No obstante, algunos autores reportan que no se requieren altos porcentajes de etanol para mejorar la extracción. Yilmaz *et al.* (2011) encontraron que al añadir 5% de etanol como co-solvente la extracción fue significativamente mejorada, lo cual concuerda con este estudio en el que el nivel más bajo de co-solvente usado en el proceso fue de 6%.

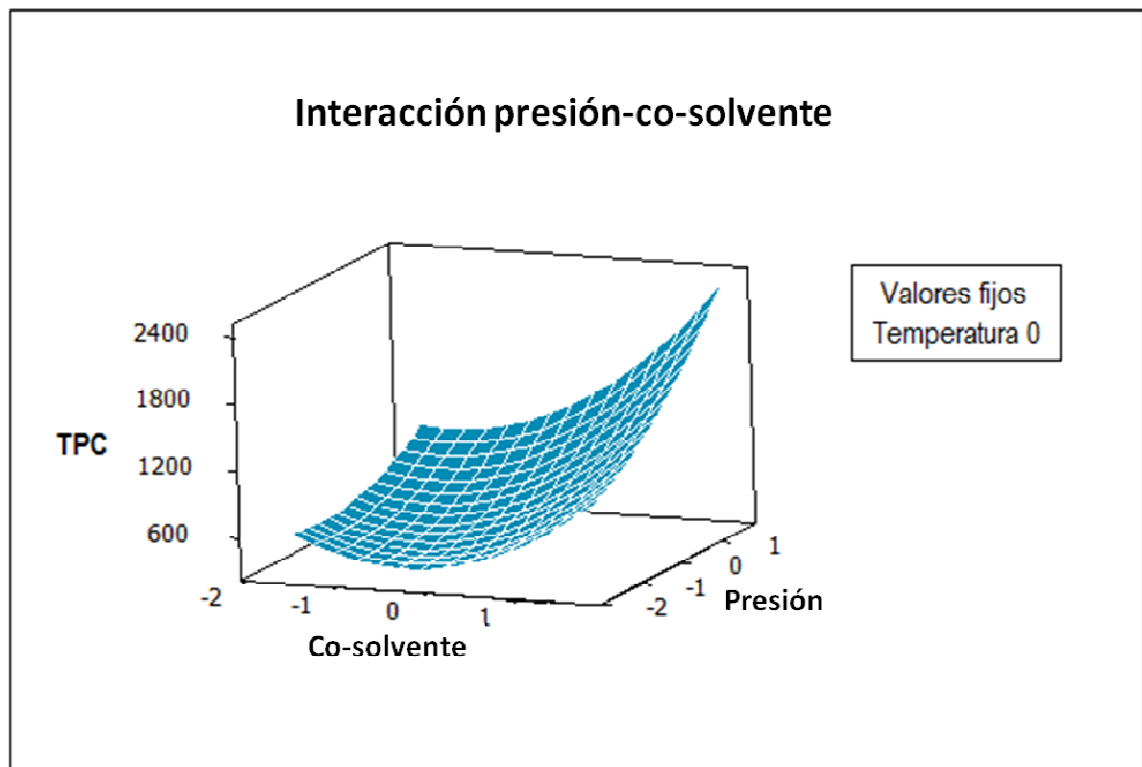
Los parámetros de extracción temperatura (30-50 °C), presión (250-300 bar) y co-solvente (6-20%) utilizados tuvieron gran influencia sobre la extracción de CF. El factor que tuvo mayor efecto fue el porcentaje de co-solvente ( $p=0.008$ ). Estos resultados sugieren que el proceso de extracción puede ser mejorado cambiando la polaridad del CO<sub>2</sub>-SC e incrementando su afinidad por los CF. Además, la temperatura y la presión tuvieron un rol importante manteniendo el parámetro de solubilidad del CO<sub>2</sub>-SC el cual define la solubilización y extracción de los CF.



**Fig 5.** Gráfica de contornos y superficie de respuesta para el efecto combinado de co-solvente y temperatura sobre el contenido total de fenoles en el extracto de pulpa de berenjena.



**Fig 6.** Gráfica de superficie de respuesta para el efecto combinado de presión y temperatura sobre el contenido total de fenoles en el extracto de pulpa de berenjena.



**Fig 7.** Gráfica de superficie de respuesta para el efecto combinado de presión y co-solvente sobre el contenido total de fenoles en el extracto de pulpa de berenjena.

### 6.3. Efecto de los factores de extracción sobre la variable de respuesta capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante es la capacidad que tienen ciertas moléculas para prevenir, inactivar o reparar el daño causado por los radicales libres (Prasad *et al.*, 2011). Diversos estudios han mostrado que los ácidos fenólicos presentes en pulpa de berenjena poseen una alta capacidad antioxidante e importantes efectos benéficos a la salud. Debido a esto, el modelo de predicción ( $Y_2$ ) en la optimización fue usado para maximizar la capacidad antioxidante en los extractos obtenidos.

$$(Ec. 2) \quad Y_2 = 1832.7 + 508.9X_1 - 400.3X_2 + 274.2X_3 + 437.1X_1^2 + 737.1X_2^2 - 166.3X_3^2 -$$

Para la variable de respuesta ORAC, los términos cuadráticos de etanol ( $p=0.013$ ) y temperatura ( $p\leq 0.001$ ) resultaron significativos. El etanol ( $p=0.007$ ) y la temperatura ( $p=0.023$ ) afectaron significativamente la capacidad antioxidante de manera lineal y todas las interacciones entre los factores etanol, temperatura y presión resultaron significativas. Estos resultados indican un efecto sinérgico entre los factores del proceso para la capacidad antioxidante. Las gráficas en 3D para las tres interacciones se obtuvieron usando la ecuación 2, la respuesta es presentada en función a dos factores y manteniendo al tercero en un nivel constante medio.

Los CF son los compuestos mayoritarios en la pulpa de berenjena y los responsables de la capacidad antioxidante. Las tendencias en las gráficas de superficie para ORAC concuerdan con las encontradas para TPC. En este sentido, se utilizó el valor de Pearson para correlacionar los resultados de ORAC con los obtenidos para TPC. Ambas variables de respuesta presentan una correlación positiva ( $p=0.002$ ) y una  $R^2$  de 0.638 lo que sugiere que el 63.8% de la variación

de ORAC está siendo explicada por TPC. La correlación linear positiva entre el contenido de fenoles y capacidad antioxidante ya ha sido observada por otros autores (Cai *et al.*, 2004; Ghafoor *et al.*, 2010). De igual manera, podemos observar los comportamientos similares a TPC en las gráficas de superficie 8, 9 y 10 de ORAC.

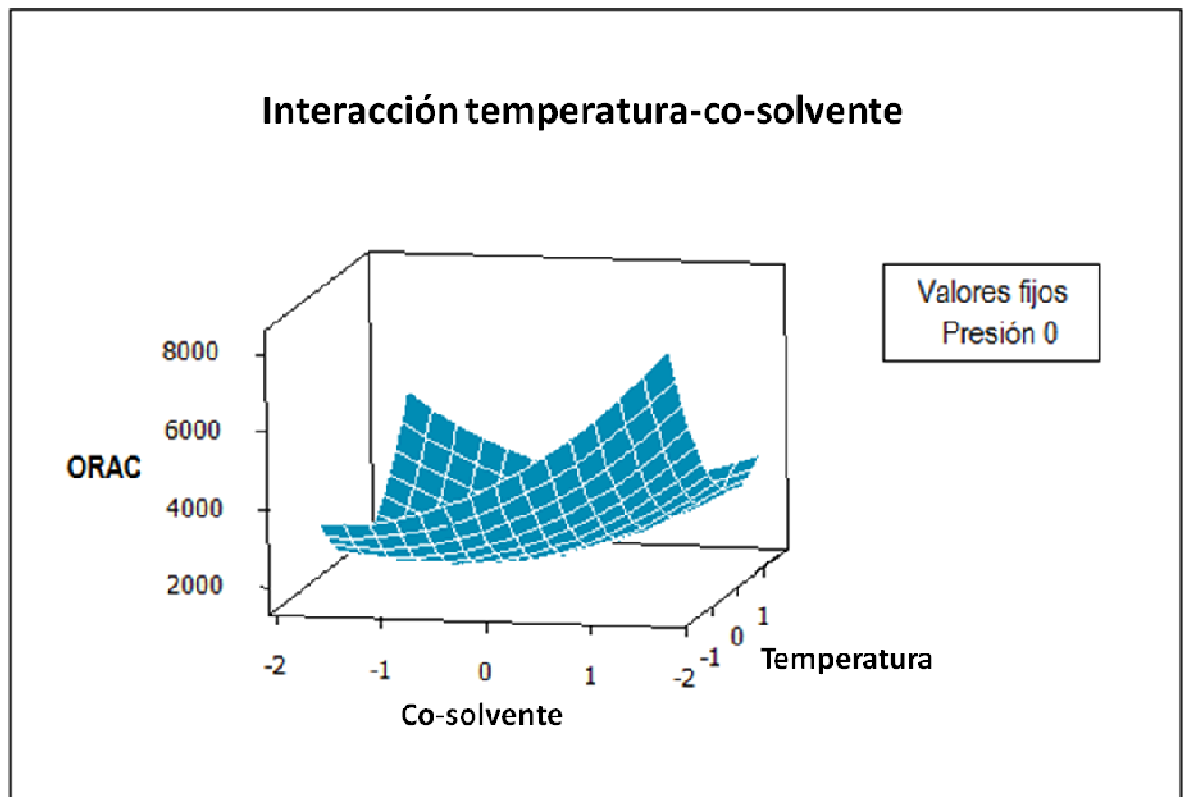
En la Figura 10 se muestra la interacción entre los factores presión y co-solvente, en donde se puede observar un incremento en la capacidad antioxidante al aumentar dichos parámetros de extracción. En el proceso de extracción con CO<sub>2</sub>-SC, el etanol es utilizado como modificador de la polaridad (aumentándola), ya que el CO<sub>2</sub> es un solvente no polar y la mayoría de los compuestos con actividad antioxidante son polares, de esta manera; se mejora la afinidad del CO<sub>2</sub>-SC-etanol por dichos antioxidantes y son extraídos en mayor medida (Herrero *et al.*, 2010; Yilmaz *et al.*, 2011). El etanol ha sido muy utilizado en la extracción con FSC de antioxidantes en materiales vegetales ya que es un solvente reconocido como seguro para aplicaciones alimentarias (Ghafoor *et al.*, 2010; Yilmaz *et al.*, 2011). Aunado a esto, es bien sabido que la presión tiene un gran efecto sobre el parámetro de solubilidad del CO<sub>2</sub>-SC incrementando la extracción de compuestos de interés, específicamente en este caso, los compuestos polares.

Los resultados de este trabajo muestran que la capacidad antioxidante del extracto de pulpa de berenjena empieza a incrementarse cuando el porcentaje de etanol se incrementa del 15 al 30% y con un aumento en la presión de 225 a 325 bar con un valor máximo de 5450  $\mu\text{mol TE/g}$  extracto (Figura 10). Así mismo, también se encontró una tendencia a aumentar de 15-30% de etanol, 28-40 °C con una presión de 275, obteniendo valores de 6430  $\mu\text{mol TE/g}$  extracto (Figura 8). Estos resultados concuerdan con los reportados por Bimakr *et al.* (2011) en extractos de flavonoides a partir de hojas de menta, ellos encontraron que el aumento en la presión y en la cantidad de co-solvente provoca un incremento en la capacidad antioxidante del extracto. De la misma manera, Martínez-Correa *et al.* (2011) observaron un incremento en la capacidad antioxidante al aumentar la presión y la cantidad de etanol en extractos de CF obtenidos a partir de *Eugenia uniflora*. Este comportamiento observado puede explicarse por el hecho de que los

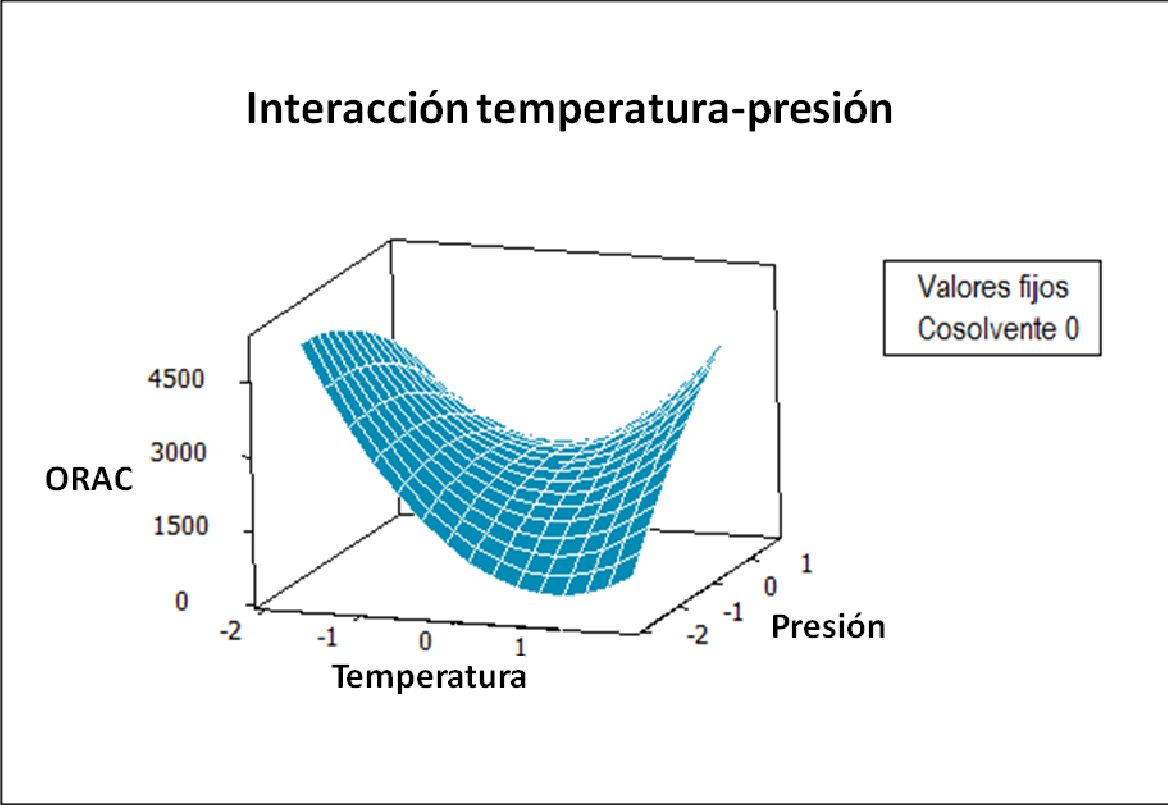


compuestos polares presentes en la matriz pueden ser más fácilmente extraídos con solventes de mayor polaridad.

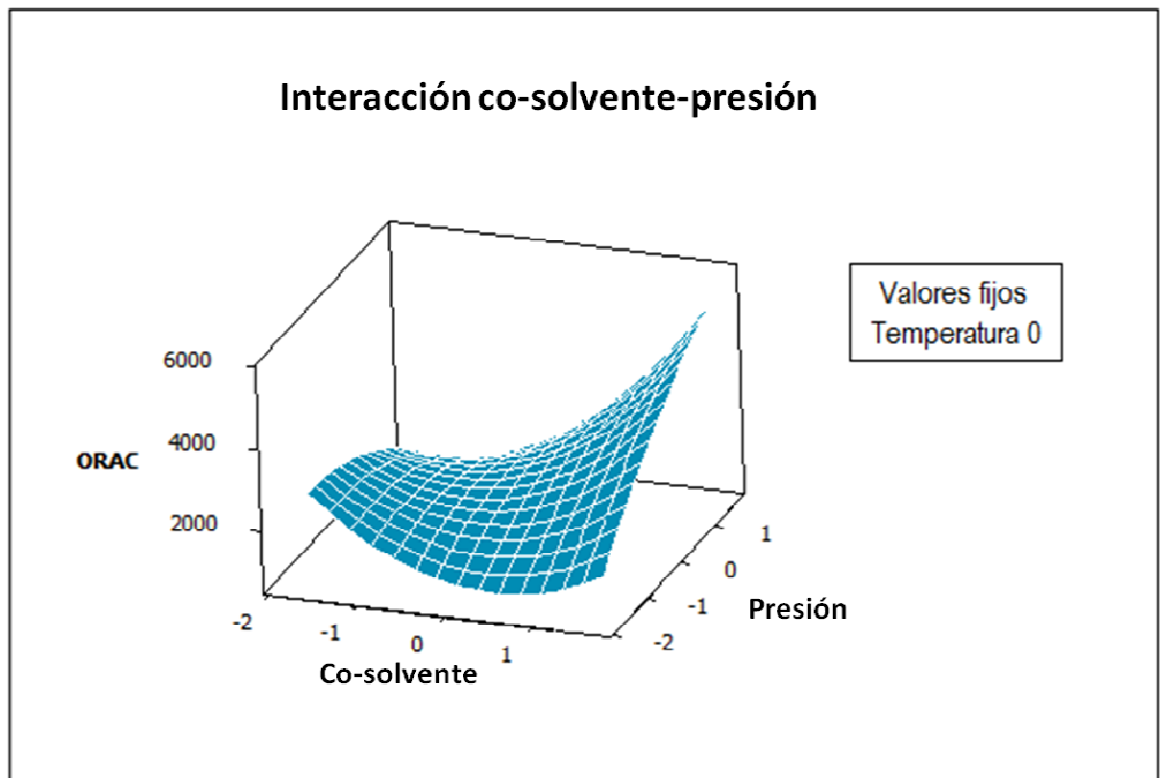
Liyana-Pathirana y Shahidi (2005) reportaron que cuando se utiliza etanol como co-solvente es posible obtener una mayor capacidad antioxidante en comparación con otros solventes acuosos. Además, también reportan que la concentración de etanol contribuye significativamente a dicha capacidad en los extractos; comportamiento observado también por Pompeu *et al.* (2009) y Kiassos *et al.* (2009). Aunado al efecto del etanol, la presión afectó significativamente la extracción de compuestos antioxidantes, ya que el aumentar la presión se favorece la interacción entre los compuestos en la matriz y el CO<sub>2</sub>-SC, provocando una mayor solubilidad de éstos (Figura 9 y 10). El incremento en la extracción de antioxidantes por efecto de la presión ya ha sido reportado por Yilmaz *et al.* (2011) en proantocianidinas de semillas de uva, por Vatai *et al.* (2009) en fenoles de cerezas y por Prasad *et al.* (2011) en fenoles a partir de *Mangifera pajang*.



**Fig 8.** Gráfica de superficie de respuesta para el efecto combinado de temperatura y co-solvente sobre la capacidad antioxidante en el extracto de pulpa de berenjena.



**Fig 9.** Gráfica de superficie de respuesta para el efecto combinado de temperatura y presión sobre la capacidad antioxidante en el extracto de pulpa de berenjena.



**Fig 10.** Gráfica superficie de respuesta para el efecto combinado de co-solvente y presión sobre la capacidad antioxidante en el extracto de pulpa de berenjena.

#### **6.4. Fenoles totales y capacidad antioxidante en la extracción supercrítica y con metanol 80**

Varios métodos han sido evaluados para mejorar la obtención de CF en pulpa de berenjena, entre los que pueden destacarse la sonicación o ultrasonido, agitación y reflujo de solventes, entre otros (Luthria y Mukhopadhyay 2006). Sin embargo, solo se han usado para mejorar el método de extracción con solventes, que es considerado como el método de extracción convencional y al cual se le han atribuido efectos adversos en el medio ambiente. En el presente trabajo evaluamos la extracción con CO<sub>2</sub>-SC como una alternativa al método convencional comparando los rendimientos de extracción de fenoles de ambos.



Los resultados muestran que la extracción supercrítica logró ser más eficaz en la extracción de CF que la extracción con metanol al 80%, con valores de 4,781.92 y 3,813.74 mg CAE/100g de extracto respectivamente. Estos resultados sugieren que la ESC presentó una mayor selectividad y solubilidad de estos compuestos que la extracción con metanol al 80%. Como se ha mencionado en párrafos anteriores el parámetro de solubilidad del CO<sub>2</sub>-SC puede incrementarse variando los parámetros de presión y temperatura. Además, el proceso de extracción fue mejorado con etanol para obtener una mayor selectividad por los CF (polares). La diferencia en el contenido de fenoles totales puede ser explicado por el rompimiento de interacciones entra la matriz y los CF en la pulpa de berenjena. Saura Calixto (2010) menciona que en la extracción con solventes no pueden romperse dichas interacciones, por lo que una parte significativa de los CF permanece remanente en la matriz aún después de su proceso de extracción.

Pinelo *et al.* (2007) obtuvieron resultados similares a los encontrados en este trabajo, ellos realizaron un estudio comparativo de extracción de fenoles por ESC y solventes en el orujo de la uva, utilizando etanol y metanol como solventes y como co-solventes en la ESC. Ellos mencionan que las temperaturas elevadas

usadas en la ESC pueden ser capaces de romper la estructura glicosilada de los CF permitiendo su desprendimiento de la matriz y provocando su solubilidad. Este efecto positivo de la temperatura en la extracción de fenoles ya ha sido reportado para otras matrices vegetales como pieles, tallos y semillas de uva blanca y roja (Pinelo *et al.*, 2005).

La capacidad antioxidante de los extractos supercríticos fue mayor que en los obtenidos con metanol 80% con resultados de 6027.48 y 380.7952  $\mu\text{mol TE/g}$  de extracto. Este comportamiento era esperado debido a que en otros estudios se muestra una correlación positiva entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante en diferentes tipos de frutas y hortalizas (Corral-Aguayo *et al.*, 2008; Mahattanatawee *et al.*, 2006). De esta manera, si el extracto supercrítico tiene un mayor contenido de fenoles, mayor será su capacidad antioxidante. Además, se ha descrito que la ESC es un método útil ya que permite establecer parámetros en los cuales el CF sea solubilizado y no sufra alguna degradación (Yilmaz *et al.*, 2011). Debido a esto, dichos compuestos no pierden sus propiedades bioactivas, como la capacidad antioxidante.

**Cuadro 8.** Comparación de métodos de extracción en las respuestas TPC y

|                                       | <b>Extracción con CO<sub>2</sub><br/>supercrítico</b>                             | <b>Extracción con<br/>Metanol 80 %</b>  |
|---------------------------------------|---|---|
|                                       |  |  |
| Tiempo (h)                            | 1   | 24  |
| Fenoles totales<br><b>mg CAE/100g</b> | 11,148.92   | 3,813.76  |
| ORAC<br><b>μMTE/g</b>                 | 6,027.49  | 380.79  |

ORAC.

## **6.5. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD**

Existe una gran cantidad de evidencia acerca de los beneficios a la salud que poseen los CF. El fruto de berenjena es conocido por tener un alto contenido de CF antioxidantes. En el presente trabajo hemos evaluado el perfil de CF en los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub>-SC y metanol 80%. Esto, con el objetivo de conocer los antioxidantes fenólicos que se encuentran presentes en los extractos y determinar la efectividad de los métodos para su extracción. El cuadro 9 muestra los compuestos identificados por su tiempo de retención y longitud de máxima absorción para cada uno de los métodos.

De los picos mostrados en el cromatograma del extracto supercrítico (Figura 11), se pudieron identificar únicamente 10 CF, de los cuales de acuerdo a su tiempo de retención y a los espectros de absorción correspondieron a (1) Ác. Gálico, (2) Ác. Protocateico, (3) Ác. 2-hidroxicinámico, (4) Ác. vanílico, (5) Ác. Cafeico, (6) Ác. Hidroxibenzoico, (7) Ác. 3-4 hidroxicinámico, (8) Epicatequina, (9) Ác. Ferúlico, (10) Ác. Elágico. En un estudio realizado por Stommel y Whitaker (2003) se lograron identificar 14 CF en pulpa de berenjena, los cuales fueron agrupados en 5 clases; isómeros de ácido clorogénico, isómeros de ácido isoclorogénico, amidas conjugadas de ácido hidroxicinámico, conjugados no identificados de ácido cafeico e isómeros acetilados de ácido clorogénico. Sin embargo, utilizaron un HPLC-MS e identificaron a los compuestos por su patrón de ionización, es por eso que lograron identificar conjugaciones de los compuestos.

Los CF se encuentran en sus matrices normalmente como ésteres, acetilados o glucósidos (Robbins y Bean 2004). Debido a esto, utilizamos una técnica de hidrólisis para liberar a los ácidos y poder identificarlos por su espectro de absorción en el HPLC-DAD. Winter y Herrmann (1986) encontraron que los CF mayoritarios en la pulpa de berenjena son los derivados del ácido cinámico, entre



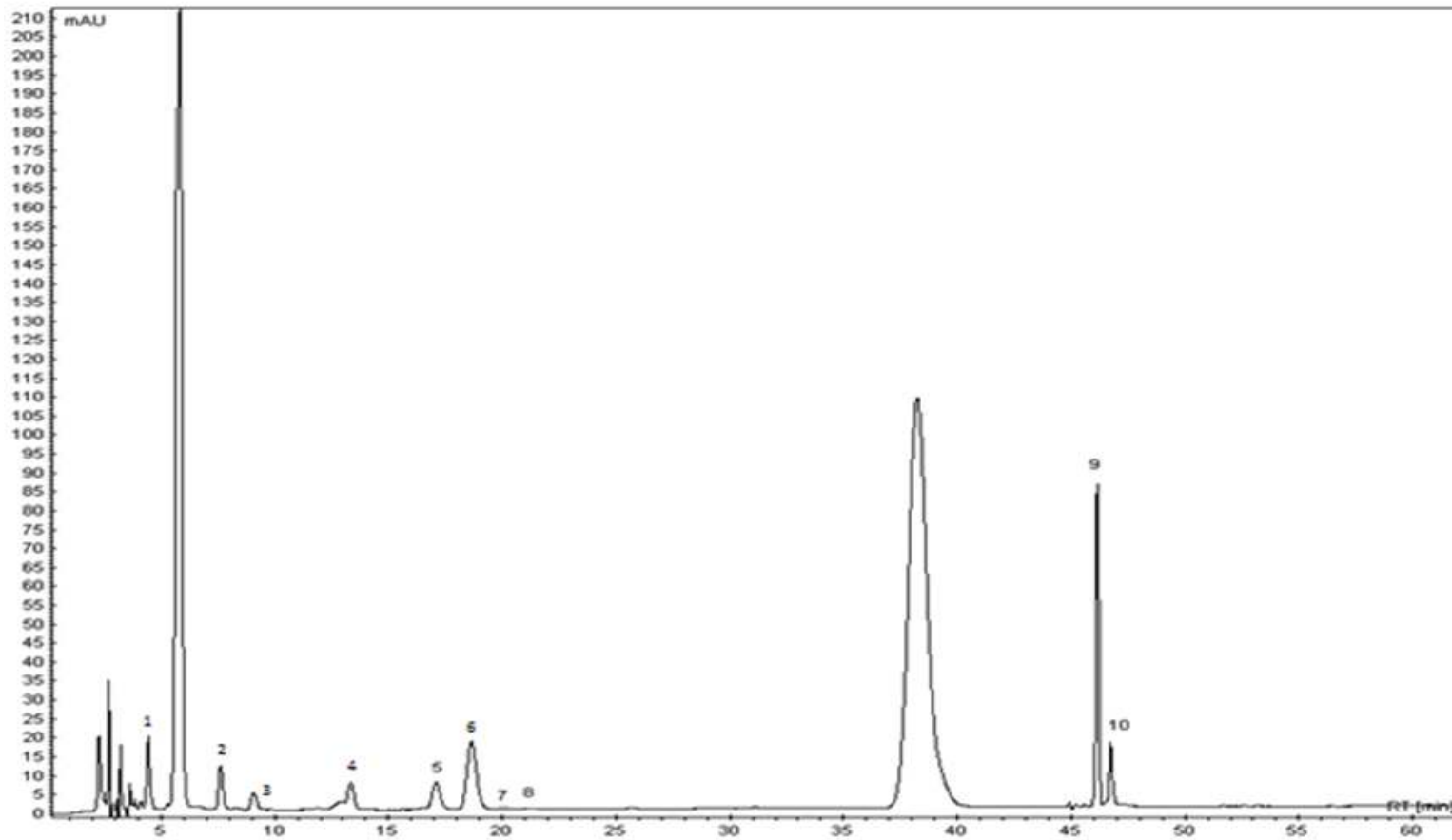
los que podemos encontrar al ácido cumárico, cafeico, ferúlico y clorogénico, algunos de los cuales se lograron identificar en los extractos supercríticos.

En los extractos supercríticos se lograron identificar 10 CF, mientras que en los extractos metanólicos solo fue posible identificar 6. Sin embargo, en los extractos supercríticos se identificaron los compuestos: ác. hidroxibenzoico, ác. 3-4 hidroxicinámico, epicatequina, ác. ferúlico y ác. elágico, los cuales no fue posible identificar en los extractos metanólicos. En un estudio llevado a cabo por Arranz *et al.* (2010) clasificaron a los CF en las frutas y vegetales como extraíbles y no extraíbles, debido a las interacciones o enlaces que puedan formar con la matriz vegetal. Ellos encontraron que los ácidos ferúlico, p-hidroxibenzoico, catequina, galocatequina, gálico y cafeico son los principales CF no extraíbles, algunos de los cuales fueron identificados en los extractos supercríticos de pulpa de berenjena. Es bien conocido que la variación en los parámetros de extracción supercrítica, presión y temperatura puede lograr el rompimiento de enlaces entre los CF y su matriz (Yilmaz *et al.*, 2011). Debido a esto, fue posible identificar una mayor cantidad de compuestos en los extractos supercríticos que en los metanólicos. Arranz *et al.* (2010) mencionan que las interacciones matriz-fenol no pueden ser debilitadas por el simple contacto con un solvente líquido, en este caso metanol al 80%.

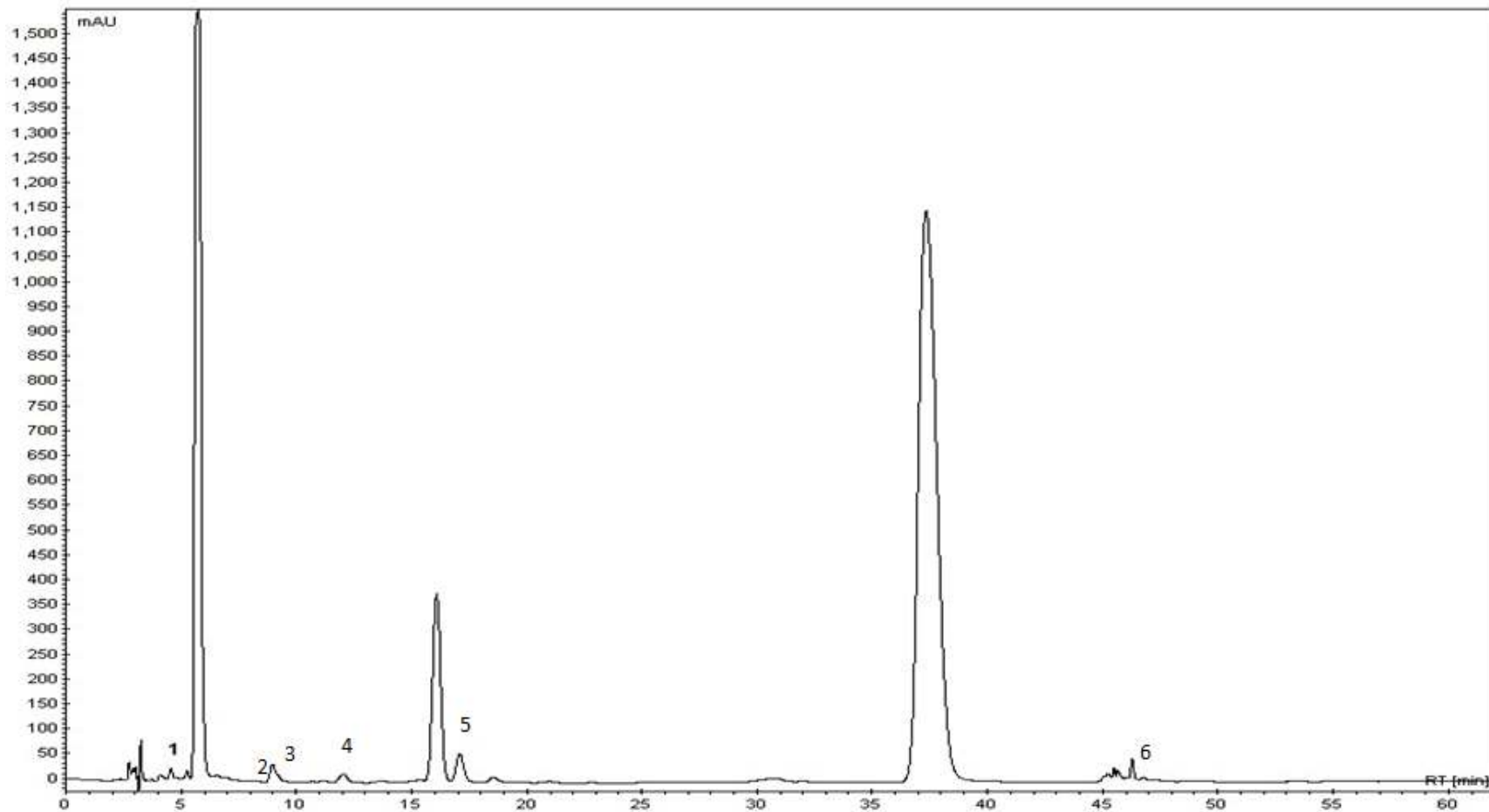
**Cuadro 9.** Compuestos fenólicos identificados en extractos de pulpa de berenjena obtenidos por CO<sub>2</sub> supercrítico y metanol al 80%.

| Extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico |          |       |                 | Extracción con Metanol 80 % |          |       |                 |
|---|----------|-------|-----------------|-----------------------------|----------|-------|-----------------|
| Compuesto                                   | Tr (min) | λ max | mg/ g extracto  | Compuesto                   | Tr (min) | λ max | mg/ g extracto  |
| Ác. gálico                                  | 4.43     | 272   | 0.5116 ± 0.033  | Ác. Gálico                  | 4.53     | 272   | 2.6434 ± 0.15 1 |
| Ác. protocateico                            | 7.64     | 260   | 11.9525 ± 1.214 | Ác. protocateico            | 8.75     | 310   | 0.0934 ± 0.001  |
| Ác. 2-hidroxicinámico                       | 12.93    | 325   | Trazas          | Ác. 2-hidroxicinámico       | 9.31     | 323   | Trazas          |
| Ác. vanílico                                | 13.21    | 255   | 3.3368 ± 0.075  | Ác. Vanílico                | 11.45    | 233   | 3.9843 ± 0.115  |
| Ác. cafeico                                 | 18.51    | 322   | 0.1118 ± 0.001  | Ác. Cafeico                 | 16.79    | 323   | 1.0153±0.044    |
| Ác. hidroxibenzoico                         | 21.16    | 310   | 0.1936 ± 0.015  | Miricetina                  | 46.72    | 277   | Trazas          |
| Ác. 3,4- hidroxicinámico                    | 13.03    | 258   | 2.4736 ± 0.016  |                             |          |       |                 |
| Epicatequina                                | 31.07    | 233   | 2.4007 ± 0.045  |                             |          |       |                 |
| Ác. ferúlico                                | 46.15    | 323   | 148.38±3.370    |                             |          |       |                 |
| Ác. elágico                                 | 46.76    | 253   | 0.2463 ± 0.004  |                             |          |       |                 |

Los valores corresponden a la media de 9 repeticiones ± error estándar.



**Fig 11.** Cromatograma de separación e identificación de los principales ácidos fenólicos por HPLC-DAD en extractos supercríticos de pulpa de berenjena. Los picos están numerados de acuerdo a su tiempo de retención: (1) Ác. gálico, (2) Ác. protocateico, (3) Ác. 2-hidroxicinámico, (4) Ác. vanílico, (5) Ác. cafeico, (6) Ác. hidroxibenzoico, (7) Ác. 3,4-hidroxicinámico, (8) Epicatequina, (9) Ác. ferúlico y (10) Ác. elágico.



**Fig 12.** Cromatograma de separación e identificación de los principales ácidos fenólicos por HPLC-DAD en extractos metanólicos de pulpa de berenjena. Los picos están numerados de acuerdo a su tiempo de retención: (1) Ácido gálico, (2) Ácido protocateico, (3) Ácido 2-hidroxicinámico, (4) Ác. vanílico, (5) Ácido cafeico y (6) Miricetina.

En el extracto supercrítico se encontró que el compuesto mayoritario fue el ácido ferúlico, seguido de ác. protocateico, vanílico y 3-4 hidroxicinámico, respectivamente. Por otro lado, en el extracto metanólico, el compuesto mayoritario fue ácido vanílico, seguido del ác. gálico, cafeico y protocateico. En los cromatogramas de las figuras 11 y 12 se pueden observar dos picos con un tiempo de retención de 5.6 y 36.3 respectivamente, los cuales corresponden a los compuestos mayoritarios en ambas muestras; sin embargo, no fue posible identificarlos. Para poder identificar los compuestos con mayor precisión se necesitaría un análisis más extensivo de las muestras por medio de HPLC-MS el cual nos brinda el patrón de ionización de cada compuesto y se considera como una huella digital de estos.

Como se describió con anterioridad, el extracto supercrítico contenía mayor contenido de CF y mayor capacidad antioxidante que el obtenido con metanol al 80% (Cuadro 8). La capacidad antioxidante se ha atribuido principalmente a la presencia de CF, los cuales son capaces de inactivar radicales libres, donando átomos de hidrógeno o electrones, o quelando cationes metálicos (Balasundram *et al.*, 2006). La estructura de los CF es determinante para la capacidad antioxidante y en el caso de los ácidos fenólicos, dicha capacidad depende del número y posición de los grupos hidroxilos en la molécula (Rice-Evans *et al.*, 1996). La capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos se incrementa con el grado de hidroxilación, como es el caso del ácido gálico (Cuadro 10), que muestra una alta capacidad antioxidante. Sin embargo, la sustitución de los grupos hidroxilos en la posición 3- y 5- con un grupo metoxilo reduce tal capacidad (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Está bien documentado, que los derivados del ác. hidroxicinámico poseen mayor capacidad antioxidante que los derivados del ác. hidroxibenzoico (Andreasen *et al.*, 2001). La mayor capacidad de estos puede deberse al grupo  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  que asegura una mayor habilidad para donar átomos de Hidrógeno que el grupo  $-\text{COOH}$  de los ácidos hidroxibenzoicos (Rice-Evans *et al.*, 1996). Las diferencias en la capacidad antioxidante del extracto supercrítico y metanólico pueden deberse al tipo de compuestos y su concentración en el

extracto, ya que la mayoría de los compuestos extraídos con CO<sub>2</sub>-SC pertenecen al grupo de los ácidos cinámicos por el contrario de los extractos metanólicos, como puede observarse en el cuadro 10.

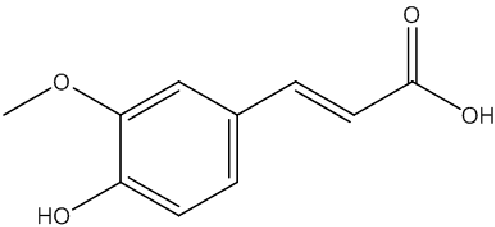
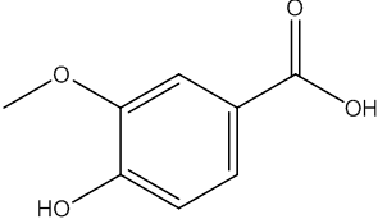
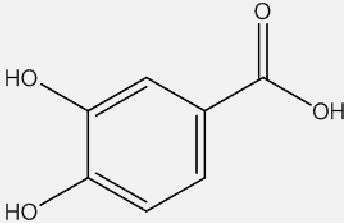
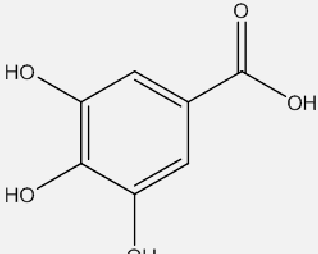
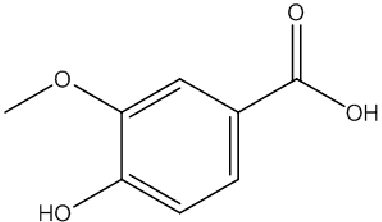
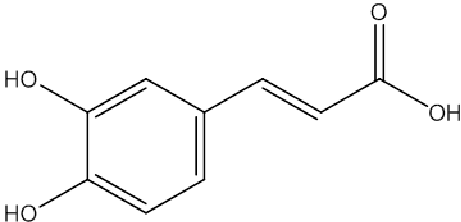
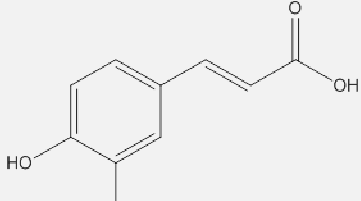
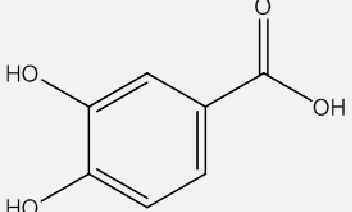
Mediante una identificación tentativa de los CF encontrados en los extractos de pulpa de berenjena, pudimos observar que dichos extractos poseen un alto valor en términos de compuestos benéficos a la salud. El extracto supercrítico mostró una mayor cantidad de compuestos en comparación con el extracto obtenido mediante el método convencional, lo que sugiere un mayor campo de aplicación y posibles usos. En el área de análisis y extracción de compuestos en alimentos, la tecnología de extracción con FSC ya ha sido comparada con otros métodos como la extracción clásica con solventes (Bimakr *et al.*, 2011), extracción soxhlet (Goli *et al.*, 2005; Grigonis *et al.*, 2005), hidrodestilación (Guan *et al.*, 2007; Hattab *et al.*, 2007), extracción sólido-líquido (Pinelo *et al.*, 2007), así como con la extracción con fluidos subcríticos (Hawthorne *et al.*, 2000).

Además de las ya demostradas ventajas de la extracción supercrítica con respecto a otras tecnologías, como el bajo consumo de solventes orgánicos y una alta selectividad (Herrero *et al.*, 2010). La extracción con FSC ha mostrado proveer de extractos con mayores rendimientos en tiempos muy reducidos, generalmente de 1-3 horas (Cavero *et al.*, 2006; Egydio *et al.*, 2010; Ghafoor *et al.*, 2010; Martínez-Correa *et al.*, 2011; Passos *et al.*, 2010; Vatai *et al.*, 2009). Lo cual, desde un punto de vista de escalamiento industrial, representa muchas ventajas al obtener los mayores resultados en un menor tiempo.

Como se describió en párrafos anteriores, existen varios trabajos en la literatura describiendo los efectos benéficos a la salud de los CF de la pulpa de berenjena. La información derivada de este trabajo acerca del perfil de CF puede ser de utilidad para una futura aplicación de los extractos supercríticos en diversos campos. Sin embargo, se necesitan más estudios enfatizando la actividad biológica de dichos extractos con pruebas *in vitro* e *in vivo*. Una vez que se demuestre en estos sistemas la efectividad de los extractos; es posible trabajar en el diseño de un alimento funcional o nutracéutico con posible uso en humanos. Es evidente que el desarrollo de este tipo de productos requiere de múltiples pasos

antes de poder tener una aplicación. Sin embargo, mediante este estudio se logra dar un paso, al comprobar la efectividad de un método de extracción cuyo uso está permitido para su aplicación en productos de consumo humano.

Cuadro 10. Estructura química de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos supercríticos y metanólicos.

| Extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico  | Extracción con metanol (80%)   |
|--|--|
|  <p data-bbox="513 884 675 919">Ác. ferúlico</p>                |  <p data-bbox="1057 884 1224 919">Ác. vanílico</p>         |
|  <p data-bbox="477 1209 711 1245">Ác. protocateico</p>         |  <p data-bbox="1068 1209 1211 1245">Ác. gálico</p>        |
|  <p data-bbox="509 1535 678 1570">Ác. vanílico</p>            |  <p data-bbox="1062 1535 1224 1570">Ác. cafeico</p>      |
|  <p data-bbox="423 1818 764 1854">Ác. 3,4-hidroxicinámico</p> |  <p data-bbox="1024 1818 1260 1854">Ác. Protocateico</p> |



## 7. Conclusiones

Se optimizó el proceso de ESC para incrementar el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en extractos de residuos de berenjena. La alta correlación del modelo matemático (TPC= 0.8987 y ORAC= 0.8889) indica que es adecuado para optimizar y predecir las respuestas. En general, los tres parámetros de extracción presión, temperatura y etanol, tuvieron un efecto significativo en las variables de respuesta.

Es posible reemplazar el método tradicional de extracción con solventes por un método amigable con el medio ambiente como es la extracción con CO<sub>2</sub>, ya que se obtienen mayores rendimientos y permite conservar las propiedades bioactivas de los compuestos. Los fenoles identificados y cuantificados en el extracto, presentaron una alta capacidad antioxidante, la cual puede contribuir a la reducción de diferentes procesos deteriorativos, como se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo*.

Por lo que se concluye que es posible obtener por ESC extractos ricos en compuestos fenólicos, que podrían utilizarse para el diseño de alimentos funcionales. Sin embargo, se recomienda realizar estudios *in vivo* para demostrar los posibles beneficios potenciales en la salud del consumidor. Con la combinación de distintas disciplinas en este trabajo, fue posible hacer más enriquecedor el estudio y atractivo desde un punto de vista práctico-científico.

## 8. Referencias

- Akanitapichat P, Phraibung K, Nuchklang K & Prompitakkul S. 2010. Antioxidant and hepatoprotective activities of five eggplant varieties. *Food Chem. Toxicol.* 48(10):3017-3021.
- Andreasen MF, Landbo AK, Christensen LP, Hansen Å & Meyer AS. 2001. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 49(8):4090-4096.
- Arranz S, Silván JM & Saura Calixto F. 2010. Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spanish diet. *Molecular Nutrition & Food Research* 54(11):1646-1658.
- Balasundram N, Sundram K & Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99(1):191-203.
- Baysal T, Ersus S & Starmans D. 2000. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\beta$ -carotene and lycopene from tomato paste waste. *J. Agric. Food Chem.* 48(11):5507-5511.
- Bernal J, Mendiola J, Ibanez E & Cifuentes A. 2010. Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55(4):758-774.
- Bimakr M, Rahman RA, Taip FS, Ganjloo A, Salleh LM, Selamat J, Hamid A & Zaidul I. 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing* 89(1):67-72.
- Cai Y, Luo Q, Sun M & Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74(17):2157-2184.

- Cantwell M & Suslow T. 1999. Eggplant: recommendations for maintaining postharvest quality.
- Cao G, Sofic E & Ronald L. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 44(11):3426-3431.
- Cavero S, García-Risco M, Marín F, Jaime L, Santoyo S, Señoráns F, Reglero G & Ibañez E. 2006. Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano:: Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays. *The Journal of Supercritical Fluids* 38(1):62-69.
- Cerezal P & Duarte G. 2005. Utilización de cáscaras en la elaboración de productos concentrados de tuna (*Opuntia ficus-índica* (L.) Miller) *Journal of the Professional Association for Cactus Development*:61-83.
- Cerezal P, Larrauri JA & Piñera RM. 1995. Influencia de factores en el aprovechamiento de subproductos de la industria de frutas y vegetales en Cuba. *Alimentaria*. p. 101-105.
- Concellon A, Anon MC & Chaves AR. 2007. Effect of low temperature storage on physical and physiological characteristics of eggplant fruit (*Solanum melongena* L.). *LWT-Food Science and Technology* 40(3):389-396.
- Corral-Aguayo R, Yahia EM, Carrillo-Lopez A & Gonzalez-Aguilar GA. 2008. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *J. Agric. Food Chem* 56(22):10498-10504.
- Daintree L, Kordikowski A & York P. 2008. Separation processes for organic molecules using SCF Technologies. *Advanced drug delivery reviews* 60(3):351-372.
- Domingos AK, Saad EB, Wilhelm HM & Ramos LP. 2008. Optimization of the ethanolysis of *Raphanus sativus* (L. Var.) crude oil applying the response surface methodology. *Bioresource Technology* 99(6):1837-1845.
- Dunford N, Irmak S & Jonnala R. 2010. Pressurised solvent extraction of policosanol from wheat straw, germ and bran. *Food Chemistry* 119(3):1246-1249.

- Egydio J, Moraes M & Rosa P. 2010. Supercritical Fluid Extraction Of Lycopene From Tomato Juice And Characterization Of Its Antioxidation Activity. *The Journal of Supercritical Fluids* 54(2): 159-164.
- Fadel J, DePeters E & Arosemena A. 2000. Composition and digestibility of beet pulp with and without molasses and dried using three methods. *Animal feed science and technology* 85(1-2):121-129.
- FAO. 1993. Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos. Código FAO: 17 AGRIS: J11. Colección FAO: Capacitación, N° 17/2. ISBN 92-5 302766-5. Roma.
- Fernandez-Ginés JM, Madera-Bravo E, González-Moreno M, Tudela-Carrasco M & Caballero-Santos B. 2008. Obtención de ingredientes funcionales a partir de subproductos. *Alimentaria*. p. 76-79.
- García V. 1996. Extracción con fluidos supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas. *Pesticide residues*. España: Instituto de Estudios Almerienses. p. 141-154.
- Gelmez N, Kincal N & Yener M. 2009. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids* 48(3):217-224.
- Ghafoor K, Park J & Choi YH. 2010. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11(3):485-490.
- Goli AH, Barzegar M & Sahari MA. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem.* 92(3):521-525.
- Grigonis D, Venskutonis P, Sivik B, Sandahl M & Eskilsson C. 2005. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids* 33(3):223-233.

- Guan W, Li S, Yan R, Tang S & Quan C. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chem.* 101(4):1558-1564.
- Guan X & Yao H. 2008. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chem.* 106(1):345-351.
- Han SW, Tae J, Kim JA, Kim DK, Seo GS, Yun KJ, Choi SC, Kim TH, Nah YH & Lee YM. 2003. The aqueous extract of *Solanum melongena* inhibits PAR2 agonist-induced inflammation. *Clinica chimica acta* 328(1-2):39-44.
- Hattab ME, Culioli G, Piovetti L, Chitour SE & Valls R. 2007. Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*. *J. Chromatogr.* 1143(1):1-7.
- Hawthorne SB, Grabanski CB, Martin E & Miller DJ. 2000. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *J. Chromatogr.* 892(1):421-433.
- He W, Gao Y, Yuan F, Bao Y, Liu F & Dong J. 2010. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of Gardenia fruit oil and the analysis of functional components. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87(9):1071-1079.
- 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 Chem.* 98(1):136-148.
- Herrero M, Mendiola J, Cifuentes A & Ibañez E. 2010. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A* 1217(16):2495-2511.
- Huang HY, Chang CK, Tso TK, Huang JJ, Chang WW & Tsai YC. 2004. Antioxidant activities of various fruits and vegetables produced in Taiwan. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 55(5):423-429.

- Huang W, Li Z, Niu H, Li D & Zhang J. 2008. Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology. *J. Food Eng.* 89(3):298-302.
- Joglekar A & May A. 1987. Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World* 32(12):857-868.
- Kassama LS, Shi J & Mittal GS. 2008. Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. *Separation and Purification Technology* 60(3):278-284.
- Kiassos E, Mylonaki S, Makris DP & Kefalas P. 2009. Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10(2):246-252.
- Kim YJ, Kim DO, Chun OK, Shin DH, Jung H, Lee CY & Wilson DB. 2005. Phenolic extraction from apple peel by cellulases from *Thermobifida fusca*. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(24):9560-9565.
- Larrauri JA. 1994. Utilización de los hollejos cítricos y las cáscaras de piñas como fuentes de fibra dietética en Cuba. *Alimentaria*. p. 57-59.
- Larrauri JA & Cerezal P. 1993. Caracterización de los residuos de diferentes variedades de Mango. *Alimentaria*. p. 89-92.
- Li B, Smith B & Hossain M. 2006. Extraction of phenolics from citrus peels:: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology* 48(2):182-188.
- Liyana-Pathirana C & Shahidi F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93(1):47-56.
- Luthria D, Biswas R & Natarajan S. 2007. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry* 105(1):325-333.
- Luthria DL & Mukhopadhyay S. 2006. Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of agricultural and food chemistry* 54(1):41-47.

- Machmudah S, Winardi S, Sasaki M, Goto M, Kusumoto N & Hayakawa K. 2012. Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seed using supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.* 108(2):290-296.
- Mahattanatawee K, Manthey JA, Luzio G, Talcott ST, Goodner K & Baldwin EA. 2006. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* 54(19):7355-7363.
- Martinez-Correa HA, Magalhães PM, Queiroga CL, Peixoto CA, Oliveira AL & Cabral FA. 2011. Extracts from pitanga ( *Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids* 55(3):998-1006.
- Matsubara K, Kaneyuki T, Miyake T & Mori M. 2005. Antiangiogenic activity of nasunin, an antioxidant anthocyanin, in eggplant peels. *J. Agric. Food Chem.* 53(16):6272-6275.
- Miron T, Plaza M, Bahrim G, Ibáñez E & Herrero M. 2011. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *J. Chromatogr.* 1218(30):4918-4927.
- Nair H, Sung B, Yadav V, Kannappan R, Chaturvedi M & Aggarwal B. 2010. Delivery of anti-inflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. *Biochemical Pharmacology* 80:1833-1843.
- Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E & Capaccioli S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research* 59(6):365-378.
- Noda Y, Kneyuki T, Igarashi K, Mori A & Packer L. 2000. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels. *Toxicology* 148(2-3):119-123.
- Onofrejšová L, Vasícková J, Klejšdus B, Stratil P, Misurcová L, Kráćmar S, Kopeck J & Vacek J. 2010. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 51(2):464-470.
- Palma M & Taylor L. 1999. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *J. Chromatogr.* 849(1):117-124.

- Passos CP, Silva RM, Da Silva FA, Coimbra MA & Silva CM. 2009. Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. *The Journal of Supercritical Fluids* 48(3):225-229.
- Passos CP, Silva RM, Da Silva FA, Coimbra MA & Silva CM. 2010. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera L.*) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. *Chem. Eng. J.* 160(2):634-640.
- Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J & Núñez MJ. 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(6):2111-2117.
- Pinelo M, Ruiz-Rodriguez A, Sineiro J, Senorans FJ, Reglero G & Nunez MJ. 2007. Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. *European Food Research and Technology* 226(1):199-205.
- Plaza M, Cifuentes A & Ibáñez E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology* 19(1):31-39.
- Pompeu D, Silva E & Rogez H. 2009. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology* 100(23):6076-6082.
- Prasad KN, Hassan FA, Yang B, Kong KW, Ramanan RN, Azlan A & Ismail A. 2011. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chem.* 128(4):1121-1127.
- Raigon MD, Prohens J, Munoz-Falcon JE & Nuez F. 2008. Comparison of eggplant landraces and commercial varieties for fruit content of phenolics, minerals, dry matter and protein. *Journal of Food Composition and Analysis* 21(5):370-376.
- Randhir R, Lin YT & Shetty K. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and



- phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 13(3):295-307.
- Rice-Evans CA, Miller NJ & Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* 20(7):933-956.
- Robbins RJ & Bean SR. 2004. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography–photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *J. Chromatogr.* 1038(1):97-105.
- Robles-Sánchez R, Rojas-Graü M, Odriozola-Serrano I, González-Aguilar G & Martín-Belloso O. 2009. Effect of minimal processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut [] Kent'mango (*Mangifera indica* L.). *Postharvest biology and technology* 51(3):384-390.
- Sabio E, Lozano M, De Espinosa VM, Mendes R, Pereira A, Palavra A & Coelho J. 2003. Lycopene and  $\beta$ -carotene extraction from tomato processing waste using supercritical CO<sub>2</sub>. *Industrial & engineering chemistry research* 42(25):6641-6646.
- Sahena F, Zaidul I, Jinap S, Karim A, Abbas K, Norulaini N & Omar A. 2009. Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction-A review. *Journal of Food Engineering* 95(2):240-253.
- Sihvonen M, Järvenpää E, Hietaniemi V & Huopalahti R. 1999. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science & Technology* 10(6-7):217-222.
- Simirgiotis MJ, Caligari PDS & Schmeda-Hirschmann G. 2009. Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography-UV detection-mass spectrometry. *Food Chemistry* 115(2):775-784.
- Singh AP, Luthria D, Wilson T, Vorsa N, Singh V, Banuelos GS & Pasakdee S. 2009. Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chemistry* 114(3):955-961.

- Singleton VL & Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* 16(3):144-158.
- Sporring S, Bøwadt S, Svensmark B & Björklund E. 2005. Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil. *Journal of Chromatography A* 1090(1-2):1-9.
- Starmans D & Nijhuis H. 1996. Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. *Trends in Food Science & Technology* 7(6):191-197.
- Stommel JR & Whitaker BD. 2003. Phenolic acid content and composition of eggplant fruit in a germplasm core subset. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 128(5):704-710.
- Todaro A, Cimino F, Rapisarda P, Catalano AE, Barbagallo RN & Spagna G. 2009. Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry* 114(2):434-439.
- Vatai T, Škerget M & Knez Z. 2009. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* 90(2):246-254.
- Vatai T, Škerget M, Knez Ž, Kareth S, Wehowski M & Weidner E. 2008. Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *The Journal of Supercritical Fluids* 45(1):32-36.
- Wang L & Weller C. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17(6):300-312.
- Wang L, Weller C, Schlegel V, Carr T & Cuppett S. 2008. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lipids from grain sorghum dried distillers grains with solubles. *Bioresource technology* 99(5):1373-1382.
- Winter M & Herrmann K. 1986. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 34(4):616-620.

- Yang B, Jiang Y, Shi J, Chen F & Ashraf M. 2010. Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit-A review. *Food Research International* DOI:10.1016/j.foodres.2010.1010.1019.
- Yepez B, Espinosa M, López S & Bolaños G. 2002. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilibria* 194:879-884.
- Yi C, Shi J, Xue S, Jiang Y & Li D. 2009. Effects of supercritical fluid extraction parameters on lycopene yield and antioxidant activity. *Food Chemistry* 113(4):1088-1094.
- Yilmaz EE, Özvural EB & Vural H. 2011. Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis Vinifera*) using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 55(3):924-928.
- Zarena AS, Sachindra NM & Udaya Sankar K. 2012. Optimisation of ethanol modified supercritical carbon dioxide on the extract yield and antioxidant activity from *Garcinia mangostana* L. *Food Chem.* 130(1):203-208.