

Obtención de extractos enriquecidos en compuestos tipo piceatannol a partir de la semilla de maracuyá (*passiflora edulis*; sims) mediante el uso de la técnica extracción líquidos presurizados (PLE)

**Yudit Paola Cuervo Ramos
Juan Manuel Baracaldo**

**Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería
Programa de Química
Bogotá, Colombia
Marzo de 2021**

Obtención de extractos enriquecidos en compuestos tipo piceatannol a partir de la semilla de maracuyá (*passiflora edulis*; sims) mediante el uso de la técnica extracción líquidos presurizados (PLE)

**Yudit Paola Cuervo Ramos
Juan Manuel Baracaldo**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Químico**

**Director:
Dr. Sc. Diego Ballesteros Vivas**

**Semillero de investigación *Química Verde para el Desarrollo
Sustentable***

**Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería
Programa de Química
Bogotá, Colombia
Marzo de 2021**

Declaración de derechos de propiedad intelectual

Los autores de la presente propuesta manifestamos que conocemos el contenido del Acuerdo 06 de 2008, Estatuto de Propiedad Intelectual de la UNAD, Artículo 39 referente a la cesión voluntaria y libre de los derechos de propiedad intelectual de los productos generados a partir de la presente propuesta. Asimismo, conocemos el contenido del Artículo 40 del mismo Acuerdo, relacionado con la autorización de uso del trabajo para fines de consulta y mención en los catálogos bibliográficos de la UNAD.

Obtención de extractos enriquecidos en compuestos tipo piceatannol a partir de la semilla de maracuyá
(*Passiflora edulis*; Sims) mediante el uso de la técnica extracción Líquidos Presurizados (PLE)

**Este trabajo fue financiado por el proyecto PS-31-2018 de la Convocatoria 007 de
la Universidad Nacional Abierta y a Distancia**

Agradecimientos

Agradecimientos de Paola Cuervo:

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi esposo, hijos y familia, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

Expresar mi más grande y sincero agradecimiento al profesor Diego Ballesteros Vivas principal colaborador durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

Finalmente, a todas las personas que me apoyaron y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

Agradecimientos de Juan M. Baracaldo:

Agradezco a Dios por permitirme culminar esta etapa de mi proyecto de vida, a mis padres por enseñarme el valor del amor, la unión familiar, la humildad y el trabajo incondicional, a mi esposa Cecilia y a mis hijos Cesar Javier, Diego Andrés y Manuel Felipe por el amor y el apoyo sin los cuales no me hubiera sido posible culminar este proyecto. Al profesor Diego Ballesteros Vivas director de este proyecto por su dedicación, compromiso y apoyar mi vocación de químico al compartir sus amplios conocimientos.

Finalmente los autores de este trabajo expresan su profundo agradecimiento a los profesores Fabián Parada Alfonso y Carlos Narváez del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por haber colaborado académicamente en el desarrollo del proyecto y por haber facilitado el uso de los equipos e infraestructura de los laboratorios del Grupo de Investigación en Química de Alimentos-GiQA de esta institución.

Dedico de manera muy especial a Dios, mi principal gestor y ayudante a lo largo de este camino, brindándome su sabiduría, me permitió afrontar con paciencia y conocimiento desarrollar y culminar de este trabajo.

Paola Cuervo.

Dedico este trabajo a mis padres, a mis hermanos, a Cecilia y a nuestros hijos Cesar Javier, Diego Andrés y Manuel Felipe.

Juan M. Baracaldo.

Resumen

En el presente trabajo se muestran los resultados de una estrategia de extracción secuencial empleando Líquidos Presurizados a partir de subproductos de maracuyá (*Passiflora edulis*; Sims), particularmente semillas y el estudio de evaluación económica. La estrategia consistió en un proceso de desengrasado seguido por un proceso de extracción de sustancias polares con particular énfasis en compuestos fenólicos y piceatanol. Este último proceso fue optimizado mediante un diseño central compuesto y la metodología de superficie de respuesta tomando como factores la composición del disolvente y la temperatura. La evaluación de etanol, acetato de etilo y sus mezclas a diferentes temperaturas (50, 100 y 150 °C) permitió obtener extractos con rendimientos adecuados, así como un contenido apreciable de compuestos fenólicos, flavonoides, piceatanol y con actividad antioxidante. El proceso de optimización permitió adicionalmente realizar el estudio de evaluación económica, el cual permitió establecer que la estrategia descrita contribuiría con la valorización económica de estos subproductos.

Palabras claves: *Passiflora edulis*; Sims, Residuos frutícolas, Compuestos fenólicos, Extracción con líquidos presurizados, Actividad antioxidante, Valorización.

Abstract

This work shows the results of a sequential extraction strategy using pressurized liquids from passion fruit by-products (*Passiflora edulis*; Sims), particularly seeds as well as the economic evaluation study. The strategy consists of a defatting process followed by a polar extraction process, with particular emphasis on phenolic compounds and piceatannol. This process was optimized by a central composite design and response surface methodology taking as factors the composition of the solvent and the temperature. The evaluation of ethanol, ethyl acetate and their mixtures at different temperatures (50, 100 and 150 °C) allowed to obtain extracts with adequate yields, as well as an appreciable content of phenolic compounds, flavonoids, and piceatannol with antioxidant activity. The improvement process additionally carried out the economic evaluation study, which establishes that the described strategy would contribute to the economic valuation of these by-products.

Keywords: *Passiflora edulis*; Sims, Fruit wastes, Phenolic compounds, Pressurized Liquid Extraction, Antioxidant activity, Valorization.

Contenido

<i>Introducción</i>	15
<i>Planteamiento del problema</i>	16
<i>Justificación</i>	18
<i>Objetivos</i>	20
Objetivo General	20
Objetivos Específicos	20
<i>Marco referencial</i>	21
Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i> ; Sims.).....	21
Técnicas de extracción con fluidos presurizados	24
Extracción con líquidos presurizados, PLE	26
<i>Diseño metodológico</i>	31
Material vegetal y reactivos.....	32
Extracción con líquidos presurizados (PLE).....	33
Diseño experimental de la segunda etapa del proceso PLE	34
Rendimiento de extracción (R)	36
Contenido de piceatanol (CP).....	36
Determinación de los contenidos totales de compuestos fenólicos (CTF) y de flavonoides (CTFI).....	37
Ensayos de actividad antioxidante.....	37
Estudio de evaluación económica.....	38
<i>Resultados y discusión</i>	39
Efecto de los factores de extracción sobre las variables de respuesta y optimización de la segunda etapa PLE	39
Evaluación económica del proceso de extracción.....	56
<i>Conclusiones y recomendaciones</i>	59
<i>Bibliografía</i>	61
<i>Anexos</i>	66

Lista de figuras

Figura 1. Estructuras químicas de A) Piceatanol, B) Escirpusina B y C) Resveratrol. ...	23
Figura 2. Esquema de un equipo PLE.....	31
Figura 3. Esquema metodológico del trabajo.....	32
Figura 4. Esquema de la unidad PLE empleada en el proceso de obtención de extractos a alta presión a partir de semillas de <i>P. edulis</i> . Tomado de (Ballesteros-Vivas & Parada-Alfonso, 2015).	34
Figura 5. A) Gráfico de Pareto y B) superficie de respuesta para la dependencia del rendimiento en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.	43
Figura 6. A) Cromatograma y B) espectro del estándar de piceatanol.....	44
Figura 7. A) Cromatogramas superpuestos del estándar de piceatanol (50 ppm), del extracto 8 y del extracto 8 co-inyectado con piceatanol. B) Espectro UV-Vis para la señal a 5,99 min.	45
Figura 8. A) Cromatogramas de piceatanol y de los extractos superpuestos desacoplados en el tiempo y B) acoplados en el tiempo.....	46
Figura 9. A) Gráfico de Pareto y B) Superficie de respuesta para la dependencia del contenido de piceatanol en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.	47
Figura 10. A) Gráfico de Pareto y B) Superficie de respuesta para la dependencia del contenido total de fenoles en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.	48
Figura 11. A) Gráfico de Pareto y B) Superficie de respuesta para la dependencia del contenido total de flavonoides en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.....	49

Figura 12. A) Gráfico de Pareto y B) Superficie de respuesta para la dependencia de la actividad antioxidante (EC_{50}) en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.

..... 51

Figura 13. A) Gráfico de Pareto y B) Superficie de respuesta para la dependencia de la actividad antioxidante (TEAC) en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas..... 52

Figura 14. Superficie de respuesta para la optimización simultánea de todas las respuestas mediante función de desabilidad. 53

Figura 15. Gráfico de rampas para la optimización simultánea de las respuestas estudiadas en el diseño experimental. 54

Figura 16. Correlaciones entre las variables estudiadas. El color azul indica una correlación negativa (Pearson -1) y el color rojo una correlación positiva (Pearson +1). Los tonos medios corresponden a correlaciones parciales y los claros indican que no hay correlación..... 55

Figura 17. Diagrama de flujo para la evaluación económica en la condiciones óptimas de extracción: 100% EtOH y 112 °C (Simulación 1)..... 56

Figura 18. Diagrama de flujo para la evaluación económica en la condiciones de mayor recuperación de piceatanol: 0% EtOH (100% EtOAc) y 150 °C (Simulación 2). 57

Lista de tablas

Tabla 1. Algunas aplicaciones de PLE para el aprovechamiento de subproductos agroindustriales. Tomado y adaptado de (Herrero et al., 2015)	29
Tabla 2. Matriz experimental de CCD para la segunda etapa de extracción PLE.....	35
Tabla 3. Condiciones del diseño experimental y resultados para cada variable de respuesta estudiada en el proceso de optimización de la segunda etapa de extracción del proceso PLE.....	40
Tabla 4. ANOVA de las variables de respuesta estudiadas en el CCD.	41
Tabla 5. Ecuaciones finales en términos de factores codificados obtenidas por análisis de RSM.	42
Tabla 6. Resultados de la evaluación económica de las simulaciones 1 y 2	58

Lista de anexos

Anexo 1. Curvas de calibración para la determinación de los contenidos asociados a las variables de respuesta.	66
---	----

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>CCD</i>	Diseño central compuesto
<i>CP</i>	Contenido de piceatanol
<i>CS</i>	Composición del disolvente
<i>CTF</i>	Contenido total de fenoles
<i>CTFI</i>	Contenido total de flavonoides
<i>EC₅₀</i>	Concentración efectiva 50
<i>EtOAc</i>	Acetato de etilo
<i>EtOH</i>	Etanol
<i>PLE</i>	Extracción con líquidos presurizados
<i>R</i>	Rendimiento de extracción
<i>RSM</i>	Metodología de superficie de respuesta
<i>TEAC</i>	Capacidad antioxidante equivalente a trolox

Introducción

En el presente trabajo se evaluó la posible valorización económica de los subproductos (semillas) de uno de los frutos exóticos de mayor importancia a nivel nacional e internacional: *P. edulis* o maracuyá. Para esto, las semillas fueron sometidas a un proceso de extracción intensificado planteado en el marco de la Química Verde. Dicho proceso consistió en el uso de la técnica de extracción con Líquidos Presurizados (PLE), la cual ha sido definida como una técnica verde, limpia y de bajo impacto medioambiental. PLE fue usado en dos etapas de extracción a partir de las semillas de *P. edulis*: una etapa para la obtención de un extracto lipofílico y, en consecuencia, el desengrasado de las semillas y una etapa consecutiva para la obtención de un extracto polar enriquecido en compuestos fenólicos y bioactivos, particularmente piceatanol un estilbeno de gran interés para las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. Para este fin, se empleó un disolvente apolar en la primera etapa y un disolvente polar para la segunda. Dada la gran importancia de la segunda etapa PLE fue necesario estudiar el efecto que tienen los factores de extracción, particularmente la composición del disolvente y la temperatura, sobre los atributos esperados en el extracto, esto es: el rendimiento, contenido de piceatanol, contenido total de fenoles, contenido total de flavonoides y actividad antioxidante. Este estudio se llevó a cabo a través de un diseño central compuesto centrado en la cara de dos factores y tres niveles. Los niveles para la composición del disolvente fueron el porcentaje de etanol en mezclas de etanol y acetato de etilo (0, 50 y 100%), mientras que para la temperatura fueron 50, 100 y 150 °C. Adicionalmente, los resultados del diseño permitieron obtener superficies de respuesta que junto a análisis de deseabilidad facilitaron la optimización de la segunda etapa de extracción. Esta información fue fundamental para la evaluación económica del proceso de extracción dado que, junto con los costos asociados al equipamiento, permitió establecer las condiciones operativas necesaria para obtener un extracto de alto valor que contribuiría con la valorización económica de las semillas *P. edulis*.

Planteamiento del problema

La industria frutícola colombiana es un sector productivo en crecimiento gracias al interés local e internacional por los frutos tropicales producidos en el territorio nacional. Las frutas son habitualmente consumidas en fresco o transformadas en pulpas, zumos, jarabes, mermeladas, helados, compotas, entre otros. La transformación industrial de las frutas genera subproductos como epicarpios, semillas, bagazos (mezclas de pulpa y semillas), residuos de poda, frutos sobre madurados, entre otros. Estos subproductos son generalmente dispuestos como desechos con importantes implicaciones negativas sobre el ambiente y la salud humana. En algunos casos los subproductos son transformados en biomasa como el compost o en energía a través de biodigestores. Por estas razones, los subproductos de la industria frutícola generalmente no integran cadenas de valor que eviten su disposición inadecuada y, en cambio, proporcionen valor económico. En este contexto, la explotación de los subproductos frutícolas para la obtención de compuestos bioactivos de alto valor agregado es una estrategia que puede contribuir a la valorización económica de estas biomásas. El interés creciente por los compuestos bioactivos se debe a su alto potencial preventivo y terapéutico frente a enfermedades crónicas que afectan la salud pública. El uso cada vez más frecuente de estos compuestos bioactivos en preparaciones como alimentos funcionales, nutracéuticos y cosmeceúticos e incluso en extractos estandarizados da cuenta su importancia. Por otra parte, las técnicas de extracción empleadas para la recuperación de los compuestos bioactivos a partir de los subproductos frutícolas o de cualquier otra fuente requiere de tecnologías que aseguren la seguridad y funcionalidad de los compuestos y extractos. En este sentido, las técnicas de extracción emergentes como la extracción con Líquidos Presurizados (PLE) y la extracción con Fluidos Supercríticos (EFS) se destacan dado su gran capacidad para cumplir con los propósitos mencionados. En este contexto, el presente trabajo pretende contribuir con la valorización económica de las semillas de maracuyá (*P. edulis*), uno de los frutales tropicales de mayor consumo a nivel nacional e

internacional, al optimizar un proceso de extracción PLE en el que se recuperen de manera eficiente compuestos bioactivos, como el piceatanol: un estilbeno de gran potencial biológico y funcional.

Desde esta perspectiva la pregunta de investigación es:

¿La optimización de un proceso de extracción empleando líquidos verdes presurizados y su evaluación económica para obtener extractos enriquecidos en compuestos bioactivos, tipo piceatanol, a partir de semillas de *P. edulis* puede aportar información científica y técnica que contribuya con la valorización económica de estos subproductos?

Justificación

La generación de residuos por los procesos de transformación y manufactura de alimentos alcanza 1,3 billones de toneladas anualmente a nivel mundial, lo que equivale a un tercio de los alimentos producidos (Gustavsson, Cederberg, Sonesson, van Otterdijk, & Meybeck, 2011). Tal cantidad de residuos está integrada por sub-productos generados por los procesos de transformación y manufactura de alimentos, por pérdidas en el transporte y almacenamiento, así como por los desperdicios de los productos finales por parte de los consumidores. En Colombia, la producción hortofrutícola alcanzó 516 millones de toneladas entre 2007 y 2017 (Agronet, 2017), de los cuales se generaron hasta un 30% de residuos constituidos por material vegetal producto del procesamiento agroindustrial (semillas y epicarpios de frutas, entre otros) (Gustavsson et al., 2011). La disposición adecuada de dichos residuos implica altos costos energéticos, por lo que en ocasiones se desechan como contaminantes con efectos adversos sobre la salud humana y el ambiente (Yepes, Montoya, & Orozco, 2008). Por tal razón, es fundamental emplear estrategias para el aprovechamiento de residuos que los convierta en materia prima de una nueva cadena de valor. La obtención de compuestos bioactivos e ingredientes funcionales a partir de residuos es una estrategia de valorización y ha sido una línea de investigación de gran crecimiento, lo cual podría generar beneficios adicionales a las cadenas productivas correspondientes (Kosseva, 2013).

La obtención de extractos y compuestos bioactivos requiere de metodologías de extracción y fraccionamiento eficientes, selectivos y de bajo o nulo impacto medioambiental. Las estrategias que emplean fluidos comprimidos, tales como: extracción con fluidos presurizados (PLE) y extracción con fluidos supercríticos (SFE), cumplen con estas características. Adicionalmente, las técnicas de extracción con fluidos comprimidos han sido consideradas como técnicas verdes dado que cumplen con algunos de los doce principios de la química verde (Anastas & Eghbali, 2010), particularmente en lo que se denomina principios de la “extracción verde” (Chemat et

al., 2012). El enfoque de la extracción verde está relacionado con el uso responsable de recursos renovables; la utilización de disolventes verdes (agua, etanol, dióxido de carbono, entre otros) y alternativos a sustancias orgánicas nocivas; el uso racional de la energía mediante la intensificación de procesos; el aprovechamiento y generación de sub-productos en lugar de residuos; y la obtención de extractos no desnaturalizados con potencial funcional, inocuos y libres de disolventes.

De esta manera, la obtención de compuestos bioactivos a partir de residuos frutícolas, como los provenientes de la cadena productiva del fruto de maracuyá, empleando estrategias de extracción con fluidos comprimidos constituye una alternativa de valorización de residuos al establecer a los mismos como fuente compuestos de valor agregado.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar el potencial aprovechamiento de los residuos del procesamiento industrial del fruto de maracuyá (*Passiflora edulis*; Sims.), mediante la obtención de extractos ricos en piceatannol empleando líquidos presurizados como estrategia verde de extracción.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la temperatura y composición del disolvente sobre el contenido de piceatannol extraídos con líquidos presurizados usando el modelo de superficie de respuesta como diseño experimental.
- Establecer el contenido total de fenoles y flavonoides de los extractos obtenidos, así como la actividad antioxidante de los mismos, como una aproximación inicial a la composición química y a la bioactividad de los mismos.
- Realizar una evaluación económica del proceso óptimo de extracción como una aproximación a la valorización de los residuos del fruto de *P. edulis*.

Marco referencial

En Colombia, la producción frutícola alcanzó los 60.768.655 toneladas en los últimos diez años (Agronet, 2017). Algunas de las frutas de mayor producción fueron mango, naranja, papaya y tomate de árbol. Mientras que, algunas especies de menor producción, pero de gran importancia comercial internacional, fueron uchuva, curuba y guanábana. Otros frutales de economía emergente son guayaba, mora y maracuyá. La producción de este último frutal ha sido de 1.106.710 toneladas (2007-2017) y constituye un importante renglón de la economía nacional (Agronet, 2017). En consecuencia, la gran productividad de éstos y otros frutales implica una cuantiosa generación de residuos. En el caso del procesamiento del fruto de maracuyá se genera hasta un 60% de subproductos del total de la masa procesada, lo que equivale a 840.000 toneladas de material (Juliane Viganó, 2016). Tal cantidad de subproductos debe aprovecharse y reincorporarse a las cadenas productivas. A continuación se describen algunas generalidades sobre el fruto de maracuyá, sus compuestos bioactivos y las estrategias que emplean líquidos presurizados para su obtención y valorización.

Maracuyá (*Passiflora edulis*; Sims.)

P. edulis es nativa de América del Sur y se ha distribuido en India, Nueva Zelanda, Israel, el Este y el Sur de África, la región sur de América del Norte, entre otros (Lim, 2012). Estudios etnofarmacológicos han descrito el uso de *P. edulis* en diversas regiones. En América del Sur, esta especie ha sido usada como sedante, diurético, antidiarreico, estimulante, tónico, así como para el tratamiento de la hipertensión, los síntomas menstruales y los cólicos en niños; adicionalmente, se reportó el uso del fruto en el tratamiento del carcinoma gástrico (Dhawan, Dhawan, & Sharma, 2004). Algunos estudios han indagado sobre las propiedades antitumorales del maracuyá. Silva y cols., aislaron los polisacáridos presentes en la harina del

epicarpio del fruto de *P. edulis* y evaluaron la actividad antitumoral *in vitro* frente a leucemia promielocítica (HL-60), melanoma de mama (MDA-MB-435), glioblastoma (SF-295) y adenocarcinoma ileocecal (HCT-8), e *in vivo* frente a Sarcoma-180 implantado en las cavidades peritoneales de ratones Swiss (Silva et al., 2012). Los polisacáridos homogalacturano y ramnogalacturonano-1, obtenidos del fruto no inhibieron el crecimiento tumoral *in vitro*, sin embargo, ejercieron un efecto positivo sobre la reducción en la masa tumoral de los animales (70, 40-72 y 89%) a los que se les administraron vía intraperitoneal. Este fenómeno parece estar relacionado con propiedades inmunoestimulantes de los polisacáridos. En el epicarpio también han sido identificados flavonoides C-glicosidados, tales como: isoorientina, vicenina, orientina, vitexina e isovitexina (Viganó, Brumer, et al., 2016). Estos compuestos fueron obtenidos mediante extracción con líquidos presurizados usando una mezcla hidroalcohólica (etanol 70%, 10 MPa y 60 °C). Flavonoides como la isoorientina poseen una amplia gama de actividades biológicas, entre las que se cuenta la antiproliferativa, particularmente frente a células de cáncer de páncreas (Ye et al., 2016).

En las semillas de *P. edulis*, se ha establecido que algunos de los polifenoles mayoritarios son piceatanol (3,4,3',5'-tetrahidroxi-*trans*-estilbeno) (un análogo del resveratrol) y escirpusina B (un dímero de piceatanol) (Shoko Sano, Kenkichi Sugiyama, Tatsuhiro Ito, Yumi Katano, 2011). Las estructuras de estos compuestos se ilustran en la Figura 1.

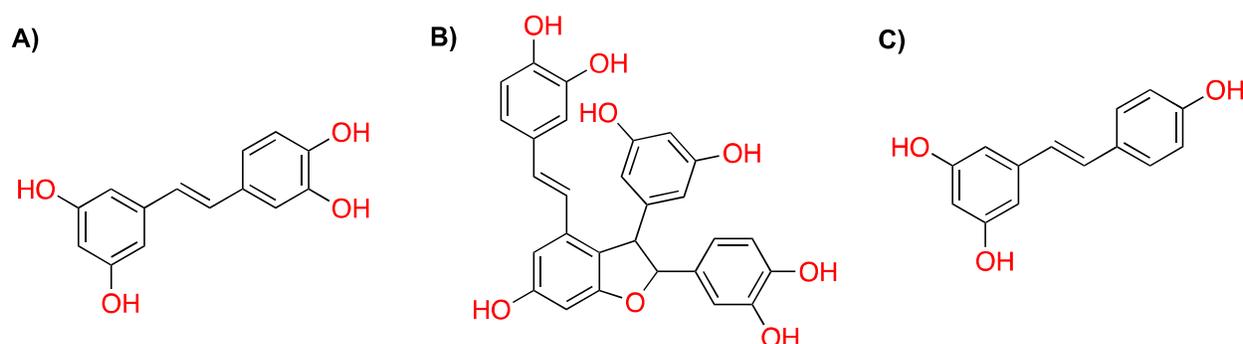


Figura 1. Estructuras químicas de **A)** Piceatanol, **B)** Escirpusina B y **C)** Resveratrol.

La actividad citotóxica del piceatannol ha sido estudiada en células tumorales de diversos orígenes: colon (HCT-116), melanoma (SK-Mel-28; A375 y SB2), leucemia mielogénica (K562, 50 μM IC50), leucemia promielocítica (HL-60, 23 μM IC50), entre otros (Piotrowska, Kucinska, & Murias, 2012). Asimismo, se han establecido algunos mecanismos de acción por los cuales el piceatannol ejerce el efecto antiproliferativo. Por ejemplo, en diferentes líneas tumorales aisladas de colon e hígado, el piceatannol bloquea el ciclo celular e induce a la apoptosis, en células de linfoma promueve la formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación del DNA, mientras que en células de adenocarcinoma de próstata inhibe la quinasa Janus 1 (Piotrowska et al., 2012). En estudios *in vivo* también se ha establecido el potencial antiproliferativo del piceatannol. Tal es el caso de la administración oral de piceatannol a hembras de ratón con carcinoma mamario inducido (4T1), la cual condujo a la disminución de la progresión tumoral, regulando el ciclo celular y bloqueando los procesos relacionados con la angiogénesis (Song et al., 2015). Los compuestos piceatannol y escirpusina B también han sido extraídos del bagazo del fruto de *P. edulis*, el cual es otro importante residuo generado por el procesamiento industrial. En este sentido, Viganó y cols. (Viganó, Aguiar, et al., 2016) haciendo uso de una estrategia secuencial de extracción a alta presión, obtuvieron extractos con polaridades y naturalezas químicas disímiles. En la primera etapa emplearon scCO_2 (26 MPa y 60 $^{\circ}\text{C}$) a fin de extraer ácidos grasos y

carotenoides, mientras que en la segunda etapa usaron una mezcla hidroalcohólica (etanol (EtOH) al 50%) presurizada y sobrecalentada (10 MPa y 100 °C), para obtener una fracción rica en piceatannol y escirpusina B. La actividad antitumoral del piceatannol ha sido vinculada a la actividad antioxidante, dados los mecanismos moleculares de señalización de rutas relacionadas con la protección frente a radicales y la regulación de potenciales redox a nivel celular. En seguida se describen algunas generalidades sobre la extracción con fluidos presurizados, aplicables a la obtención de compuestos bioactivos del fruto de *P. edulis* y sus residuos.

Técnicas de extracción con fluidos presurizados

Los materiales vegetales son de gran interés para las industrias alimentarias, cosmética y farmacéutica, ya que contienen compuestos con propiedades biológicas de alto valor nutricional y/o terapéutico. Sin embargo, la explotación de estos materiales requiere de una serie de procesos secuenciados: muestreo, preparación de la muestra, extracción, evaluación de actividad biológica y calidad sensorial, así como el análisis de los compuestos presentes en el extracto, lo que garantiza el potencial de las materias primas y de sus componentes (Cambel, 2014). En esta dinámica, la extracción puede ser considerada como uno de los procesos clave, dado que puede afectar la calidad y cantidad de los compuestos recuperados, así como los costos globales de la explotación del material vegetal. En el proceso de extracción un conjunto de compuestos es transferido, de manera preferente, de una matriz a una fase extractante o disolvente, lo que permite la recuperación y separación eventual de los compuestos (Palma et al., 2013). Para llevar a cabo este proceso, existen diversas técnicas de extracción, las cuales se diferencian en el sistema tecnológico que emplean y en la posibilidad de optimizar las condiciones experimentales inherentes al proceso: naturaleza del disolvente, tiempo de extracción, temperatura, presión, entre otros.

Las técnicas de extracción tradicionales han sido empleadas desde hace siglos (como en los casos de la maceración, infusión, decocción y la extracción Soxhlet) y se caracterizan por ser asequibles, ya que no requieren instrumentación compleja, y por facilitar el desarrollo de métodos de extracción de manera sencilla. Sin embargo, en las técnicas tradicionales, la cantidad de muestra empleada (1-100 g), el tiempo de extracción (horas-días) y el consumo de disolvente (100-5000 mL), suelen ser elevados, situación que, aunada a la baja selectividad para la recuperación de los compuestos objetivos, hace que estas técnicas sean consideradas poco efectivas. Asimismo, los disolventes orgánicos empleados tradicionalmente en las técnicas clásicas de extracción (hexano, diclorometano, éter etílico, éter de petróleo, cloroformo, metanol, entre otros) han sido considerados como indeseables para fines farmacéuticos, cosméticos y alimenticios, por su toxicidad, residualidad y persistencia (Capello et al., 2007; Dunn, 2012).

En contraste, las técnicas de extracción emergentes han tenido un desarrollo tecnológico pronunciado en los últimos 50 años y se caracterizan por presentar altos niveles de instrumentación y automatización, así como por emplear pequeñas cantidades de muestra (1-50 g) y disolvente (10-100 mL) en períodos cortos de extracción (3-90 min) (Cambel, 2014). Entre estas técnicas se cuentan: extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción con líquidos presurizados (PLE), extracción asistida por microondas (MAE), microextracción en fase sólida (SPME), dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y el método QuEChERS (Rápido, fácil, barato, robusto, efectivo y seguro). La alta selectividad de SFE y la selectividad moderada de PLE, SPME y MSPD, hacen de estas estrategias, recursos deseables para la obtención de compuestos bioactivos. Tanto SFE como PLE hacen parte de un conjunto de técnicas en el que se emplean fluidos comprimidos. Estas técnicas se caracterizan por permitir el ajuste de parámetros fisicoquímicos del disolvente (densidad, difusividad, poder de solvatación, viscosidad, constante dieléctrica, entre otros) en función de la presión y la temperatura, lo que las hace selectivas (Herrero, Castro-Puyana, Mendiola, & Ibañez,

2013). Mientras que en SFE se emplean disolventes por encima de sus condiciones críticas de presión y temperatura (Herrero et al., 2013), en PLE los disolventes se mantienen por encima de su punto de ebullición pero a una presión tal que permanecen en fase líquida (Mustafa & Turner, 2011).

Adicionalmente, las técnicas de extracción con fluidos comprimidos han sido consideradas como verdes dado que cumplen con algunos de los doce (12) principios de la química verde (Anastas & Eghbali, 2010), particularmente en lo que se ha denominado como principios de la extracción verde (Chemat et al., 2012). El enfoque de la extracción verde está relacionado con el uso responsable de recursos renovables; la utilización de disolventes verdes (agua, EtOH, CO₂, entre otros) y alternativos a sustancias orgánicas nocivas; el uso racional de la energía mediante la intensificación de procesos; el aprovechamiento y generación de sub-productos en lugar de residuos; y la obtención de extractos no desnaturalizados con potencial funcional, inocuos y libres de disolventes.

A continuación, se describen las generalidades de las técnicas PLE y algunas de sus aplicaciones en la obtención de extractos y compuestos bioactivos.

Extracción con líquidos presurizados, PLE

PLE fue introducida en 1995 por Dionex Corporation bajo el nombre de ASE® (extracción acelerada por disolventes), sin embargo también ha sido empleada bajo el nombre de extracción con disolventes presurizados y sobrecalentados, PHSE, o cuando se emplea agua como disolvente es conocida como extracción con agua sub-crítica, SWE, y extracción con agua presurizada y sobrecalentada, PHWE (Herrero et al., 2015). De acuerdo con Mustafa y Turner (Mustafa & Turner, 2011), los parámetros que afectan el proceso de extracción están relacionados con las características de la

matriz, la modalidad y tipo de extracción, la naturaleza del disolvente, la temperatura y presión, el tiempo, entre otros.

La naturaleza química de los analitos (estructura, tamaño, polaridad) y su ubicación en la matriz, inciden sobre la eficiencia de la extracción. Asumiendo que la matriz está conformada por un conjunto de partículas semiesféricas y porosas, los compuestos pueden encontrarse: adsorbidos sobre la superficie de la muestra, adsorbidos y/o disueltos en poros, micro o nanoporos y/o enlazados químicamente a la muestra. La interacción analito-matriz debe ser vencida por la energía suministrada en el proceso (Cambel, 2014). Aquellos compuestos que se encuentren en la superficie de la muestra o débilmente enlazados a ésta, serán transferidos a la fase extractante con mayor facilidad en un proceso de solubilidad controlada. En cambio, los compuestos que interactúan con mayor intensidad con la muestra y/o se ubican en la estructura porosa, son desorbidos con lentitud y se transfieren a la fase extractante por difusión controlada. Estos fenómenos son de gran interés, ya que la extracción de los compuestos objetivo puede realizarse en función del tiempo, haciendo relativa la necesidad de procesos exhaustivos (Mustafa & Turner, 2011).

En PLE, la temperatura es quizás uno de los factores de mayor importancia, ya que proporciona la energía para superar las interacciones analito-matriz (fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, atracciones dipolo) y analito-analito, lo que disminuye la energía de activación necesaria para la desorción. La temperatura elevada disminuye la tensión superficial, aumenta la viscosidad y mejora la difusividad del disolvente, lo que favorece su penetración en los poros de la muestra y contribuye con el transporte de masa, haciéndolo más rápido y eficiente (Christen & Kaufmann, 2014). Esto se traduce en extracciones más cortas con consumos menores de disolvente. Sin embargo, la extracción simultánea de compuestos hace que el proceso sea menos selectivo y la alta temperatura puede descomponer compuestos termolábiles, situaciones que implican dificultades.

Por otra parte, la presión tiene la función de mantener al disolvente en fase líquida a pesar de la temperatura elevada. El uso de presiones moderadas en PLE permite forzar el ingreso del disolvente en la estructura de la matriz, lo que favorece la humectación y contribuye con el transporte de masa. Sin embargo, se ha evidenciado que la presión no posee un efecto significativo sobre el rendimiento y la selectividad de la extracción (Mustafa & Turner, 2011).

Otro factor crítico en la PLE es la naturaleza del disolvente, ya que de ésta depende en gran medida la selectividad del proceso. El disolvente más empleado en esta técnica es el agua, seguido por las mezclas hidroalcohólicas, etanol, ésteres orgánicos (acetato y lactato de etilo), limoneno, entre otros. Estos disolventes han sido categorizados como seguros (GRAS) porque no representan riesgos para el ambiente o la salud humana y algunos de ellos se pueden obtener por transformación química o bioquímica (Chemat et al., 2012). En este sentido, PLE también es reconocida como una técnica de extracción “verde” en el marco de la química sustentable (Herrero et al., 2015).

El agua es el principal agente extractante de compuestos a partir de fuentes naturales. Al aumentar la temperatura disminuye la constante dieléctrica, atenuando las interacciones electrostáticas entre las moléculas de agua, así como entre las moléculas de agua y los compuestos circundantes. Por tanto, el uso de agua líquida a una temperatura y presión más altas permite disolver compuestos menos polares, ya que las interacciones intermoleculares que implican enlaces de hidrógeno se hacen menos pronunciadas, favoreciendo las fuerzas de dispersión de London (fuerzas dipolo). En otras palabras, el agua en estas condiciones es un disolvente menos polar, lo que se explica por el cambio de la constante dieléctrica en función de la temperatura, la cual es comparable a la de disolventes orgánicos a temperatura ambiente (Plaza & Turner, 2015).

De manera análoga, el etanol es una sustancia versátil dadas las posibilidades de ajustar algunas de sus propiedades físicas en función de la presión y la temperatura. Por ejemplo, los parámetros solvatocrómicos de Kamlet-Taft (dipolaridad/polarizabilidad, acidez y basicidad) del etanol (EtOH) decrecen en función de la temperatura, disminuyendo su polaridad con algunos grados de capacidad de donación y aceptación de enlaces de hidrógeno (Lu, Boughner, Liotta, & Eckert, 2002). Estos parámetros también son afectados por la densidad, la cual disminuye directamente con la temperatura y aumenta con la presión. Este comportamiento implica que el etanol puede disolver compuestos de diferente masa con polaridades medianas a bajas, realizando cambios en la temperatura y presión dentro de un proceso extractivo.

Por otra parte, algunos ésteres orgánicos (como acetato de etilo o lactato de etilo) y terpenos (como d-limoneno) son empleados para extraer sustancias de baja polaridad e incluso apolares (Herrero et al., 2013). En la Tabla 1 se resumen algunas aplicaciones de PLE, en las que se emplean algunos de los disolventes mencionados, en el aprovechamiento de subproductos agroindustriales y otras matrices.

Tabla 1. Algunas aplicaciones de PLE para el aprovechamiento de subproductos agroindustriales (Herrero et al., 2015)

Tabla 1. Algunas aplicaciones de PLE para el aprovechamiento de subproductos agroindustriales. Tomado y adaptado de (Herrero et al., 2015)

Matriz	Compuestos de interés	Disolvente	Condiciones de extracción
			T (°C) / P (MPa)
Subproductos de <i>Agaricus bisporus</i>	Esteroles	Etanol	50 / 10,3
Subproductos de manzana	Flavonoides	Agua	120 / 10,3

Semillas de cerezo brasileño	Compuestos fenólicos	Etanol	70 / ND
Subproductos de zanahoria	Carotenoides	Etanol	60 / 5,2
Epicarpio de Citrus unshiu	Hesperidina y narirutina	Agua	160 / 10,0
Orujo de uva	Agliconas aromáticas	Etanol:agua (50:50)	90 / 10,3
Hojas de olivo	Compuestos fenólicos	Etanol	150 / 10,3
Residuos de cebolla	Quercetina	Agua	120 / 5,0
Cáscara de papa	Antocianinas	Etanol:agua (80:20)	80 / 10,0

ND: No descrito

El equipamiento básico de un sistema PLE (Figura 2), consta de un reservorio de disolvente, una bomba para líquidos (usualmente proveniente de un sistema de cromatografía líquida), una espiral de precalentamiento, la celda de extracción, una válvula restrictiva de presión y un recipiente colector del extracto. En la modalidad dinámica de extracción, el disolvente fluye continuamente por la muestra contenida en la celda de extracción, por lo que la relación masa de muestra y flujo de disolvente afecta los resultados del proceso. En esta modalidad, el flujo constante de disolvente fresco permite varios equilibrios de transferencia de material e impide su saturación. En la modalidad estática, un volumen determinado de disolvente es puesto en contacto con la muestra por un tiempo dado, tras lo cual el disolvente se satura. Es posible realizar varias extracciones estáticas sobre una misma muestra, lo que constituiría una modalidad semicontinua. El uso de una modalidad u otra depende del interés del análisis.

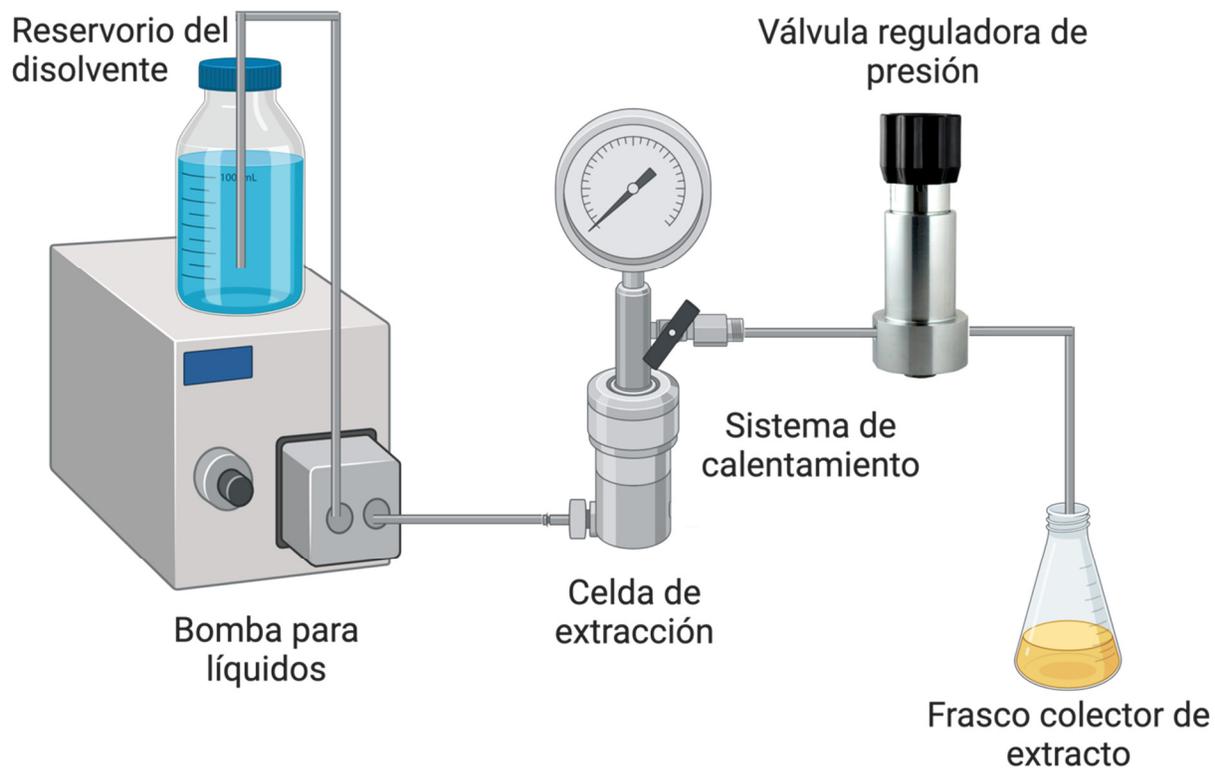


Figura 2. Esquema de un equipo PLE.

Diseño metodológico

El desarrollo de este trabajo implicó dos fases experimentales: la optimización del proceso de extracción y el estudio de evaluación económica para la valorización de las semillas de *P. edulis* tal y como se resume en la Figura 3:



Figura 3. Esquema metodológico del trabajo.

Los materiales y métodos que posibilitaron el desarrollo experimental de dichas fases se describen a continuación:

Material vegetal y reactivos

Los frutos de *P. edulis* fueron adquiridos en una central mayorista del mercado local (<https://www.corabastos.com.co/>) en Bogotá D. C., Colombia. Posteriormente el proceso industrial de despulpado fue simulado y las semillas fueron separadas de la pulpa (arilos) de manera manual. Las semillas fueron lavadas con agua destilada y

eventualmente secadas a temperatura ambiente en la sombra durante 48 h. Las semillas secas fueron molidas empleando un molino de café. Finalmente, las muestras molidas se almacenaron en bolsas de cierre hermético a -20 °C hasta su uso.

Los reactivos piceatanol, ácido gálico, quercetina, trolox, 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), acetato de potasio, acetato de amonio, carbonato de sodio, ácido fórmico, persulfato de potasio y cloruro de aluminio (III) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (MO, USA), mientras que el reactivo Folin-Ciocalteu fue comprado a Merck (Darmstadt, Germany). Los disolventes empleados fueron grado HPLC, entre estos: acetonitrilo, metanol, etanol, acetato de etilo y ácido acético (Pareac, Barcelona, España). *n*-Heptano fue adquirido a Pareac (Barcelona, España). El agua usada fue obtenida empleando un sistema Water Pro PS Labonco (MO, USA).

Extracción con líquidos presurizados (PLE)

El proceso de extracción se llevó a cabo en una unidad PLE ensamblada en el Laboratorio de Alta Presión del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. La unidad que se ilustra en la Figura 4 consiste en una bomba para líquidos (Hitachi L-6210, Tokio, Japón), una celda de precalentamiento (185 mL) y una celda de extracción (40 mL) de cierre rápido, cada una de las cuales está cubierta por una chaqueta de calentamiento controlada por un sistema Watlow SD. La presión de la unidad es regulada por una válvula Amflow BP-6 que se encuentra sumergida en un intercambiador de calor a fin de enfriar el extracto y facilitar su recuperación. Los materiales de la unidad están fabricados en acero inoxidable 316.

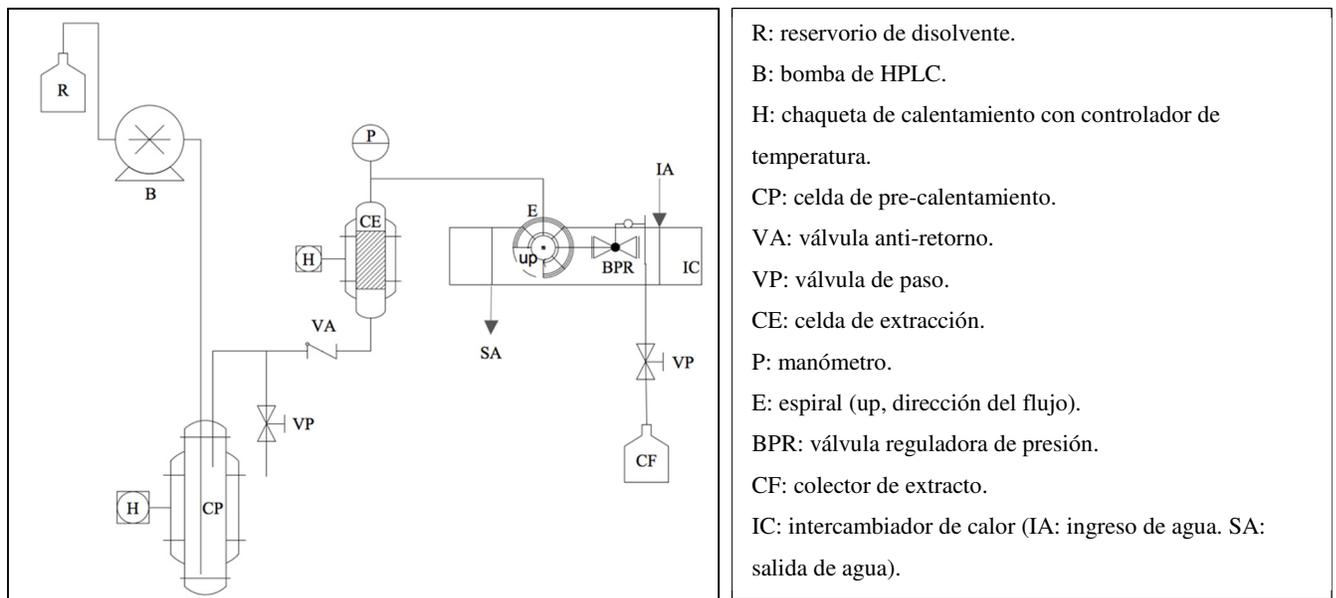


Figura 4. Esquema de la unidad PLE empleada en el proceso de obtención de extractos a alta presión a partir de semillas de *P. edulis*. Tomado de (Ballesteros-Vivas & Parada-Alfonso, 2015).

Dado el contenido de sustancias de naturaleza lipofílica de las semillas, el proceso de extracción se llevó a cabo en dos etapas secuenciales. En la primera etapa $\approx 5,0$ g de semillas fueron dispuestas en la celda de extracción y desengrasadas empleando *n*-heptano a 10 MPa y 100 °C durante 20 min. Posteriormente, una vez el extracto fue desalojado del sistema y durante la segunda etapa, se obtuvieron extractos de mayor polaridad de acuerdo con las condiciones descritas en el siguiente apartado:

Diseño experimental de la segunda etapa del proceso PLE

La obtención de extractos más polares con un contenido mayoritario de compuestos fenólicos luego de la etapa de desengrasado fue llevada a cabo siguiendo un diseño central compuesto centrado en la cara (CCD) de dos factores y tres niveles. Este diseño permitió estudiar el efecto de la composición del disolvente (CS) y de la temperatura de extracción (T) sobre seis variables de respuesta: rendimiento de extracción (R), contenido de piceatanol (CP), contenido total de fenoles (CTF), contenido total de flavonoides (CTFI) y actividad antioxidante (medidas por los métodos

de DPPH y ABTS). Los niveles de CS estudiados fueron 100% etanol-EtOH (nivel +1), 100% acetato de etilo-EtOAc (nivel -1, indicado como 0% EtOH) y la mezcla EtOH:EtOAc 1:1 %v/v (nivel 0, indicado como 50% EtOH). La matriz experimental del CCD se resume en la Tabla 2:

Tabla 2. Matriz experimental de CCD para la segunda etapa de extracción PLE

Experimento (i)	Variable codificadas		Variables reales	
	CS (%EtOH)	T (°C)	CS (%EtOH)	T (°C)
1	+1	-1	100	50
2	+1	0	100	100
3	+1	+1	100	150
4	0	-1	50	50
5	0	0	50	100
6	0	+1	50	150
7	-1	-1	0	50
8	-1	0	0	100
9	-1	+1	0	150
10	0	0	50	100
11	0	0	50	100
12	0	0	50	100

Los experimentos 5, 10, 11 y 12 corresponden al punto central del diseño.

Los datos experimentales se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden como se ilustra en la ecuación (1):

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 CS + \beta_2 T + \beta_{1,2} T \times CS + \beta_{1,1} CS^2 + \beta_{2,2} T^2 \quad (1)$$

Donde Y_i es la variable de respuesta, β_0 , β_1 , β_2 , $\beta_{1,1}$, $\beta_{2,2}$ y $\beta_{1,2}$ son coeficientes de regresión para el intercepto y los términos lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente, mientras que CS y T son los factores o variables

independientes y representan a la composición del disolvente y a la temperatura de extracción respectivamente. La adecuación del modelo fue determinada por el coeficiente de regresión ajustado (R^2) y los valores F y p obtenidos por el análisis de la varianza (ANOVA).

Adicionalmente, con base en los datos experimentales se realizó un proceso de optimización multirespuesta simultáneo de la segunda etapa de extracción empleando el enfoque matemático de deseabilidad a fin de establecer las condiciones de CS y T con las cuales es posible obtener respuestas maximizadas. El análisis estadístico y el proceso de optimización se hizo usando el programa Design-Expert Software version 9 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN).

Rendimiento de extracción (R)

Los extractos obtenidos en el proceso PLE secuencial de acuerdo con las condiciones planteadas en la Tabla xx 2 fueron secados en un evaporador rotatorio (Rotavapor R-300, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza) a 40 °C y presión reducida (175-240 mbar). El extracto seco fue pesado en balanza analítica y su rendimiento fue reportado como el porcentaje de la relación entre la masa del extracto y la masa de semillas secas empleadas en el proceso secuencial de extracción (%R).

Contenido de piceatanol (CP)

La cuantificación de piceatanol (P) se llevó a cabo en un sistema UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). La elución se llevó a cabo en una columna Hypersil gold RP-C18 (150 mm × 2.1 mm, 1.9 μm, Thermo Scientific, Waltham MA, USA) a 30 °C. Las fases móviles consistieron en agua:acetonitrilo:ácido acético 98,9:1:0,1 %v/v (Fase A) y acetonitrilo:ácido acético 99,9:0,1 %v/v (Fase B). El gradiente de elución fue el siguiente: 15% B en 0-2 min, 15-40% B en 2-13 min, 40-100% B en 13-14 min, 100% B en 14-16 min, 100-15% B en 16-17 min y 15%B en 17-20 min. El flujo fue de 0.4 mL/min y el volumen de inyección de la muestra fue de 2 μL. Los eluatos fueron monitoreados a 280, 305, 325 y 350 nm. La información cuantitativa de piceatanol en los extractos se obtuvo mediante una curva de calibración construida con el estándar de este compuesto en el rango de 7 a 250

$\mu\text{g/mL}$. Esta información fue procesada con el programa Chromeleon7® V7 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). CP en los extractos fue expresado como mg de P por g de semillas en base seca (mg P/g Db).

Determinación de los contenidos totales de compuestos fenólicos (CTF) y de flavonoides (CTFI)

CTF fue determinado por el método de Folin–Ciocalteu (FC) (Hosu, Cristea, & Cimpoiu, 2014) con algunas modificaciones, usando ácido gálico (GA) la curva estándar de calibración (0–100 $\mu\text{g/mL}$). 10 μL de disolución de extracto, 600 μL de agua y 50 μL de reactivo de FC (0.2 M), fueron mezclados. Después de 5 min, 150 μL de Na_2CO_3 (20% w/v) y 190 μL de agua fueron añadidos. Luego de 120 min de reacción, la absorbancia de la mezcla fue medida a 760 nm (Synergy HT, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de GA por g de semillas en base seca (mg GAE/g Db). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

CTFI fue estimado por el método colorimétrico de cloruro de aluminio (III) (Hosu et al., 2014) con algunas modificaciones, usando quercetina (QE) para la curva estándar de calibración (0–100 $\mu\text{g/mL}$). 100 μL de disolución de extracto, 30 μL de AlCl_3 (10% w/v), 30 μL of acetado de potasio (1 M), 300 μL of EtOH y 540 μL of agua fueron mezclados e incubados por 30 min, para luego medir la absorbancia a 415 nm. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de Q por g de semillas en base seca (mg Q/g Db). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Ensayos de actividad antioxidante

Ensayo DPPH

El ensayo de DPPH se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995) con algunas modificaciones. El valor de EC_{50} se definió como la concentración del extracto suficiente para reducir al 50% el valor de

máximo de absorción estimado en el blanco de DPPH. Para ello, se mezclaron e incubaron 25 μL de diferentes disoluciones metanólicas de los extractos y 975 μL de disolución DPPH (60 μM) durante 4 h. Después, se midió la absorbancia a 516 nm. La EC_{50} se expresó como $\mu\text{g}/\text{mL}$ de disolución de extracto (media de tres repeticiones).

Ensayo TEAC

El ensayo TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a Trolox) se realizó siguiendo el procedimiento de Re et al., 1999, usando trolox (0.25–2.0 mM) para la curva de calibración. $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se produjo mezclando ABTS (7.00 mM) y $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2.45 mM) en la oscuridad por 16 h. La disolución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se diluyó hasta una absorbancia de 0.7 a 734 nm. A continuación, se añadieron 10 μL de diferentes disoluciones de extractos a 990 μL de disolución $\text{ABTS}^{\bullet+}$. La absorbancia de la mezcla se registró a 734 nm cada 5 minutos durante 45 min. Los extractos se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valores TEAC (mM trolox/g extracto).

Estudio de evaluación económica

Los costos de fabricación (COM) del extracto óptimo de las semillas de *P. edulis* y la determinación de su posible valorización se realizó mediante una evaluación económica utilizando el programa SuperPro Designer 9.0® (Intelligen Inc., Scotch Plains, NJ, USA). Para ello se realizaron diagramas de flujo del proceso y se calcularon los COM de acuerdo con los precios de los componentes del equipo además de otros costos directos, fijos y gastos generales. Los costos de las operaciones se determinaron a partir de las condiciones óptimas de extracción de la segunda etapa PLE.

Resultados y discusión

El proceso de extracción secuencial PLE permitió obtener extractos de naturaleza lipofílica en la primera etapa y extractos polares ricos en compuestos de naturaleza fenólica, particularmente piceanol, con actividad antioxidante en la segunda etapa. En este capítulo se describen y discuten los resultados asociados a la segunda etapa de extracción, es especial, aquellos relacionados con el efecto de los factores de extracción sobre las variables de respuesta, la optimización de esta etapa y la evaluación económica que proporciona una base técnica para la valorización de las semillas de *P. edulis*.

Efecto de los factores de extracción sobre las variables de respuesta y optimización de la segunda etapa PLE.

El efecto de la composición del disolvente-CS (porcentaje de EtOH en la mezcla EtOH:EtOAc 0, 50 and 100% v/v) y de la temperature (50, 100 y 150 °C) fue estudiado sobre R, CP, CTF, CTFI, EC₅₀ y TEAC a fin de optimizar la segunda etapa del proceso PLE sobre las semillas desengrasadas. Para esto, un CCD fue usado para establecer la mejor combinación posible de los factores CS y T para cada respuesta. La Tabla 3 muestra los niveles codificados y reales de las variables independientes y de las respuestas resultantes. Los datos experimentales se ajustaron a modelos lineales, de interacción y de regresión cuadrática. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó para confirmar la adecuación, el nivel de significancia y el valor predictivo de los modelos de regresión (Tabla 4). La mayoría de los términos mostraron valores *F* altos y valores *p* bajos (< 0.005), lo que indica que los modelos de regresión fueron significativos. Los coeficientes de determinación (R^2) fueron cercanos a 1 (0,8032-0,9567), lo que indicó un alto grado de correlación entre los valores experimentales y predichos de los modelos.

Tabla 3. Condiciones del diseño experimental y resultados para cada variable de respuesta estudiada en el proceso de optimización de la segunda etapa de extracción del proceso PLE.

<i>i</i>	Variable codificadas		Variables reales		CP	R	CTF ^a	CTFI ^a	EC ₅₀ ^a	TEAC ^a
	%EtOH	T (°C)	%EtOH	T (°C)	(mg P/g)	(%)	(mg GAE/g)	(mg QE/g)	(µg/mL)	(mM trolox/g)
1	+1	-1	100	50	0,39	10,32	4,53 ± 0,11	1,73 ± 0,02	139,28 ± 0,25	2,38 ± 0,19
2	+1	0	100	100	2,62	17,18	12,94 ± 0,09	2,99 ± 0,06	91,87 ± 0,17	7,07 ± 0,32
3	+1	+1	100	150	5,19	19,83	9,18 ± 0,08	0,91 ± 0,15	131,74 ± 0,34	3,28 ± 0,05
4	0	-1	50	50	0,49	10,96	4,23 ± 0,39	1,38 ± 0,01	157,58 ± 0,18	2,78 ± 0,09
5 ^b	0	0	50	100	3,33	14,56	10,24 ± 0,08	3,13 ± 0,28	34,84 ± 0,21	5,00 ± 0,04
6	0	+1	50	150	3,89	19,08	6,29 ± 0,14	1,71 ± 0,12	139,53 ± 0,15	3,21 ± 0,11
7	-1	-1	0	50	0,34	7,06	1,78 ± 0,12	0,27 ± 0,01	186,76 ± 1,25	2,29 ± 0,18
8	-1	0	0	100	4,50	10,26	5,24 ± 0,12	1,32 ± 0,03	57,92 ± 0,35	5,99 ± 0,97
9	-1	+1	0	150	11,87	17,45	4,92 ± 0,1	2,08 ± 0,03	136,40 ± 1,02	3,4 ± 0,21
10 ^b	0	0	50	100	3,66	14,41	7,09 ± 0,35	3,11 ± 0,01	37,19 ± 0,67	4,44 ± 0,08
11 ^b	0	0	50	100	3,79	14,95	6,25 ± 0,36	3,2 ± 0,05	38,55 ± 0,57	4,63 ± 0,15
12 ^b	0	0	50	100	3,48	14,15	6,45 ± 0,13	2,97 ± 0,02	44,07 ± 0,71	4,61 ± 0,17

i: Experimento; EtOH: Etanol; T: temperatura; R: Rendimiento de extracción; CP: Contenido de piceatanol; P: Piceatanol; CTF: Contenido total de fenoles; GAE: Equivalentes de ácido gálico; CTFI: Contenido total de flavonoides; QE: Equivalentes de quercetina; EC₅₀: Concentración efectiva 50; TEAC: Capacidad antioxidante equivalente a trolox.

^a Valores presentados como la media ± la desviación estándar, *n* = 3.

^b Punto central del diseño experimental.

Tabla 4. ANOVA de las variables de respuesta estudiadas en el CCD.

Variable de respuesta	Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Valor-F	Valor-p
Rendimiento de extracción (R)	CS (% EtOH)	1	26,2923	235,120	0,0006*
	T (°C)	1	130,8534	1170,162	0,0000*
	CS × T	1	0,1936	1,731	0,2797
	CS ²	1	3,0888	27,622	0,0134*
	T ²	1	0,1335	1,194	0,3544
	Falta de ajuste:	3	6,2968	20,648	0,0166*
	Error puro: R ² : 0,9567	3	0,3355		
Contenido de piceatanol (CP)	CS (% EtOH)	1	12,0656	290,331	0,0004*
	T (°C)	1	64,8462	1560,369	0,0000*
	CS × T	1	11,3585	273,314	0,0004*
	CS ²	1	3,3727	81,154	0,0029*
	T ²	1	0,1593	3,832	0,1452
	Falta de ajuste:	3	11,618	93,457	0,0018*
	Error puro: R ² : 0,8862	3	0,1247		
Contenido total de fenoles (CTF)	CS (% EtOH)	1	36,08044	10,46900	0,0480
	T (°C)	1	16,14183	4,68367	0,1191
	CS × T	1	0,57220	0,16603	0,7110
	CS ²	1	1,35530	0,39325	0,5751
	T ²	1	25,91648	7,51986	0,0712
	Falta de ajuste:	3	9,02430	0,87282	0,5432
	Error puro: R ² : 0,8032	3	10,33922		
Contenido total de flavonoides (CTFI)	CS (% EtOH)	1	0,63549	68,5704	0,0037*
	T (°C)	1	0,28784	31,0585	0,0114*
	CS × T	1	1,71996	185,5864	0,0008*
	CS ²	1	1,03373	111,5408	0,0018*
	T ²	1	4,07019	439,1790	0,0002*
	Falta de ajuste:	3	1,07417	38,6348	0,0067*
	Error puro: R ² : 0,9000	3	0,02780		
EC ₅₀	CS (% EtOH)	1	55,20	3,596	0,1542
	T (°C)	1	961,61	62,641	0,0042*
	CS × T	1	458,42	29,862	0,0120*
	CS ²	1	874,99	56,998	0,0048*
	T ²	1	22457,89	1462,933	0,0000*
	Falta de ajuste:	3	2116,48	45,957	0,0052*
	Error puro: R ² : 0,9349	3	46,05		
TEAC	CS (% EtOH)	1	0,17848	3,1727	0,1729
	T (°C)	1	0,99903	17,7591	0,0244*
	CS × T	1	0,01155	0,2054	0,6811
	CS ²	1	1,92660	34,2481	0,0099*
	T ²	1	19,16496	340,6845	0,0003*
	Falta de ajuste:	3	3,23367	19,1610	0,0184*
	Error puro: R ² : 0,8568	3	0,16876		

*Valor significativo.

Los coeficientes de la ecuación polinómica se calcularon mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM) y se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Ecuaciones finales en términos de factores codificados obtenidas por análisis de RSM.

$Y_i = \beta_0 + \beta_1CS + \beta_2T + \beta_{1,2}T \times CS + \beta_{1,1}CS^2 + \beta_{2,2}T^2$	(1)
$R = 14,60 + 2,23CS + 4,67T - 0,22T \times SC - 1,04CS^2 + 0,21T^2$	(2)
$CP = 3,19 - 1,42CS + 3,29T - 1,69T \times SC + 1,12CS^2 - 0,24T^2$	(3)
$CTF = 3,03 + 0,45CS + 0,22T - 0,66T \times SC - 0,73CS^2 - 1,20T^2$	(4)
$CTFl = 7,73 + 2,70CS + 1,64 + 0,78T \times SC + 0,92CS^2 - 3,19T^2$	(5)
$EC_{50} = 42,85 + 1,53CS - 12,66T + 10,71T \times SC + 23,68CS^2 + 89,91T^2$	(6)
$TEAC = 4,91 + 0,25CS + 0,41T - 0,05T \times SC + 1,14CS^2 - 2,78T^2$	(7)

En la Tabla 5 la ecuación 1 describe el modelo polinómico general de segundo orden, mientras que las ecuaciones 2 a 7 describen las superficies de respuesta generadas para cada una de las respuestas estudiadas. A partir de dichas gráficas y con la información proporcionada por los gráficos de Pareto fue posible analizar la influencia de los parámetros de extracción sobre las respuestas. De acuerdo con la Figura 5, el rendimiento de extracción se vio afectado principalmente por los efectos lineales de temperatura-T y composición del disolvente-CS. Así, el mayor rendimiento de extracción (19,83 %) se obtuvo a 150 °C y 100% EtOH. Si bien este valor de rendimiento es considerable es inferior al informado por otros autores que han estudiado los subproductos del fruto de *P. edulis*. Por ejemplo, Oliveira, Angonese, Gomes, & Ferreira, (2016) obtuvieron un rendimiento de extracción de 25,9% a partir de semillas empleando dióxido de carbono supercrítico (25 MPa, 50 °C y 240 min), mientras que Viganó, Aguiar, et al., (2016) obtuvieron un rendimiento significativo (33,5%) a partir del bagazo (residuo integrado por semillas y pulpa) del fruto empleando

PLE y usando como disolvente una mezcla hidroalcohólica (H₂O:EtOH 1:1 %v/v, 10 MPa, 70 °C y 120 min) Estas diferencias pueden obedecer a los prolongados tiempos de extracción.

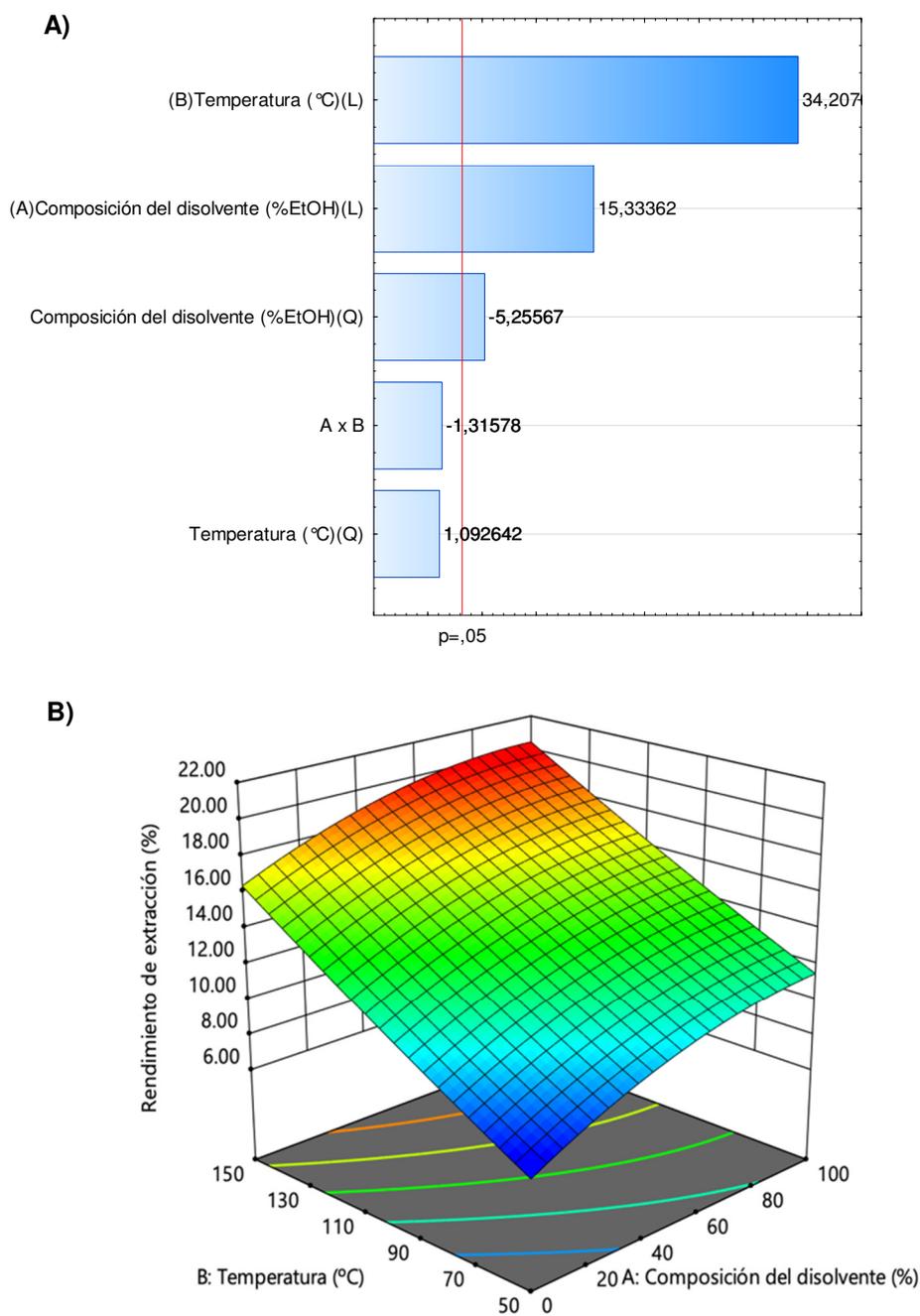


Figura 5. A) Gráfico de Pareto y **B)** superficie de respuesta para la dependencia del rendimiento en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.

Por otra parte, CP fue determinado en los extractos utilizando el respectivo estándar del compuesto. Para ello, el estándar fue inyectado de acuerdo con las condiciones cromatográficas descritas en el apartado 5.5. El cromatograma del piceatannol (P) y el espectro UV-Vis se muestran en la Figura 6.

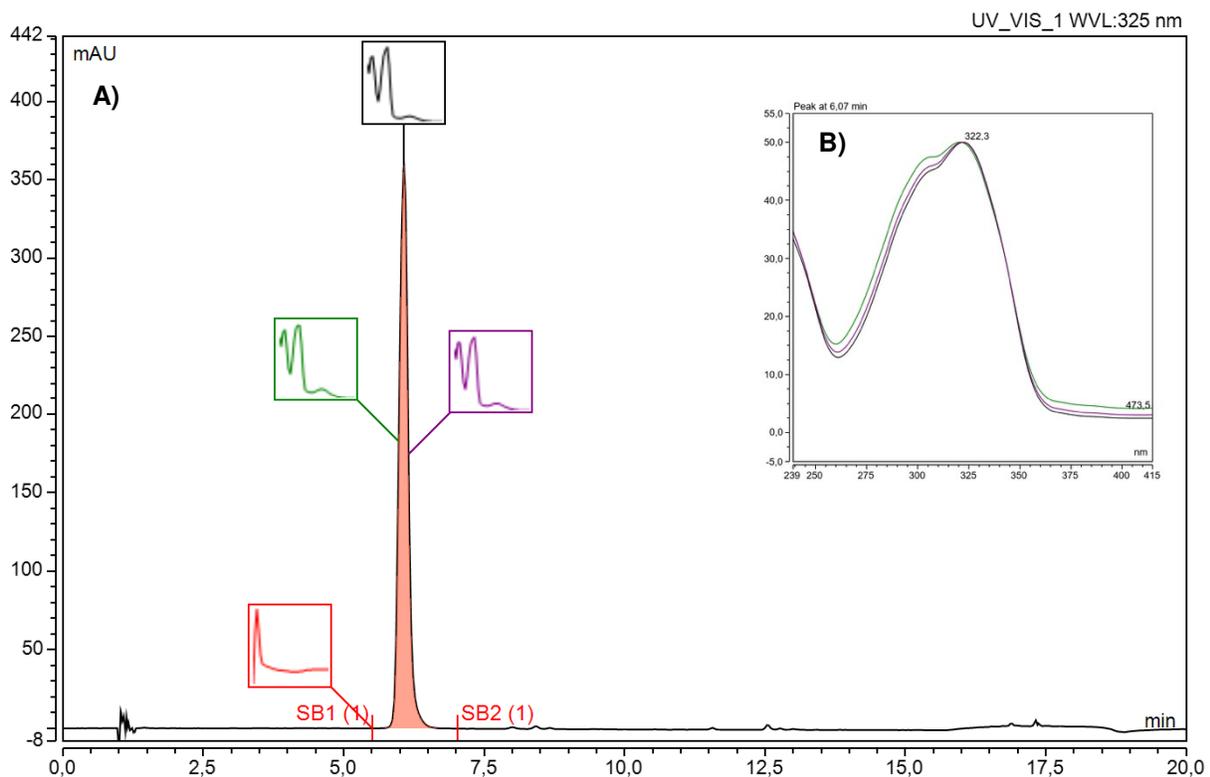


Figura 6. A) Cromatograma y **B)** espectro del estándar de piceatannol.

En este cromatograma se puede apreciar una única señal con una alta pureza, así como el perfil del espectro del compuesto. Con base en esta información se realizó la inyección de una de las muestras (Extracto obtenido en las condiciones $i = 8$: 0% EtOH y 100 °C) y el cromatograma obtenido se superpuso al cromatograma del estándar como se aprecia en la Figura 7. Tal y como se observa, se encontró una señal con el mismo tiempo de retención y un espectro muy similar al exhibido por el estándar,

lo cual permite suponer la presencia del compuesto en el extracto. Sin embargo, con la finalidad de comprobar este supuesto se procedió a co-inyectar al extracto junto con el estándar. De esta manera se observó un incremento en la señal (área) del extracto co-inyectado en el mismo tiempo de retención.

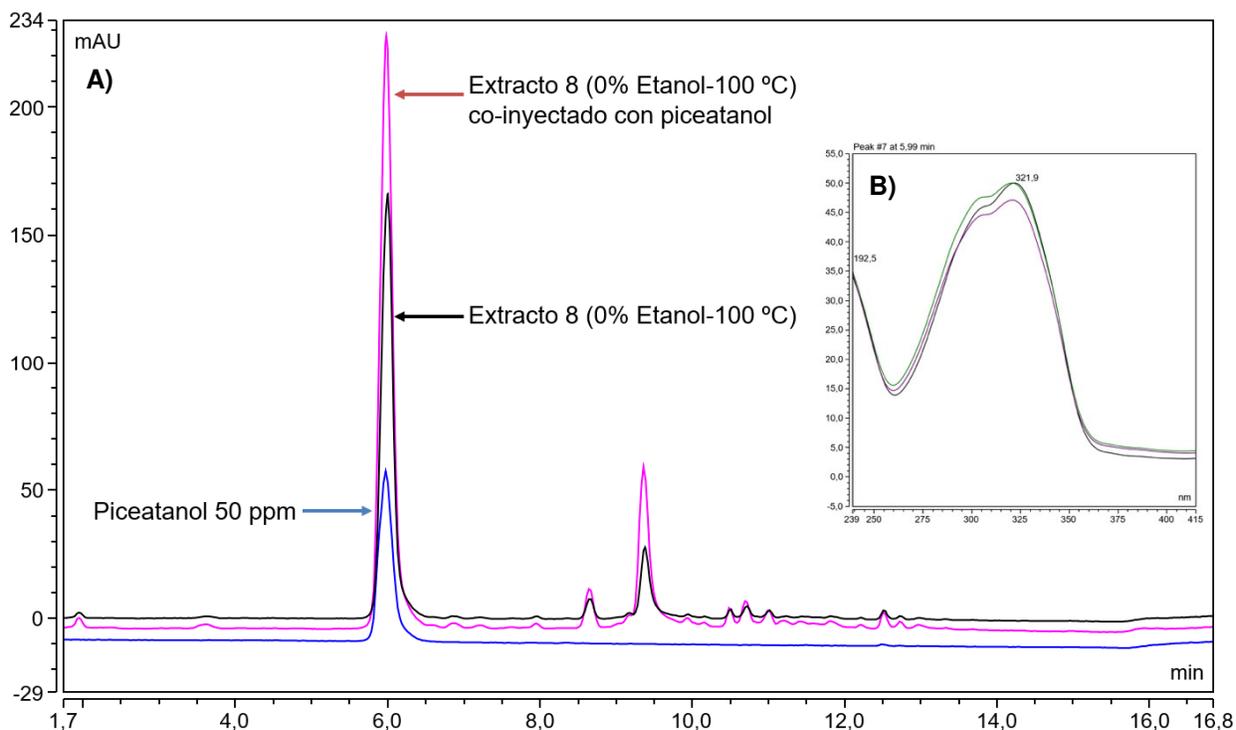


Figura 7. A) Cromatogramas superpuestos del estándar de piceatanol (50 ppm), del extracto 8 y del extracto 8 co-inyectado con piceatanol. **B)** Espectro UV-Vis para la señal a 5,99 min.

Una vez se verificó la presencia del piceatanol en el extracto, los extractos 1 a 12 fueron inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas y los resultados se muestran en la Figura 8. En dicha figura los cromatogramas del estándar de piceatanol y de los extractos 1 a 12 fueron superpuestos y el recuadro amarillo resalta las señales que corresponden al piceatanol en las muestras. El extracto 9 (0% EtOH y 150 °C) exhibió el mayor valor de CP (11,87 mg P/g) mientras que los extractos 1 (100% EtOH y 50 °C) y 7 (0% EtOH y 50 °C) presentaron el menor contenido de este compuesto (0,39 y 0,34 mg P/g, respectivamente), lo que indica que el efecto de T es el más

importante sobre esta variable, seguido por el efecto lineal y negativo CS. La temperatura mejora la transferencia de masa desde la muestra hacia la fase extractante. Este fenómeno se evidencia en el gráfico de Pareto y en la RSM de la Figura 9.

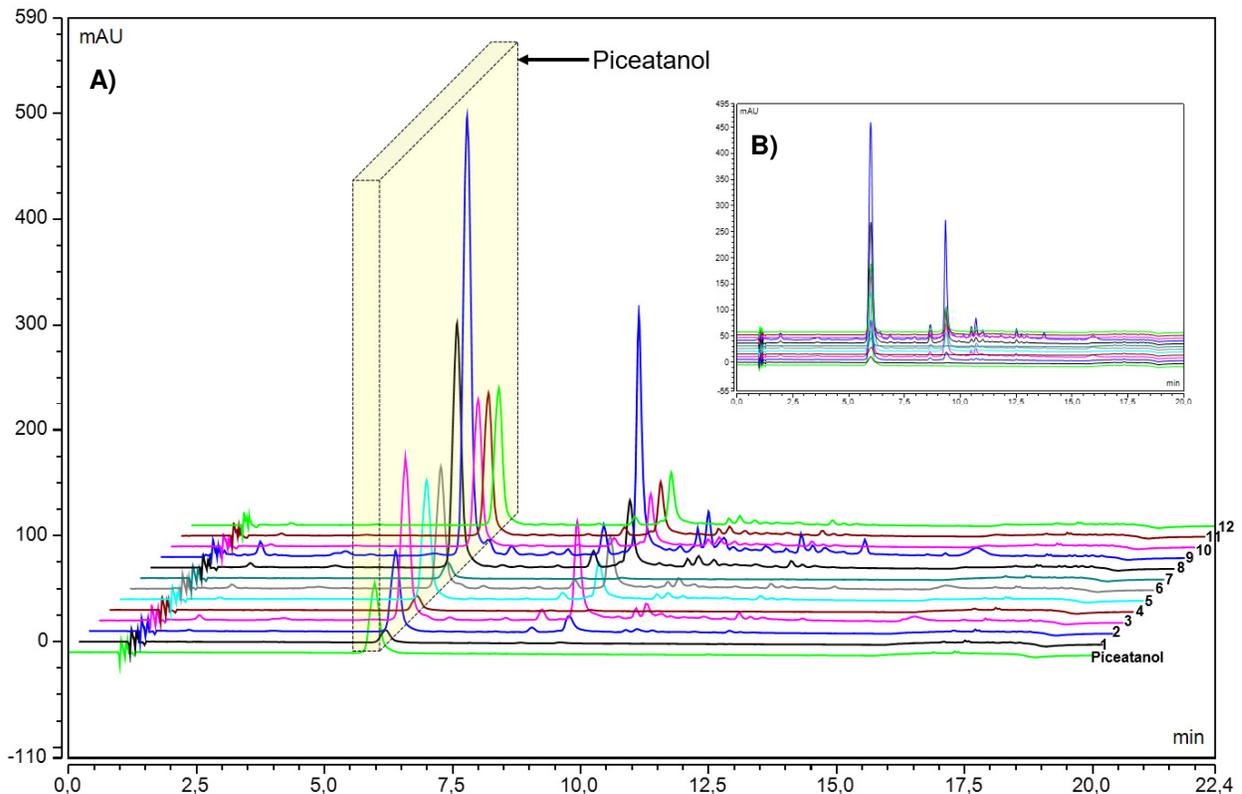


Figura 8. A) Cromatogramas de piceatannol y de los extractos superpuestos desacoplados en el tiempo y B) acoplados en el tiempo.

En otros estudios se ha informado sobre el CP en semillas de *P. edulis*. Por ejemplo, en un trabajo reciente (Viganó, Aguiar, et al., 2016) se reportó un CP de 18,56 mg P/g en un extracto obtenido mediante PLE ($H_2O:EtOH$ 1:1 %v/v, 10 MPa, 70 °C y 120 min) a partir del bagazo de *P. edulis*. En otro estudio, Pan et al., (2020) informaron que consiguieron 29,9 mg de piceatannol con una pureza de 94,8% a partir de 300 mg de un extracto de semillas de *P. edulis* obtenido por maceración y de manera secuencial usando primero éter de petróleo y posteriormente etanol. El extracto

alcohólico fue eventualmente sometido a un proceso de purificación en un sistema de cromatografía en contracorriente. Estos dos trabajos tienen en común un tiempo de extracción superior al empleado en el presente trabajo (20 min), por lo que es necesario explorar tiempos de extracción más prolongados a fin de mejorarla eficiencia en la recuperación de piceatanol.

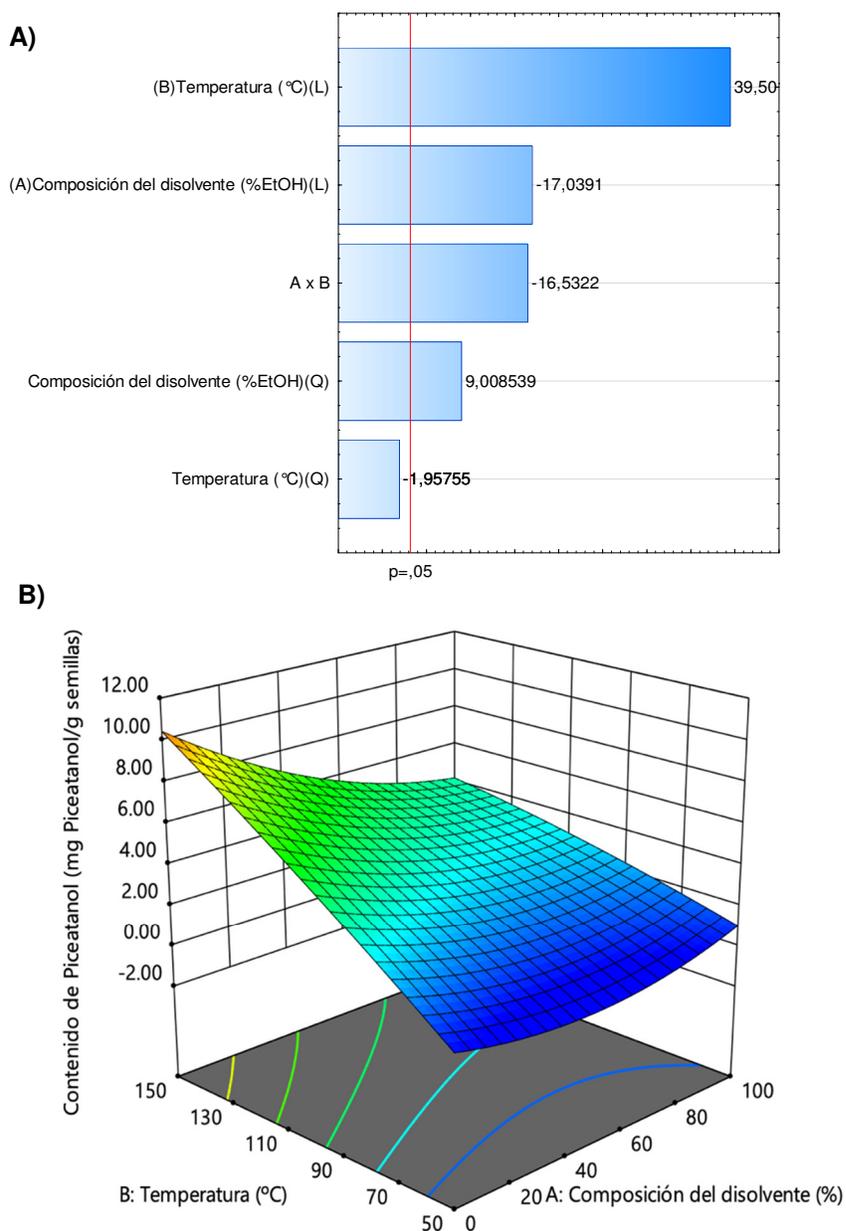


Figura 9. A) Gráfico de Pareto y **B)** Superficie de respuesta para la dependencia del contenido de piceatanol en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.

Por otra parte, la respuesta CTF (ver Figura 10) se vio afectada únicamente por el efecto lineal de CS, mientras que en el caso de CTFI (ver Figura 11) todos los factores lineales y cuadráticos tuvieron un efecto considerable, siendo el más importante el efecto cuadrático negativo de T y el efecto negativo de la interacción lineal entre CS y T.

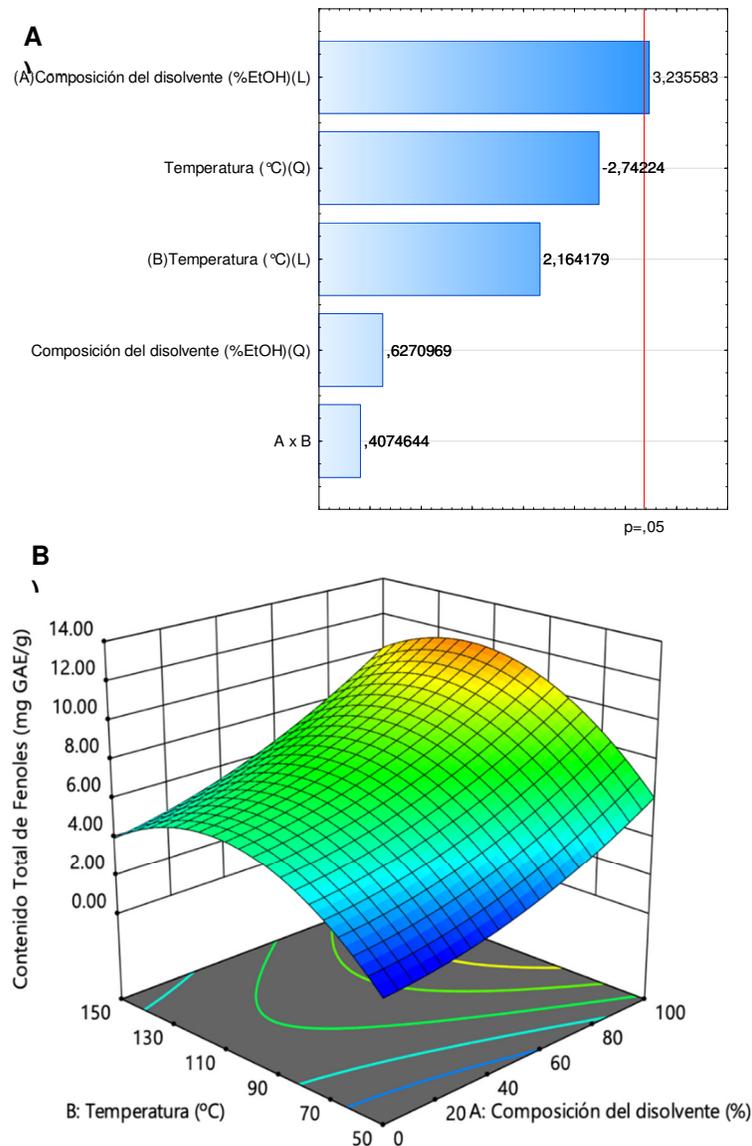


Figura 10. A) Gráfico de Pareto y **B)** Superficie de respuesta para la dependencia del contenido total de fenoles en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.

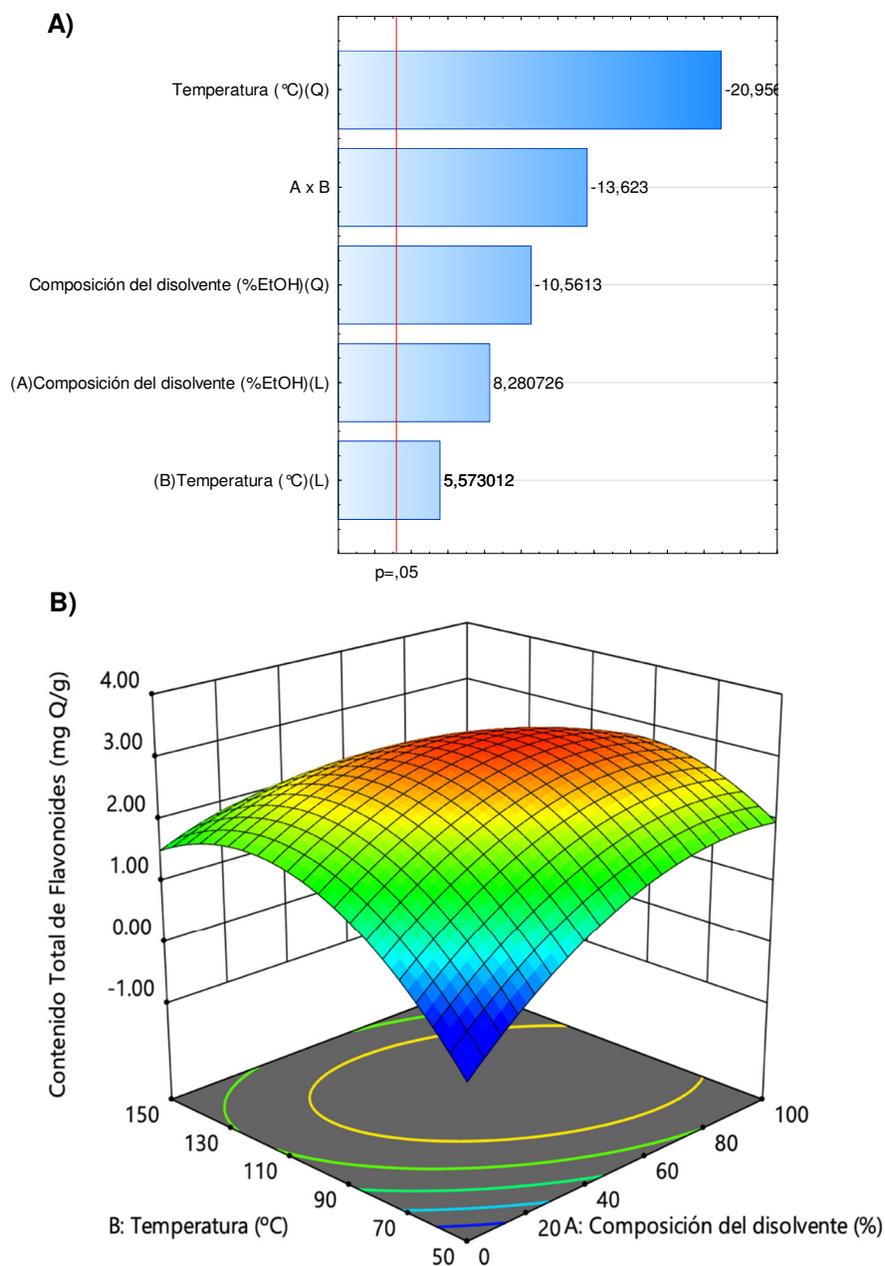


Figura 11. A) Gráfico de Pareto y **B)** Superficie de respuesta para la dependencia del contenido total de flavonoides en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.

Los mejores resultados de CTF ($12,94 \pm 0,09$ mg GAE/g db) fueron obtenidos a 100% EtOH y 100 °C, mientras que para CTFI ($3,2 \pm 0,05$ mg QE/g db) fueron obtenidos a 50% EtOH y 100 °C.

En la literatura científica es posible observar que los valores de CTF y de CTFI en semillas de *P. edulis* varían de acuerdo con la técnica de extracción, las condiciones de extracción (naturaleza del disolvente, temperatura, presión, tiempos de extracción, entre otros) y la variedad de la planta (Viganó, Aguiar, et al., 2016). De esta manera se ha informado sobre valores de CTF y de CTFI que alcanzan 31,1 mg GAE/g semilla y 10,3 mg Catequina/g semilla, respectivamente (de Santana et al., 2017).

Por otra parte, la respuesta EC_{50} (Figura 12) estuvo influenciada principalmente por el efecto cuadrático de la temperatura y el efecto lineal y negativo de la temperatura, obteniendo la mayor actividad antioxidante EC_{50} ($34,84 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$) con 50% EtOH y 100 °C. En cuanto a TEAC (Figura 13) el efecto principal fue el de la temperatura (cuadrático y negativo) seguido por el de la composición del disolvente (cuadrático) y se observó el mejor valor ($7,07 \pm 0,32\text{mM}$ de trolox/g) usando 100% EtOH a 100 °C. Comparativamente, los extractos PLE de las semillas de *P. edulis* tienen una actividad antioxidante EC_{50} moderada respecto a la observada en otros trabajos, por ejemplo Lourith & Kanlayavattanakul (2013) reportaron una actividad de 2,7 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo la actividad evaluada por TEAC del presente trabajo es superior a la informada por Domínguez-Rodríguez, García, Plaza, & Marina (2019): 2,01 mmol trolox/g.

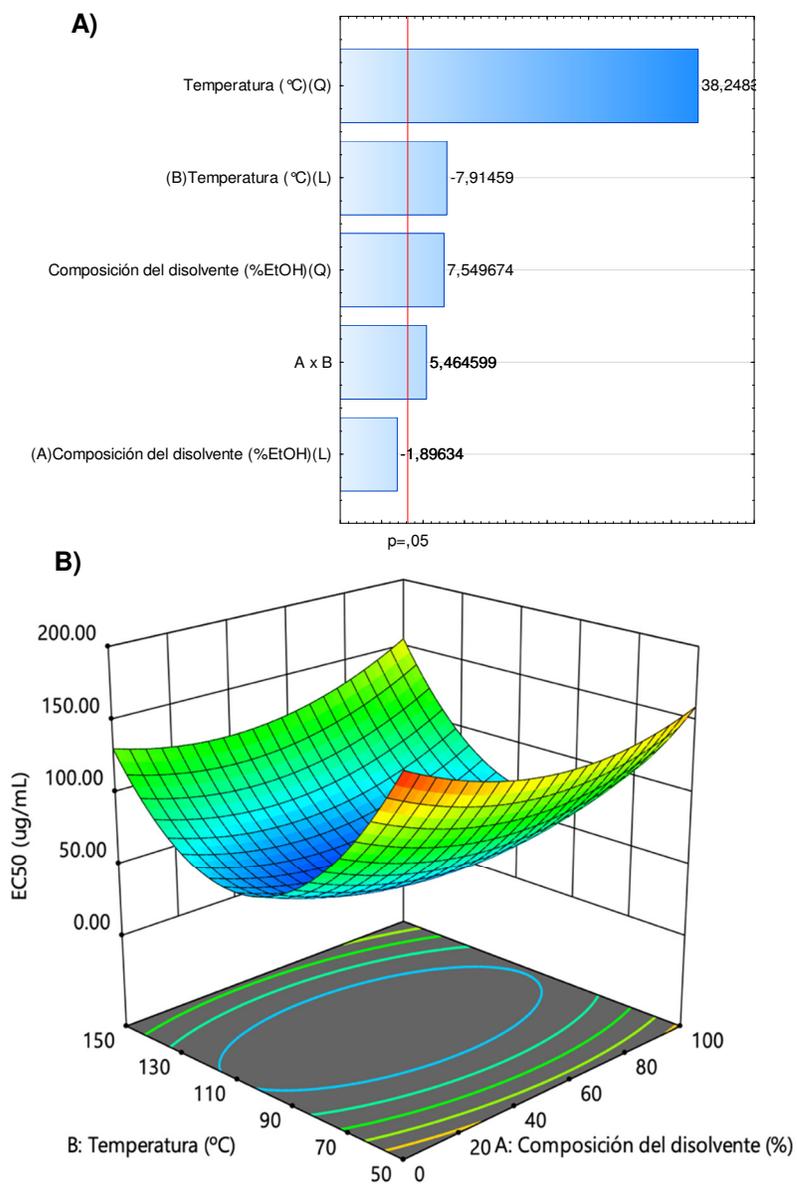


Figura 12. A) Gráfico de Pareto y **B)** Superficie de respuesta para la dependencia de la actividad antioxidante (EC_{50}) en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.

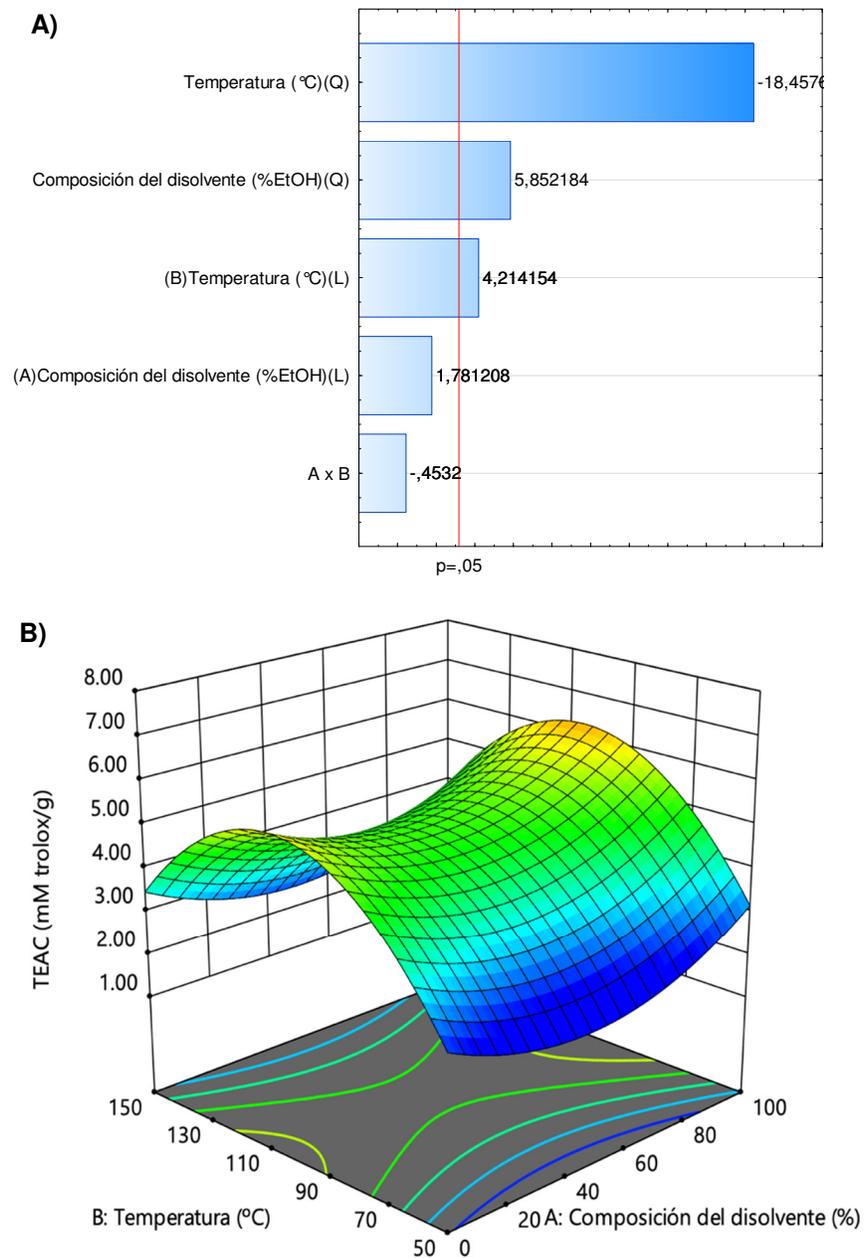


Figura 13. A) Gráfico de Pareto y **B)** Superficie de respuesta para la dependencia de la actividad antioxidante (TEAC) en función de la composición del disolvente y la temperatura durante la obtención del extracto polar a partir de semillas de maracuyá desengrasadas.

Con base en los resultados obtenidos se llevó a cabo un proceso de optimización de todas las respuestas estudiadas calculando la función de deseabilidad multirespuesta simultánea en el programa estadístico referenciado en el apartado 5.3.

La RSM de optimización se presenta en la Figura 14 y evidencia un valor máximo de deseabilidad 0,622.

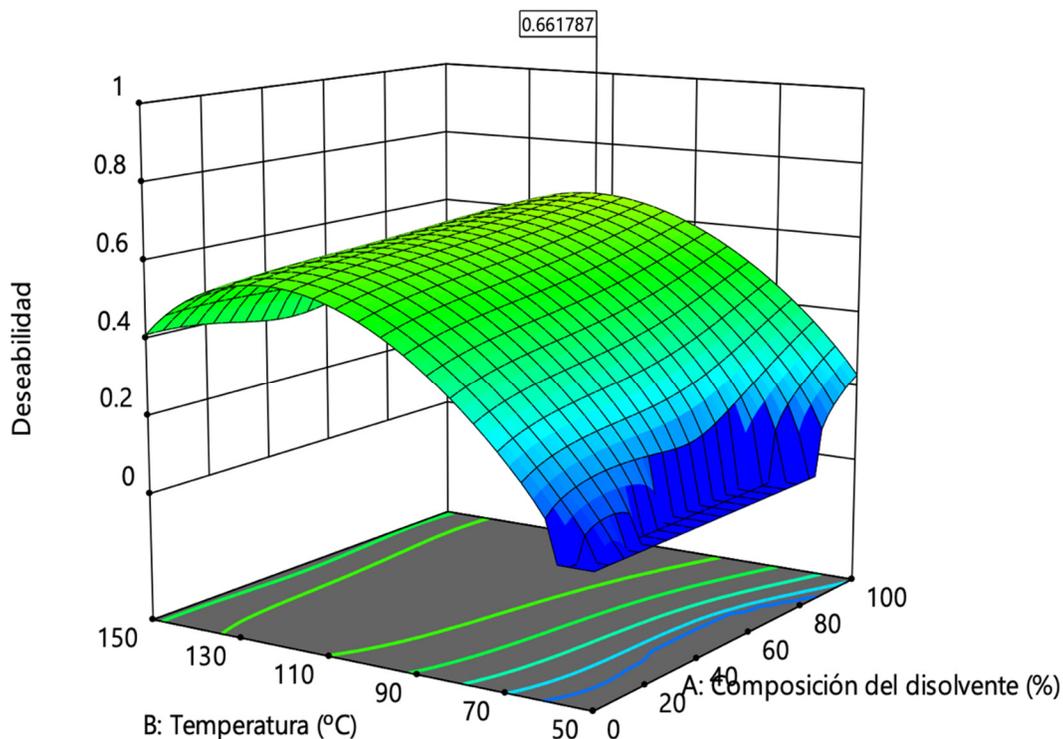


Figura 14. Superficie de respuesta para la optimización simultánea de todas las respuestas mediante función de deseabilidad.

El factor CS afecta de manera considerable a la superficie por lo que solo a valores altos se genera la curvatura deseada. Esto también ocurre con el factor T el cual es considerable a partir de los 100 °C. Con base en la RSM de deseabilidad se estimaron las condiciones óptimas, las rampas de maximización para las variables R, CP, CTF, CTFI y TEAC y la rampa de minimización para EC₅₀. Los resultados de la función muestran que las condiciones óptimas son 100% EtOH y 112 °C y los valores pronosticados para todas las respuestas se observan en la Figura 15.

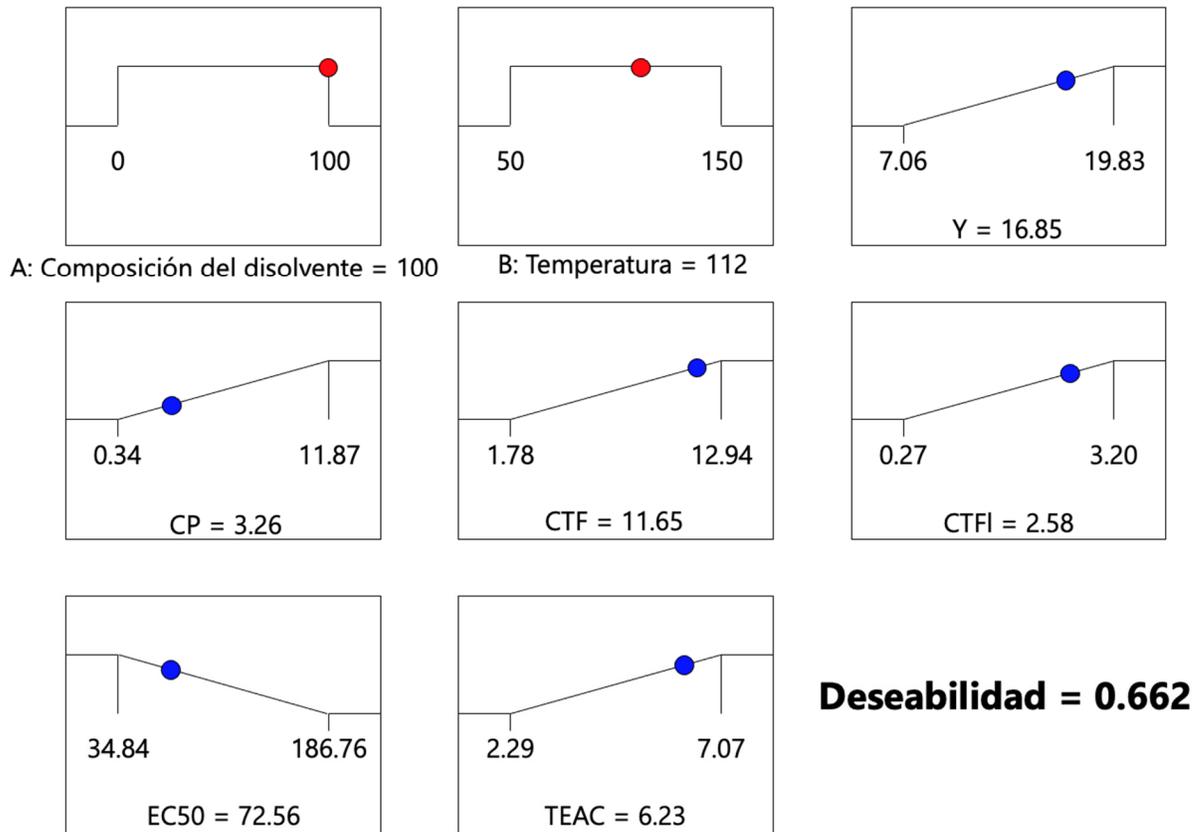


Figura 15. Gráfico de rampas para la optimización simultánea de las respuestas estudiadas en el diseño experimental.

De acuerdo con la Figura 15 es posible deducir que no es posible obtener un extracto con todas las variables maximizadas de manera simultánea, es decir, que dentro de los límites experimentales del CCD propuesto no es posible conseguir un extracto con un máximo de compuestos fenólicos, especialmente piceatannol, con una actividad antioxidante significativa. Sin embargo, los resultados de CCD permitieron establecer condiciones en las que es viable obtener un extracto con alto contenido de piceatannol (Condición 9), o un extracto con alto contenido fenólico y de flavonoides, así como con actividad antioxidante (Condiciones 5, 10-12). Esta situación se puede explicar por las correlaciones observadas entre las variables como se ilustra en la Figura 16.

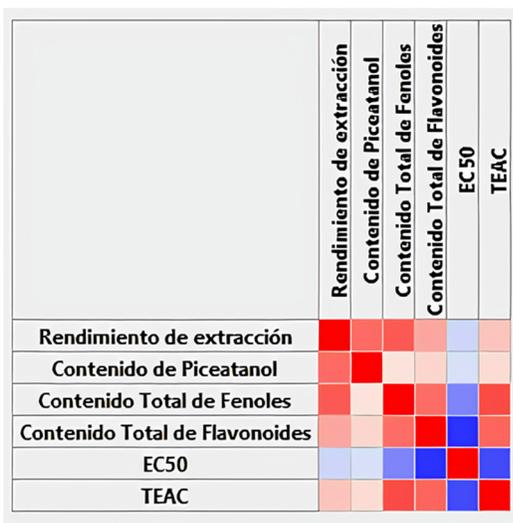


Figura 16. Correlaciones entre las variables estudiadas. El color azul indica una correlación negativa (Pearson -1) y el color rojo una correlación positiva (Pearson +1). Los tonos medios corresponden a correlaciones parciales y los claros indican que no hay correlación.

En la Figura 16 se observa que R se correlaciona con CP, CTF y CTFI, mientras que CTF se correlaciona de manera parcial con CTFI y TEAC. Por otra parte, CP no se correlaciona con la actividad antioxidante. Finalmente, CTF y CTFI se correlacionan de manera negativa con EC₅₀ y ese último a su vez se correlaciona de la misma manera con TEAC. Este comportamiento explica la dificultad para obtener un extracto PLE con todos los atributos deseados de manera simultánea. Si bien, la actividad antioxidante ha sido correlacionada en la diversos estudios con el contenido fenólico (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouységu, 2011), es claro que existen otros compuestos que pueden ser responsables de esta actividad y en el caso de los extractos PLE del presente estudio se observa que hay una gran variedad de compuestos (ver cromatogramas de la Figura 8) que no fueron identificados y que deben ser caracterizados en estudios posteriores.

Evaluación económica del proceso de extracción

Dado que las condiciones óptimas de extracción obtenidas mediante la función de deseabilidad no permitieron lograr el propósito de maximizar la totalidad de las respuestas de manera simultánea y el interés de este trabajo por obtener extractos ricos en piceatannol; se resolvió llevar a cabo dos procesos de evaluación económica: uno siguiendo las condiciones óptimas y otro de acuerdo con las condiciones del extracto de mayor contenido de piceatannol. De esta forma, la primera evaluación (Simulación 1) se realizó con 100% EtOH y a 112 °C, mientras que la segunda evaluación (Simulación 2) se llevó a cabo a 0% EtOH (100% EtOAc) y a 150 °C (condiciones del experimento 9), dado que a estas condiciones se obtuvo el mayor contenido de piceatannol (11,87 mg P/g). Los diagramas de flujo para las simulaciones 1 y 2 se ilustran en las Figuras 17 y 18, respectivamente.

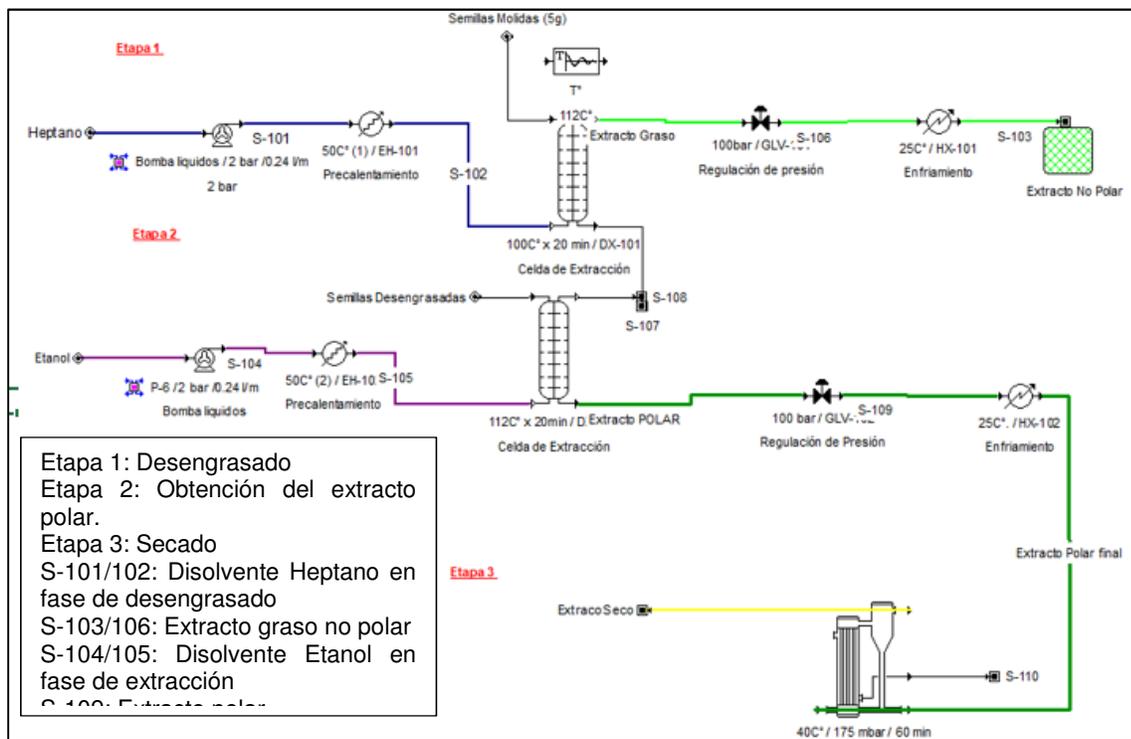


Figura 17. Diagrama de flujo para la evaluación económica en las condiciones óptimas de extracción: 100% EtOH y 112 °C (Simulación 1).

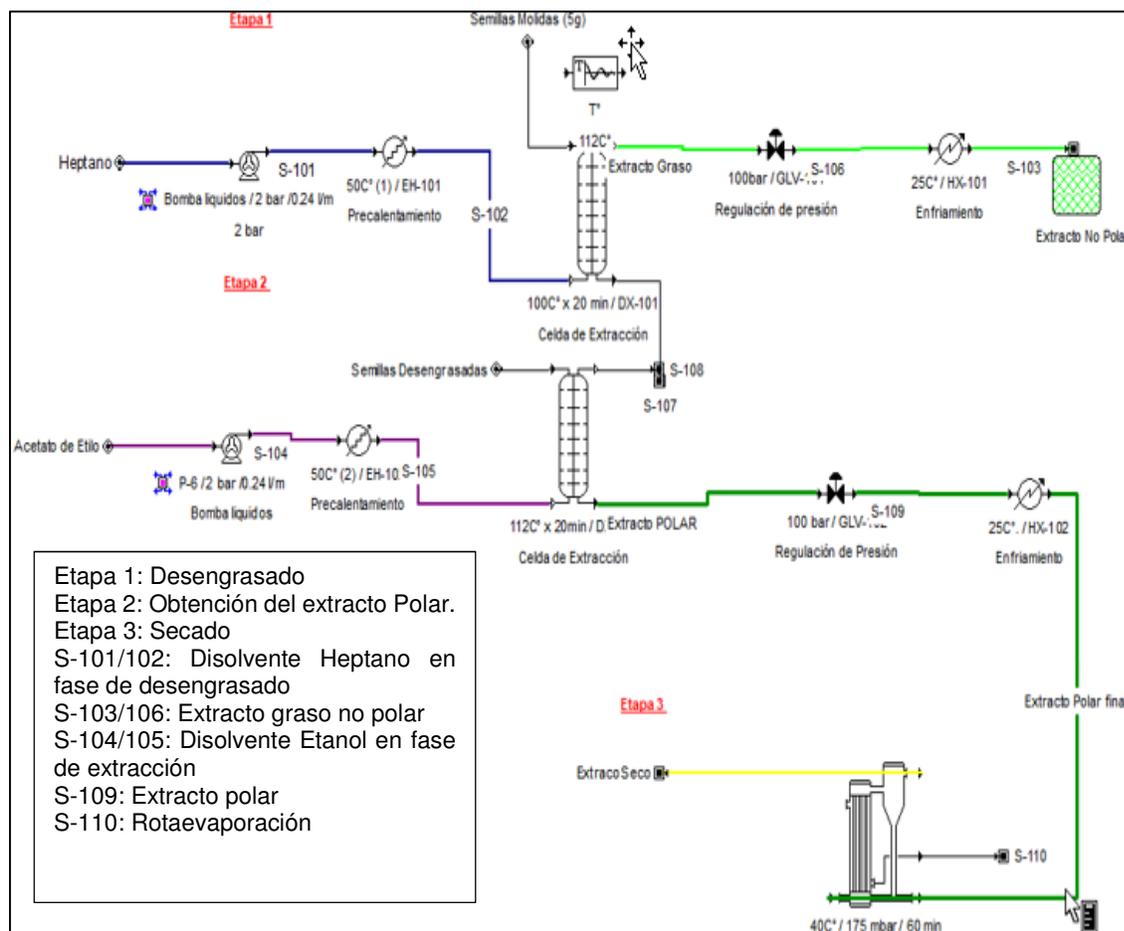


Figura 18. Diagrama de flujo para la evaluación económica en la condiciones de mayor recuperación de piceatanol: 0% EtOH (100% EtOAc) y 150 °C (Simulación 2).

Los diagramas de flujo de los dos esquemas contienen tres etapas que permiten obtener el extracto deseado:

- 1) Etapa de desengrasado, llevada a cabo con n-heptano a 100 °C, 10 MPa y 20 min.
- 2) Etapa de obtención del extracto polar, llevada a cabo con 100% EtOH (112 °C, 10 MPa y 20 min) o con 0% EtOH (150 °C, 10 MPa y 20 min).
- 3) Etapa de secado del extracto polar, llevada a cabo por rotaevaporación a 40 °C y 175 mbar (para el caso de EtOH) o 240 mbar (para el caso de EtOAc).

Las simulaciones fueron realizadas considerando los costos de manufactura del equipo PLE, el gasto energético del proceso secuencial de extracción y de secado, el consumo de disolventes y el uso del liofilizador. Adicionalmente se consideraron los datos de rendimiento de extracción de la segunda etapa para cada caso y el contenido de piceatnol obtenido. Del mismo modo, el costo comercial del piceatanol para el año 2020 fue incluido y se calculó el valor de los extractos de acuerdo con el contenido de este en los mismos. Esta información fue alimentada en programa descrito en la página No 38. Los resultados de la evaluación económica para las simulaciones 1 y 2 se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la evaluación económica de las simulaciones 1 y 2

Evaluación Económica	Simulación No 1	Simulación No 2
Inversión Total	19003 USD	18906 USD
Ingresos Totales	3567 USD/año	4844 USD/año
Costos Operativos	2395 USD/año	2229 USD/año

De acuerdo con la Tabla 6 los dos procesos son rentables, generando mayores beneficios el uso de EtOAc debido al mayor contenido de piceatanol que este permite obtener en el proceso de extracción. Adicionalmente, la evaluación económica indica que el retorno de la inversión se daría en 7.23 años dado que el costo de la materia prima, es decir, las semillas de *P. edulis*, es prácticamente nulo, el proceso PLE secuencial es viable y el producto final tiene gran valor. De esta manera es posible asumir que es posible valorizar económicamente las semillas de *P. edulis* si se explotan de acuerdo con la metodología descrita en el trabajo.

Conclusiones y recomendaciones

Los resultados del trabajo permiten concluir que:

- 1) Las semillas de *P. edulis* son una fuente importante de extractos con actividad antioxidante y un contenido considerable de compuestos fenólicos, como piceatanol, y flavonoides.
- 2) El proceso secuencial de extracción en condiciones PLE permite obtener extractos enriquecidos en piceatanol.
- 3) El diseño experimental-CCD, la metodología de análisis de superficie de respuesta-RSM y la función matemática de deseabilidad permitieron conocer el efecto de los factores de extracción sobre las variables estudiadas, además de las condiciones óptimas de extracción.
- 4) El proceso de evaluación económica permitió establecer que el proceso secuencial PLE permitiría obtener extractos de valor agregado cuya comercialización permitiría la valorización de las semillas de *P. edulis*.

Asimismo es recomendable seguir las siguientes observaciones para trabajos futuros orientados a:

- 1) La caracterización e identificación de otros compuestos químicos presentes en el extracto usando técnicas avanzadas como la cromatografía líquida o gaseosa acoplada a espectrometría de masas de alta resolución o el análisis de mezclas mediante resonancia magnética nuclear.
- 2) La evaluación de la relación entre la composición química de los extractos y su actividad antioxidante.

3) El estudio de tiempos de extracción más prolongados, así como la evaluación de otros disolventes bajo condiciones PLE.

Bibliografía

- Agronet. (2017). Base Agrícola EVA 2007-2017. (17 de Diciembre de 2020) Bogotá: Sistema de estadísticas agropecuarias. Ministerio de Agricultura-Gobierno de Colombia. <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. *Chem Soc Rev*, 39(1), 301–312. <https://doi.org/10.1039/b918763b>
- Ballesteros-Vivas, D., & Parada-Alfonso, F. (2015). *Estudio comparativo sobre la obtención de extractos con actividad citotóxica a partir de residuos frutícolas*. Departamento de Química-Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cambel, V. (2014). Extraction Methodologies: General Introduction. In K. Hostettmann (Ed.), *Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods* (First, pp. 17–42). Chichester: Wiley & Sons.
- Capello, C., Fischer, U., & Hungerbühler, K. (2007). What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9(9), 927. <https://doi.org/10.1039/b617536h>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Christen, P., & Kaufmann, B. (2014). New Trends in Extraction of Natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurized Liquid Extraction. In K. Hostettmann, H. Stuppner, A. Marston, & S. Chen (Eds.), *Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods, Volume 1* (First, pp. 77–103). West Sussex,

United Kingdom: John Wiley & Sons.

- de Santana, F. C., de Oliveira Torres, L. R., Shinagawa, F. B., de Oliveira e Silva, A. M., Yoshime, L. T., de Melo, I. L. P., ... Mancini-Filho, J. (2017). Optimization of the antioxidant polyphenolic compounds extraction of yellow passion fruit seeds (*Passiflora edulis* Sims) by response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3552–3561. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2813-3>
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>
- Domínguez-Rodríguez, G., García, M. C., Plaza, M., & Marina, M. L. (2019). Revalorization of *Passiflora* species peels as a sustainable source of antioxidant phenolic compounds. *Science of the Total Environment*, 696, 134030. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134030>
- Dunn, P. J. (2012). The importance of green chemistry in process research and development. *Chem Soc Rev*, 41(4), 1452–1461. <https://doi.org/10.1039/c1cs15041c>
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., & Meybeck, A. (2011). *Global food losses and food waste (Save Food!)*. Düsseldorf.
- Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J. a., & Ibañez, E. (2013). Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43(2), 67–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.12.008>
- Herrero, M., Sánchez-Camargo, A. del P., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2015). Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.018>
- Hosu, A., Cristea, V.-M., & Cimpoi, C. (2014). Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: prediction of antioxidant

- activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chemistry*, *150*, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.153>
- Kosseva, M. R. (2013). *Sources, characterization, and composition of food industry wastes*. (M. R. Kosseva & C. Webb, Eds.), *Food Industry Wastes* (First Edit). Oxford: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391921-2.00003-2>
- Lim, T. K. (2012). *Passiflora edulis*. In T. K. Lim (Ed.), *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. Volume 4, Fruits* (First, Vol. 4, pp. 147–165). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2>
- Lourith, N., & Kanlayavattanakul, M. (2013). Antioxidant activities and phenolics of *Passiflora edulis* seed recovered from juice production residue. *Journal of Oleo Science*, *62*(4), 235–240. <https://doi.org/10.5650/jos.62.235>
- Lu, J., Boughner, E. C., Liotta, C. L., & Eckert, C. A. (2002). Nearcritical and supercritical ethanol as a benign solvent : polarity and hydrogen-bonding, *198*, 37–49.
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, *703*(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- Oliveira, D. A., Angonese, M., Gomes, C., & Ferreira, S. R. S. (2016). Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. *Journal of Supercritical Fluids*, *111*, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.01.010>
- Palma, M., Barbero, G. F., Piñero, Z., Liazid, A., Barroso, C. G., Rostagno, M. A., ... Prado, J. M. (2013). Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects. In M. A. Rostagno & J. M. Prado (Eds.), *Natural Product Extraction. Principles and Applications* (First, pp. 58–88). Cambridge: RSC Publishing.
- Pan, Z. H., Ning, D. S., Fu, Y. X., Li, D. P., Zou, Z. Q., Xie, Y. C., ... Li, L. C. (2020). Preparative Isolation of Piceatannol Derivatives from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds by High-Speed Countercurrent Chromatography Combined with High-Performance Liquid Chromatography and Screening for α -Glucosidase Inhibitory

- Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(6), 1555–1562. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04871>
- Piotrowska, H., Kucinska, M., & Murias, M. (2012). Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 750(1), 60–82. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.11.001>
- Plaza, M., & Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, In Press*, 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.022>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységú, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Shoko Sano, Kenkichi Sugiyama, Tatsuhiko Ito, Yumi Katano, and A. I. (2011). Identification of the strong vasorelaxing substance scirpusin B, a dimer of piceatannol, from passion fruit (*Passiflora edulis*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6209–6213. <https://doi.org/10.1021>
- Silva, D. C., Freitas, A. L. P., Barros, F. C. N., Lins, K. O. A. L., Alves, A. P. N. N., Alencar, N. M. N., ... de Paula, R. C. M. (2012). Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.029>
- Song, H., Jung, J. I., Cho, H. J., Her, S., Kwon, S.-H., Yu, R., ... Park, J. H. Y. (2015). Inhibition of tumor progression by oral piceatannol in mouse 4T1 mammary cancer is associated with decreased angiogenesis and macrophage infiltration. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(11), 1368–1378.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.005>

- Viganó, J., Aguiar, A. C., Moraes, D. R., Jara, J. L. P., Eberlin, M. N., Cazarin, C. B. B., ... Martínez, J. (2016). Sequential high pressure extractions applied to recover piceatannol and scirpusin B from passion fruit bagasse. *Food Research International*, *85*, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.015>
- Viganó, J., Brumer, I. Z., Braga, P. A. de C., da Silva, J. K., Maróstica Júnior, M. R., Reyes Reyes, F. G., & Martínez, J. (2016). Pressurized liquids extraction as an alternative process to readily obtain bioactive compounds from passion fruit rinds. *Food and Bioproducts Processing*, *100*, 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.08.011>
- Ye, T., Su, J., Huang, C., Yu, D., Dai, S., Huang, X., ... Zhou, M. (2016). Isoorientin induces apoptosis, decreases invasiveness, and downregulates VEGF secretion by activating AMPK signaling in pancreatic cancer cells. *Oncotargets and Therapy*, *Volume 9*, 7481–7492. <https://doi.org/10.2147/OTT.S122653>
- Yepes, S. M., Montoya, L., & Orozco, F. (2008). Valorización de residuos agroindustriales -Frutas- en Medellín y el Sur del Valle del Aburrá, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *61*(1), 4422–4431.

Anexos

Anexo 1. Curvas de calibración para la determinación de los contenidos asociados a las variables de respuesta.

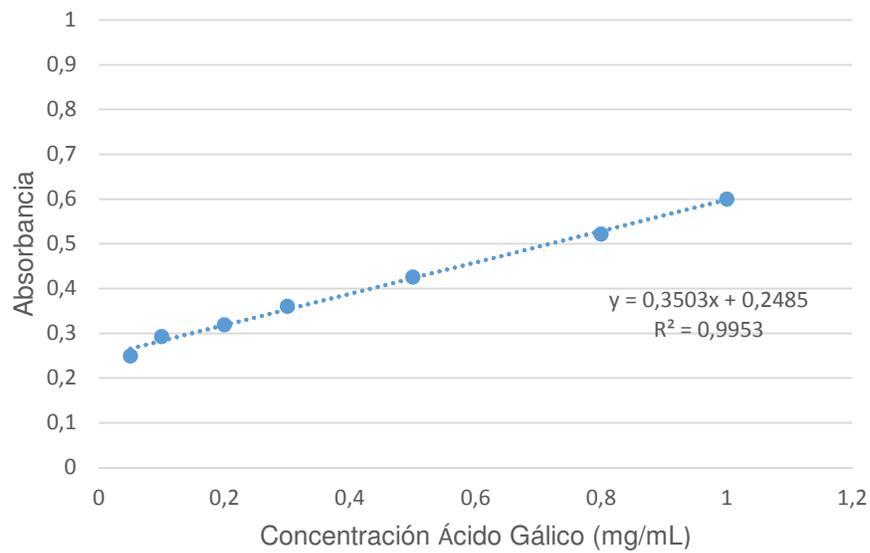


Figura A19. Curva de calibración con Ácido Gálico para determinación de concentración total de Fenoles

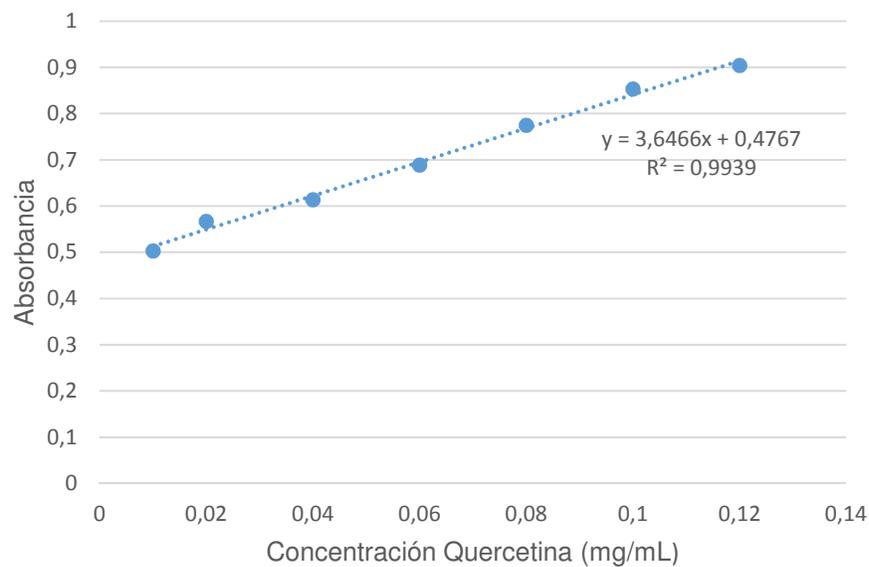


Figura A20. Curva de calibración con Quercetina para determinación de concentración total de Fenoles

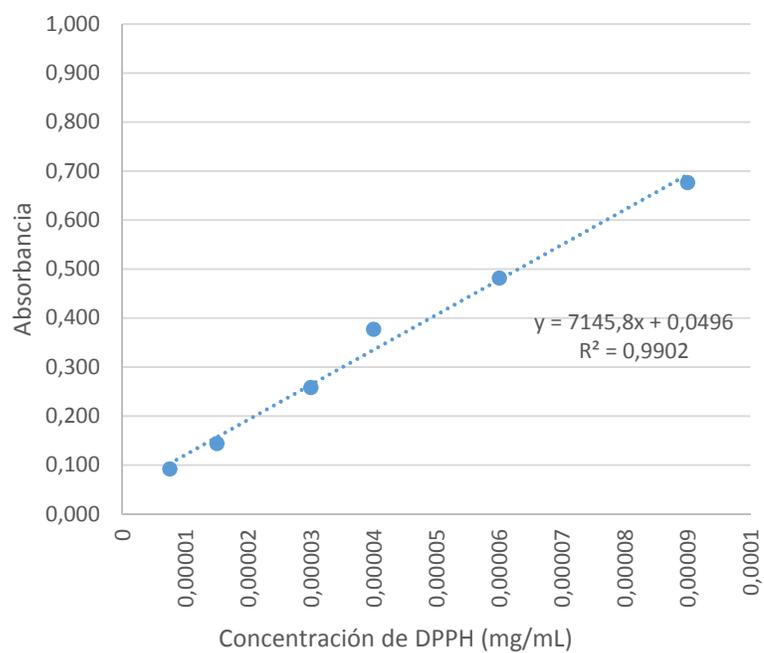


Figura A21 Curva de calibración para determinación de concentración de DPPH

Obtención de extractos enriquecidos en compuestos tipo piceatannol a partir de la semilla de maracuyá (*Passiflora edulis*; Sims) mediante el uso de la técnica extracción Líquidos Presurizados (PLE)

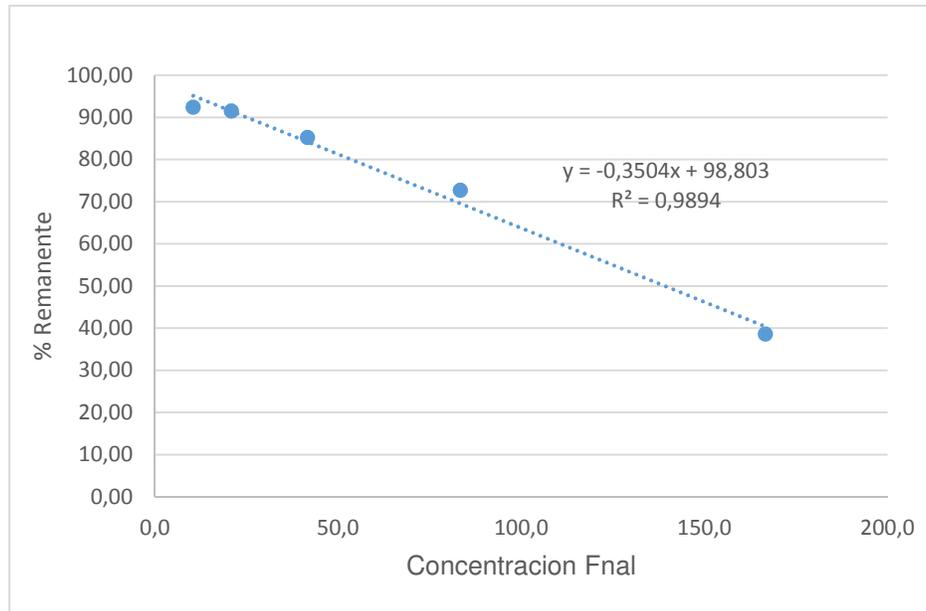


Figura A22 Curva de determinación EC50 del extracto 1 condiciones EtOH 100% y 50 °C

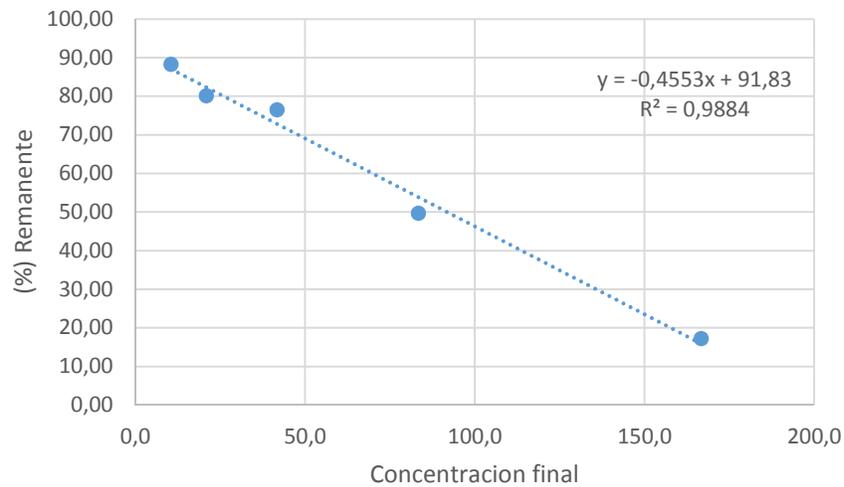


Figura A23. Curva de determinación EC50 del extracto 2 condiciones EtOH 100% y 100 °C

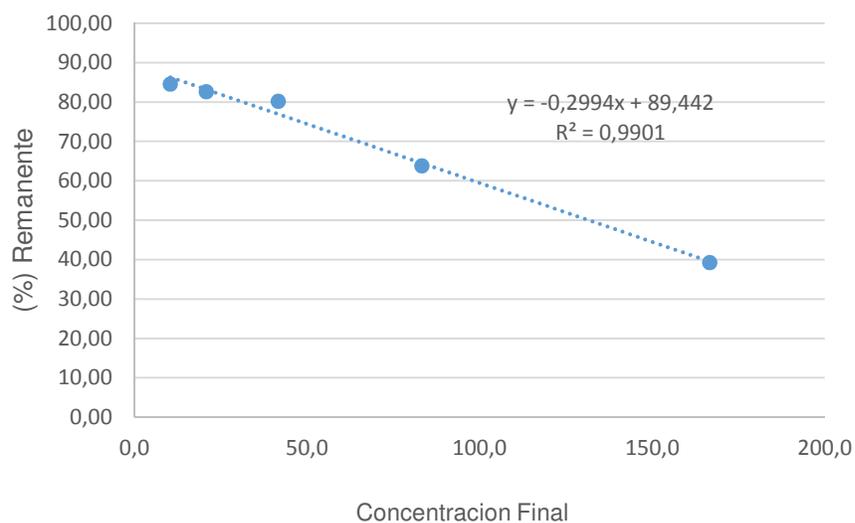


Figura A24. Curva de determinación EC50 del extracto 3 condiciones EtOH 100% y 150 °C

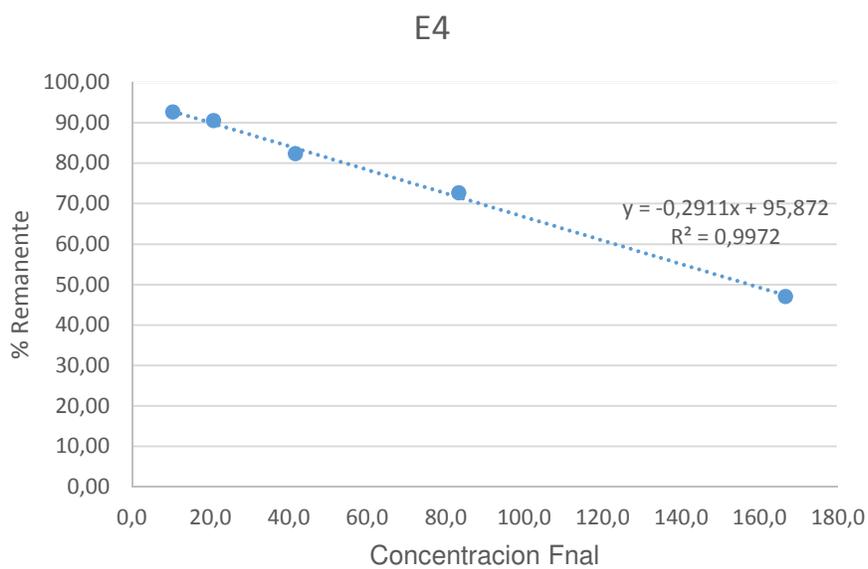


Figura A25. Curva de determinación EC50 del extracto 4 condiciones EtOH 50% y 50 °C

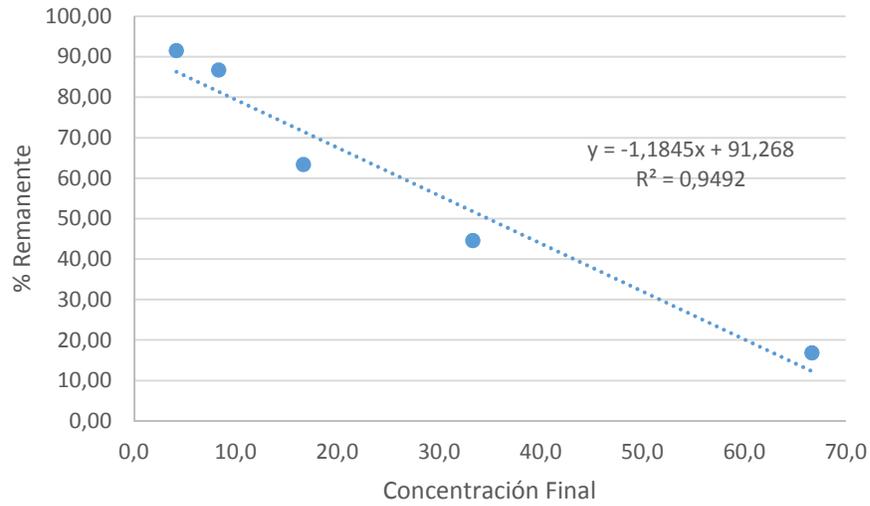


Figura A26. Curva de determinación EC50 del extracto 5 condiciones EtOH 50% y 100 °C

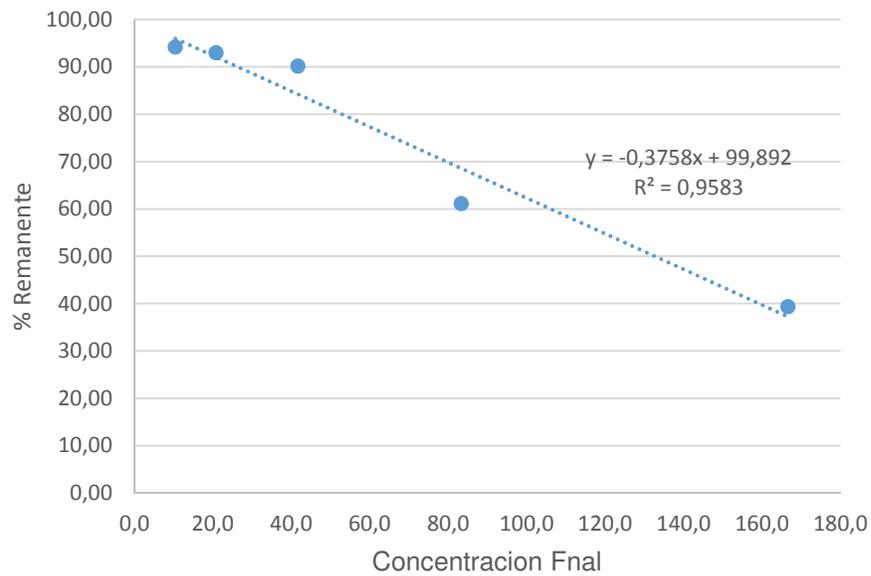


Figura A27. Curva de determinación EC50 del extracto 6 condiciones EtOH 50% y 150 °C

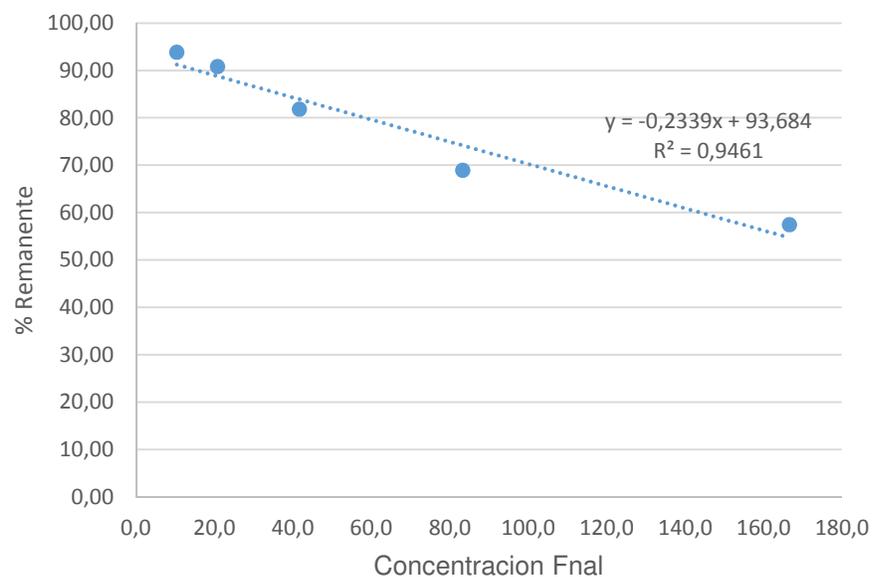


Figura A28. Curva de determinación EC50 del extracto 7 condiciones EtOAc 100% y 50 °C

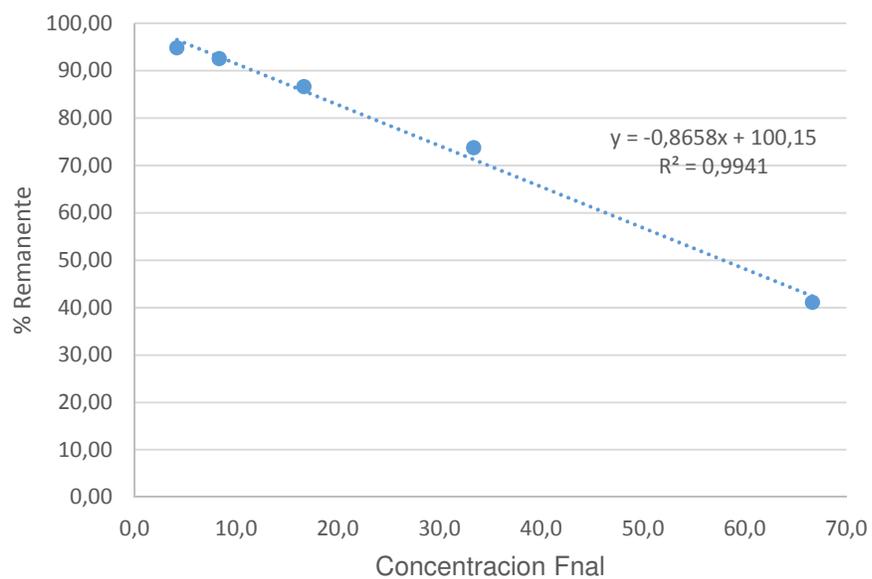


Figura A29. Curva de determinación EC50 del extracto 8 condiciones EtOAc 100% y 100 °C

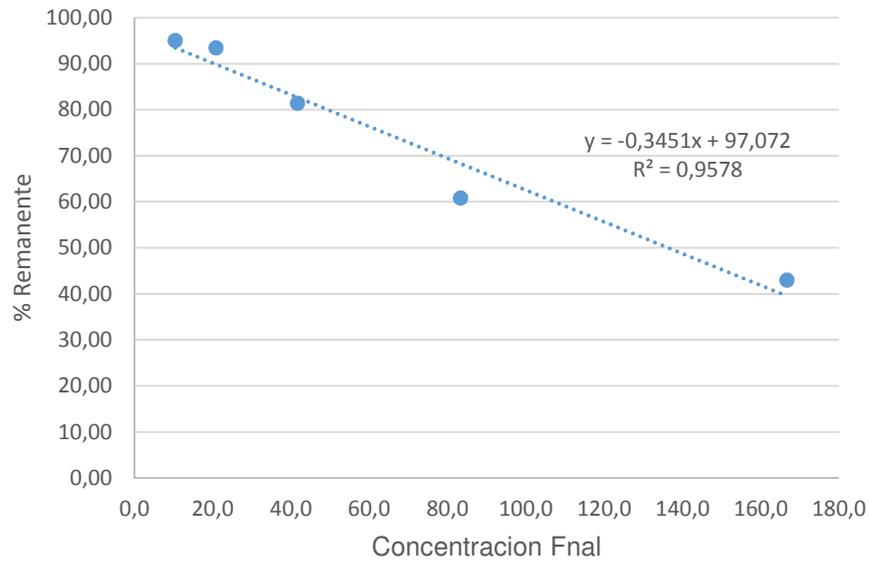


Figura A30. Curva de determinación EC50 del extracto 9 condiciones EtOAc 100% y 150 °C

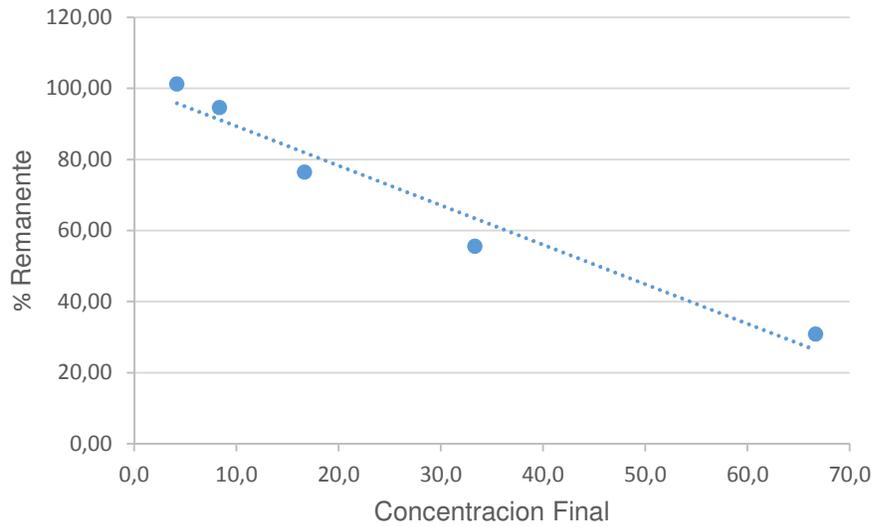


Figura A31. Curva de determinación EC50 del extracto 10 condiciones EtOH 50 % y 100 °C

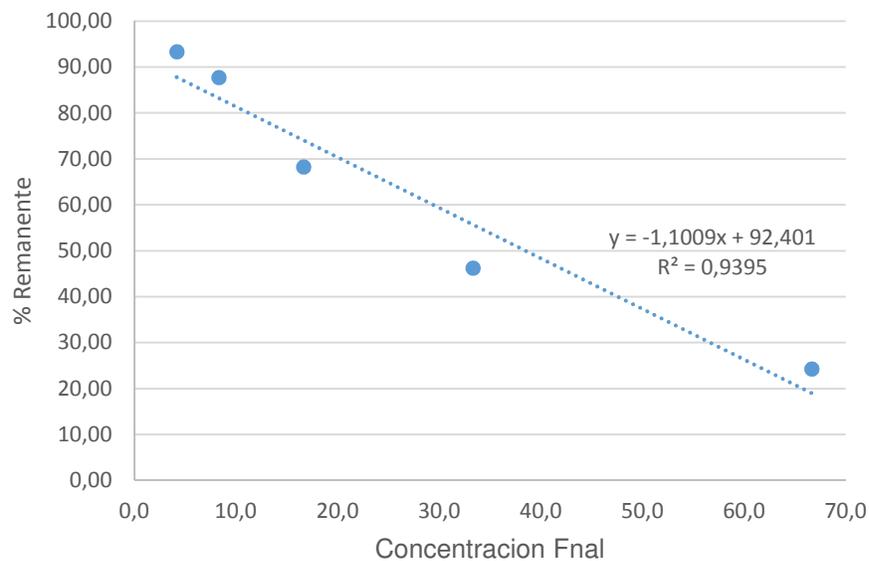


Figura A32. Curva de determinación EC50 del extracto 11 condiciones EtOH 50 % y 100 °C

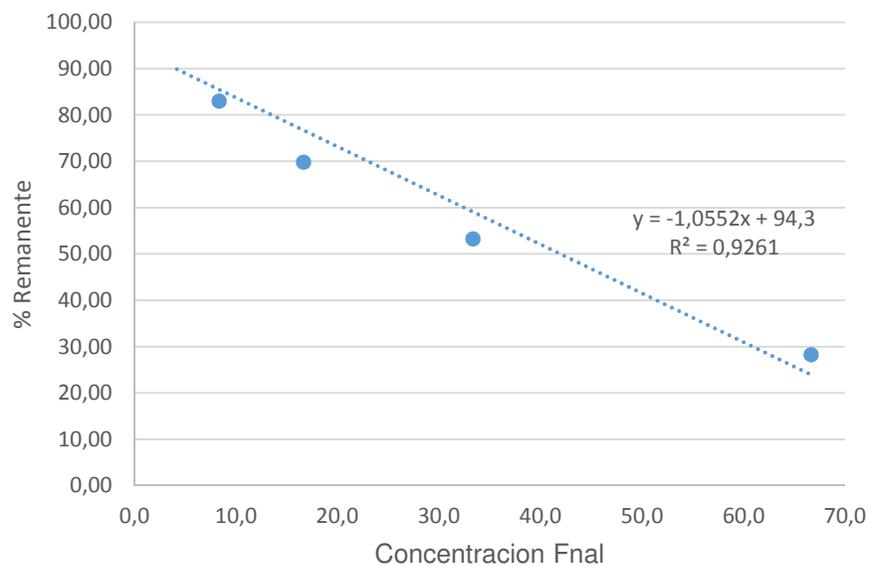


Figura A33. Curva de determinación EC50 del extracto 12 condiciones EtOH 50 % y 100 °C

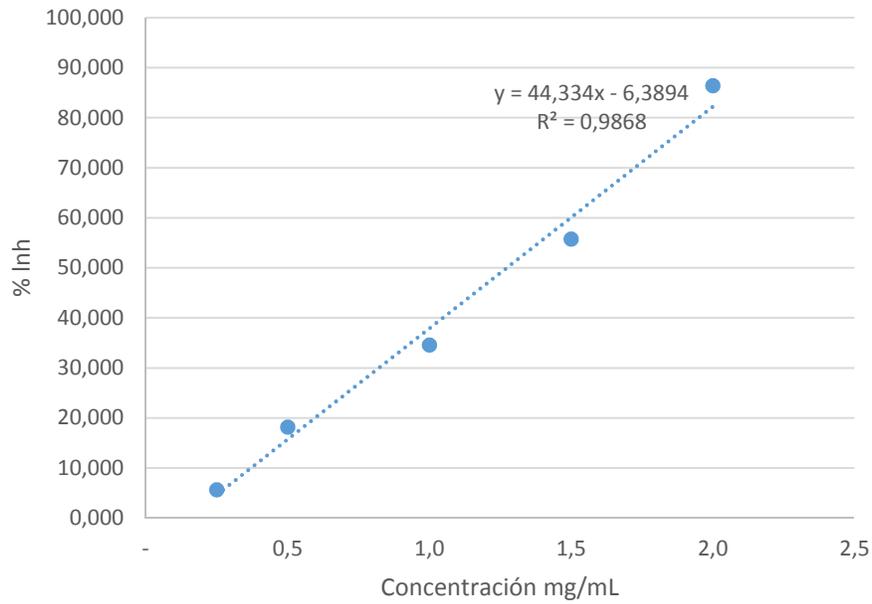


Figura A34. Curva de calibración para determinación de concentración de ABTS

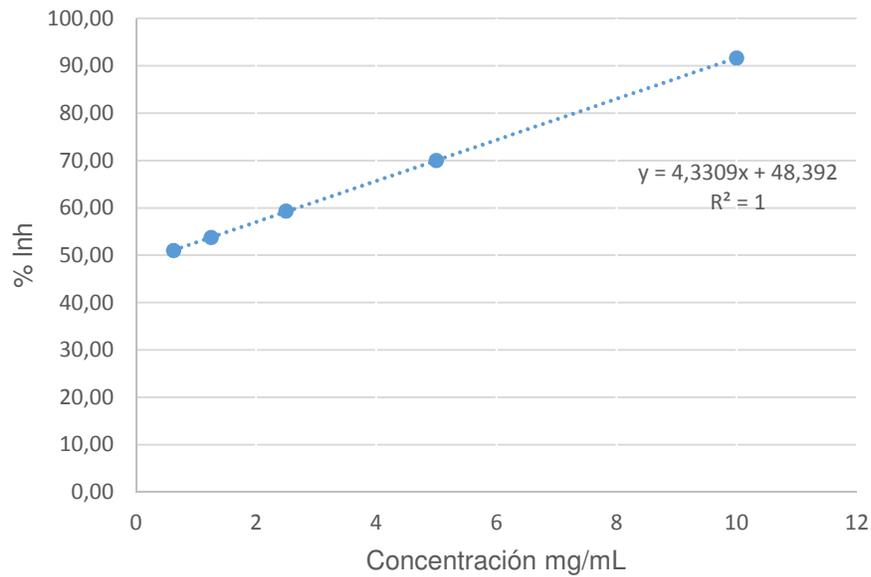


Figura A35. Curva de determinación ABTS del extracto 1 condiciones EtOH 100% y 50 °C

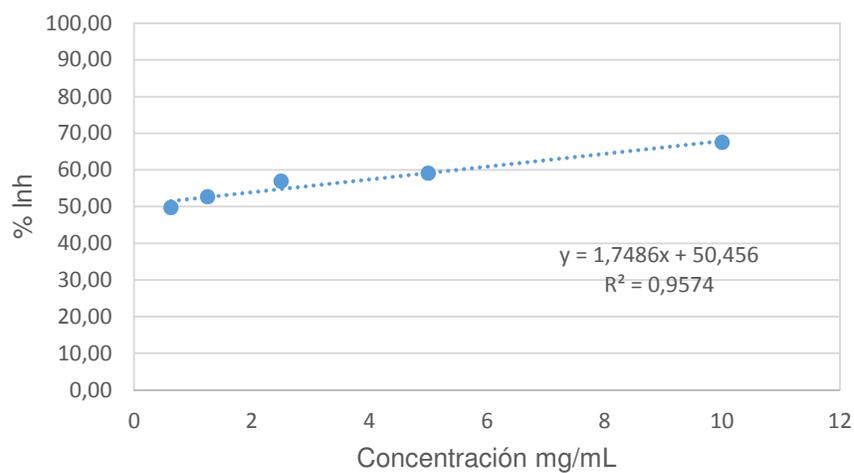


Figura A36. Curva de determinación ABTS del extracto 2 condiciones EtOH 100% y 100 °C

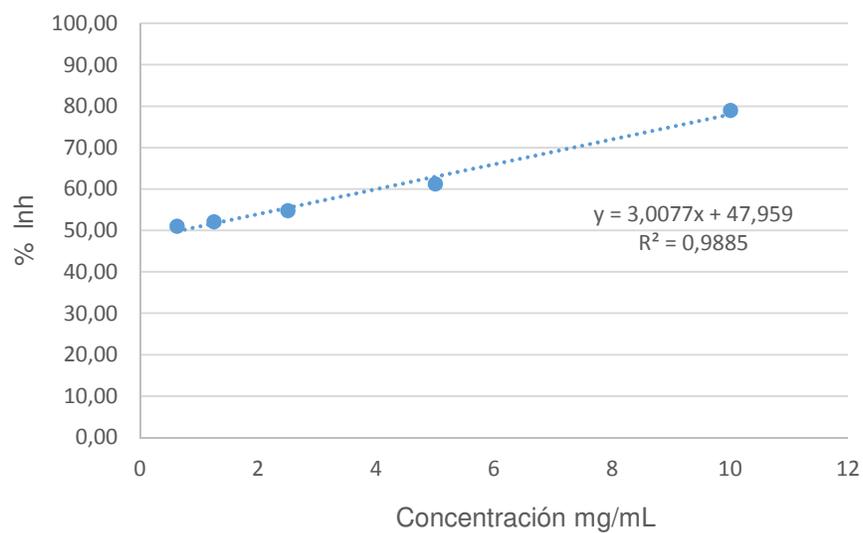


Figura A37. Curva de determinación ABTS del extracto 3 condiciones EtOH 100% y 150 °C

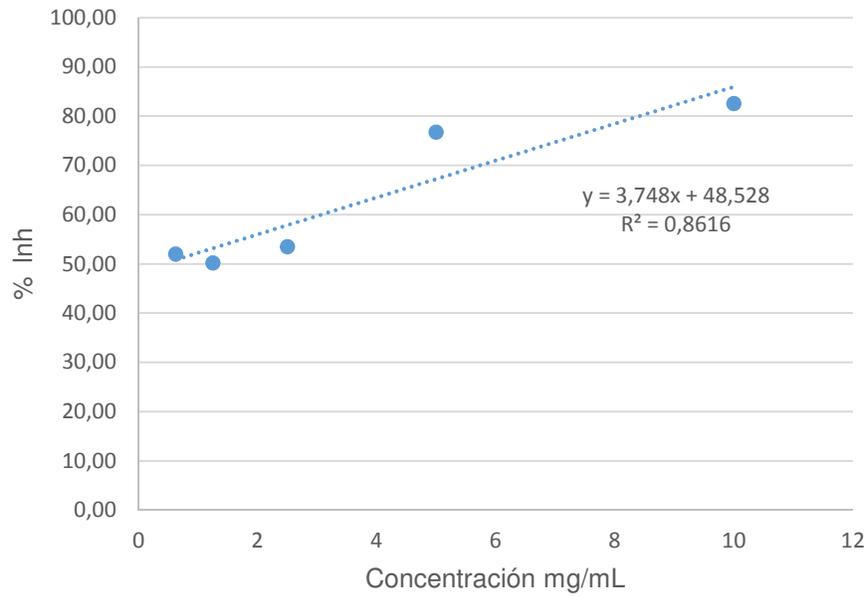


Figura A38. Curva de determinación ABTS del extracto 4 condiciones EtOH 50% y 50 °C

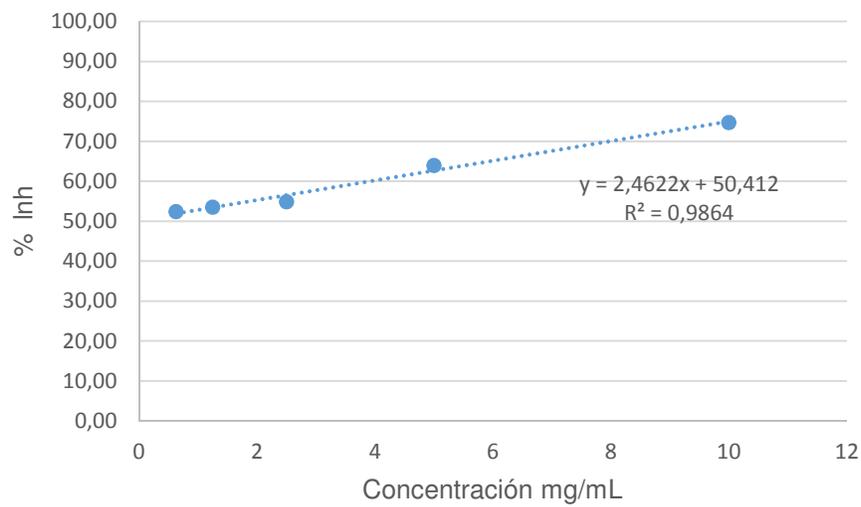


Figura A39. Curva de determinación ABTS del extracto 5 condiciones EtOH 50% y 100 °C

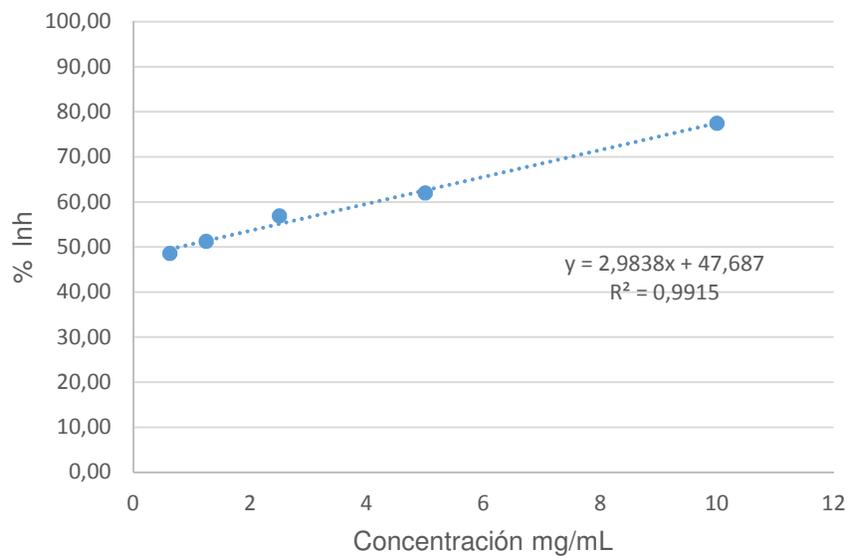


Figura A40. Curva de determinación ABTS del extracto 6 condiciones EtOH 50% y 150 °C

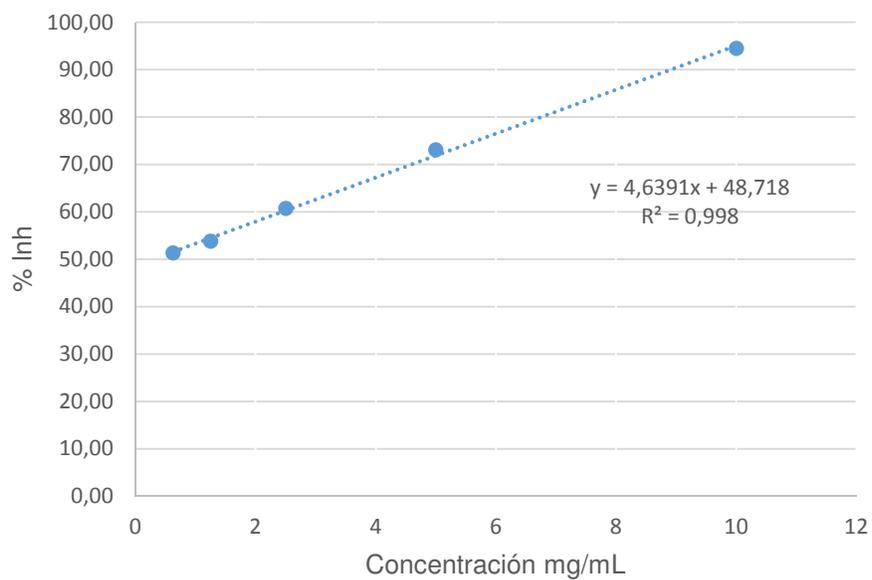


Figura A41. Curva de determinación ABTS del extracto 7 condiciones EtOAc 100% y 50 °C

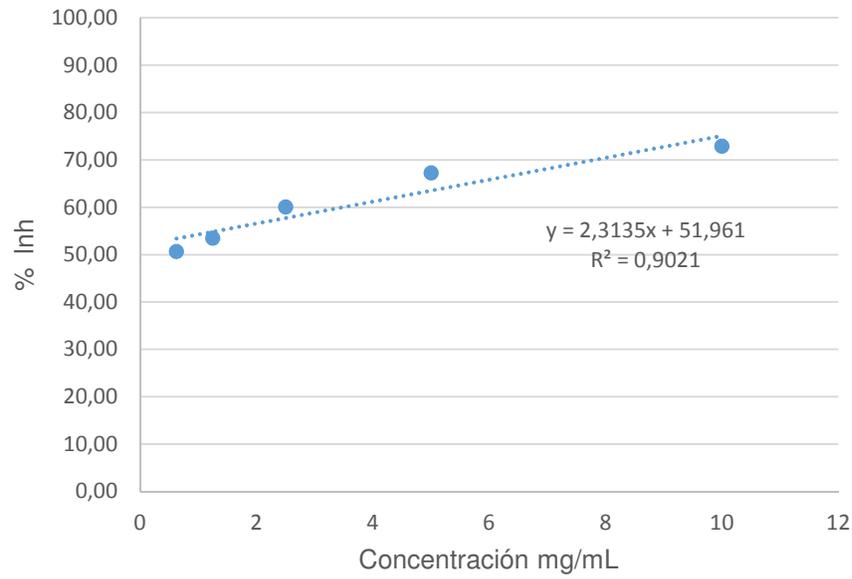


Figura A42. Curva de determinación ABTS del extracto 8 condiciones EtOAc 100% y 100 °C

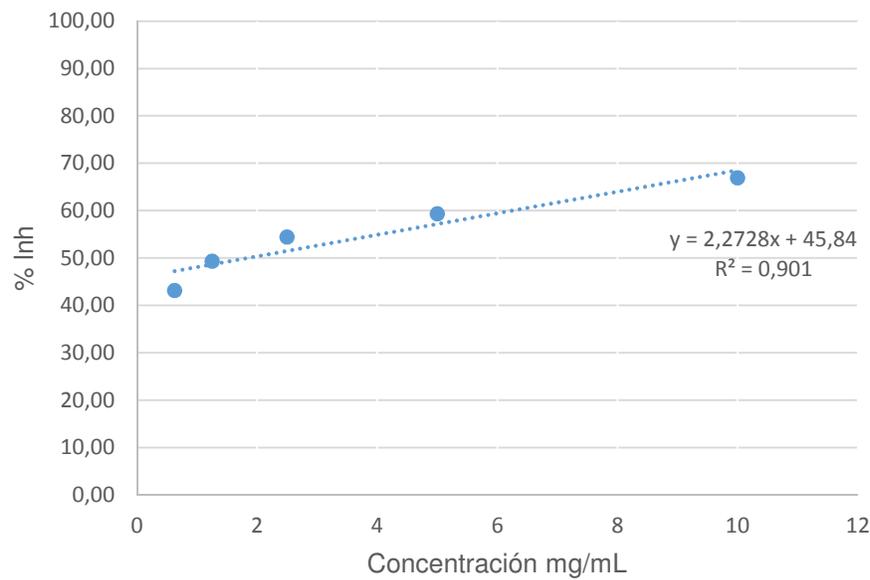


Figura A43. Curva de determinación ABTS del extracto 9 condiciones EtOAc 100% y 150 °C

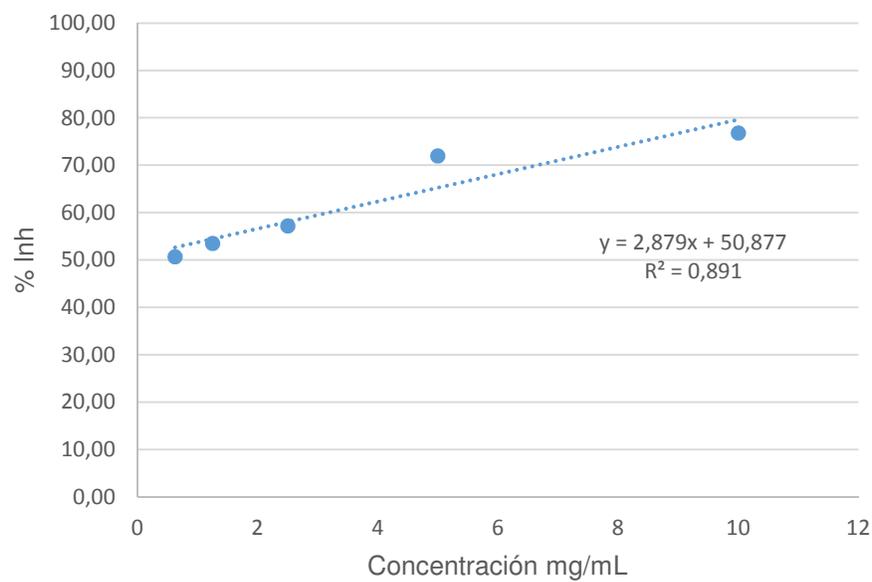


Figura A44. Curva de determinación EC50 del extracto 10 condiciones EtOH 50 % y 100 °C

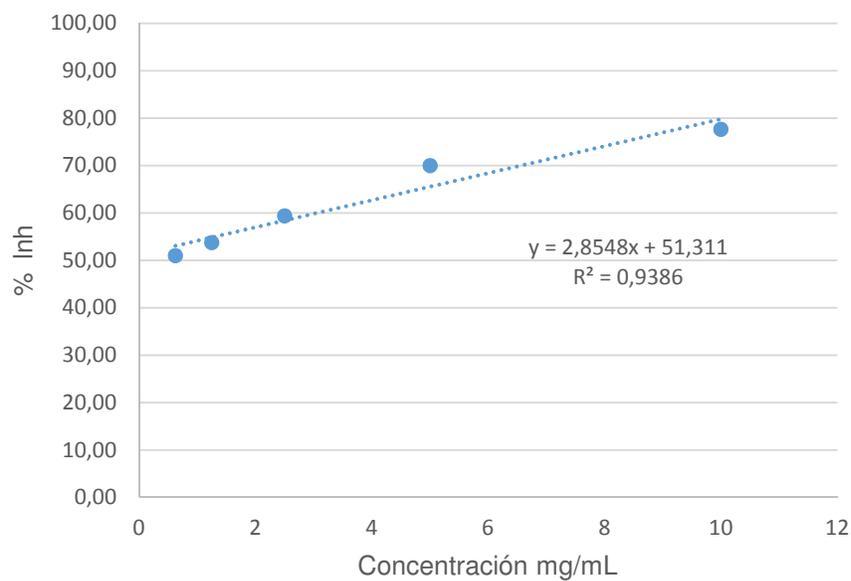


Figura A45. Curva de determinación EC50 del extracto 11 condiciones EtOH 50 % y 100 °C

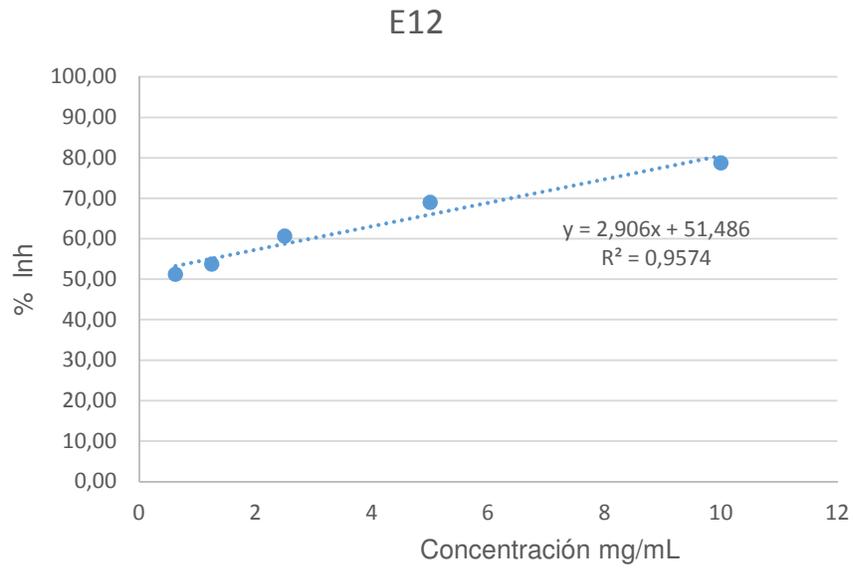


Figura A46. Curva de determinación EC50 del extracto 12 condiciones EtOH 50 % y 100 °C