



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y
TECNOLOGÍA QUÍMICA
LABORATORIO DE QUÍMICA DE ALIMENTOS

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN
SUPERCRÍTICA DE LOS POLIFENOLES DE LA VAINA DE
TARA (*Caesalpinia spinosa*)**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

SEBASTIÁN PATRICIO SILVA CHANDÍA

PROFESORA PATROCINANTE Y DIRECTORA DE MEMORIA:

Prof. MSc Nalda Romero Palacios

Químico Farmacéutico

SANTIAGO DE CHILE

2012

DEDICATORIA

A mis padres, Hilda y Luis; y a mi hermano, Luis Andrés.

*"Comprender las cosas que nos rodean es la mejor preparación para comprender las cosas que hay más allá."
Hipatia de Alejandría (370 - 415) Filósofa y matemática egipcia.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer:

A mi familia, quienes me apoyaron durante todos los años de estudio y me dieron fuerzas para conseguir mis logros.

A la profesora Nalda Romero, directora de mi memoria, quien me tuvo paciencia, estuvo siempre apoyándome y me condujo en la realización de mi trabajo.

A los profesores Paz Roberts y Carlos Basualto, quienes me orientaron y ayudaron en la corrección de mi memoria.

Al profesor Jaime Ortiz, por su apoyo y consejos; y al profesor Jorge Saavedra, quien me ayudó desinteresadamente en el aspecto estadístico de mi trabajo.

A las personas del laboratorio: Paula García, Andrés Bustamante, Paula Jiménez, Juan Carlos Moreno y Graciela Cáceres, por recibirme con los brazos abiertos y por su constante ayuda.

A mis amigos que me ayudaron en mis experimentos: Francisco Ormazábal, Juan Vega, Francisco Mura y Carolina Velasco. Gracias por su constante apoyo y amistad.

A todos mis amigos que creyeron en mí y me otorgaron todo el apoyo, subiéndome el ánimo y ofreciéndome ayuda.

Y a todos aquellos que me ayudaron y que no han sido nombrados,

Gracias.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 GENERALIDADES	1
1.2 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (EFS)	2
1.2.1 Fundamentos	2
1.2.2 El CO ₂ como fluido supercrítico	3
1.3 LA TARA	5
1.4 LOS TANINOS.....	7
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS.....	10
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	10
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4. MATERIALES Y EQUIPOS	12
4.1 MATERIALES	12
4.2 EQUIPOS.....	13
5. METODOLOGÍA	14
5.1 PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE POLVO DE TARA	14
5.2 TRATAMIENTO DEL POLVO DE VT	15
5.3 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	15
5.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SUPERCRÍTICO DE VT	16
5.4.1 Determinación del tiempo de extracción:	18
5.4.2 Adición de co-solvente:.....	19
5.4.3 Extracción:.....	19
5.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES.....	20

5.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS	22
5.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	26
6.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	26
6.2 CARACTERIZACIÓN DE TIPOS DE POLVO DE VT	27
6.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SUPERCRTICO DE VT	28
6.3.1 Comportamiento de los ensayos preliminares de EFS-VT	28
6.3.2 Extracciones con adición de celite o arena.	29
6.3.3 Optimización de la EFS-VT mediante el diseño experimental.....	31
6.3.4 Cinética de EFS-VT bajo las condiciones óptimas	37
6.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH.....	41
7. CONCLUSIONES.	48
8. REFERENCIAS.....	49
ANEXOS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de temperatura versus presión de una sustancia para conocer las condiciones de punto triple y punto crítico (Vásquez, 2008).	3
Figura 2. Árbol de tara.	5
Figura 3. Vainas y semillas de tara.....	5
Figura 4. Relación química entre los taninos: galotaninos y elagitaninos.	8
Figura 5. 3,4,5-tri-O-galoil ácido quínico.....	9
Figura 6. Gráfico del contenido de polifenoles totales acumulados en el tiempo. Condiciones de extracción: 70°C, 450 bar y 10% de etanol.	28
Figura 7. Gráfico del contenido de polifenoles totales acumulados en el tiempo. Condiciones de extracción: 35°C, 550 bar y 5% de etanol.	29
Figura 8. Efecto de la adición de 0,5 g de celite o arena en 1 g de muestra sobre la extracción de polifenoles totales a 35°C, 450 bar y 10% de etanol.....	30
Figura 9. . Efecto de la adición de 1,25 g de celite o arena en 2,5 g de muestra sobre la extracción de polifenoles totales a 35°C, 450 bar y 10% de etanol.....	31
Figura 10. Gráfico de Superficie de Respuesta: Temperatura y Presión versus Polifenoles totales.	34
Figura 11. Gráfico de Superficie de Respuesta: Temperatura y Etanol versus Polifenoles totales.	35
Figura 12. Gráfico de Superficie de Respuesta: Presión y Etanol versus Polifenoles totales.....	36
Figura 13. Gráfico de efectos principales.	36
Figura 14. Gráfico de las cantidades de polifenoles totales acumulados en el tiempo.	38
Figura 15. Cinética de DPPH de la muestra extraída a los 5 minutos.....	42
Figura 16. Cinética de DPPH de la muestra extraída a los 15 minutos.....	43
Figura 17. Cinética de DPPH de la muestra extraída a los 35 minutos.....	43
Figura 18. Gráfico muestra extraída a los 5 min.	45
Figura 19. Gráfico muestra extraída a los 15 min.	45
Figura 20. Gráfico muestra extraída a los 35 min	45
Figura 21. Gráfico promedio.	45
Figura 22. Gráfico de Pareto.....	56

Figura 23. Curva de Calibración utilizada en este estudio.....	63
Figura 24. Curva de calibración del método de Antrona.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables originales y codificadas en un Diseño Factorial Completo 2^3	17
Tabla 2. Diseño Factorial Completo 2^3 con Dos Puntos Centrales para la EFS-VT de componentes bioactivos.	18
Tabla 3. Volúmenes utilizados en el método de DPPH.....	25
Tabla 4. Resultados y cálculo del tamaño de partícula promedio.....	26
Tabla 5. Contenido de carbohidratos por gramo de VT.	27
Tabla 6. Contenido de polifenoles totales extraídos desde VT aplicando un diseño factorial completo 2^3	32
Tabla 7. Análisis de la varianza para polifenoles de polvo de VT.	33
Tabla 8. Cinética de extracción en el tiempo. Los datos corresponden a polifenoles totales (μg EAG por gramo de VT).	37
Tabla 9. Ajuste de la cinética de extracción.....	39
Tabla 10. Porcentaje de decoloración máxima versus concentración de polifenoles totales.....	44
Tabla 11. EC_{50} de las distintas tres muestras.....	46
Tabla 12. Densidad y fase del CO_2 según temperatura y presión	54
Tabla 13. Flujos de CO_2 y etanol según condiciones experimentales	54
Tabla 14. Preparación curva de calibración con ácido gálico	62
Tabla 15. Datos curva de calibración método Antrona.....	64
Tabla 16. Tabla de absorbancias para la muestra de 5 min	65
Tabla 17. Tabla de absorbancias para la muestra de 15 min	66
Tabla 18. Tabla de absorbancias para la muestra de 15 min	67

RESUMEN

La tara, *Caesalpinia spinosa*, especie nativa de Perú, ampliamente distribuida en Latinoamérica (Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile) se encuentra al estado silvestre y posee un gran potencial médico, alimenticio e industrial, siendo de gran utilidad para la producción de hidrocoloides o gomas, taninos y ácido gálico, entre otros.

El objetivo de esta memoria fue estudiar el efecto de las variables de extracción supercrítica (presión, temperatura y co-solvente) sobre el rendimiento de los polifenoles en la vaina de tara (VT). Estudiar la curva de extracción de los polifenoles en condiciones óptimas y la caracterización del extracto en cuanto a su capacidad antioxidante.

La extracción con fluido supercrítico (EFS) usando CO₂ es una herramienta selectiva para extraer componentes bioactivos y presenta las ventajas de este fluido de ser no tóxico, no inflamable, amigable con el medioambiente, alta disponibilidad, bajo costo a alta pureza y útil para la extracción de sustancias termolábiles.

Las VT fueron recolectadas en el vivero Leliantú del cerro San Cristóbal, Región Metropolitana, Chile. Las vainas sin semillas se molieron en un molinillo Ufesa hasta pulverización, tamaño de partícula 173 µm. Previo a la EFS, se realizó un pretratamiento con NaOH al 0,75% para la eliminación de los carbohidratos.

Se aplicó un diseño factorial completo 2³ con dos puntos centrales; las variables fueron: presión (450-550 bar), temperatura (35-70°C), co-solvente etanol (5-10%). La VT presentó un contenido total de polifenoles de 3937 µg de equivalente a ácido gálico (EAG) por gramo de VT en las condiciones óptimas de extracción (70°C, 550 bar, 10% etanol). El rendimiento de extracción de los polifenoles presentó una relación directa con la presión y la temperatura. Se estudió la curva de extracción de polifenoles en el tiempo y se determinó la actividad antioxidante del extracto supercrítico por DPPH y Folin-Ciocalteau.

SUMMARY

Optimization of Supercritical Extraction Process of Polyphenols from Tara Pods (*Caesalpinia spinosa*)

Tara (*Caesalpinia spinosa*), from Peru, is widely distributed in Latin America (Venezuela, Chile, Colombia, Ecuador, Peru, Bolivia, Chile) and can be found wildy. It has a great medical, food and industrial potential, being useful to produce hydrocolloids o rubber, tannis and gallic acid, among others.

The aim of this thesis was to study the effect of the supercritical extraction variables (pressure, temperature and co-solvent) in obtaining polyphenols from tara pod. Also, it was studied the polyphenols extraction curve in the optimized terms and the antioxidant capacity was determined in the supercritical extract.

The supercritical fluid extraction (SFE) using CO₂ is a selective tool to extract bioactive compounds and it has the advantage of being non-toxic, non-flammable, environmentally friendly, highly available, low cost in high pureness and a useful method to extract thermolabile substances.

Tara pods were collected in the Leliantú greenhouse at the San Cristóbal Hill, RM, Chile. The pods without seeds were grounded in an Ufesa grinder, reaching a 173 µm of particle average size. A pre-treatment using NaOH 0.75% was carried out before SFE in order to eliminate carbohydrates.

It was used a Complete Factorial Design 2³ with 2 central points; variables were: pressure (450-550 bar), temperature (35-70°C), ethanol as co-solvent (5-10%). The tara pods showed a total polyphenol content of 3937 mg of galic acid equivalent (GAE) by gram in the optimal conditions of extraction (70°C, 550 bar, 10% ethanol). The extraction yield of polyphenols showed a direct relationship with pressure and temperature. The polyphenol extraction curve over time was studied and the antioxidant activity of supercritical extract by DPPH and Folin-Ciocalteau was determined.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

En la elaboración de alimentos, los antioxidantes se usan ampliamente para detener o prevenir la oxidación de compuestos como grasas y aceites. La autoxidación corresponde a un proceso complejo inducido por factores como la luz, temperatura o presencia de metales, que involucra reacciones en cadena que producen radicales libres. Los antioxidantes de tipo fenólico juegan un rol importante en la autoxidación, ya que son capaces de atrapar a los radicales libres, inhibiendo la autoxidación y dando término a la reacción en cadena (Beliz H. y Grosch W., 1999).

Dentro de estos antioxidantes fenólicos se encuentran tanto aquellos de origen sintético como los de origen natural. Los sintéticos, tales como butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) y terbutil hidroquinona (TBHQ) en la actualidad se han cuestionado en cuanto a su uso, por sus efectos negativos, tales como la carcinogenicidad y toxicidad (Sikwese y Duodu, 2007). Es por esto, que es interesante a nivel mundial estudiar nuevas fuentes naturales de antioxidantes más seguros, evitando todo riesgo posible en el ámbito de la salud y el medio ambiente (Malecka, 2002).

Los antioxidantes naturales a su vez, se encuentran en prácticamente todos los seres vivos: plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales. La mayoría de estos antioxidantes son compuestos fenólicos, que entre los principales grupos se encuentran: los tocoferoles y polifenoles. (Pokorny et al., 2001; Zheng and Wang, 2001). En general, este tipo de antioxidantes poseen menor actividad que los sintéticos, es por esto que también hay un gran interés a nivel global en estudiar nuevas fuentes naturales de antioxidantes más efectivos y de menor costo.

1.2 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (EFS)

1.2.1 Fundamentos

Los métodos comúnmente usados para la extracción de compuestos antioxidantes en plantas involucran la aplicación de solventes de distinta polaridad, con el inconveniente de manejar grandes volúmenes de solvente, acompañada de un alto costo y del cuestionamiento del uso de los mismos (Menaker et al., 2004; Cavero et al., 2006).

Recientemente ha habido un interés creciente en el uso de la extracción con fluidos supercrítico (EFS) con dióxido de carbono como solvente. Este proceso usa las propiedades de los gases por sobre sus puntos críticos para extraer en forma selectiva los componentes solubles de una materia prima (Cavero et al., 2006). Tal como lo muestra la Figura 1, un fluido supercrítico se define como una sustancia que se encuentra por sobre la Presión Crítica (P_c) y la Temperatura Crítica (T_c).

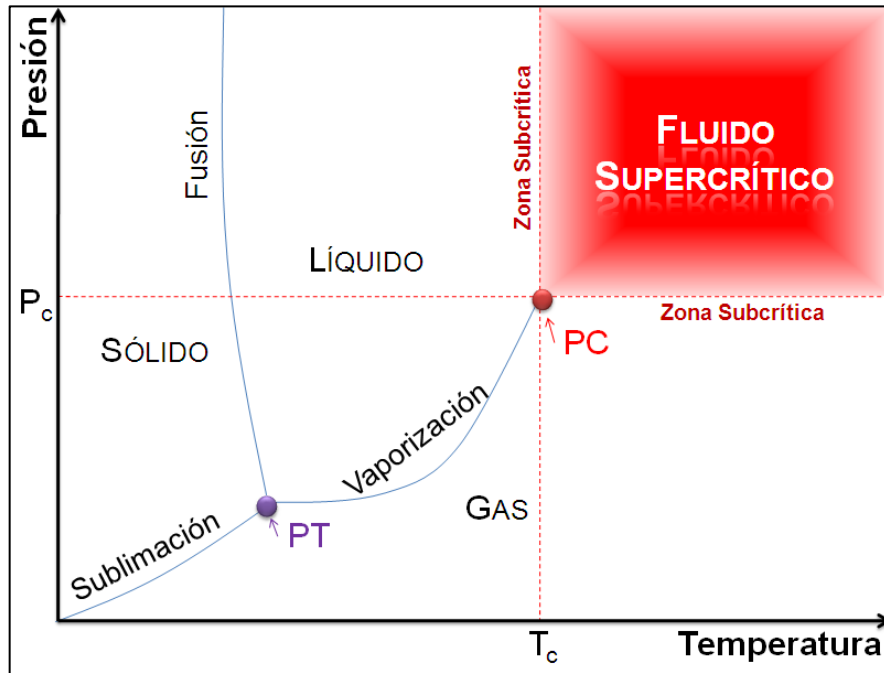


Figura 1. Diagrama de temperatura versus presión de una sustancia para conocer las condiciones de punto triple y punto crítico (Vásquez, 2008).

La Figura 1 muestra también la relación entre los estados sólido, líquido y gaseoso en función de la temperatura y la presión. En el Punto Triple (PT) coexisten las tres fases. Por sobre el Punto Crítico (PC) la sustancia no es ni un líquido ni un gas, sin embargo posee propiedades de ambos: se comporta como un gas al llenar y tomar la forma de su contenedor y tiene la densidad de un líquido, además de su poder disolvente.

1.2.2 El CO₂ como fluido supercrítico

El CO₂ es el solvente frecuentemente usado para la EFS debido a sus ventajas prácticas, las que incluyen su carácter no-tóxico, no inflamable, seguro para el ambiente, de gran disponibilidad, de bajo costo a alta pureza y su conveniencia para extraer compuestos termolábiles y compuestos con baja volatilidad y polaridad. Cuando el extracto se recupera en los separadores, el CO₂ es fácilmente separado

debido a su alta volatilidad (Díaz-Reinoso et al., 2006). Otra de las ventajas es que el poder de extracción del CO₂ y otros fluidos supercríticos puede ser ajustado por pequeños cambios en la presión y temperatura de extracción (Pereira y Meireles, 2007).

La EFS es utilizada por muchos investigadores para obtener compuestos volátiles, flavonoides, triterpenoides y otras sustancias. Estudios de componentes naturales de plantas normalmente se han focalizado en la composición y propiedades farmacológicas de los extractos (Fernández, 2008). En el área de fluidos supercríticos la cantidad de información relacionada a la composición y propiedades funcionales de extractos obtenidos con esta tecnología es realmente muy extensa como se ha demostrado por recientes investigaciones (Pereira y Meireles, 2007).

Dentro de los disolventes usados en EFS, los polares tienen más capacidad disolvente que los disolventes apolares y pueden solubilizar una variedad de compuestos de polaridad más amplia. Una limitación que presenta el dióxido de carbono como fluido supercrítico es su carácter apolar, que lo hace un disolvente poco adecuado para compuestos polares. Además, la solubilidad del CO₂ también va siendo menor a medida que aumenta el peso molecular de los compuestos a disolver. Sin embargo, esta característica puede no ser una desventaja, puesto que confiere una mayor selectividad en la extracción de compuestos y más posibilidades en el fraccionamiento de los mismos (Vásquez, 2008). Al igual que todas las sustancias, el CO₂ es susceptible de ser polarizado al variar la densidad, esto es: al variar la presión y la temperatura. No obstante, la polarización del CO₂ es mucho menor que la de los hidrocarburos. Un ejemplo es el siguiente: para conseguir una polarización por unidad de volumen que se compare al ciclohexano en estado líquido, se necesita una presión de 2.700 bar y 45°C (Rizvi, 1994). Sin embargo, existe una alternativa al uso de condiciones tan extremas como las mencionadas anteriormente: esta consiste en adicionar pequeñas cantidades de modificadores o co-solventes, que son sustancias polares que varían enormemente la polaridad del fluido si son añadidas en conjunto durante la extracción (Vásquez, 2008). El co-solvente puede ser seleccionado para interactuar fuertemente con los solutos de interés para facilitar su extracción. Metanol y

etanol son capaces de formar interacciones de puentes de hidrógeno y dipolo-dipolo con los fenoles, lo que indica que podrían ser buenos co-solventes del dióxido de carbono (Murga et al., 2000). Los disolventes más utilizados como modificadores en tecnología de alimentos son: etanol, metanol y acetona. Los inconvenientes del uso de ellos son de partida el ser orgánicos y potencialmente tóxicos. No obstante aquello, la baja cantidad con que intervienen y la solubilidad que tienen en el fluido supercrítico hacen que sus residuos en el extracto sean prácticamente despreciables. Aún así, en tecnología de alimentos se tiende a evitar su uso o restringirlo al etanol (Vásquez, 2008).

1.3 LA TARA

La tara, *Caesalpinia spinosa*, es una especie nativa del Perú, ampliamente distribuida en América Latina. Se distribuye entre los 4° y 32° S, abarcando diversas zonas áridas, en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia hasta el norte de Chile (AGROGESTIÓN, 2007). En Chile se extiende desde la provincia de Arica (I Región) hasta el sur de la IV Región. La tara se encuentra al estado silvestre y posee un gran potencial médico, alimenticio e industrial, siendo de gran utilidad para la producción de hidrocoloides o gomas, taninos y ácido gálico, entre otros (De La Cruz Lapa, 2004).



Figura 2. Árbol de tara.



Figura 3. Vainas y semillas de tara.

La tara es un árbol pequeño, de dos a tres metros de altura, de fuste corto, cilíndrico y a veces tortuoso y su tronco está provisto de una corteza gris espinosa, con ramillas densamente pobladas (Figura 2). En muchos casos las ramas se inician desde la base dando la impresión de varios tallos. La copa de la tara es irregular, aparasolada y poco densa, con ramas ascendentes. Sus hojas son en forma de plumas, parcadas ovoides y brillantes, ligeramente espinosa de color verde oscuro y miden 1,5 cm de largo. Posee inflorescencia con racimos terminales de 15 a 20 cm de longitud de flores ubicadas en la mitad distal, flores hermafroditas, zigomorfas, cáliz irregular provisto de un sépalo muy largo de alrededor de 1 cm, con numerosos apéndices en el borde, cóncavo, corola con pétalos libres de color amarillento, dispuestas en racimos de 8 a 20 cm de largo, con pedúnculos pubescentes de 56 cm de largo, articulado debajo de un cáliz corto y tubular de 6 cm de longitud; los pétalos son aproximadamente dos veces más grandes que los estambres. En la Figura 3 se presentan sus frutos: vainas explanadas e indehiscentes de color naranja de 8 a 10 cm de largo y 2 cm de ancho aproximadamente, que contienen de 4 a 7 granos de semilla redondeada de 0,6 a 0,7 cm de diámetro y son de color pardo negruzco cuando están maduros (De La Cruz Lapa, 2004).

Cada árbol de tara puede rendir un promedio de 20 a 40 kg de vainas cosechándolos dos veces al año. Generalmente, un árbol de tara da frutos a los tres años; y si es silvestre, a los cuatro años. Su promedio de vida es de cien años y el área que ocupa cada árbol es de 10 metros cuadrados (De La Cruz Lapa, 2004).

La vaina de tara (VT) separada de la pepa se muele y forma un extraordinario producto de exportación como materia prima para la obtención de ácido tánico, que es muy usado en las industrias peleteras de alta calidad, farmacéutica, química y de pinturas, entre otras. De las semillas o pepas se obtiene, mediante un proceso térmico-mecánico, una goma de uso alimenticio proveniente del endospermo, constituyéndose en una alternativa a las gomas tradicionales usadas en la industria mundial de alimentos, pinturas y barnices entre otros (De La Cruz Lapa, 2004).

1.4 LOS TANINOS

Los taninos vegetales son productos naturales de peso molecular relativamente alto los cuales tienen la capacidad de complejar fuertemente carbohidratos y proteínas (Garro Gálvez et al., 1997). Químicamente, los taninos son condensaciones de moléculas que contienen la función fenol (Ribereau-Gayon et al., 1980) y existen como polifenoles condensados (o pirocatéquicos) o hidrolizados (o pirogálicos) de variado tamaño molecular y complejidad en extractos vegetales (King-Thom et al., 1998).

Los taninos se encuentran en una variedad de plantas que se utilizan como alimentos y forraje, incluyendo granos (sorgo, frijoles secos, arvejas y otras leguminosas), frutas (manzanas, bananas, moras, uvas, duraznos, peras y ciruelas), fruitivos (té, café) y vinos (tintos) (Marcano, 2002).

Los taninos hidrolizables están compuestos por una molécula glúcida, sobre la que se fijan diferentes cuerpos fenólicos (Ribereau-Gayon et al., 1980). Son fácilmente hidrolizados por ácidos (o enzimas) en un azúcar o polihidroalcohol relacionado y en un ácido carboxílico fenólico. Como lo muestra la Figura 4, dependiendo de la naturaleza del ácido carboxílico fenólico, los taninos hidrolizables usualmente se subdividen en galotaninos y elagitaninos. La hidrólisis de los galotaninos produce ácido gálico, mientras que la de los elagitaninos produce ácido hexahidroxidifénico, el cual se aísla normalmente como su dilactona estable: el ácido elágico.

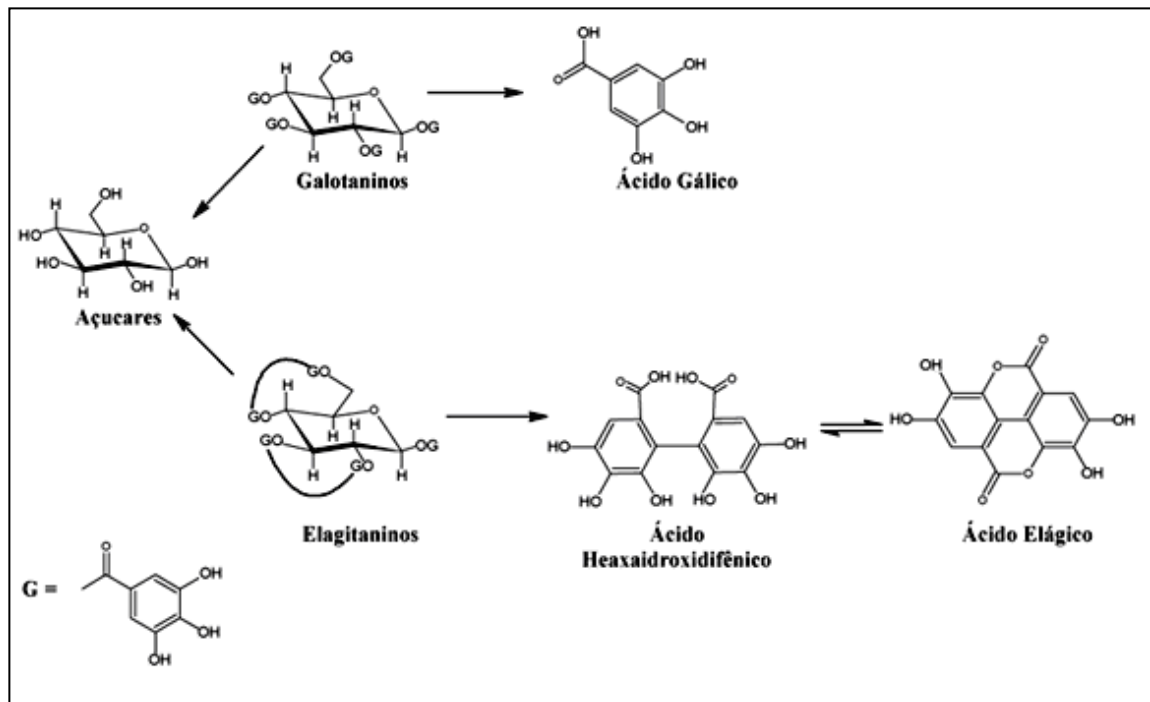


Figura 4. Relación química entre los taninos: galotaninos y elagitaninos. (Queiroz, 2002)

Los taninos condensados, también llamados proantocianidinas, son poliflavonoides que consisten de cadenas de unidades de flavan-3-ol. La clase más común de proantocianidinas son las procianidinas, las que consisten de cadenas de catequina y/o epicatequina unidas por enlaces 4→6 o 4→8. Por el contrario de los taninos hidrolizables, los taninos condensados sufren una polimerización a la forma amorfa de flobafenos o taninos rojos, bajo la acción de ácidos (Garro Gálvez et al., 1997).

La información existente respecto a taninos o polifenoles específicos presentes en la tara es escasa. Sin embargo, Haslam et al. (1962) reportaron que los principales componentes de los polifenoles de la tara son probablemente estructuras derivadas de la adición al azar de 2 ó 3 grupos galoil al núcleo de 3,4,5-tri-O-galoil ácido quínico (Figura 5).

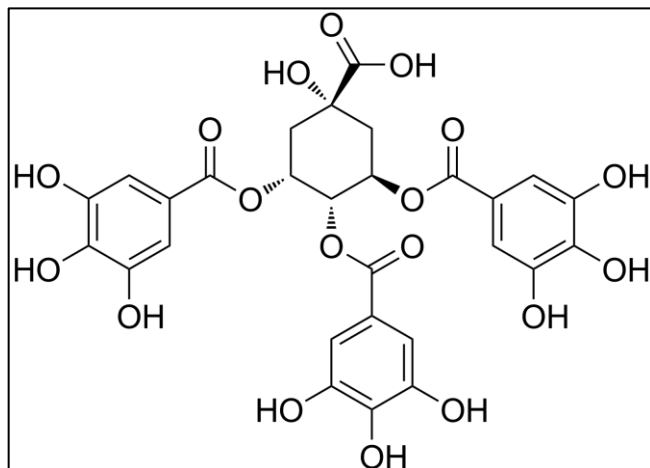


Figura 5. 3,4,5-tri-O-galoi ácido quínico.

2. HIPÓTESIS

Es posible optimizar la extracción supercrítica de los polifenoles de la vaina de tara (VT), obteniendo un extracto antioxidante de origen natural.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de tres variables de extracción supercrítica (presión, temperatura y co-solvente) sobre el rendimiento de polifenoles en la VT. Estudiar la curva de extracción de los polifenoles en condiciones óptimas y la caracterización del extracto en cuanto a su capacidad antioxidante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1** Aplicar un pretratamiento a la VT para eliminar carbohidratos que dificulten la extracción de los polifenoles por fluido supercrítico.
- 3.2.2** Estudiar las condiciones de presión, de porcentaje de co-solvente (etanol) y de temperatura, en la extracción con fluido supercrítico de vaina de tara (EFS-VT) con CO₂ para obtener un extracto de polifenoles bajo condiciones óptimas.
- 3.2.3** Estudiar la curva de EFS-VT de polifenoles en el tiempo, en condiciones óptimas.

3.2.4 Caracterizar la capacidad atrapadora de radicales libres del extracto supercrítico en las condiciones óptimas mediante el método del radical DPPH.

4. MATERIALES Y EQUIPOS

4.1 MATERIALES

- Vainas de tara obtenidas de la cosecha 2010 en el Vivero Leliantú (ubicado en el cerro San Cristóbal).
- Ácido gálico p.a. Sigma-Aldrich, Alemania.
- Ácido perclórico p.a. Winkler Ltda., Argentina.
- Ácido sulfúrico p.a. Winkler Ltda., Argentina.
- Agua destilada y bidestilada, Merck, Alemania.
- Arena de mar p.a. Merck, Alemania.
- Carbonato de sodio p.a. Merck, Alemania.
- Celite (tierra de diatomea) 545 Merck, Alemania.
- Dióxido de carbono (CO₂) 99,5% pureza, AGA NU: 1013.
- DPPH Sigma-Aldrich, Alemania.
- Etanol p.a. Merck, Alemania.
- Glucosa anhidra p.a., BDH Chemicals Ltd., Inglaterra.
- Hidróxido de sodio p.a. Merck, Alemania.
- Metanol p.a. Merck, Alemania.
- Patrones de pH (4, 7 y 10) Merck, Alemania.
- Reactivo Antrona p.a. Merck, Alemania.
- Reactivo Folin-Ciocalteau p.a. Merck, Alemania.

4.2 EQUIPOS

- Extractor Supercrítico Spe-ed SFE system, modelo 7071, (Applied Separations, Inc., Allentown, PA, United States) equipado con celda de extracción de 50 mL.
- Balón con CO₂, Indura.
- Sistema enfriador equipo extractor supercrítico Julabo F200 con refrigerante R134a. Seelbach, Alemania.
- Agitador de brazo Burrel-Wrist-Action; modelo BB; Burrel Corp., Pittsburg, PA.
- Agitador magnético Nuova Barnstead Thermolyne. Dubuque, Iowa, EEUU.
- Agitador Erweka Apparatebau AR 400, Alemania.
- Balanza analítica Swiss Quality precisa 125a, Suiza.
- Balanza granataria SCALTEC SP0 51. Heiligenstadt, Alemania.
- Baño ultrasonido Fisher Scientific modelo FS30H; 2000 Park Lane Pittsburg, PA.
- Centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B Automatic refrigerated centrifuge. Norwalk, Conn, Estados Unidos.
- Compresor Indura tipo DN 35 Ox4 modelo Huracan 3000.
- Congelador Bosch. Alemania.
- Estufa de aire forzado WTB binder, Alemania.
- Espectrofotómetro Unicam UV/Vis Modelo UV3, Cambridge, UK.
- Molinillo de café, Ufesa.
- pHmetro OAKLON, pH 500 series, Singapore.
- Refrigerador Samsung, Corea.

5. METODOLOGÍA

5.1 PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE POLVO DE TARA

En primer lugar, se obtuvo una muestra homogénea de polvo de tara a través de la molienda de las vainas sin semillas en molinillo de café.

Procedimiento experimental:

- a. Limpieza: Se removieron manualmente todas las impurezas tales como restos de pasto seco, tierra, palos, ramas y cualquier otra sustancia ajena a las vainas de tara.
- b. Preclasificación: Se separaron las vainas sanas de aquellas con defectos (quemaduras, presencia de hongos, quebradas, etc.).
- c. Clasificación: Se separaron las vainas de mayor tamaño, ya que permitieron un rendimiento mayor.
- d. Separación de semillas: Se separaron las semillas de la vaina de forma manual.
- e. Molienda: Se tomaron todas las vainas sin semillas y se molieron en un “molinillo de café” Ufesa®, obteniendo un polvo fino mezclado con delgados trozos fibrosos.
- f. Almacenamiento: El polvo molido homogenizado se almacenó en un frasco de vidrio, en lugar fresco y protegido de la luz.

5.2 TRATAMIENTO DEL POLVO DE VT

El método aplicado correspondió a una adaptación del descrito por Estévez et al. (2004) para la extracción de gomas y carbohidratos desde las semillas de algarrobo. Consistió en una extracción alcalina efectuada de la siguiente manera: aproximadamente 25 g de polvo de VT se suspendieron en 100 mL (equivalente a una suspensión de polvo de VT al 25% p/p) de una solución de NaOH al 0,75% p/v en un matraz erlenmeyer de 250 mL con tapa esmerilada, agitando con una varilla de vidrio. Luego, se llevó a un baño termostático a 38°C por 30 minutos. Posteriormente, se sometió a agitación en un agitador de brazo. El pH de la suspensión resultante (5,6) se ajustó al pH inicial de una mezcla agua/VT de 3,6. Este ajuste se realizó en un pH-metro mediante la adición gradual con pipeta Pasteur de gotas de una solución de HCl 10,7 N. Luego de ajustado el pH, la suspensión se filtró al vacío con papel Whatman nº 1¹. La torta resultante de vaina tratada, se secó en una estufa de aire por convección a 37°C por 4-6 horas y se sometió a una molturación hasta la ausencia de partículas aglomeradas. El polvo de VT reducido en carbohidratos se almacenó en frasco de vidrio en oscuridad a 5°C, hasta su utilización en extracción supercrítica.

5.3 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

El tamaño de partícula del polvo de VT tratado fue calculado por el método de tamizado. Se utilizó una amplia batería de tamices que abarcó todos los grados disponibles: entre tamiz número 10 y número 400 (luz de tamices: 2 y 0,038 mm, respectivamente).

Procedimiento experimental:

¹ Una variante en la técnica de separación consiste en separar las partículas de mayor tamaño mediante una malla (colador); la solución no retenida se centrifuga a 2000 rpm por 10 minutos. Luego de lo anterior, las partículas más finas resultantes de la centrifugación se incorporan con las partículas filtradas en la malla, obteniendo una torta, la cual es secada de acuerdo a como se explicó anteriormente.

- a. 50 g de polvo de VT tratado fueron puestos en el tamiz de luz mayor en la parte superior de la torre de tamices.
- b. La muestra se agitó con un agitador “Erweka AR 400” durante 15 minutos.
- c. Se procedió a pesar la cantidad que quedó retenida en cada tamiz previamente tarado.
- d. Se calculó a qué porcentaje del total correspondía el peso en cada tamiz y se multiplicó por el valor correspondiente de luz de malla promedio (valor medio entre la luz de maya del tamiz anterior y la que contiene la muestra) obteniendo los “promedios ponderados” para cada malla. La sumatoria de todos los valores que se obtuvieron para cada tamiz se expresa como “tamaño peso promedio”, que es el valor que indica el tamaño promedio que tiene en longitud la muestra.

5.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SUPERCRÍTICO DE VT

Con el objetivo de ver los efectos de distintos parámetros en la EFS-VT, se formuló un Diseño Factorial Completo 2^3 con Dos Puntos Centrales. Los parámetros a considerar fueron la temperatura (mínimo de 35°C y máximo de 70°C), presión (mínima de 450 bar y máxima de 550 bar) y porcentaje de co-solvente (etanol, mínimo de 5% y máximo de 10%).

En este método, los valores de las variables experimentales son codificadas y representadas como -1, +1 y 0, dependiendo de la distancia relativa con el valor central. Para transformar las variables experimentales temperatura (T), presión (P) y porcentaje de co-solvente (S) en variables codificadas tipo x_i , se realizó según la siguiente ecuación:

Donde, VO es el valor de la variable original, \bar{V} es el valor promedio entre el máximo y mínimo, y Δ es el valor medio entre la diferencia de los valores máximo y mínimo.

Los valores centrales que se determinaron para temperatura, presión y porcentaje de co-solvente fueron: 52,5°C, 500 bar y 7,5%, respectivamente. Se asignaron los valores -1, 0 ó +1 dependiendo si los valores eran menores, iguales o mayores al punto central, tal como lo muestra la Tabla 1.

Tabla 1. Variables originales y codificadas en un Diseño Factorial Completo 2^3 .

Parámetros	Relación entre las variables codificadas y las variables originales		
	-1	0	1
Temperatura (T, °C)	35	52,5	70
Presión (P, bar)	450	500	550
Porcentaje de co-solvente (S, %)	5	7,5	10

En la Tabla 2 se muestran los 10 experimentos que resultan de la matriz utilizada en el modelo. Las variables codificadas fueron x_1 para la temperatura, x_2 para la presión y x_3 para el porcentaje de co-solvente. C_i representa a experimentos realizados a $x_i = 0$.

Tabla 2. Diseño Factorial Completo 2^3 con Dos Puntos Centrales para la EFS-VT de componentes bioactivos.

Experimento	Variable Codificada		
	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
C ₁	0	0	0
C ₂	0	0	0

x_1 : temperatura; x_2 : presión; x_3 : % de etanol; C₁ y C₂: puntos centrales.

Los resultados fueron analizados mediante la metodología de “Superficie Respuesta”, que es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas, y que tiene como objetivo determinar las condiciones óptimas de operación de un sistema. En este estudio, los resultados obtenidos de los distintos experimentos del modelo de optimización se analizaron y optimizaron con el programa StatGraphics Plus 5.1.

5.4.1 Determinación del tiempo de extracción:

La determinación del tiempo total de extracción a utilizar en todos las EFS-VT fue un punto importante en este estudio, ya que permitió ahorrar recursos en el desarrollo de las extracciones supercríticas. El tiempo de extracción que se usó en las diez extracciones correspondientes al diseño factorial 2^3 fue determinado mediante ensayos preliminares, que consistieron en extracciones supercríticas de polvo de VT tratado realizadas durante 3 horas. Estas se llevaron a cabo usando condiciones de

presión, temperatura y co-solvente dentro del rango del diseño utilizado. En los ensayos preliminares se analizaron muestras obtenidas cada 20 ó 30 minutos para obtener gráficas del tipo tiempo v/s extracción acumulada de polifenoles, donde se observó que en el tiempo se alcanzó un valor constante, es decir, se alcanzó un estado estacionario.

De acuerdo a la definición clásica de “Optimización”, hay que tener en cuenta que al optimizar un proceso tratamos de tomar una decisión óptima para maximizar (ganancias, velocidad, eficiencia, etc.) o minimizar un criterio determinado (costo, tiempo, riesgo, error, etc.). Las restricciones significan que no cualquier decisión es posible. En este sentido, no es recomendable usar tiempos de extracción muy extensos, ya que estos involucran gastos en trabajo y recursos materiales, disminución de la eficiencia y la velocidad, aumento del tiempo y de la posibilidad de cometer errores. Tomando como criterio estos dos puntos (ensayos preliminares y optimización clásica) se decidió como tiempo de extracción al resultado de la adición de 20 minutos (para evitar errores) al tiempo donde ya no se extrajeron más polifenoles totales.

5.4.2 Adición de co-solvente:

Previo a la EFS-VT se añadió al polvo de VT tratado, el co-solvente o modificador; para ello, 5 g de polvo tratado se pesaron en un vaso de precipitado de 250 mL, se agregó 2,5 mL de etanol absoluto con pipeta graduada gota a gota, tratando de solvatar en forma uniforme el polvo. Luego el vaso se tapó con *parafilm* y la mezcla se dejó macerar por 5 minutos.

5.4.3 Extracción:

En un vaso extractor de 50 mL de acero inoxidable se cargaron aproximadamente 5 g de muestra (previamente tratada con co-solvente) usando como soportes lana de vidrio y tierra de diatomea Celite. La extracción se realizó una vez que

las condiciones de presión y temperatura se alcanzaron. Los experimentos se llevaron a cabo entre 35 y 70°C y entre 450 y 550 bar, a tamaño peso promedio de 173 μm . Se usó CO_2 a una razón de flujo de 2,5 L/min y válvula dosificadora a 120°C de temperatura. Las muestras fueron puestas durante 30 minutos en extracción estática, seguido de 60 minutos de extracción dinámica, tiempo considerado por los ensayos preliminares. Cada extracto fue recolectado en tubos de vidrio de 20 mL (propios del equipo), puestos en un baño de agua y hielo y posteriormente transferido a matraces volumétricos de 10 mL. Se completó el volumen con etanol y los extractos se almacenaron a -4°C hasta su análisis.

5.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

Para la determinación de los fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu. El procedimiento consiste en una adaptación del método descrito por Gutfinger (1981). Este método se refiere a una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), que se reduce; por acción de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). La coloración azul producida posee una absorción máxima a aproximadamente 765 nm y es proporcional al contenido de compuestos fenólicos (Ribéreau-Gayon et al., 1980).

Procedimiento experimental:

- a. Se tomó una alícuota de 0,1 mL de muestra (EFS-VT aforado a 10 mL) usando micropipeta y se depositó en un matraz aforado de 10 mL.
- b. Se añadieron 4,9 mL de agua.
- c. Se agregaron 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y se dejó reposar por 3 minutos.

- d. Se agregaron 1,7 mL de carbonato de sodio al 20%, se mezcló y se aforó a 10 mL con agua destilada. Se esperó 30 min.
- e. Se leyó en espectrofotómetro a 765 nm contra un blanco preparado con las mismas condiciones de la muestra.
- f. Se calculó el contenido de polifenoles totales interpolando en una curva de calibración, previamente realizada.

Los resultados de polifenoles totales en este estudio fueron todos expresados como “equivalentes a ácido gálico” (EAG), ya que la curva de calibración se construyó con este ácido como estándar.

Curva de calibración:

- La curva de calibración de ácido gálico se realizó pesando 25 mg de ácido gálico en matraz aforado de 25 mL, agregando 1 mL de etanol para disolver el ácido gálico y se aforó con agua destilada.
- Se prepararon soluciones patrones entre 50 y 400 µg de ácido gálico/mL.
- Se realizó la reacción de Folin-Ciocalteu con cada solución.
- La Figura 23 en el Anexo 3 muestra la curva de calibración utilizada en este estudio.

5.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS

Consiste en una digestión de la muestra con ácido perclórico al 52%, para determinar colorimétricamente los almidones hidrolizados y los azúcares solubles que reaccionan con el reactivo de antrona (Barnett y Miller, 1950).

Procedimiento experimental:

- a. Se pesaron 2 g de muestra en un matraz erlenmeyer con tapa.
- b. Se agregaron 10 mL de agua destilada y se agitó con una varilla de vidrio hasta la completa homogenización.
- c. Se agregaron 15 mL de ácido perclórico al 52%.
- d. Se agitó y se tapó, dejando por 12 horas para que hidrolizara la muestra.
- e. Se agregó agua al matraz hasta completar 100 mL aproximadamente.
- f. Se filtró la solución con embudo analítico y papel filtro, recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 250 mL.
- g. Se lavó el precipitado, el matraz y el papel filtro con agua destilada, recibiendo siempre la solución en el matraz de 250 mL.
- h. Se aforó el matraz de 250 mL.
- i. Se tomó una alícuota que tuviera 10 mg de carbohidratos aproximadamente y se trasladó a un matraz de 100 mL, aforando con agua destilada.
- j. Se tomó una alícuota de 1 mL de esta solución y se colocó en un tubo de ensayo con tapa.

- k. Se agregaron 5 mL de solución de antrona al 0,1% y se agitó.
- l. Se llevó a baño de agua a ebullición por exactamente 12 min y luego se enfrió con hielo y agua fría.
- m. Se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 630 nm.
- n. Se calculó la concentración interpolando los datos en una curva de calibración.

Curva de Calibración:

- La curva de calibración se realizó con soluciones estándares de concentraciones 0,05; 0,1 y 0,15 mg de glucosa por mL (obtenidas de diluciones de un patrón de glucosa), usando un blanco de 1 mL de agua destilada.
- La solución patrón de glucosa se realizó al 1%, de la que se sacaron alícuotas de 5, 10 y 15 mL y se llevaron a matraces de 100 mL aforando con agua destilada. Debe prepararse solución patrón para cada día.
- El reactivo de antrona se preparó al 0,1% disolviéndola en ácido sulfúrico al 76%, preparando sólo una cantidad suficiente para el análisis del día.
- El ácido sulfúrico 76% se preparó añadiendo cuidadosamente 760 mL de ácido (peso específico 1,84) a 330 mL de agua destilada. Se enfrió antes de usar.
- El ácido perclórico al 52% se preparó añadiendo 270 mL de ácido perclórico (peso específico 1,7) a 100 mL de agua. Se realizó esta acción en un baño de agua fría para enfriar la mezcla.

- La Figura 24 en el Anexo 4 muestra la curva de calibración utilizada en este estudio.

5.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH

El método correspondió a una modificación del descrito por Brand-Williams et al. (1995). El ensayo “in vitro” de DPPH, se fundamenta en que el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) es de color violeta intenso, al ser capturado su radical libre pierde su color característico. Es posible cuantificar la capacidad atrapadora de radicales libres que poseen distintas sustancias mediante la determinación del grado de decoloración que dichos compuestos provocan a una solución metanólica de DPPH.

Procedimiento experimental:

- a. Se preparó una solución metanólica de DPPH de aproximadamente 20 mg/mL que presentara una absorbancia entre 550 y 650 medida en un espectrofotómetro a 517 nm.
- b. Se prepararon soluciones metanólicas de 0,5; 0,8; 1,1 y 1,4 µg EAG/mL para cada extracto supercrítico a analizar.
- c. Se prepararon soluciones de acuerdo a la Tabla 3:

Tabla 3. Volúmenes utilizados en el método de DPPH.

	Muestra (μL)	Blanco muestra (μL)	Control de reactivo (μL)
Muestra	750	750	0
DPPH	1500	0	1500
Metanol	0	1500	750
Volumen total	2250	2250	2250

- d. Se registró la absorbancia inicial de la solución de DPPH y se hizo un seguimiento después de la adición de la muestra, tomando nota de las absorbancias a diferentes intervalos de tiempo durante 2 horas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm.
- e. Se calculó el porcentaje de decoloración (capacidad atrapadora de radicales libres) mediante la siguiente fórmula:

—

Donde:

- A_c es la absorbancia de la muestra a 517 nm.
 - A_b es la absorbancia de la solución de DPPH frente al blanco a 517nm.
- f. Por cada muestra y cada porcentaje de decoloración y su correspondiente concentración de polifenoles se realizó una regresión lineal útil para calcular la concentración de extracto necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% (EC_{50}). Un valor de EC_{50} igual a 100 corresponde a la máxima capacidad atrapadora de radicales libres y un valor cercano a 0 indica una reducida capacidad. El grado de decoloración indica la eficiencia de las sustancias como atrapadoras de radicales libres.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la determinación del tamaño de partícula del polvo de tara tratado.

Tabla 4. Resultados y cálculo del tamaño de partícula promedio.

Tamiz N°	Peso de la muestra (g)	% del Total	Luz de malla del tamiz (mm)	Luz de malla promedio (mm)	Promedio ponderado (mm)
10	0,0	0,0	2,000	-	-
20	0,3	0,6	0,850	1,425	0,0088
30	1,3	2,7	0,600	0,725	0,0193
50	6,2	12,7	0,300	0,450	0,0572
60	0,4	0,8	0,250	0,275	0,0023
80	3,6	7,4	0,180	0,215	0,0159
100	0,9	1,8	0,150	0,165	0,0030
120	5,3	10,9	0,125	0,138	0,0149
140	12,4	25,4	0,106	0,116	0,0293
200	0,7	1,4	0,075	0,091	0,0013
400	17,7	36,3	0,038	0,057	0,0205
48,8				Tamaño peso promedio:	0,1725 mm

Para obtener el tamaño de partícula promedio se ocupó una sumatoria de promedios ponderados, obteniendo como resultado 173 micrómetros como “tamaño peso promedio”. Este tamaño peso promedio de partícula fue el utilizado en todas las EFS-VT que se realizaron en este estudio.

6.2 CARACTERIZACIÓN DE TIPOS DE POLVO DE VT

El polvo de VT se clasificó en 3 categorías de acuerdo al tamaño de partícula en: grueso, mediano y fino.

Este análisis se llevó a cabo con el fin de conocer la composición en carbohidratos de cada categoría y explorar la posibilidad de separar los tipos de polvo para trabajar con aquel que no tuviera (o que tuviera en cantidades muy mínimas) carbohidratos y así evitar el tratamiento que se hace con hidrólisis alcalina. Los resultados se muestran en la Tabla 5:

Tabla 5. Contenido de carbohidratos por gramo de VT.

Muestra	Carbohidratos %p/p
Grueso	5,74
Mediano	2,63
Fino	1,87

Los resultados muestran que el tamaño de partícula más grueso fue el que presentó mayor cantidad de carbohidratos en porcentaje peso-peso y que el polvo fino presentó menor cantidad. Se esperaba que el polvo más fino tuviera una mayor composición de carbohidratos que el polvo más grueso, ya que este último estaba compuesto principalmente de fragmentos fibrosos de celulosa. La posible explicación del bajo contenido de carbohidratos en el polvo fino podría atribuirse a una caramelización de estos en el proceso de molienda, desnaturalizándose y por lo tanto, no siendo posible su cuantificación.

Como conclusión, los datos señalan que no existió una categoría de polvo que tuviera en su composición una cantidad traza de carbohidratos, por lo que finalmente se trabajó con el polvo de tara sin hacer separaciones de tamaño de partícula y aplicando posteriormente el tratamiento para eliminación de carbohidratos con hidrólisis alcalina.

6.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SUPERCRÍTICO DE VT

6.3.1 Comportamiento de los ensayos preliminares de EFS-VT

Se realizaron extracciones previas con el fin de determinar el tiempo máximo de extracción, el cual se usaría en todas las extracciones posteriores (Figuras 6 y 7).

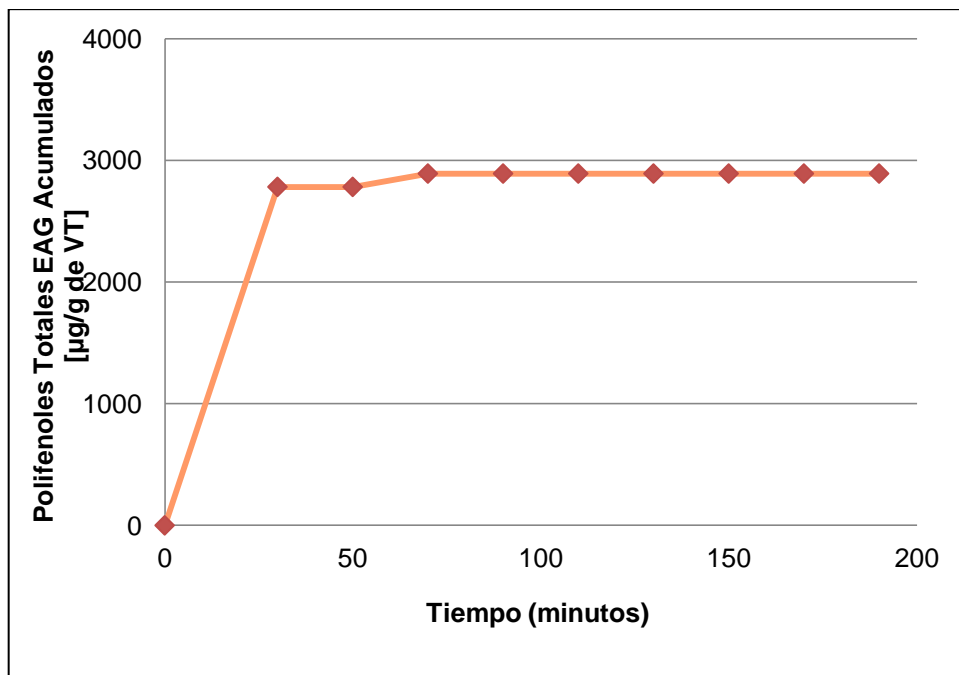


Figura 6. Gráfico del contenido de polifenoles totales acumulados en el tiempo. Condiciones de extracción: 70°C, 450 bar y 10% de etanol.

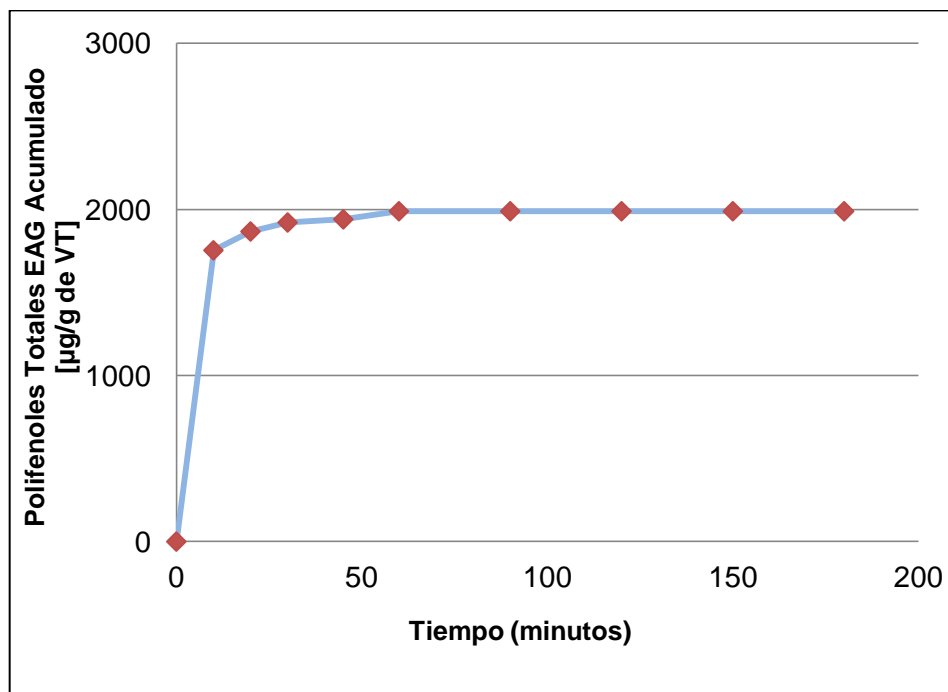


Figura 7. Gráfico del contenido de polifenoles totales acumulados en el tiempo. Condiciones de extracción: 35°C, 550 bar y 5% de etanol.

Los resultados de las cinéticas mostraron que a partir de los 40 minutos se alcanzó un *plateau*, por lo que se fijó 60 minutos como tiempo total de extracción. Se sumaron 20 minutos para abarcar posibles casos en que el estado estacionario superara los 40 minutos.

En el trabajo de Huynh et al. (2007), se determinó el tiempo de extracción mediante experimentos preliminares, se decidió un aumento de un 20% después de que la extracción de aceite esencial se hubiese detenido.

6.3.2 Extracciones con adición de celite o arena.

Se ha visto en trabajos anteriores que la adición de celite (King et al., 1992) o arena (Liza et al., 2010) ha aumentado el rendimiento y mejorado el proceso, esto es

debido a que se mantienen las condiciones de fluido del CO₂ apropiadamente, asegurando el acceso a las partículas durante el proceso de extracción.

Las Figuras 8 y 9 presentan el efecto de la adición de celite y arena a dos tamaños de muestra: 1 y 2,5 gramos respectivamente de polvo de VT tratado, sobre la extracción de polifenoles EAG.

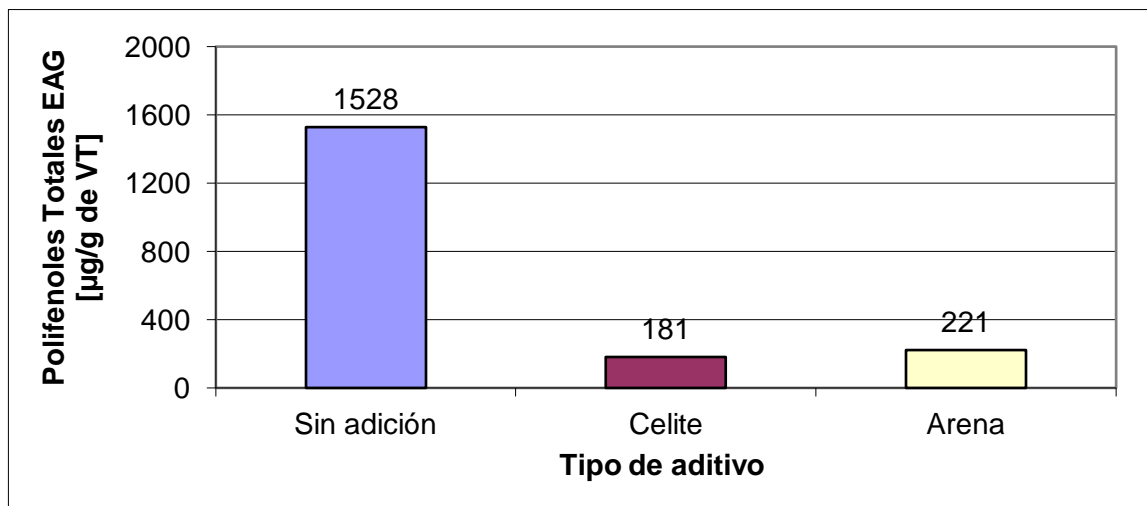


Figura 8. Efecto de la adición de 0,5 g de celite o arena en 1 g de muestra sobre la extracción de polifenoles totales a 35°C, 450 bar y 10% de etanol.

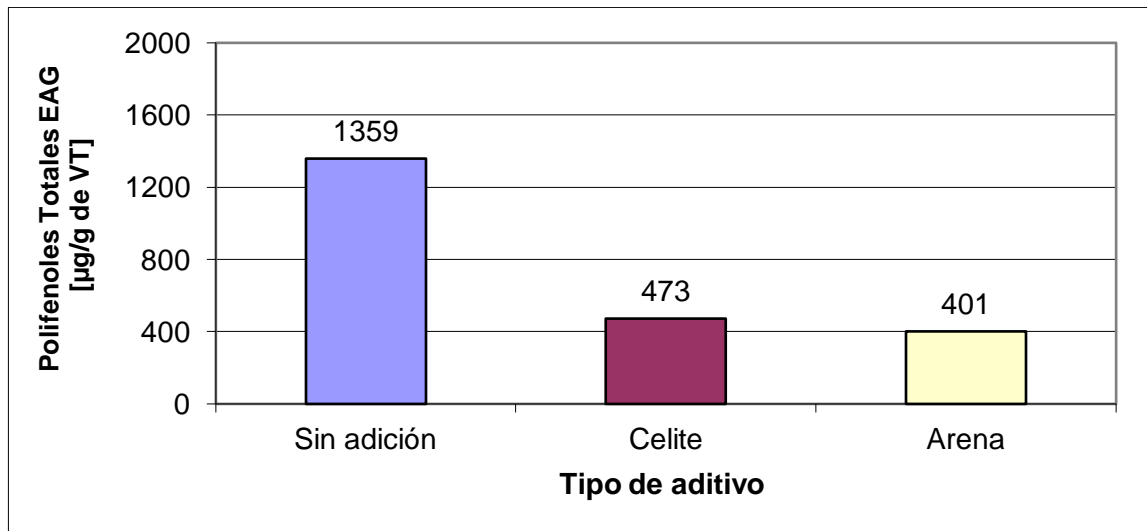


Figura 9. . Efecto de la adición de 1,25 g de celite o arena en 2,5 g de muestra sobre la extracción de polifenoles totales a 35°C, 450 bar y 10% de etanol.

Las Figuras 8 y 9 muestran que la adición de celite o arena disminuyó el contenido de polifenoles totales extraídos, perjudicando el rendimiento. Estos resultados fueron contrarios a los reportados por otros autores (King et al., 1992; Liza et al., 2010). Esta diferencia podría atribuirse a una mayor compactación del polvo de vaina de tara con los aditivos por efecto de la presión ejercida, impidiendo el libre flujo del CO₂ supercrítico, entorpeciendo su acción como solvente y disminuyendo el rendimiento.

Dado estos resultados se decidió que las extracciones se realizarían sin agregar aditivo.

6.3.3 Optimización de la EFS-VT mediante el diseño experimental

En la Tabla 6 se presenta el contenido de polifenoles totales extraído en la VT por fluido supercrítico aplicando un diseño factorial completo 2³.

Tabla 6. Contenido de polifenoles totales extraídos desde VT aplicando un diseño factorial completo 2³.

T (°C)	P (bar)	Etanol (%)	µg EAG/g de VT
35	450	5	792
70	450	5	2137
35	550	5	2072
70	550	5	3497
35	450	10	1437
70	450	10	2966
35	550	10	2865
70	550	10	3946
52,5	500	7,5	3198
52,5	500	7,5	3225

La extracción de polifenoles desde el polvo de VT pre tratado con NaOH mostró un rango entre 792 y 3946 µg EAG/g de VT.

El análisis estadístico (Tabla 7) mostró que la forma lineal de la temperatura y la presión tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la extracción de polifenoles del polvo de VT pre tratado. Sin embargo, el co-solvente no mostró un efecto significativo ($p > 0,05$).

Tabla 7. Análisis de la varianza para polifenoles de polvo de VT.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
x ₁ : Temperatura	3,61805E6	1	3,61805E6	11,68	0,0419
x ₂ : Presión	3,18529E6	1	3,18529E6	10,28	0,0491
x ₃ : Etanol	922082,0	1	922082,0	2,98	0,1829
x ₁ x ₂	16928,0	1	16928,0	0,05	0,8302
x ₁ x ₃	3200,0	1	3200,0	0,01	0,9255
x ₂ x ₃	6728,0	1	6728,0	0,02	0,8922
Factor	Constante	x₁: Temperatura	x₂: Presión	x₃: Etanol	
Estimación	-6732,5	38,43	12,62	135,8	

De los resultados mostrados en la Tabla 7 podría obtenerse que el rendimiento de polifenoles totales extraídos del polvo de VT pre tratado puede estar representado por la siguiente ecuación del modelo ajustado, expresado en términos de variables codificadas:

$$\text{Polifenoles totales} = -6732,5 + 38,43x_1 + 12,62x_2$$

Se puede observar que los factores x₃, x₁x₂, x₁x₃ y x₂x₃ fueron rechazados debido a que sus valores p no fueron significativos. El modelo muestra que hubo un aumento en el rendimiento de la extracción de polifenoles totales correspondiente a 38,43 por cada incremento en unidad de temperatura (x₁) y de 12,62 por cada incremento en unidad de presión (x₂).

Los datos obtenidos en los 10 experimentos, que correspondieron al modelo aplicado, se procesaron en el programa para estadísticas StatGraphics Plus 5.1 donde se obtuvieron gráficos de Superficie Respuesta.

Haciendo uso también de la aplicación de la metodología de superficie respuesta se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción de polifenoles desde el polvo de VT pre tratado.

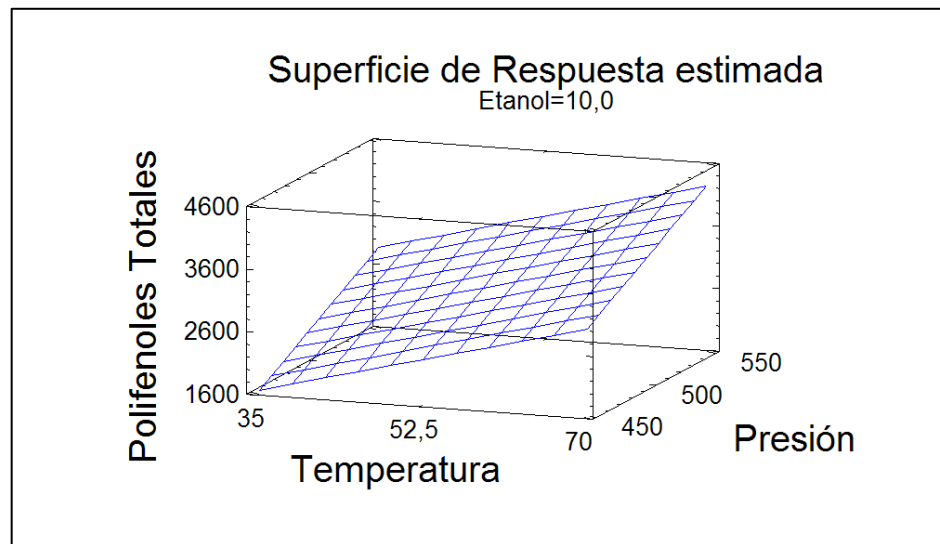


Figura 10. Gráfico de Superficie de Respuesta: Temperatura y Presión versus Polifenoles totales.

Las condiciones óptimas para la extracción de polifenoles desde el polvo de vaina de tara fueron: 70°C, 550 bar y 10% de etanol. En el trabajo de Huynh et al.(2007), donde se procedió de manera similar a este estudio, se observó que para mejorar el rendimiento de extracción de aceite esencial desde las hojas de hierba limón, las condiciones debían ser las siguientes: 35,14°C; 111 bar; 4,07 mm (tamaño de partícula). En el mismo estudio también se determinó que en el caso del tallo las condiciones debieron ser: 50°C, 111 bar y 8mm. En la publicación de Mendiola et al. (2008), donde se ocupó un diseño central compuesto y rotativo, fue posible estudiar y estimar la concentración de vitamina E y el rendimiento de extracción en función de las temperaturas y presiones de extracción, empleando CO₂ puro como agente de extracción, obteniendo como condiciones óptimas de extracción: 366 bar y 83,3 °C.

La Figura 10 muestra las variables presión y temperatura, dejando la variable “porcentaje de etanol” de forma constante y en su valor óptimo (10%) dado que el

análisis estadístico muestra que la variable “porcentaje de etanol” no afectó significativamente a las extracciones (Anexo, Figura 19). En el gráfico de superficie de respuesta se puede observar que a medida que se aumentó la temperatura, aumentó también la cantidad de polifenoles totales extraídos desde el polvo de VT pre tratado. Así mismo, a medida que aumentó la presión, también aumentó el rendimiento de los polifenoles totales.

En las Figuras 11 y 12 se puede observar gráficamente el comportamiento de las variables a Presión y Temperatura constantes, respectivamente. Al igual que en la Figura 10, se hizo uso del valor obtenido como óptimo para dejar la variable restante como constante.

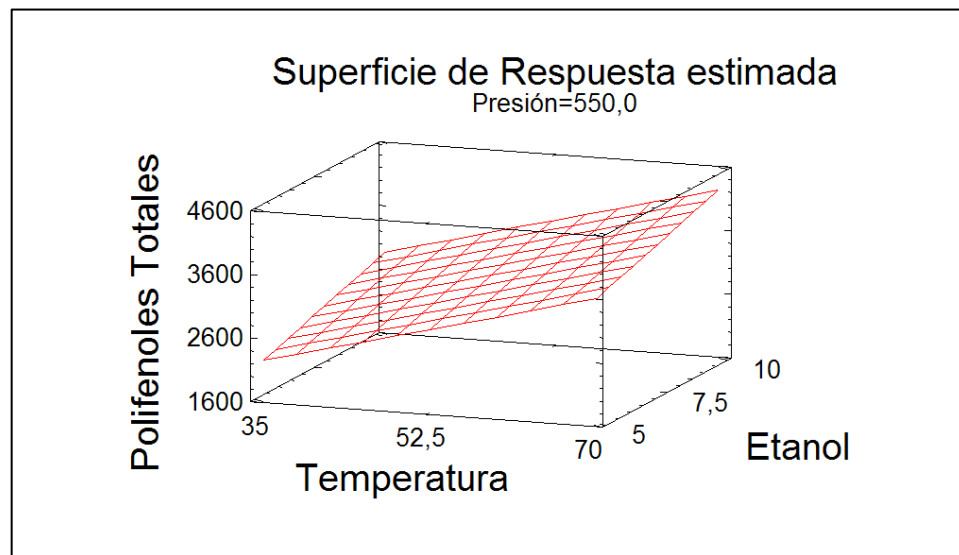


Figura 11. Gráfico de Superficie de Respuesta: Temperatura y Etanol versus Polifenoles totales.

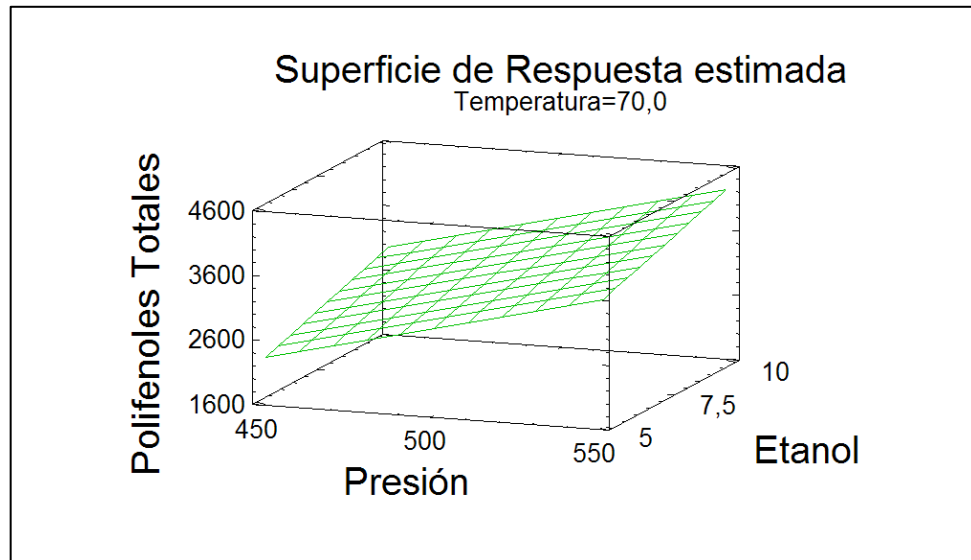


Figura 12. Gráfico de Superficie de Respuesta: Presión y Etanol versus Polifenoles totales.

En la Figura 13 se puede observar y corroborar cómo afectan las tres variables, dando cuenta de que lo hacen de manera directamente proporcional.

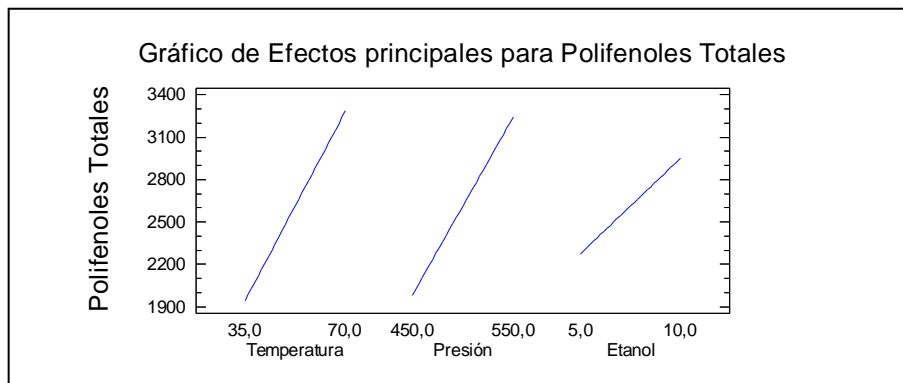


Figura 13. Gráfico de efectos principales.

6.3.4 Cinética de EFS-VT bajo las condiciones óptimas

Se estudió la extracción de polifenoles totales en el polvo de VT pre tratada en las condiciones óptimas de temperatura, presión y co-solvente, obtenidas de acuerdo al diseño experimental, los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Cinética de extracción en el tiempo. Los datos corresponden a polifenoles totales (μg EAG por gramo de VT).

Tiempo (minutos)	Cantidad de polifenoles extraídos	Cantidad de polifenoles acumulado	CV (%)
0	0	0	-
5	2689 \pm 100	2689 \pm 100	4
10	108 \pm 4	2797 \pm 97	3
15	284 \pm 37	3081 \pm 71	2
20	188 \pm 14	3269 \pm 70	2
25	112 \pm 15	3381 \pm 78	2
30	74 \pm 64	3455 \pm 142	4
35	296 \pm 89	3751 \pm 69	2
40	77 \pm 67	3828 \pm 132	3
45	75 \pm 65	3903 \pm 133	3
50	34 \pm 59	3937 \pm 127	3
55	0	3937 \pm 127	3
60	0	3937 \pm 127	3
Total Extraído:	3937 \pm 127	3937 \pm 127	3

CV: Coeficiente de variación. La cantidad extraída y la cantidad acumulada corresponden a los valores promedio obtenidos en las extracciones por triplicado.

Los datos de la Tabla 8 muestran el promedio de 3 extracciones realizadas bajo condiciones óptimas, donde se puede observar que no hubo diferencias en los triplicados.

La Figura 14 muestra la cinética de extracción de los polifenoles durante los 60 minutos en las condiciones óptimas de presión, temperatura y co-solvente.

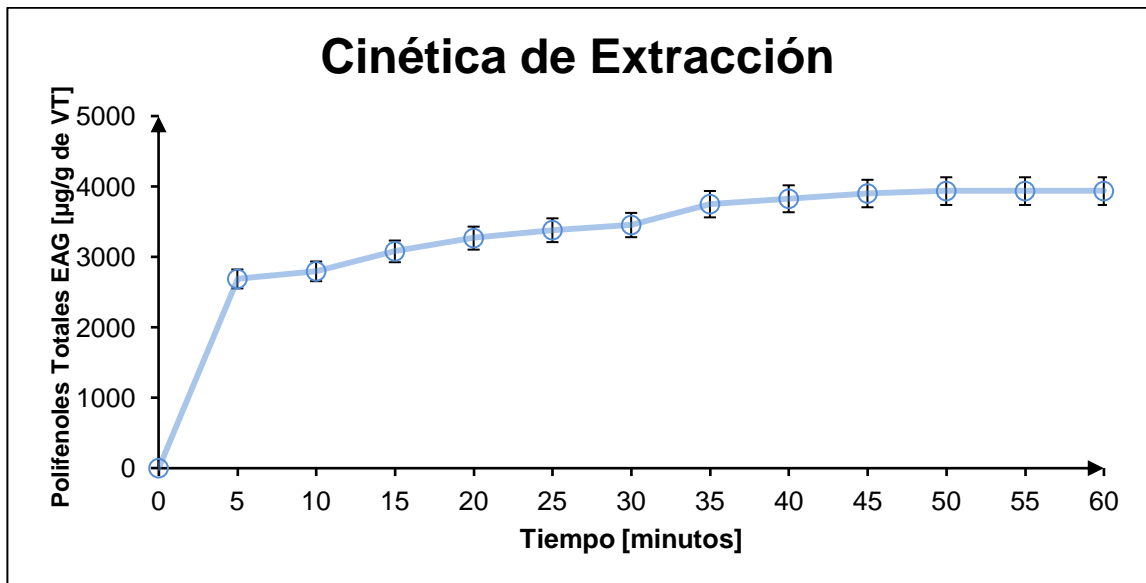


Figura 14. Gráfico de las cantidades de polifenoles totales acumulados en el tiempo en las condiciones óptimas de presión, temperatura y co-solvente (70°C, 550 bar y 10% de etanol).

En la Figura 14 además es posible apreciar el máximo rendimiento extraído (3937 µg de EAG/g de VT) alcanzado cerca de los 45 minutos. La cinética muestra dos comportamientos: uno rápido, que va desde el inicio de la extracción hasta los 5 minutos; seguido de uno lento, que termina aproximadamente a los 45 minutos donde ya no se observa extracción de polifenoles y se alcanza el estado estacionario.

La cinética de extracción corresponde a una “cinética de liberación” de polifenoles desde el polvo de vaina de tara. En el análisis de los datos y tras ajustar la correlación con un tipo de cinética, se encontró que la extracción se ajustó de mejor forma a una cinética de “orden cero” con un $R^2=0,918$, versus la de “orden uno” con un $R^2=0,879$ (Anexo 2).

Con los resultados obtenidos de la extracción de los polifenoles en condiciones óptimas se realizaron ajustes de los datos a diferentes modelos matemáticos que explicaran la cinética de extracción (Anexo 2). Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Ajuste de la cinética de extracción

Modelo	Correlación	R-cuadrado
Raíz cuadrada de X	0,9826	96,55%
Multiplicativo	0,9820	96,43%
Logarítmico de X	0,9764	95,33%
Lineal	0,9585	91,87%
Raíz cuadrada de Y	0,9538	90,98%
Exponencial	0,9485	89,97%
Inverso de Y	-0,9361	87,62%
Doble inverso	0,9003	81,05%
Curva S	-0,8813	77,67%
Inverso de X	-0,8608	74,10%

Donde X es la variable tiempo e Y es Polifenoles Totales extraídos

Esta tabla muestra los resultados de ajuste a los datos de varios modelos curvilíneos. De los modelos ajustados, el modelo “raíz cuadrada de X” presenta el valor de R-cuadrado más alto con 96,5524%.

La relación entre Polifenoles y tiempo (t) quedó descrita por el modelo ajustado en la siguiente ecuación:

$$\text{Polifenoles} = 2093,79 + 257,473 \cdot \sqrt{t}$$

Donde, Polifenoles está expresado en μg de polifenoles totales EAG por g de VT y tiempo en minutos.

Dado que el valor-p en la tabla de ANOVA es inferior a 0,01; existe relación estadísticamente significativa entre Polifenoles y Tiempo, para un nivel de confianza del 99% (Anexo 2).

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo es capaz de explicar un 96,6% de la variabilidad en Polifenoles. Así mismo, el “coeficiente de correlación” fue igual a 0,98, indicando una relación relativamente fuerte entre las dos variables. En el estudio realizado para extraer aceite esencial de girasol (Bravi et al., 2001) se ajustó al modelo matemático logarítmico explicando, un 98,9% de sus datos. Yu et al. (2012), indicaron obtener cerca del 92% del ajuste de sus resultados en el rendimiento de aceite desde semillas de colza, usando un modelo matemático polinomial.

En un estudio previo, realizado por Fernández et al. en 2008, se aplicó EFS para extraer los polifenoles desde la VT. Sin embargo, en este caso no se optimizó la extracción, por lo que se obtuvieron rendimientos significativamente inferiores (601 µg de EAG/g de VT) a los presentados en este trabajo. Esto demuestra las ventajas que nos ofrece la optimización de un proceso, y en este caso en particular, la optimización usando la extracción con fluido supercrítico de la VT, ya que de acuerdo a los datos obtenidos significó extraer más de 6 veces la cantidad de polifenoles totales. Por lo tanto, el uso del Diseño Factorial Completo se presenta como una herramienta útil para analizar y optimizar los efectos de 3 variables en EFS-VT.

En otros trabajos llevados a cabo en distintas matrices, como en Mendiola et al. (2008) trabajando en antioxidantes de microalgas, y Huynh et al. (2007) en antioxidantes de hierba limón, se ocupó la metodología de superficie respuesta para optimizar la EFS aplicando el mismo modelo factorial, obteniendo elevados rendimientos y buenas actividades antioxidantes (Mendiola, 2008), en relación a la EFS sin optimización.

6.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH

La actividad antioxidante medida por el método de DPPH es un buen descriptor del poder que tiene una sustancia para captar radicales libres. En muchos estudios se utiliza esta metodología para dar a conocer las propiedades antioxidantes de un extracto o un grupo de compuestos químicos.

El método utilizado correspondió a una modificación del descrito por Brand-Williams et al. (1995), fundamentado en que el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) de color violeta intenso pierde su color característico al ser capturado su radical libre, por lo tanto, a mayor decoloración, mayor poder antioxidante.

Se aplicó este método a aquellos puntos de la cinética donde la cantidad de polifenoles extraídos fue mayor con respecto a las demás (tiempos 5, 15 y 35 minutos, Tabla 8) para observar si existía alguna variación en cuanto a poder antioxidante en el tiempo. Es decir, con este análisis se pretendió observar si distintas fracciones de extracto pudieron haber presentado polifenoles de distinto tipo que pudieran haber tenido distinta capacidad antioxidante.

En el trabajo de Fernández et al. (2008), el método de DPPH se llevó a cabo midiendo la acción del antioxidante sobre el DPPH a un tiempo determinado de 5 minutos. Este procedimiento puede ser erróneo si se piensa que después de ese tiempo el antioxidante sigue actuando. Para evitar subestimaciones de la medida del DPPH se recomienda realizar una cinética de la reacción hasta alcanzar el estado estacionario.

En este trabajo se realizó una cinética durante 2 horas para cada concentración de antioxidante. Por cada muestra se prepararon concentraciones de 0,5; 0,8; 1,1 y 1,4 μg EAG/mL. Estas diluciones fueron determinadas mediante ensayos preliminares con el propósito de obtener concentraciones que estuvieran cercanas al 50% de decoloración del DPPH. En cada muestra, cada una de las 4 concentraciones produjo un “máximo de decoloración” de la solución de DPPH. Este máximo fue

calculado tomando el valor de absorbancia del estado estacionario alcanzado en el tiempo y expresado en porcentaje con respecto a la absorbancia inicial del DPPH. Con estos 4 “máximos de decoloración” se pudo calcular una recta de regresión lineal haciendo la correspondencia entre la concentración de polifenoles (expresada en EAG) y sus “máximos de decoloración” (expresados en porcentaje). Obtenida la recta es posible el cálculo de la concentración de extracto necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% (EC_{50}), donde un valor de EC_{50} igual a 100 corresponde a la máxima capacidad atrapadora de radicales libres y un valor cercano a 0 indica una reducida capacidad.

Los resultados de las cinéticas se muestran en las Figuras 15, 16 y 17.

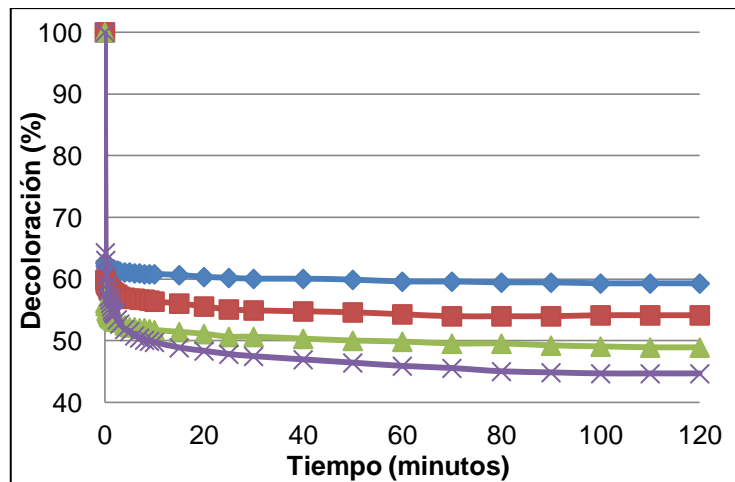


Figura 15. Cinética de DPPH de la muestra extraída a los 5 minutos. Concentraciones del extracto (en $\mu\text{gEAG/ml}$): $\blacklozenge=0,5$; $\blacksquare=0,8$; $\blacktriangle=1,1$; $\blackcross=1,4$.

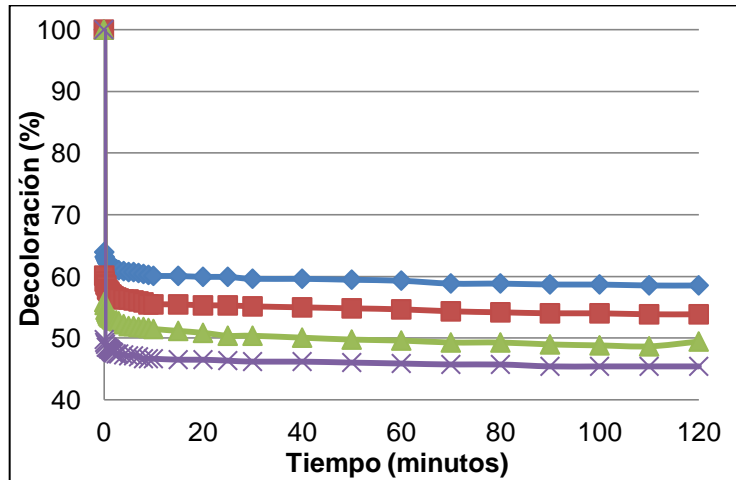


Figura 16. Cinética de DPPH de la muestra extraída a los 15 minutos. Concentraciones del extracto (en µgEAG/ml): ♦=0,5; ■=0,8; ▲=1,1; ×=1,4.

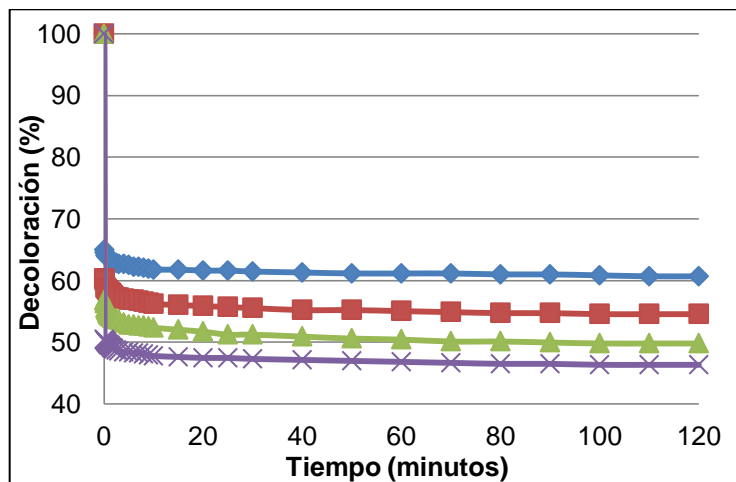


Figura 17. Cinética de DPPH de la muestra extraída a los 35 minutos. Concentraciones del extracto (en µgEAG/ml): ♦=0,5; ■=0,8; ▲=1,1; ×=1,4.

Las tres muestras presentaron cinéticas de decoloración de DPPH similares, lo que podría implicar que la composición de los extractos de polifenoles de vainas de tara extraídos a distintos tiempos pudiera ser similar.

Como anteriormente se señaló, la actividad antioxidante puede ser expresada como la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% (EC₅₀) (Puengphian y Sirichote, 2008), en la Tabla 10 se presenta el porcentaje de decoloración en función de la concentración de polifenoles de los extractos.

Tabla 10. Porcentaje de decoloración máxima versus concentración de polifenoles totales.

Concentración ($\mu\text{g EAG/mL}$)	Muestra	Muestra	Muestra	Promedio	CV (%)
	5min % de decoloración	15min % de decoloración	35min % de decoloración		
0,5	40,72	41,45	39,32	40,50 \pm 1,08	2,7
0,8	45,87	46,14	45,41	45,81 \pm 0,37	0,8
1,1	51,10	50,55	50,16	50,60 \pm 0,47	0,9
1,4	55,34	54,57	53,66	54,53 \pm 0,84	1,5

CV: coeficiente de variación. No existen diferencias significativas al 95% de confianza.

En la Tabla 10 es posible apreciar que no existen diferencias entre las 3 muestras estudiadas, al 95% de confianza. Con los resultados obtenidos se determinaron las regresiones lineales de cada muestra y se calcularon los coeficientes de correlación (R^2) y sus respectivas ecuaciones. Con cada ecuación de la recta, que se detallan en las Figuras 18 a la 20 fue posible calcular los EC₅₀ de las 3 muestras.

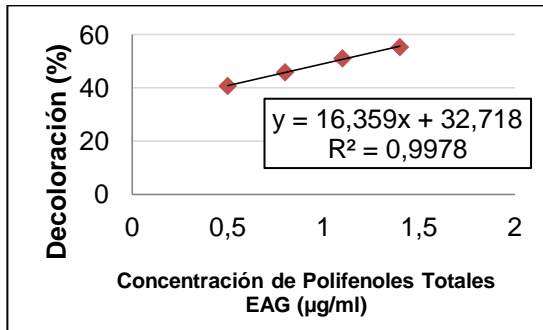


Figura 18. Gráfico muestra extraída a los 5 min.

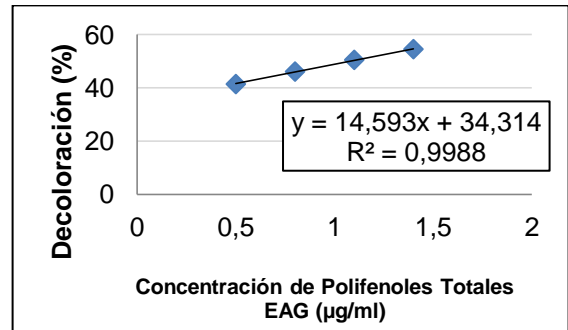


Figura 19. Gráfico muestra extraída a los 15 min.

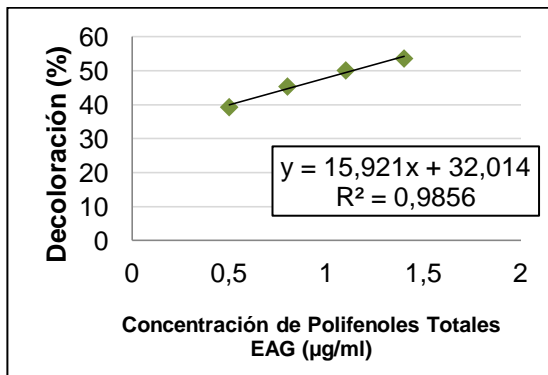


Figura 20. Gráfico muestra extraída a los 35 min.

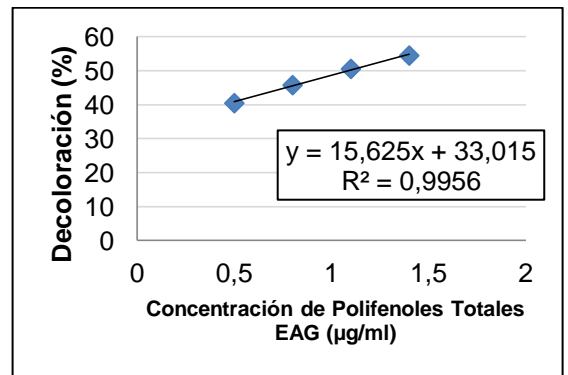


Figura 21. Gráfico promedio.

Los resultados de los respectivos EC_{50} se muestran en la Tabla 11, con un valor promedio de 1,09 ug de EAG/mL.

Tabla 11. EC₅₀ de las distintas tres muestras.

Muestra	EC₅₀ (µg/mL)
1	1,06
3	1,07
7	1,13
Promedio	1,09 ± 0,04
CV	3,48

Con los datos obtenidos de las 3 muestras y teniendo en cuenta que no hubo diferencias significativas entre ellas, fue posible graficar la curva promedio de DPPH (Figura 21), y determinar el EC₅₀ promedio de estos análisis.

Ya que el índice EC₅₀ es un buen predictor de la potencia antioxidante de los extractos es un parámetro útil de comparación entre muestras de distintos orígenes, sin embargo, es de vital consideración que los estudios a comparar hayan sido llevados a cabo con el mismo protocolo de reacción de DPPH. Es decir, dos EC₅₀ no son comparables si es que se añadieron distintas cantidades de microlitros de muestra y de DPPH. Es por esto que para realizar una comparación válida entre los valores que se obtuvieron en este estudio y valores de otros trabajos, los resultados se expresaron de mejor manera señalando la cantidad necesaria (en masa) en microgramos de polifenoles totales EAG para causar la disminución del 50% de absorbancia de una solución de DPPH, en vez de expresarla en volúmenes o concentraciones.

Como antecedente, en el trabajo realizado por Villanueva-Tiburcio et al. (2010), se determinó la capacidad antioxidante de la cáscara de un fruto de origen peruano (camu-camu) y se obtuvo como EC₅₀ una concentración igual a 114 µg/mL, que correspondieron en masa a 5,7 µg de polifenoles para disminuir al 50% la absorbancia de DPPH. En otro estudio, Cavero et al. (2006), se determinó que para un extracto de

orégano se obtuvo un EC_{50} igual a 53,8 μg EAG/mL, correspondiente a 5,4 μg EAG expresados en masa.

En el caso del extracto de polvo de tara, se obtuvo como resultado 1,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como EC_{50} (Tabla 11) esta concentración, tomando en cuenta el volumen ocupado en la reacción, correspondieron a 0,75 μg de polifenoles totales, presentando el extracto supercrítico de polvo de tara un mayor poder antioxidante que el extracto de camu-camu y orégano, este último conocido por su gran valor antioxidante. En la EFS-VT del estudio de Fernández et al. (2008), se obtuvo un valor menor (0,9 μg), pero cercano al de este trabajo usando la misma matriz vegetal.

Por último, las diferentes capacidades antioxidantes de los extractos se pueden explicar por las distintas composiciones de los compuestos fenólicos. El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su capacidad para donar hidrógeno lo cual depende estrechamente del número de grupos hidroxilos y de la estructura química del compuesto (Simic, 2007; Kumar Roy et al., 2007).

7. CONCLUSIONES.

Fue posible optimizar el proceso de extracción de polifenoles de la vaina de tara por fluido supercrítico. Se obtuvieron valores de presión, temperatura y porcentaje de co-solvente óptimos dentro del rango en el que se trabajaron las variables.

El rendimiento de extracción de los polifenoles fue proporcional a la presión y la temperatura. El porcentaje de modificador no afectó de forma significativa la extracción de los polifenoles de la vaina.

La extracción de los polifenoles de la vaina de tara se comportó como una cinética de orden cero y fue posible ajustarla a un modelo matemático de la Raíz Cuadrada del tiempo de extracción.

La capacidad atrapadora de radicales libre del extracto medida por la reacción de DPPH mostró un alto poder como antioxidante, superior a otros extractos vegetales con un valor de EC_{50} inferior a 1 μg .

La Extracción por Fluido Supercrítico constituye un proceso moderno, limpio y seguro para extraer componentes fenólicos con actividad antioxidante desde la vaina de tara, u otras matrices vegetales, para una potencial aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.

8. REFERENCIAS

1. AGROGESTIÓN. Desarrollo de cultivos de kumquat y tara como alternativas agroindustriales de alto valor para la IV Región de Coquimbo, PROYECTO FDI – CORFO.
2. BARNET, A.; MILLER, T. The determination of soluble carbohydrate in dried samples of grass silage by anthrone method. Journal of the Science of Food Agriculture, 1:336-339, 1950.
3. BELIZ, H. y GROSCH, W. Food Chemistry. Springer Ed., Berlín, 1999. 992p.
4. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology, v. 28, n. 1, p. 25 -30, 1995.
5. CAVERO et al. Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano. Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays. Journal of Supercritical Fluids, 38: 62-69, 2006.
6. DE LA CRUZ LAPA, P. Aprovechamiento integral y racional de la tara (*Caesalpinia spinosa* – *Caesalpinia tinctoria*) Revista del Instituto de Investigación FIGMMG Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 7(14): 64-73. 2004.
7. DÍAZ-REINOSO, B., MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. Journal of Agricultural Food Chemistry, 54: 2441-469, 2006.
8. ESTÉVEZ, A. M. et al. Extraction methods and some physical properties of mesquite (*Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz) seed gum. Journal of the Science of Food Agriculture, 84: 1487-92, 2004.
9. FERNÁNDEZ, A. et al. Estudio de las propiedades antioxidante de un extracto supercrítico de la vaina de tara (*Caesalpinia spinosa*) para su uso potencial como aditivo alimentario, Tesis de Químico Farmacéutico, Universidad de Chile, 2008.
10. GARRO GALVEZ, J., RIEDL, B., CONNER, H. Analytical Studies on tara tannins. Holzforschung, 51 (3): 235-43, 1997.
11. GUTFINGER, T. Polyphenols in olive oils. Journal of American oils Chemistry Society, 58: 966-968, 1981.
12. HASLAM, E., HAWORTH, R., KEEN, P., Gallotannins. Part VII. Tara Gallotannin. Journal of the Chemical Society, 1962, 3814-3818.
13. HOFF, J. E. and SINGLETON, K. I. A method for determination of tannins in foods by means of immobilized protein. Journal of Food Science, 42: 1566,1977.
14. HUYNH K. et al. Modeling and optimization of supercritical carbon dioxide extraction on essential oil from lemongrass using response surface

- methodology, Journal of Research in Science, Computing and Engineering, 2007.
15. KING et al. Carbon Dioxide Extraction of Spent Bleaching Clays, Journal of Supercritical Fluids, 5:38-41, 1992.
 16. KING-THOM et al. Tannins and human health: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38 (6): 421 – 464, 1998.
 17. KUMAR ROY, M., TAKENAKA, M., ISOBE, S. Thermal processing enhances antiradical activity and reduces pro-oxidant activity in water-soluble fraction of selected *Allium* vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture, 87:2259–2265, 2007.
 18. LIZA et al. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca), Journal Elsevier, food and bioproducts processing, 88: 319-326, 2010.
 19. MALECKA, M. Antioxidant properties of the unsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil. Food Chemistry, 79: 327-330, 2002.
 20. MARCANO, D., MASAHISA, H, Fitoquímica Orgánica, segunda edición, Editorial Torino, Venezuela, 2002.
 21. MENAKER, A., KRAVETS, M., KOEL, M., ORAV, A. Identification and characterization of supercritical fluids extracts from herbs. C.R. Chimie, 7: 629-33, 2004.
 22. MENDIOLA, J., Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos, Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Madrid, 2008.
 23. MURGA, R. et al. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48: 3408-412, 2000.
 24. PEREIRA, C., MEIRELES, M. Evaluation of global yield, composition, antioxidant activity and cost of manufacturing of extracts from lemon verbena (*Aloysiatriphylla*[L'hérit.] britton) and mango (*mangiferaindical.*) leaves. Journal of Food Process Engineering, 30: 150-173, 2007.
 25. POKORNY, J., YANISHLIEVA, N., GORDON, M. Antioxidantes en los Alimentos: Aplicaciones prácticas. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, 2001.
 26. PUENGPHIAN y SIRICHOTE, (6)-gingerol content and bioactive properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts from supercritical CO₂ extraction, Asian Journal of Food and Agro-industry, 29-36, 2008.
 27. QUEIROZ, C., MORAIS, S., NASCIMENTO, E. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). Rev. Árvore [online]. 2002, vol.26, n.4 [citado 2011-12-06], pp. 493-497. Disponible desde: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-7622002000-

400011&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0100-6762. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622002000400011>

28. RIZVI, S.S.H. *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*. 1^a Ed. 1994, London UK: Balckie Academic & Professional.
29. RIBÉREAU-GAYON et al. *Ciencias y técnicas del vino Tomo I: análisis y control de los vinos*. Editorial Hemisferio Sur S.A. Bordeaux, Francia, 1980.
30. SIMIC, A. et. al., Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. Molecules, 12: 2327-2340, 2007.
31. SIKWESE, F., DUODU, K. Antioxidant effect of a crude phenolic extract from sorghum bran in sunflower oil in the presence of ferric ions. Food Chemistry, 104: 324–331, 2007.
32. VÁSQUEZ, L., *Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales*, Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Madrid, 2008.
33. VILLANUEVA-TIBURCIO J. et al. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh), Ciência e Tecnologia de Alimentos, 30 (Supl. 1): 151-160, 2010.
34. YU J. et al. Application of response surface methodology to optimize supercritical carbon dioxide extraction of oil from rapeseed (*Brassica napus* L.). International Journal of Food Science and Technology, 47: 1115-1121, 2012.
35. ZHENG, W., WANG, S. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural Food Chemistry, 49 (11): 5165-170, 2001.

ANEXOS

ANEXO 1

1. CÁLCULO DEL FLUJO DE CO₂ Y DE CO-SOLVENTE:

Primero que todo, se fija el flujo de CO₂ con el que se quiere trabajar. En este caso es de 2,5L/min, así que se calcula la masa de CO₂ que pasa por minuto. Con la densidad a temperatura experimental (28°C) se obtiene como flujo 4,415g/min:

— — —

Ya sabiendo la masa de CO₂ que pasa por minuto, se determina el nuevo flujo en volumen de acuerdo a la densidad correspondiente a la temperatura y presión que se use. Por ejemplo, a 35°C y a 450bar, el flujo de CO₂ es de 4,460mL/min:

— — —

Además, si el porcentaje de co-solvente es de 5%, para que 4,460mL (por minuto) sea el 95% v/v, con una proporción se calcula el flujo de etanol:

Lo que da como resultado 0,23mL de etanol por minuto.

Tabla 12. Densidad y fase del CO₂ según temperatura y presión

Temperatura (°C)	Presión (bar)	Densidad (kg/m ³)	Fase
28	1	1,7661	Vapor
35	450	989,87	Supercrítico
35	550	1020,0	Supercrítico
70	450	882,37	Supercrítico
70	550	924,11	Supercrítico
52,5	500	955,22	Supercrítico

Sucesivamente se calculan los flujos para cada caso, los que son presentados en la Tabla 11.

Tabla 13. Flujos de CO₂ y etanol según condiciones experimentales

Experimento	Densidad CO ₂ (kg/m ³)	Flujo CO ₂ (mL/min)	Flujo etanol (mL/min)
1	989,87	4,460	0,235
2	1020	4,328	0,228
3	989,87	4,460	0,496
4	1020	4,328	0,481
5	882,37	5,004	0,263
6	924,11	4,778	0,251
7	882,37	5,004	0,556
8	924,11	4,778	0,531
C ₁	955,22	4,622	0,375
C ₂	955,22	4,622	0,375

ANEXO 2

ANÁLISIS CON STATGRAPHICS PLUS 5.1

2.1 Análisis de la Optimización para Polifenoles Totales

Efectos estimados para Polifenoles Totales

Promedio	=	2613,5 +/- 126,232
A: Temperatura	=	1345,0 +/- 282,264
B: Presión	=	1262,0 +/- 282,264
C: Etanol	=	679,0 +/- 282,264

Los errores estándar están basados en un error total con 6 g.l. (grados de libertad).

Análisis de la Varianza para Polifenoles Totales

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor p
A: Temperatura	3,61805E6	1	3,61805E6	22,71	0,0031
B: Presión	3,18529E6	1	3,18529E6	19,99	0,0042
C: Etanol	922082,0	1	922082,0	5,79	0,0529
Error Total	956079,0	6	159346,0		
Total (corr.)	8,6815E6	9			

R-cuadrado = 88,9872 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 83,4808 por ciento

Error Estándar de Est. = 399,182

Error absoluto de la media = 239,2

Estadístico Durbin-Watson = 0,972491 (P=0,0336)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0,301536

En este caso, 2 de los efectos tienen los valores p inferiores a 0,05 (temperatura y presión), indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza.

Gráfico de Pareto correspondiente a los resultados de las extracciones del modelo utilizado:

Gráfico de Pareto estandarizado para Polifenoles Totales

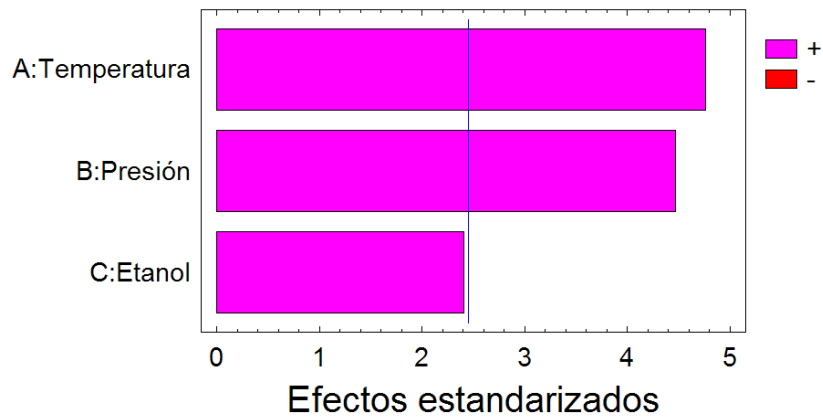


Figura 22. Gráfico de Pareto.

Coef. de regresión para Polifenoles Totales

Constante	=	-6732,5
A: Temperatura	=	38,4286
B: Presión	=	12,62
C: Etanol	=	135,8

Se muestra la ecuación de la regresión que se ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es:

Polifenoles Totales = -6732,5 + 38,4286*Temperatura + 12,62*Presión + 135,8*Etanol
siendo los valores de las variables especificados en sus unidades originales.

2.2 Anova de Extracción del Óptimo

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Entre grupos	249771,0	2	124886,0	0,59	0,5582
Intra grupos	6,94502E6	33	210455,0		
Total (Corr.)	7,19479E6	35			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 0,593407, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos.

Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un 95,0%.

2.3 Análisis de los Puntos de la Cinética de DPPH

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Entre grupos	3,1232	2	1,5616	0,04	0,9588
Intra grupos	332,432	9	36,9372		
Total (Corr.)	335,558	11			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en

este caso es igual a 0,0422771, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos.

Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un 95,0%.

2.4 Análisis de la Regresión de la Cinética de DPPH

Análisis de Regresión - Modelo Raíz Cuadrada-X: $Y = a + b \cdot \sqrt{X}$

Variable dependiente: Polifenoles

Variable independiente: Tiempo

Parámetro	Error estimación	Estadístico estándar	T	Valor p
Ordenada	2093,79	87,7109	23,8716	0,0000
Pendiente	257,473	15,3855	16,7348	0,0000

Fuente	Sumas de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Entre grupos	2,22344E6	1	2,22344E6	280,05	0,0000
Intra grupos	79393,5	10	7939,35		
Total (Corr.)	2,3028E6	11			

Coefficiente de Correlación = 0,982611

R-cuadrado = 96,5524 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 96,2076 porcentaje

Error estándar de est. = 89,103

Error absoluto medio = 64,603

Estadístico de Durbin-Watson = 1,06826 (P=0,0144)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,319553

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo raíz cuadrada-X para describir la relación entre Polifenoles y Tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Polifenoles} = 2093,79 + 257,473 \cdot \sqrt{\text{Tiempo}}$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, existe relación estadísticamente significativa entre Polifenoles y Tiempo para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 96,5524% de la variabilidad en Polifenoles. El coeficiente de correlación es igual a 0,982611, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 89,103. Este valor puede usarse para construir límites de la predicción para las nuevas observaciones seleccionando la opción Predicciones del menú del texto.

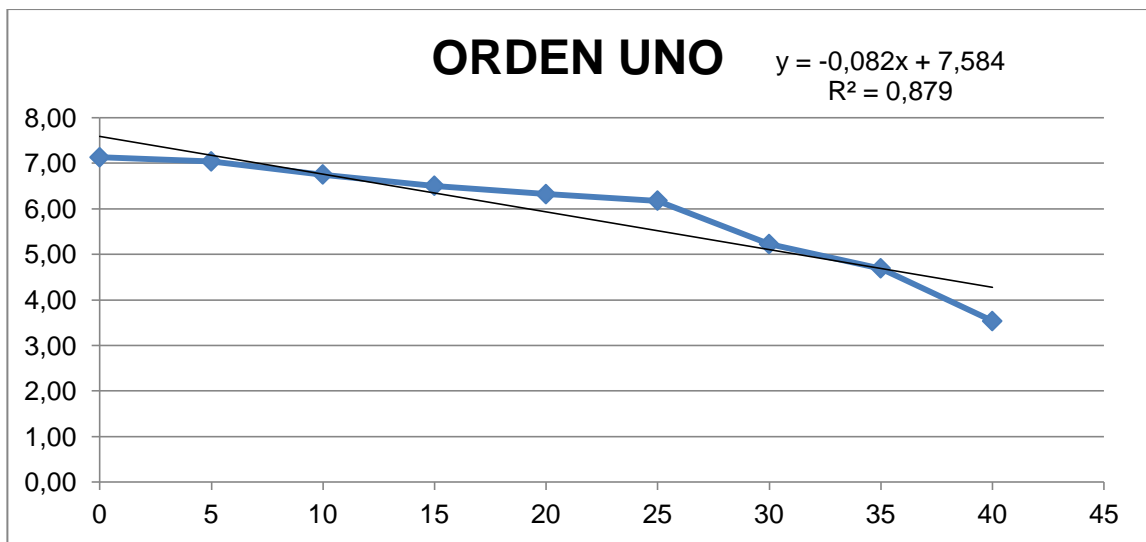
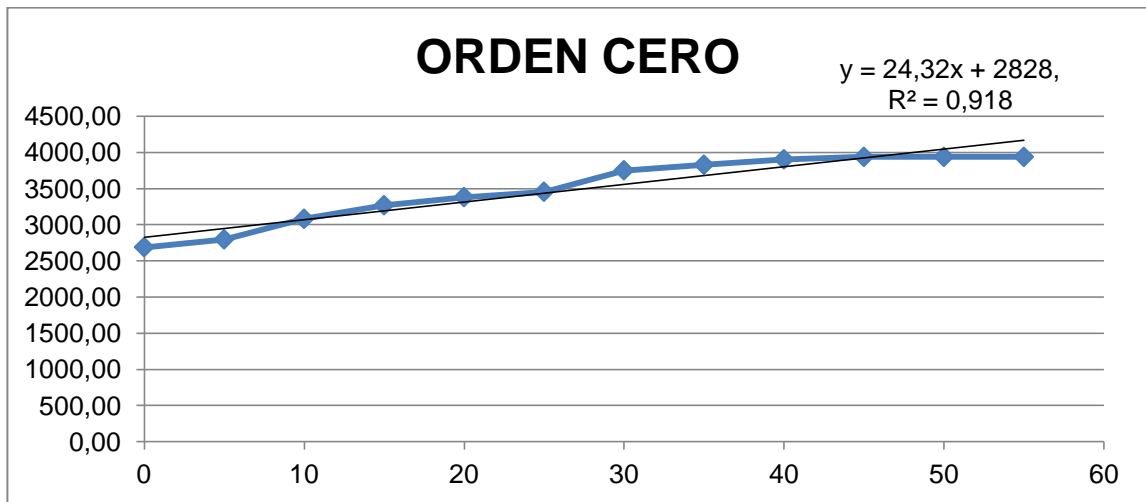
El error absoluto medio (MAE) de 64,603 es el valor medio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se han introducido los datos en el fichero. Dado que el p-valor es inferior a 0.05, hay indicio de una posible correlación serial. Represente los residuos frente al orden de fila para ver si hay algún modelo que pueda verse.

Comparación de Modelos Alternativos

Modelo	Correlación	R-Cuadrado
Raíz cuadrada-X	0,9826	96,55%
Multiplicativo	0,9820	96,43%
Logarítmico-X	0,9764	95,33%
Lineal	0,9585	91,87%
Raíz cuadrada-Y	0,9538	90,98%
Exponencial	0,9485	89,97%
Inverso-Y	-0,9361	87,62%
Doble Inverso	0,9003	81,05%
Curva-S	-0,8813	77,67%
Inverso-X	-0,8608	74,10%
Logístico	Sin ajuste	
Log Probit	Sin ajuste	

Esta tabla muestra los resultados de ajuste a los datos de varios modelos curvilíneos. De los modelos ajustados, el modelo raíz cuadrada-X procura el valor de R-cuadrado más alto con 96,5524%. Este es el modelo seleccionado actualmente.

2.5 Orden de cinética



ANEXO 3

CURVA DE CALIBRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Se realizó una curva de calibración para calcular la concentración de polifenoles totales. Esta se realizó con Ácido Gálico como estándar y los resultados se muestran en concentración de polifenoles totales equivalentes a ácido gálico (EAG).

Tabla 14. Preparación curva de calibración con ácido gálico

Alícuota (mL)	Matraz (mL)	Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0,2	10	0,1010	0,130
0,4	10	0,2021	0,260
0,6	10	0,3031	0,359
0,8	10	0,4042	0,479
1,0	10	0,5052	0,590
1,2	10	0,6062	0,698
1,4	10	0,7073	0,792

Concentración en mg de polifenoles totales EAG por mL.

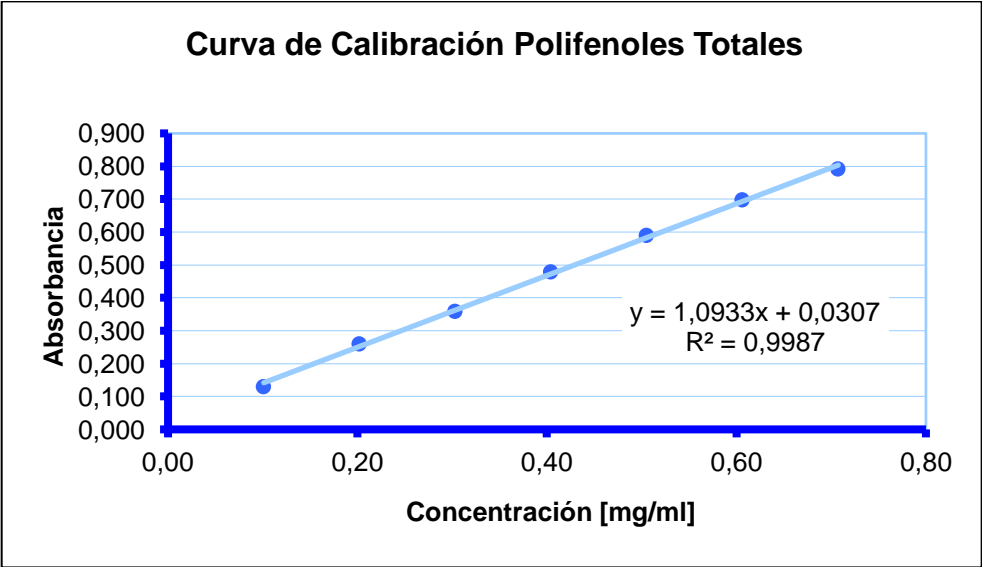


Figura 23. Curva de Calibración utilizada en este estudio.

ANEXO 4

CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DE ANTRONA

Tabla 15. Datos curva de calibración método Antrona.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0,052	0,226
0,103	0,464
0,155	0,652

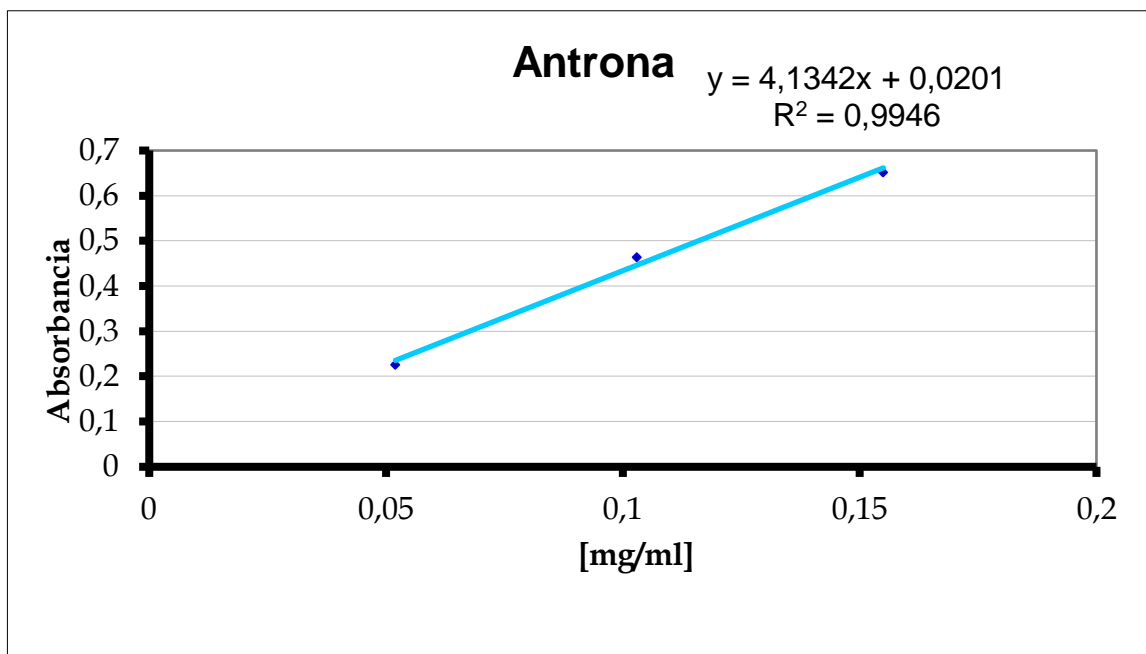


Figura 24. Curva de calibración del método de Antrona.

Anexo 5: Tabla de absorbancias de DPPH

Tabla 16. Tabla de absorbancias para la muestra de 5 min

Concentración	0,5	0,8	1,1	1,4	0,5	0,8	1,1	1,4
Tiempo	A2	A3	A4	A5	%A2	%A3	%A4	%A5
0:00:00	0,663	0,630	0,638	0,571	100,0	100,0	100,0	100,0
0:00:05	0,415	0,377	0,358	0,367	62,6	59,8	56,1	64,3
0:00:10	0,412	0,374	0,355	0,360	62,1	59,4	55,6	63,0
0:00:20	0,411	0,372	0,350	0,346	62,0	59,0	54,9	60,6
0:00:30	0,411	0,371	0,348	0,338	62,0	58,9	54,5	59,2
0:00:40	0,410	0,369	0,346	0,332	61,8	58,6	54,2	58,1
0:00:50	0,409	0,368	0,344	0,326	61,7	58,4	53,9	57,1
0:01:00	0,408	0,366	0,343	0,323	61,5	58,1	53,8	56,6
0:01:10	0,408	0,366	0,342	0,320	61,5	58,1	53,6	56,0
0:01:20	0,408	0,365	0,342	0,317	61,5	57,9	53,6	55,5
0:01:30	0,408	0,365	0,341	0,314	61,5	57,9	53,4	55,0
0:01:40	0,408	0,364	0,340	0,312	61,5	57,8	53,3	54,6
0:01:50	0,408	0,363	0,340	0,311	61,5	57,6	53,3	54,5
0:02:00	0,407	0,363	0,339	0,310	61,4	57,6	53,1	54,3
0:02:30	0,407	0,362	0,339	0,305	61,4	57,5	53,1	53,4
0:03:00	0,406	0,360	0,338	0,301	61,2	57,1	53,0	52,7
0:04:00	0,405	0,359	0,335	0,296	61,1	57,0	52,5	51,8
0:05:00	0,405	0,358	0,333	0,294	61,1	56,8	52,2	51,5
0:06:00	0,404	0,358	0,333	0,290	60,9	56,8	52,2	50,8
0:07:00	0,404	0,357	0,332	0,288	60,9	56,7	52,0	50,4
0:08:00	0,403	0,357	0,332	0,286	60,8	56,7	52,0	50,1
0:09:00	0,403	0,356	0,331	0,285	60,8	56,5	51,9	49,9
0:10:00	0,403	0,355	0,330	0,284	60,8	56,3	51,7	49,7
0:15:00	0,402	0,353	0,328	0,279	60,6	56,0	51,4	48,9
0:20:00	0,400	0,350	0,326	0,276	60,3	55,6	51,1	48,3
0:25:00	0,399	0,347	0,323	0,273	60,2	55,1	50,6	47,8
0:30:00	0,398	0,346	0,323	0,271	60,0	54,9	50,6	47,5
0:40:00	0,398	0,345	0,321	0,268	60,0	54,8	50,3	46,9
0:50:00	0,397	0,344	0,319	0,265	59,9	54,6	50,0	46,4
1:00:00	0,395	0,342	0,318	0,262	59,6	54,3	49,8	45,9
1:10:00	0,395	0,340	0,316	0,260	59,6	54,0	49,5	45,5
1:20:00	0,394	0,340	0,316	0,257	59,4	54,0	49,5	45,0
1:30:00	0,394	0,340	0,314	0,256	59,4	54,0	49,2	44,8
1:40:00	0,393	0,341	0,313	0,255	59,3	54,1	49,1	44,7
1:50:00	0,393	0,341	0,312	0,255	59,3	54,1	48,9	44,7
2:00:00	0,393	0,341	0,312	0,255	59,3	54,1	48,9	44,7

Tabla 17. Tabla de absorbancias para la muestra de 15 min

Concentración	0,5	0,8	1,1	1,4	0,5	0,8	1,1	1,4
Tiempo	A2	A3	A4	A5	%A2	%A3	%A4	%A5
0:00:00	0,649	0,622	0,641	0,645	100,0	100,0	100,0	100,0
0:00:05	0,415	0,374	0,358	0,321	63,9	60,1	55,9	49,8
0:00:10	0,410	0,368	0,355	0,318	63,2	59,2	55,4	49,3
0:00:20	0,408	0,365	0,350	0,316	62,9	58,7	54,6	49,0
0:00:30	0,406	0,364	0,348	0,313	62,6	58,5	54,3	48,5
0:00:40	0,404	0,360	0,346	0,313	62,2	57,9	54,0	48,5
0:00:50	0,403	0,359	0,344	0,312	62,1	57,7	53,7	48,4
0:01:00	0,402	0,358	0,343	0,311	61,9	57,6	53,5	48,2
0:01:10	0,401	0,357	0,342	0,311	61,8	57,4	53,4	48,2
0:01:20	0,401	0,355	0,342	0,310	61,8	57,1	53,4	48,1
0:01:30	0,400	0,355	0,341	0,309	61,6	57,1	53,2	47,9
0:01:40	0,399	0,354	0,340	0,308	61,5	56,9	53,0	47,8
0:01:50	0,398	0,353	0,340	0,308	61,3	56,8	53,0	47,8
0:02:00	0,398	0,353	0,339	0,307	61,3	56,8	52,9	47,6
0:02:30	0,397	0,352	0,339	0,306	61,2	56,6	52,9	47,4
0:03:00	0,396	0,351	0,338	0,306	61,0	56,4	52,7	47,4
0:04:00	0,395	0,350	0,335	0,305	60,9	56,3	52,3	47,3
0:05:00	0,394	0,350	0,333	0,304	60,7	56,3	52,0	47,1
0:06:00	0,394	0,349	0,333	0,304	60,7	56,1	52,0	47,1
0:07:00	0,393	0,348	0,332	0,303	60,6	55,9	51,8	47,0
0:08:00	0,392	0,347	0,332	0,301	60,4	55,8	51,8	46,7
0:09:00	0,391	0,345	0,331	0,301	60,2	55,5	51,6	46,7
0:10:00	0,390	0,345	0,330	0,301	60,1	55,5	51,5	46,7
0:15:00	0,390	0,345	0,328	0,300	60,1	55,5	51,2	46,5
0:20:00	0,389	0,344	0,326	0,300	59,9	55,3	50,9	46,5
0:25:00	0,389	0,344	0,323	0,299	59,9	55,3	50,4	46,4
0:30:00	0,387	0,343	0,323	0,298	59,6	55,1	50,4	46,2
0:40:00	0,387	0,342	0,321	0,298	59,6	55,0	50,1	46,2
0:50:00	0,386	0,341	0,319	0,297	59,5	54,8	49,8	46,0
1:00:00	0,385	0,340	0,318	0,296	59,3	54,7	49,6	45,9
1:10:00	0,382	0,338	0,316	0,295	58,9	54,3	49,3	45,7
1:20:00	0,382	0,337	0,316	0,295	58,9	54,2	49,3	45,7
1:30:00	0,381	0,336	0,314	0,293	58,7	54,0	49,0	45,4
1:40:00	0,381	0,336	0,313	0,293	58,7	54,0	48,8	45,4
1:50:00	0,380	0,335	0,312	0,293	58,6	53,9	48,7	45,4
2:00:00	0,380	0,335	0,317	0,293	58,6	53,9	49,5	45,4

Tabla 18. Tabla de absorbancias para la muestra de 15 min

Concentración	0,5	0,8	1,1	1,4	0,5	0,8	1,1	1,4
Tiempo	A2	A3	A4	A5	%A2	%A3	%A4	%A5
0:00:00	0,651	0,610	0,630	0,628	100,0	100,0	100,0	100,0
0:00:05	0,423	0,368	0,358	0,317	65,0	60,3	56,8	50,5
0:00:10	0,420	0,366	0,355	0,316	64,5	60,0	56,3	50,3
0:00:20	0,417	0,359	0,350	0,315	64,1	58,9	55,6	50,2
0:00:30	0,416	0,358	0,348	0,314	63,9	58,7	55,2	50,0
0:00:40	0,415	0,357	0,346	0,313	63,7	58,5	54,9	49,8
0:00:50	0,415	0,356	0,344	0,312	63,7	58,4	54,6	49,7
0:01:00	0,414	0,355	0,343	0,311	63,6	58,2	54,4	49,5
0:01:10	0,413	0,354	0,342	0,311	63,4	58,0	54,3	49,5
0:01:20	0,413	0,354	0,342	0,310	63,4	58,0	54,3	49,4
0:01:30	0,412	0,353	0,341	0,309	63,3	57,9	54,1	49,2
0:01:40	0,411	0,352	0,340	0,308	63,1	57,7	54,0	49,0
0:01:50	0,411	0,351	0,340	0,308	63,1	57,5	54,0	49,0
0:02:00	0,410	0,350	0,339	0,307	63,0	57,4	53,8	48,9
0:02:30	0,409	0,349	0,339	0,306	62,8	57,2	53,8	48,7
0:03:00	0,408	0,349	0,338	0,305	62,7	57,2	53,7	48,6
0:04:00	0,408	0,348	0,335	0,304	62,7	57,0	53,2	48,4
0:05:00	0,407	0,347	0,333	0,304	62,5	56,9	52,9	48,4
0:06:00	0,405	0,347	0,333	0,303	62,2	56,9	52,9	48,2
0:07:00	0,405	0,346	0,332	0,303	62,2	56,7	52,7	48,2
0:08:00	0,404	0,345	0,332	0,302	62,1	56,6	52,7	48,1
0:09:00	0,403	0,344	0,331	0,301	61,9	56,4	52,5	47,9
0:10:00	0,402	0,343	0,330	0,300	61,8	56,2	52,4	47,8
0:15:00	0,402	0,342	0,328	0,299	61,8	56,1	52,1	47,6
0:20:00	0,401	0,341	0,326	0,298	61,6	55,9	51,7	47,5
0:25:00	0,401	0,340	0,323	0,298	61,6	55,7	51,3	47,5
0:30:00	0,400	0,339	0,323	0,297	61,4	55,6	51,3	47,3
0:40:00	0,399	0,337	0,321	0,296	61,3	55,2	51,0	47,1
0:50:00	0,398	0,337	0,319	0,295	61,1	55,2	50,6	47,0
1:00:00	0,398	0,336	0,318	0,294	61,1	55,1	50,5	46,8
1:10:00	0,398	0,335	0,316	0,293	61,1	54,9	50,2	46,7
1:20:00	0,397	0,334	0,316	0,292	61,0	54,8	50,2	46,5
1:30:00	0,397	0,334	0,315	0,292	61,0	54,8	50,0	46,5
1:40:00	0,396	0,333	0,314	0,291	60,8	54,6	49,8	46,3
1:50:00	0,395	0,333	0,314	0,291	60,7	54,6	49,8	46,3
2:00:00	0,395	0,333	0,314	0,291	60,7	54,6	49,8	46,3