

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



TESIS

“Aprovechamiento de residuos de granada (*Punica granatum*)
variedad Wonderful, para la extracción de biocompuestos
mediante la aplicación de CO₂ supercrítico”

PARA OPTAR:
TITULO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PRESENTADO POR:

Bach. Marianné Hilda Cornejo Figueroa

TACNA – PERÚ

2020

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

Tesis

“Aprovechamiento de residuos de granada (*Punica granatum*)
variedad Wonderful, para la extracción de biocompuestos
mediante la aplicación de CO₂ supercrítico”

Tesis sustentada y aprobada el 17 de julio de 2020; estando el
jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE:



MSc. NORMAN TOMÁS DELGADO CABRERA

SECRETARIO:



Ing. DANNY DANIEL CARHUAZ VALDEZ

VOCAL:



Ing. JORGE KARIM CÁCERES SANCHEZ

ASESOR:



Dr. RAUL CARTAGENA CUTIPA

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Marianné Hilda Cornejo Figueroa, en calidad de bachiller de la Escuela de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Privada de Tacna, identificado(a) con DNI 70667718

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor (a) de la tesis titulada:

“Aprovechamiento de residuos de granada (*Punica Granatum*) variedad Wonderful, para la extracción de biocompuestos mediante la aplicación de CO₂ supercrítico”

la misma que presento para optar el:

Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.

4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo frente a LA UNIVERSIDAD cualquier responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. En consecuencia, me hago responsable frente a LA UNIVERSIDAD y a terceros, de cualquier daño que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado o que pudiera encontrar como causa del trabajo presentado, asumiendo todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse de ello en favor de terceros con motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontrasen causa en el contenido de la tesis, libro y/o invento.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente de la Universidad Privada de Tacna.

Tacna, Julio Del 2020



Firma

Marianné Hilda Cornejo Figueroa
70667718

DEDICATORIA

A mi mamá Carmen

Que gracias a ella soy quien soy. Por su amor incondicional y su constante atención, por haberme hecho una mujer de principios, buenos sentimientos y que busca cada día ser mejor, como ser humano y profesional. Por su comprensión y su especial forma de enseñarme a luchar por mis sueños, valorar todo lo que me da la vida y aprender de mis desaciertos.

A mi tía Anita:

Por escucharme y enseñarme a afrontar mis miedos, así como reconocer mis virtudes y defectos. Por ser como una segunda madre para mí.

A mi papá:

Porque de algún modo su apoyo y preocupación por mi bienestar fueron también motivo para seguir adelante en la persecución de mis metas.

A mi familia:

Por creer siempre en mí, y haberme dado ánimos cada que me veían, además de mostrarme cuán orgullosos estaban de mí.

AGRADECIMIENTO

Valorar a las personas y todo aquello que nos rodea y da sosiego, calma, amor y motivación a continuar en la vida, es una virtud que se construye cada día. Hoy, quiero agradecer a todos aquellos que me acompañaron y acompañan en el camino.

Agradezco a Dios primordialmente por haberme dado destrezas y habilidades que he podido desarrollar para conseguir mis sueños y objetivos. Gracias por el regalo que me da cada día al despertar: la vida.

Gracias a mis padres por su amor. Por tener la mirada puesta siempre en mí, y con o sin palabras hacerme sentir su presencia y compañía. Por haberme demostrado incontables veces su orgullo y entrega.

Gracias a mis amigos: Daniela, por su amistad incondicional y las lecciones, lágrimas y risas. A Maricarmen, Triana, Nicola, Alexis, Anthony, Verónica, Diego, Carlos y Andres, por su grata compañía y gran amistad.

Gracias también a las personas que se cruzaron en mi camino para enseñarme tanto y marcar mi existencia con maravillosos momentos, gracias eternas para aquellos que ya no están más.

Gracias a mis maestros: Raul y Sylvia, por su constante asesoramiento para lograr este trabajo, mi mayor consideración a ambos, así como a mis docentes de universidad: Martha, Daniela, Karim, Daniel y Anabel por sus enseñanzas, las que me servirán por siempre. Al Dr. Pedro Alonso Dávila por su gran aporte científico y el aprendizaje invaluable brindado, por su hospitalidad en mi estancia en México y su amable predisposición. Al Dr. Rogelio Flores, Dr. Raúl García y Dr. Alejandro Rocha, docentes de la UASLP-México.

*Agradezco también al proyecto EFBIGRANADA 2019 por ser el soporte permanente de este trabajo de investigación y por haberme considerado para ser parte de su ejecución. De mismo agradezco el financiamiento de CONCYTEC/FONDECYT y Banco Mundial según **CP N° 8682-PE-BM-FONDECYT/CONCYTEC, Contrato N° 127-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV** para la realización de esta tesis en la movilización a México, ciudad de San Luis Potosí, Universidad Autónoma San Luis Potosí.*

Contenido

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
RESUMEN	VIII
ABSTRACT.....	IX
INTRODUCCION	1
CAPÍTULO I	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	5
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	8
1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	9
1.4. OBJETIVOS	10
1.4.1. <i>Objetivo general</i>	10
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	10
1.5. HIPÓTESIS	10
CAPÍTULO II	11
MARCO TEÓRICO	11
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	11
2.2. BASES TEÓRICAS	15
2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	35
CAPÍTULO III	37
MARCO METODOLÓGICO	37
3.1. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	37
3.2. ACCIONES Y ACTIVIDADES	37
3.3. MATERIALES Y/O INSTRUMENTOS	42
3.4. MUESTRA DE ESTUDIO	43
3.5. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS.....	43
CAPÍTULO IV	46
RESULTADOS	46
CAPÍTULO V	60
DISCUSIÓN.....	60

CONCLUSIONES.....	64
RECOMENDACIONES.....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	66
ANEXOS 1	74
MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	80

RESUMEN

Esta tesis se desarrolla en torno a la extracción y caracterización de biocompuestos no polares presentes en subproductos de procesamiento de granada variedad Wonderful, específicamente de semillas; utilizando dióxido de carbono supercrítico (sc-CO₂) a temperaturas entre 40 y 60 °C, y presión constante de 320 bar, en un intervalo de tiempo entre 1 a 5 horas, con un caudal de CO₂ promedio de ~4,05 kg/h. A modo de comparación, se realizó la extracción con hexano utilizando un equipo Soxhlet que permitió obtener un rendimiento del 18,3524 %. Los extractos se analizaron mediante cromatografía de gases por detección de ionización de llama y espectrometría de masas. Se propuso un diseño experimental de rotación central compuesto con $2^2 +$ estrella o 2k para el análisis estadístico en el software MINITAB 18, con 13 tratamientos aleatorizados que se controlaron con la propuesta de estudiar el efecto de la temperatura y el tiempo durante la extracción supercrítica a una presión constante. La temperatura de 60 °C tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el rendimiento alcanzado, con el valor más alto del aceite en 19,53 %, obtenido en un tiempo de 5 horas de extracción a 320 bar. El perfil de ácidos grasos mostró al ácido púnico como el ácido graso más abundante en el aceite de semilla de granada seguido de ácido esteárico y palmítico. En menor medida, encontramos al ácido oleico, lignocérico, araquídico, caproico y linoleico. En cuanto a los tocoferoles y esteroides se encontraron gamma y beta tocoferol, gamma y beta sitosterol, estigmasterol y alfa tocoferol (vitamina E) como componentes en mayor proporción.

Palabras claves: *fluido supercrítico, granada Wonderful, ácidos grasos, tocoferoles, esteroides, CO₂ crítico, cromatografía de gases masas, ácido púnico.*

ABSTRACT

This study is developed around the extraction and characterization of non-polar biocomposites present in by-products of pomegranate processing variety Wonderful, specifically from seeds; using supercritical carbon dioxide (sc-CO₂) at temperatures between 40 and 60 °C, and constant pressure of 320 bar, in a time interval between 1 to 5 hours, with an average CO₂ flow rate of ~4,05 kg/h. For comparison, extraction with hexane was performed using a Soxhlet kit that obtained a yield of 18.35 %. Extracts are analyzed by gas chromatography by flame ionization detection and mass spectrometry. A composite central rotation experimental design with 2² + star or 2k was proposed for statistical analysis in the MINITAB 18 software, with 13 randomized treatments that control the effect of temperature and time during extraction with the study proposal. supercritical at constant pressure. The temperature of 60 ° C had a significant effect (p <0.05) on the obtained yield, with the highest value of the oil at 19.53 %, obtained in a time of 5 hours of extraction at 320 bar. The fatty acid profile found to punic acid as the most abundant fatty acid in pomegranate seed oil followed by stearic and palmitic acid. To a lesser extent, we find oleic, lignoceric, arachidic, caproic and linoleic acids. Regarding tocopherols and sterols, gamma and beta tocopherol, gamma and beta sitosterol, stigmasterol and alpha tocopherol (vitamin E) were found as components in a greater proportion.

Key Words: Supercritical fluid, grenade Wonderful, fatty acids, tocopherols, sterols, critical CO₂, mass gas chromatography, puniceic acid.

INTRODUCCION

La granada es una fruta muy valorada por su alto contenido de antioxidantes ya que tiene un alto índice en polifenoles y antocianinas. El modo convencional de consumo de la granada se centra en el jugo o zumo, como mermelada y jalea, que se obtiene prensando los arilos que están contenidos en membranas llamadas carpelos, las cuales se encuentran en la parte interna de la granada, así como los arilos que contienen las semillas (Martínez, J. J., Melgarejo, P., Hernández, F., Salazar, D. M., y Martínez, 2006). Tanto la corteza como la cáscara, los carpelos y las semillas se consideran residuos de esta fruta y el uso que se le da es mínimo. En el Perú, a pesar de reconocer las bondades de la granada no hay industria para procesar el jugo o zumo, mucho menos la matriz vegetal no comestible. Es por ello que de la producción destinada al mercado nacional su descarte se da en grandes cantidades.

En el distrito de Ite, región de Tacna, la Asociación de productores de Granada Wonderful exporta la mayor parte a Países Bajos con un 44% de participación, Rusia (20%) y Canadá (20%) según lo reportado en el portal Fresh Plaza (2019). Fresh Fruit (2020) detalla asimismo que en el mes de marzo la granada peruana contabilizó 109 embarcaciones, 196 compradores y llegó a 39 países. En cuanto a las principales empresas exportadoras de granadas en ese periodo se encuentran Exportadora Frutícola del Sur S.A. (con un 20% de participación), Pómica Perú S.A.C. (10%) y Agro Victoria S.A.C. (8%) (Fuente: agraria.pe). El resto se vende en el sur del Perú, incluyendo la región de Tacna, en donde solo es de conocimiento general el consumo de arilos o el jugo de estos. Es así que una forma de impulsar la agroindustria en nuestra región y el país permitiría valorizar esta materia prima en su totalidad, lo cual podría darse del mismo modo en diversas frutas con gran producción y de este modo aprovechar, tal es el caso en la granada, las cáscaras, los carpelos y las semillas; valorando sus grandes aportes y beneficios a la salud.

Brevemente, de la literatura existente, se sabe que las semillas de granada son fuentes ricas en componentes bioactivos de naturaleza lipídica con posibles actividades fisiológicas benéficas y de interés por su uso en la nutrición y salud humana (Cam M, Erdogan F, Aslan D., 2013). Debido a sus propiedades nutricionales y medicinales, en los últimos años el aceite extraído de las semillas de granada (PSO - Pomegranate Seed Oil) también ha sido investigado como un ingrediente funcional en la industria alimentaria (Mohagheghi M, Rezaei K, Labbafi M, 2011). Diversos estudios afirman que los extractos

nutracéuticos son valiosos porque tienen un alto contenido de biocompuestos activos que están contenidos en la corteza y las semillas, encontrando en éstos un contenido significativo de compuestos fenólicos además de ácidos grasos, tocoferoles (vitamina E), fitoesteroles y esteroides. Su extracción representa un gran potencial para la industria alimentaria, farmacéutica, química y cosmética logrando concentrar en los extractos, compuestos de interés a partir de productos naturales sin intervención de materiales sintéticos o productos químicos (Verardo et al., 2014).

En lo que respecta a las semillas, ya lavadas sin restos de arilo, los estudios respaldan un rendimiento de contenido de aceite esencial de 12-20 %; Liu, Xu, Hao, y Gao, (2009) reportan un rendimiento de extracción de aceite de semilla de granada en un 15.63%, lo que se encuentra dentro de la media. Con un perfil importante de ácidos grasos, se encuentra en forma característica de esta fruta está el ácido púnico (omega 5), un ácido graso poliinsaturado, isómero de ácido linoleico conjugado (CLA), que se puede encontrar en una concentración, aproximadamente 64-83 % en PSO. Además, el ácido púnico tiene efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antioxidantes, antiateroscleróticos, antitumorales y antihipertensivos (Kaufman y Wiesman, 2007). El PSO posee una composición rica en ácidos grasos poliinsaturados que comprende predominantemente ácido púnico (~55 %) como se caracteriza por Carvalho Filho (2014).

Ácido graso conjugado (Conjugated Fatty Acid - CFA), es el término general de isómeros posicionales y geométricos de ácidos grasos poliinsaturados con dobles enlaces conjugados. El contenido de componentes bioactivos también se ve afectado por factores como la variedad, las condiciones agroclimáticas, el riego y la fertilización de la granada en el campo. Natolino y Da Porto (2019), argumenta que el contenido total de lípidos en las semillas de granada varía entre 7,9 y 16 % y, en términos del contenido de ácido púnico entre 74-85 % del contenido total de ácidos grasos. Estos valores dependen de la variedad de estudio. El ácido púnico podría sintetizarse químicamente por deshidratación e isomerización de productos de oxidación secundaria de los ácidos linoleico y alfa-linolénico (Kinami et al., 2007). Entre los ácidos grasos con mayor contenido se encuentran el ácido oleico, el ácido linoleico y el ácido palmítico. Las semillas de granada también contienen un alto contenido de tocoferoles, uno de ellos es el γ -tocoferol, con 87,9-95,0 % del total (Verardo et al., 2014).

En cuanto a los fitosteroides analizados, Kaufman y Wiesman (2007), se encontraron: campesterol; estigmasterol; sitosterol; Δ^5 -avenasterol y citrostadienol. Los

fitosteroles se encontraron en una concentración bastante alta en el PSO (4089-6205 mg/kg). Un perfil detallado de los fitosteroles en el PSO mostró una amplia variedad, siendo los principales, el beta-sitosterol (con recientes estudios en tratamientos antidiabéticos), el campesterol y el estigmasterol. Este estudio muestra un nuevo análisis detallado de PSO, y un gran potencial para futuras investigaciones sobre los efectos fisiológicos de componentes valiosos específicos en los aceites procedentes de esta fruta.

Debido al contenido de estos compuestos activos, el PSO puede ser muy efectivo en el tratamiento de diversas enfermedades crónicas y degenerativas, además de poder contribuir con la alimentación o terapia de diferentes trastornos funcionales. Se pueden usar varios métodos para su extracción, como el prensado en frío, extracción con solventes orgánicos (Boussetta T, Raad H, Letteron P, Gougerot-Pocidal MA, Marie JC, 2009; McFarlin BK, 2008), o Extracción con Fluidos Supercrítico (SFE), que se basa en que tanto la presión como la temperatura de extracción juegan un factor determinante para la variación en el contenido de componentes bioactivos y el rendimiento del extracto obtenido. Las condiciones de temperatura y presión son alcanzadas por el fluido supercrítico antes de entrar en contacto con la matriz vegetal e ingresar al extractor, estas condiciones determinan el comportamiento y las cualidades solventes del fluido relacionadas a su polaridad y afinidad con los compuestos de interés. En el caso de los compuestos no polares se presentan los aceites esenciales que contienen ácidos grasos, ácidos orgánicos, tocoferoles y esteroides (Esquivel-Hernández et al., 2017).

Los análisis proximales de caracterización se realizaron en la Escuela de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Privada de Tacna, donde se llevó a cabo la determinación de humedad, cenizas, lípidos y proteínas en semillas y cáscaras de Granada (*Punica granatum*) variedad Wonderful por métodos Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC).

Las actividades experimentales y análisis de extractos se desarrollaron en la Universidad Autónoma San Luis Potosí de México. Las extracciones de aceite de semillas de granada, el cual contendría los biocompuestos activos de interés se llevaron a cabo en el laboratorio de Manejo de Residuos Ambientales. Los análisis por espectrometría de masas acoplado a un cromatógrafo de gases (CG-MS) Los análisis de cromatografía de gases masas, se llevaron a cabo en el laboratorio de la Escuela de Industrias alimentarias; en lo que respecta al perfil de ácidos grasos y el estudio de los tocoferoles se llevó a cabo en el CYACIT (Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología).

Una vez que el CO₂ alcanza el estado supercrítico y entra en contacto con la matriz vegetal el proceso SFE se desarrolla en el siguiente orden:

El proceso SFE incluye los siguientes pasos para la extracción: (i) el sustrato sólido absorbe solvente supercrítico, lo que promueve la expansión de su estructura celular; esto facilita el flujo de disolvente debido a la reducción de la transferencia de masa. (ii) De forma simultánea los compuestos solubles se disuelven en el solvente; (iii) los compuestos disueltos se transfieren al exterior de las células de la matriz; y (iv) los compuestos son transportados por el solvente y salen del extractor (Rodrigues et al., 2002).

Para tener una referencia sobre el rendimiento de extracción del aceite con tecnología supercrítica con CO₂ como solvente, se puede realizar una extracción comparativa con solventes comunes como hexano en equipo soxhlet, la cual también podría ser de utilidad para una comparativa en el contenido de biocompuestos del extracto.

Finalmente, esta investigación busca generar una alternativa en el manejo de los residuos provenientes de la granada pues su aplicación podría significar una gran oportunidad para la agroindustria local. El presente estudio además permitirá conocer más profundamente el proceso de extracción supercrítica para la obtención de compuestos bioactivos, herramientas de análisis para la evaluación del contenido del extracto y la eficiencia en el rendimiento, así como las ventajas en la aplicación de tecnología supercrítica. Es en ese sentido que, al estudiar y conocer estos biocompuestos, a la vez de tener un producto inocuo y con reconocidas cualidades benéficas, podrá ser luego destinado a su aplicación en la industria farmacológica, cosmética, de higiene, y la industria de aditivos alimentarios.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del problema

El aprovechamiento de recursos y subproductos en la industria alimentaria y no alimentaria ha tenido en los últimos años mayor relevancia e impacto en nuestro contexto, su auge se debe a las normativas que propician la innovación y competitividad en la agroindustria, permitiendo el desarrollo de la gestión pertinente de recursos con la finalidad de generar ingresos y/o solucionar problemas en la localidad, sobre todo en lo que se refiere a un enfoque de gestión ambiental. Estos recursos o subproductos podrán generar a su vez valor agregado, y, por ende, rentabilidad directa e indirecta.

El manejo de residuos agroindustriales tiene cada vez más importancia por considerarse un problema de alto impacto ambiental en la actualidad, puesto que su descarte no solo genera grandes pérdidas en cuanto a la materia prima remanente que se tiene, sino que también pone en riesgo la salud de las personas y demás seres vivos que coexisten en diversos ecosistemas. La agroindustria guarda una relación estrecha entre sus procesos y el medio ambiente, tanto en la producción, el manejo de la materia prima, su procesamiento y comercialización, suelen generarse subproductos o residuos que generan serios problemas en su disposición final (Cury, K., Aguas, Y., Martínez, A., Olivero, R. y Chams, 2017). Estos desechos orgánicos pueden ser empleados como materias primas a bajo costo o costo cero por su naturaleza de descarte común en la agroindustria, y que a su vez puede generarle un valor agregado a sus actividades; considerando la diversidad de residuos generados por el agro, de acuerdo a su composición y a la tecnología o método de aprovechamiento que se puede emplear (Cabrera, E., León, V., Montano, A. y Dopico, 2016). Debe resaltarse así también, que los procesos a los cuales esta materia prima será sometida tendrán un control determinado y se estandarizarán parámetros para mejorar las condiciones que permitan obtener nuevos subproductos.

En el Perú y el mundo existen diversos frutos aún considerados novedosos y exóticos por sus compuestos recientemente estudiados y en proceso de experimentación, estos frutos pertenecientes al grupo de super foods o súper alimentos se encuentran en esta

denominación por su alto contenido de vitaminas y antioxidantes (MINCETUR, 2017). La granada no posee grasas saturadas ni colesterol, es rica en vitaminas C, K y E, y en fibra dietética. El consumo del fruto de la granada o el zumo puede contribuir a reducir los niveles de colesterol, prevenir enfermedades del corazón, y revertir la aterosclerosis, además posee un sabor exótico, agradable al gusto y realmente atractivo para diferentes mercados, con propiedades altamente recomendadas para llevar un estilo de vida más saludable (Eikani, Golmohammad, y Homami, 2012).

En nuestro país la granada es considerada una fruta considerada un súper alimento (PROMPERU, 2020), propia del verano y parte del otoño y con gran poder antioxidante; la encontramos en diversas variedades. La variedad de estudio es la Wonderful, de fruto grande, semilla semi dura y grande de sabor semi ácido, que contrasta con la variedad Emek de forma esférica y corona alargada con semilla blanda y pequeña, de sabor dulce (Minagri, 2019).

En el Perú, según Sierra y Selva exportadora, la variedad "Wonderful" es la que se cultiva más, de hecho, es la que tiene mayor consumo en el extranjero por color llamativo de sus granos; además, es una de las variedades más cultivadas en el mundo, como: Israel, Estados Unidos, Grecia y Chile. Suele ser cultivada con fines de exportación y de obtener así mayor rentabilidad, por su alto valor de cotización. Al ser la variedad con mayor acogida y demanda por sus beneficios y características, su producción es mayor, con campaña entre los meses de diciembre y mayo. Las toneladas producidas comprenden un alto volumen de producto remanente, ya que solo se hace uso del arilo, que es la parte comestible del fruto, donde se concentra el zumo. De esta forma las semillas, la membrana capilar y la corteza son descartadas al medio ambiente en grandes cantidades donde son expuestas, descomponiéndose y generando contaminación ambiental, pero sobretodo desaprovechándose componentes que darán origen a nuevos subproductos a partir de estos descartes comunes (Programa del MINAGRI, 2019).

La granada compone su estructura de las membranas carpelares y la corteza que representan el 25-60 % del peso del fruto (LIU, SHI, y LANGRISH, 2006), además de los arilos que son el 55-60 % del peso total del fruto y tienen 75-80 % de jugo y 15-25 % de semillas (Llerena Huaracha, 2017).

En Ite, distrito de la región de Tacna, se descarta la parte no comestible de la granada que representa aproximadamente el 60 % de peso de la fruta. La granada se encuentra en

gran auge en este distrito y es por ello que se implementó maquinaria para su procesamiento. Al ser un fruto de gran rendimiento en cuanto a su producción surge la necesidad de procesarlo para la obtención del zumo de granada, y otros subproductos con fines alimentarios. La maquinaria consta de una desmembradora de granada, prensa hidráulica, envasadora y selladora de botellas, licuadora industrial, mesones acerados para los procesos que se vayan a realizar. Dicha maquinaria, estará al servicio de los agricultores que vienen apostando por el cultivo de este nuevo producto bandera (APG, La Yarada Los Palos, 2019).

Aun así, el aprovechamiento con fines no alimentarios no está del todo desarrollado y se entiende que el mismo, complementaría el manejo integral de la granada, ya que como se menciona, tan solo aproximadamente el 40 % de este fruto, se consume por la extracción de zumo y el porcentaje restante, formado por la corteza, las semillas y la membrana carpelar, aún carece de un procesamiento para la obtención de productos que se clasificarían dentro de la tecnología de productos no alimentarios. Este es el caso de la extracción de biocompuestos orgánicos de naturaleza lipídica como los ácidos grasos, tocoferoles y esteroides. Algunos estudios han investigado la extracción de PSO con dióxido de carbono supercrítico ($sc - CO_2$), donde la granada presenta una porción significativa de sustancias oleosas (aprox. 16 % b.s.), entre los componentes lipídicos presentes en la matriz vegetal se encuentran los tocoferoles, esteroides y ácidos grasos (Verardo et al., 2014), sustancias no polares y posibles de extracción con disolventes no polares como el $sc - CO_2$

El $sc - CO_2$ es un fluido ampliamente utilizado en estado supercrítico debido a sus ventajas de no toxicidad, no inflamabilidad, ser químicamente estable y de bajo costo, disponibilidad en grandes cantidades, y por presentar una presión y temperatura crítica moderada (74 bar y 31,1 °C, respectivamente). Por otra parte, basado en las propiedades de los solventes, el $sc - CO_2$ presenta una importante ventaja sobre las extracciones a baja presión, debido a que la selectividad en el estado supercrítico puede ser modificada variando la temperatura y presión para obtener fracciones que contienen componentes específicos o una familia de compuestos con características semejantes. El $sc - CO_2$ es un solvente no polar, que mantiene afinidad con sustancias como los lípidos y sustancias liposolubles (Velasco, Villada, y Carrera, 2007).

En la industria de alimentos se realiza la extracción de compuestos fitoquímicos que pueden ser obtenidos de los residuos proveniente de la matriz vegetal de diversos alimentos

mínimamente procesados. Este enfoque es beneficioso para los productores del sector agroindustrial, ya que genera una ventaja económica al emplear todo el material lignocelulósico que conforman las frutas y hortalizas (Silva et al., 2014). En las plantas, los fitoquímicos se encuentran en diferentes proporciones, dependiendo de la variedad y de la parte (semillas, frutos, hojas y tallos) de la cual éstos se extraen. La industria de los fitoquímicos son precursores de compuestos bioactivos está en constante innovación y son necesarios nuevos procesos en los que se incremente el rendimiento global, la productividad y selectividad de la operación. La recuperación de extractos concentrados en los compuestos de interés puede conducir a la obtención de productos de alto valor económico y simplificar las posteriores etapas de fraccionamiento (Azmir et al., 2013).

Para el tratamiento de la materia prima destinada a la extracción de biocompuestos se sigue un diagrama de flujo de procesos, donde el acondicionamiento es la base para una correcta conservación de la misma. La materia prima se somete a un proceso de secado, en un secador de bandeja a una determinada temperatura, velocidad de aire y humedad; ésta debe encontrarse en condiciones de corte homogéneo para un secado uniforme y así reducir la actividad de agua de la materia prima ya que esta debe ingresar en condiciones de producto seco en el extractor con un fluido supercrítico, en este caso $sc - CO_2$. De acuerdo a estudios e investigaciones de selectividad con el uso de tecnología de fluidos supercríticos, se realizó en estos la obtención de biocompuestos a niveles en temperatura y presión según se indica en sus resultados; se modifican estos parámetros para determinar los que se controlarán y aplicarán en el presente trabajo de investigación, donde se realizará tratamientos para el proceso de extracción con el manejo de parámetros en temperatura y tiempo a presión constante de 320 bar.

1.2. Formulación del problema

Problema general

- ¿Es posible extraer biocompuestos lipídicos a partir de semillas de granada, tales como, ácidos grasos, tocoferoles y esteroides, mediante la tecnología supercrítica con CO_2 ?

Problemas específicos

- ¿Cuáles son los parámetros en; temperatura, tiempo y presión; así como el diseño experimental a seleccionar?
- ¿Cuál es el rendimiento que se obtiene mediante el método de extracción dinámica de biocompuestos a partir de las semillas de granada?
- ¿Qué ecuación de optimización se obtiene mediante la caracterización de las curvas de extracción según los grupos de biocompuestos lipídicos?
- ¿Qué metodología permite realizar el análisis de las muestras de compuestos bioactivos, su identificación y cuantificación?

1.3. Justificación e importancia de la Investigación

La tecnología agroindustrial tiene como uno de sus grandes objetivos el aprovechamiento integral de residuos agroindustriales usando técnicas sostenibles para dar valor a los residuos e incorporarlos a la cadena productiva, permitiendo la creación e inserción de nuevas industrias que generen utilidades (Casas, 2014). De este modo se busca evitar que estos residuos biológicos dañen el medio ambiente por la contaminación que podrían ocasionar tras su descomposición en áreas en contacto con diversos ecosistemas. El uso de tecnologías limpias y el desarrollo de operaciones de extracción y fraccionamiento sucesivo usando $sc - CO_2$ permitirá la obtención de extractos fraccionados, concentrados en biocompuestos a partir de la matriz vegetal, tales como ácidos grasos, tocoferoles y esteroides; según Brunner (2005) este proceso de extracción con $sc - CO_2$ como fluido constante, se selecciona por su bajo costo de obtención, pureza y rendimiento en función al control de parámetros, tales como temperatura y presión. Así mismo, este estudio busca impulsar nuevos productos a partir de la granada para su uso integral, y a su vez generando fuentes de empleo para realizar estos procesos de obtención con mayor eficiencia y rendimiento; dando a conocer además biocompuestos activos de interés presentes en la granada, tales como los presentes en las semillas, el ácido púrico, denominado también $\omega - 5$ y el $\alpha - tocoferol$, conocido también como la vitamina E; compuestos que contribuyen al buen funcionamiento del organismo humano y en muchos casos su consumo reduce el riesgo de padecer enfermedades, además de sus propiedades nutracéuticas y antiinflamatorias (Coursodon-Boydiddle et al., 2012).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Extraer compuestos bioactivos tales como, ácidos grasos, tocoferoles y esteroides, a partir de semillas de granada mediante tecnología supercrítica con CO₂.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros de temperatura y tiempo, así como el diseño experimental a emplear.
- Determinar el rendimiento de aceite mediante un método de extracción dinámica de componentes no polares a partir de las semillas de granada.
- Obtener la ecuación de optimización mediante la caracterización de las curvas de extracción según los grupos de biocompuestos lipídicos.
- Analizar las muestras de compuestos bioactivos para la identificación y cuantificación de los mismos.

1.5. Hipótesis

General: El empleo de *sc* – CO₂ favorece la extracción de biocompuestos lipídicos asociados al aceite de semilla de granada.

Específica: En la extracción con *sc* – CO₂ de biocompuestos activos de matrices vegetales, se favorecerá la extracción de compuestos no polares como aceites, pero también se extraerán compuestos solubles en ese aceite. Así mismo el rendimiento de extracción se verá sujeto a las variables de temperatura, presión y caudal según los tratamientos planteados en el diseño experimental.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Un estudio sobre el CO₂ como solvente presentado por el SCI Food Group, Food Engineering Panel realizado en Londres (1982), explica sus propiedades y aplicaciones. Las primeras aplicaciones del CO₂ como solvente de extracciones se llevaron a cabo utilizando el CO₂ en estado líquido como solvente. El CO₂ líquido subcrítico existe desde - 55 °C hasta + 31 °C y de 5 bar a 74 bar, siempre el solvente CO₂ que éste se mantenga en estado líquido y bajo presión constante, puede ser manejado como un líquido ordinario, esto significa que al aumentar su temperatura alcanzará su punto de ebullición y finalmente se evaporará. El vapor que existe a temperaturas más altas se puede volver a licuar mediante enfriamiento. Como se esperaría de cualquier fase de vapor de un solvente líquido, la potencia del solvente del vapor de CO₂ es mínima, pudiendo separar solvente y el soluto por evaporación.

El CO₂ líquido es miscible con todos los solventes líquidos comunes. desde metanol a pentano y con mono terpenos de hidrocarburos puros, mono terpenos aldehídicos y cetónicos y todos los ácidos carbónicos líquidos. El agua es soluble en CO₂ líquido con una solubilidad del 0,1 % en peso. Una mirada más cercana a las concentraciones de saturación de muchos otros compuestos, conduce a la conclusión de que el CO₂ es un solvente no polar, y que su polaridad es cercana a la del hexano y el pentano. El poder disolvente del CO₂ líquido no es alto en comparación con disolventes líquidos ordinarios. Para estos solventes no polares ordinarios, un aumento en la temperatura generalmente conduce a un incremento en su potencial, esta regla no siempre es válida, sin embargo, el CO₂ incluso a temperaturas más altas, incrementa también la presión garantizando así una fase líquida.

Dorado, Hurtado-Benavides, y Martínez-Correa (2016) estudiaron la extracción de biocompuestos no polares a partir de semillas de guanábana controlando parámetros de temperatura y presión. Para la extracción del aceite a partir de las semillas, aplicaron *sc - CO₂* a presiones entre 200 y 350 bar y temperaturas entre 40 y 60 °C, con un flujo de dióxido de carbono constante de 1,8 kg/h y un tiempo de extracción de 150 min. Se planteó

un diseño experimental compuesto central para estudiar el efecto de la presión y la temperatura sobre el rendimiento, el perfil de ácidos grasos y composición de tocoferoles. Se analizó por cromatografía de gases la composición en ácidos grasos y esteroides. Es así que la presión tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre el rendimiento alcanzando un rendimiento óptimo del 12,9 %. En el extracto obtenido, el ácido oleico fue el ácido graso mayoritario, seguido del ácido palmítico y linoleico. En menor proporción se encontraron el ácido esteárico, palmitoleico, linolénico y dodecanoico, además, se encontró la presencia de campesterol, estigmasterol y β -sitosterol. Los autores concluyen que el aceite obtenido se muestra libre de solventes y presenta un gran potencial para ser usado como ingrediente natural en diferentes industrias.

Natolino y Da Porto (2019) realizaron un estudio enfocado en la extracción de biocompuestos de granada usando $sc - CO_2$ para determinar rendimientos de extracción y el porcentaje de ácido graso mayoritario, así como la relación másica del solvente empleado y el aceite obtenido. Además se llevaron a cabo tratamientos experimentales y de modelado de extracción con $sc - CO_2$ para obtener aceite de semilla de granada (PSO) a 240, 280 y 320 bar, y 40, 50 y 60 °C con una tasa de flujo de CO_2 de 8 kg/h. Como resultado de este estudio el valor más alto de solubilidad del aceite se obtuvo a 320 bar y 60 °C, contrariamente, se encontró un comportamiento de solubilidad retrógrado a 50 °C y 280 bar. El PSO extraído por $sc - CO_2$ presentó una alta calidad, evaluada en términos de actividad antioxidante y riqueza en su contenido de ácido púrico en comparación con el aceite extraído Soxhlet.

Liu et al., (2009) llevó a cabo un estudio de extracción de PSO con $sc - CO_2$ usando la metodología de superficie de respuesta, con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de operación, evaluando los efectos de los parámetros del proceso, a saber, la presión de extracción, la temperatura y el caudal de CO_2 en el rendimiento del aceite de semilla de granada. Los parámetros de extracción se optimizaron con un experimento central de diseño compuesto. El término lineal de presión, seguido del término lineal de caudal de CO_2 , los términos cuadráticos de presión, temperatura y caudal de CO_2 y las interacciones entre presión y temperatura, así como el caudal y la temperatura de CO_2 , tuvieron efectos significativos sobre el rendimiento de aceite ($p < 0,05$). Se pronosticó que el rendimiento máximo de aceite de semilla de granada aplicando el modelo matemático sea de 156,3 g/kg en base seca bajo la condición de presión 379 bar y temperatura 47,0 °C con una tasa de flujo de CO_2 de 18 kg/h. La composición de ácidos grasos y el contenido

de tocoferoles del PSO extraído con $sc - CO_2$ se compararon con los obtenidos por el método Soxhlet, encontrando una diferencia menor en la composición de ácidos grasos de los aceites extraídos por los dos métodos, no así, el contenido de tocoferoles totales que fue aproximadamente un 14 % mayor en el aceite extraído con $sc - CO_2$ que el obtenido por extracción con Soxhlet.

Ahangari y Sargolzaei (2011) estudiaron también la extracción de PSO mediante tecnología de fluidos supercríticos a diferentes condiciones de presión y temperatura para estudiar la influencia de esos parámetros del proceso en la velocidad de extracción y la composición del aceite. El $sc - CO_2$ alcanzó una extracción del 14 % después de 3 h de extracción (correspondiente a un rendimiento máximo de 2,66 g de aceite / 100 g de semillas de granada seca). Se realizó una extracción Soxhlet con n-hexano para comparación, lo que resultó en un rendimiento máximo de aceite de 18,8 g de aceite / 100 g de semillas de granada seca. La composición de ácidos grasos del aceite extraído mostró que los ácidos grasos consistían en cadenas de carbono C16, C18, C20, C22 y C24. El ácido púnico (C18: 3) y linoleico (C18: 2) fueron los principales ácidos grasos y comprenden aproximadamente el 82 % del contenido total de ácidos grasos presentes en el aceite. Finalmente, se aplicó a este sistema un modelo de difusión que tiene en cuenta las propiedades del sustrato, la partición de solutos entre la fase sólida y la supercrítica, y el coeficiente de transferencia de masa y la dispersión axial en la fase fluida y un buen acuerdo con el experimental.

Ahangari y Sargolzaei (2012), realizaron un nuevo estudio comparativo al anterior publicado en 2011, usando propano subcrítico y dióxido de carbono supercrítico para la extracción usando como materia prima, el residuo sólido de la industria del jugo de granada utilizando $sc - CO_2$, y tuvo como finalidad estudiar el comportamiento de los solventes. Las condiciones de temperatura y presión de extracción mostraron significativa influencia en el rendimiento de extracción de aceite y el perfil correspondiente de ácidos grasos. A su vez se realizó la extracción Soxhlet con n-hexano para comparación con la extracción supercrítica resultó en un rendimiento máximo de aceite del 22,31 % en peso. La extracción con $sc - CO_2$ y propano subcrítico extrajo hasta 58,53 % (correspondiente al rendimiento máximo de 13,06 % en peso) y 76,73 % (correspondiente al rendimiento máximo de 17,12 % en peso) de la cantidad total de PSO como medido utilizando extracción Soxhlet, respectivamente. Los resultados indicaron que el propano subcrítico es un adecuado y selectivo solvente para la extracción del PSO en función de tiempo y presiones menores

empleada en comparación con la extracción de dióxido de carbono. La composición de ácidos grasos del aceite extraído mostró la presencia de ácidos grasos de cadenas de carbono C16, C18, C20, C22 y C24. El ácido púnico (C18.3) fue el principal ácido graso y comprenden hasta el 70 % del contenido total de ácidos grasos del aceite extraído entre todas las muestras.

Verardo et al., (2014), estudió semillas de granada como fuente de aceite nutracéutico naturalmente rico en lípidos bioactivos, sus objetivos fueron, determinar el contenido total de lípidos de las semillas de granada que varió entre 7,9 y 16 %. Así mismo se determinó que el PSO contenía grandes cantidades de ácidos linolénicos conjugados (CLnA), como el ácido púnico, en el rango de 74 a 85 % del contenido total de ácidos grasos. Otros ácidos grasos importantes fueron el ácido oleico, linoleico y palmítico, respectivamente. El extracto también presentó un alto contenido de tocoferoles; uno de ellos, el γ -tocoferol, era 87,9-95,0 % del total de tocoferoles. Además, se identificaron dos tocotrienoles por primera vez en PSO, el γ y δ tocoferol. Los principales fitosteroles analizados fueron campesterol, estigmasterol, sitosterol, Δ^5 -avenasterol y citrostadienol.

Đurđević et al., (2017) realizaron un estudio realizado en Belgrado. El autor sugirió la radiación de microondas como técnica de pretratamiento para aumentar el rendimiento del aceite de semilla de granada. Las semillas se pre trataron a 100, 250 y 600 W durante 2 y 6 minutos y luego se extrajeron con *sc* – CO_2 en la unidad de alta presión, así como por n-hexano en el aparato Soxhlet. Incluso en el tratamiento de microondas más bajo, los parámetros de tratamiento previo aplicados (100 W durante 2 min) aumentaron el rendimiento del aceite de semilla obtenido por extracción en técnicas comparadas con semillas no tratadas (de 27,7 a 34,0 % y de 21,6 a 25,5 % para Soxhlet y *sc* – CO_2). El rendimiento máximo de aceite en la extracción Soxhlet (36,3 %) se obtuvo con microondas radiación de 600 W durante 6 min, mientras que para la extracción de *sc* – CO_2 el rendimiento máximo de aceite (27,2 %) fue de 250 W durante 6 min. La composición cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos de los obtenidos del aceite se determinaron mediante cromatografía de gases / detección de ionización de llama y cromatografía de gases / masa. El ácido púnico fue el ácido graso más abundante en el aceite de semilla de granada (>60 %).

de O. Silva, Ranquine, Monteiro, y Torres (2019) investigaron la influencia de las técnicas de extracción, expulsión, prensado, extracción con etanol y $sc - CO_2$ en la composición química, la capacidad antioxidante y la estabilidad oxidativa de PSO, determinado por un diseño experimental para determinar las mejores condiciones de extracción de $sc - CO_2$ con co solvente para obtener PSO concentrado en compuestos bioactivos procedentes de las semillas. La aplicación de técnicas de prensado (P-PSO) y extracción supercrítica (SC-PSO) presentaron mayores contenidos de ácido linolénico conjugado (cLnA), mientras que el PSO extraído con alcohol o etanol (A-PSO) mostró mayores contenidos de compuestos fenólicos, tocoferoles y fitosteroles, y mayor capacidad antioxidante y estabilidad oxidativa que P-PSO y SC-PSO. El diseño factorial fraccional del SC-PSO con el alcohol como co solvente indicó dos condiciones de extracción mejoradas, una que resultó en un aceite enriquecido con tocoferoles y el otro en un aceite enriquecido con fenólicos. A-PSO y SC-PSO con etanol como co solvente pueden ser considerados aceites especiales, ricos en cLnA, fenólicos y tocoferoles, prometedores como ingredientes nutracéuticos.

2.2. Bases teóricas

La granada

La granada (*Punica granatum L.*) es una fruta originaria de Asia Occidental (Medio Oriente) de Irán y sus alrededores, extendiéndose hasta la zona del Mediterráneo y Asia Central y Sur; fue llevada a España y posteriormente a América, donde tuvo un gran crecimiento. En el Perú la variedad Mollar ha sido cultivada tradicionalmente en los valles de Chilca y Huaral, de mismo modo los últimos años la variedad Wonderful fue comercializada en los departamentos de Ica y La Libertad, en forma de fruta fresca. Se encuentra dentro del grupo de las exportaciones no tradicionales y su partida arancelaria es la siguiente: 0810909000 “otros frutos frescos” (Promperú, 2014). Su producción está dirigida a las empresas agroexportadoras peruanas, lo que implica tener mínimamente certificación Global GAP, conocer las características comerciales del producto relativas al calibre y las tolerancias de cada categoría (Uribe Lescano, 2016).

Se consume popularmente como fruta fresca, bebidas, productos alimenticios (mermeladas y jaleas) y extractos en los que se utilizan como ingredientes botánicos en

medicamentos a base de hierbas y suplementos dietéticos (Goula y Adamopoulos, 2010; JS., 2008). Las semillas de granada son los subproductos obtenidos durante el procesamiento de granada.

La granada es de color rojo intenso, se caracteriza por ser un fruto de forma globosa de aproximadamente 6 a 12 centímetros de diámetro con un cáliz en forma de corona, su corteza de color amarillo rojizo a rojo escarlata que cubre una gran cantidad de granos y de sabor agridulce a dulce, con piel coriácea, en forma de granada y coronado por los puntiagudos, cáliz. La fruta se puede dividir en tres partes: las semillas (aproximadamente el 3 % del peso de la fruta), el jugo (aproximadamente el 30 % del peso de la fruta) y las cáscaras, que también incluyen la red interior de membranas (Lansky EP, 2007). Las semillas de granada, generalmente consideradas como un desperdicio de la industria del jugo, comprenden 12 a 20 % del aceite graso (Al-Maiman y Ahmad, 2002). Según los resultados publicados anteriormente, el aceite de semilla de granada (PSO) consiste en 65 a 80 % de ácidos linoléicos conjugados (CLnAs), entre los cuales el más importante es el ácido púnico (Abbasi, H., Rezaei, K., Emamdjomeh, Z., Mousavi, 2008).

2.2.1 Estados Fenológicos de la granada

Se presentan los Estados tipo, del granado:

En la etapa del cuajado del fruto, el ovario fecundado aumenta de tamaño, produciendo un engrosamiento rápido de la base del cáliz. Los estambres se marchitan varando a color pardo. La corteza del fruto cambia del color rojo anaranjado al marrón verdoso, predominado la tonalidad marrón. En la etapa de fruto joven, se produce un rápido crecimiento del fruto, virando su color marrón verdoso, predominado ahora la tonalidad verdosa, luego se presenta la etapa del desarrollo del fruto, en este estado, las células ya formadas aumentan de volumen, produciéndose el engorde del fruto hasta su tamaño casi definitivo. Los sépalos forman una corona, que aumenta de tamaño con el crecimiento del fruto y en su interior se encuentran los estambres secos. Posteriormente ocurre la segunda movida de los brotes, donde se produce un crecimiento rápido de los brotes del árbol. En la etapa de maduración del fruto, es donde se produce una serie de transformaciones bioquímicas en el interior del fruto, obteniéndose las características organolépticas óptimas para su consumo. Entre las transformaciones internas más importantes, apreciables visualmente, está el cambio en la coloración de las semillas carnosas del blanco al rosado rojizo o rojo. Exteriormente la corteza del fruto cambia del verde al amarillo verdoso,

tomando finalmente el color amarillo marrón con algunas zonas más o menos extensas de color rojizo, o totalmente rojo según la variedad. Luego ocurre la caída de hojas: Durante el otoño se produce el amarillamiento de las hojas que acaban su caída progresiva en el tiempo, comenzando con al final de ésta un nuevo periodo invernal. (Melgarejo, Salazar, Amorós, y Artés, 1995).

2.2.1.1 Descripción de la granada variedad Wonderful

La variedad Wonderful es originaria de Florida y fue propagada por primera vez en California en 1896, es la principal variedad comercial a nivel mundial y cuenta con una gran difusión en los países con mayor desarrollo del cultivo. Es una variedad tardía, con cáscara de grosor medio y arilos de color rosado a rojo oscuro y semillas de suavidad media, de sabor agridulce. Con peso medio de 550 gramos, con rendimientos de 40 TM/Ha y buen vigor de árbol. Se conocen variedades más comunes como “Shany”, “Acco” y “116” con las que se podrían obtener cosechas más tempranas en los meses de febrero y marzo, consiguiendo mejores precios continuando con la variedad “Wonderful” los meses de marzo y abril donde aún se pueden alcanzar buenos precios, ya que estos disminuyen con la entrada al mercado de Chile y Argentina en los meses de abril y mayo. Es un árbol caducifolio de porte bajo cuyo fruto forma parte las culturas judeo-cristiana y del islam en los países del medio oriente tiene un alto consumo interno ya sea en forma de fruta fresca o jugo, pues es una fruta tradicional en esta región y es su gran contenido de antioxidantes lo que la ha convertido en los últimos años en una fruta muy apreciada no sólo en estos países sino también en Europa, Asia y Norteamérica, lo que ha generado una mayor demanda por dicho producto (Uribe, 2016).

2.2.1.2 Composición de la granada variedad Wonderful

La granada tiene valiosos compuestos en diferentes partes de la fruta. Su composición química varía en función de la variedad, zona y manejo de cultivo, el clima, la madurez y las condiciones de almacenamiento. Existen estudios donde se muestran variaciones significativas en el contenido de los ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, azúcares solubles, vitaminas y minerales de granadas dependiendo de las condiciones de cultivo (Mirdehghan y Rahemi, 2007; Tezcan, Gültekin-Özgüven, Diken, Özçelik, y Erım, 2009).

En la siguiente Tabla 1., se deja ver la composición de la granada, proximales, minerales, vitaminas y lípidos presentes.

Tabla 1. Composición de la granada

Nutriente	Unidad	Valor por 100 gramos
PROXIMALES		
Agua	g	77,93
Energía	Kcal	831,67
Proteínas	g	1,17
Lípidos totales	g	18,7
Fibra	g	4
Azúcares totales	g	13,67
MINERALES		
Calcio	mg	10
Hierro	mg	0,3
Magnesio	mg	12
Fósforo	mg	36
Potasio	mg	236
Sodio	mg	3
Zinc	mg	0,35
VITAMINAS		
Tiamina	mg	10,2
Riboflavina	mg	0,067
Niacina	mg	0,053
Vitamina B6	mg	0,075
Folato total	μg	38
Vitamina E	mg	0,6
Vitamina K	μg	16,4
LÍPIDOS		
Ácidos grasos saturados	g	0,120
Ácidos grasos monoinsaturados	g	0,093
Ácidos grasos poliinsaturados	g	0,079
Grasas trans	g	0,000
Colesterol	mg	0

Fuente: USDA (Department of Agriculture, US)
(Basado en una muestra de variedad Wonderful en California)

La granada se puede dividir en cuatro partes: la cáscara, las membranas carpelares, las semillas y los arilos como se puede apreciar en la Figura 1.

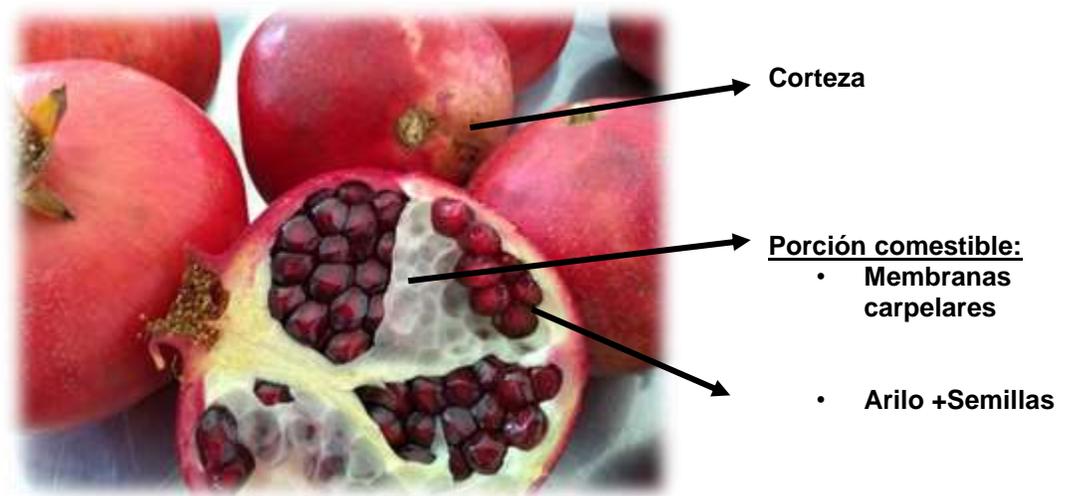


Figura 1. Estructura de la granada
Fuente: adaptado de Granate plus (2014)

Generalmente contiene 8 carpelos, que son divisiones en las que se encuentran los arilos (porción comestible), representado éstas un porcentaje comprendido entre el 40 y el 75 %, dependiendo de las variedades; las membranas carpelares y la corteza representan el 25-60 % del peso del fruto (Gutiérrez Estrada y Terrones Blas, 2016), siendo esta una importante fuente de compuestos bioactivos tales como los compuestos fenólicos, flavonoides, elagitaninos y proantocianidinas (Li et al., 2006), además de minerales como sodio, potasio, nitrógeno, calcio, fósforo y magnesio. De estos porcentajes el zumo ocupa el ~45 % y las semillas solas el ~10 % (Ver Fig. 2)

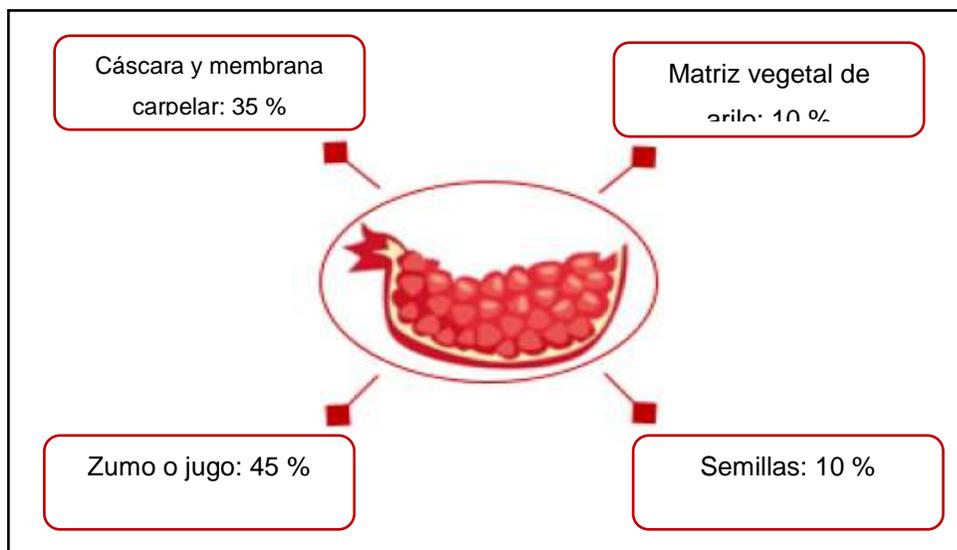


Figura 2. Distribución porcentual de las partes que componen la granada variedad Wonderful. Fuente: Elaboración propia (2020)

La porción leñosa de los arilos (semillas) varía entre el 5 y el 15 %. El fruto completo posee aproximadamente un 80 % de agua. Los granos de granada son una fuente importante de lípidos, ya que las semillas contienen una cantidad de ácidos grasos que oscilan entre el 12 y el 20 % de su peso total en peso seco (Lansky EP, 2007). En la siguiente Tabla 2., se puede apreciar la composición de semillas de granada, proximales, minerales y vitaminas presentes.

Tabla 2. Composición de semillas de granada

Nutriente	Unidad	Valor por 100 gramos
PROXIMALES		
Energía	Kcal	86
Proteínas	g	1,43
Lípidos totales	g	0,36
Carbohidratos por diferencia	g	19,29
Fibra total dietaria	g	7,9
Azúcares totales	g	10,00
MINERALES		
Calcio	mg	14
Hierro	mg	0,51
Sodio	mg	4
VITAMINAS		
Vitamina C	mg	10,7
Vitamina A IU	IU	0

Fuente: USDA (Department of Agriculture, US)
(Basado en una muestra de variedad Wonderful en California)

2.2.1.3 Composición de las semillas, corteza y membranas carpelares de la granada variedad Wonderful

2.2.1.3.1 Ácidos grasos

Las semillas de granada comprenden entre un 5 % y un 15 % de porción leñosa, siendo ésta rica en fibra y grasa. La parte leñosa de estas semillas contiene grasa en cantidades que varían entre 37 y 143 g/kg de fruto (Melgarejo et al., 1995). Este contenido en grasa es analizado para determinar así su composición en ácidos grasos y clasificarlos como ácidos grasos saturados o insaturados. Resulta de gran importancia la composición en ácidos grasos esenciales (linoléico, linolénico y araquidónico) y especialmente por su contenido en ácidos grasos poliinsaturados. La composición en grasa y ácidos grasos de la semilla, no sólo nos ayuda a establecer relaciones quimiotaxonómicas entre las variedades estudiadas, sino que también tienen un gran interés alimenticio y para la prevención de algunas enfermedades (Mirmiran, Fazeli, Asghari, Shafiee, y Azizi, 2010). Sobre todo, de índole cardiovascular por su alto contenido en colesterol HDL, debido a que son una buena fuente de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente linoleico, ácido púnicico y tocoferoles (Jing et al., 2012). Las semillas dependiendo de la variedad, la ubicación geográfica, las condiciones de crecimiento, madurez etapa, tienen diferentes propiedades antioxidantes y se componen principalmente de fibra y lípidos Legua et al, (2000).

Considerando estos porcentajes en la distribución de cáscara, membrana carpelar, arilo, jugo y semillas de granada; éstas últimas presentan el 10 % del peso de la fruta entera, donde según diversos autores el rendimiento de extracción esperado oscila entre el 12-20 %, por lo tanto, se puede obtener entre 12 a 20 g de aceite de semilla de granada por kg de fruta. En la siguiente Tabla 3. Se presentan las propiedades fisicoquímicas de las semillas y las cáscaras de granada.

Tabla 03 Propiedades fisicoquímicas de las semillas y cáscara de la granada (púnica granatum)

Análisis en base seca	Cantidad por 100 g de muestra	
	Semilla (g)	Cáscara (g)
Materia seca	74.33 ± 0.09	94.45 ± 1.25
Humedad	25.66 ± 0.09	5.5 ± 1.25
Cenizas	3.62 ± 0.13	3.59 ± 0.08
Grasa cruda	10.33 ± 0.17	3.57 ± 0.38
Proteína total	10.42 ± 2.62	1.26 ± 0.17
Fibra cruda	12.12 ± 2.10	17.75 ± 1.61
Azúcares totales	10.13 ± 0.33	16.08 ± 0.61
Azúcares reductores	4.67 ± 0.02	4.34 ± 0.01
Fenoles hidrolizables totales	0.002 ± 0.00015	6.11 ± 1.83
Ácido elágico	0.0048 ± 0.00002	0.26 ± 0.08
Índice de absorción de agua (WAI)	1.26 ± 0.020	4.84 ± 0.006
Punto crítico de humedad (CHP)	64.55 ± 2.170	22.08 ± 0.630
pH	5.37 ± 0.354	5.70 ± 0.420
Actividad de agua (aw)	0.156 ± 0.015	0.189 ± 0.018

Fuente: (Juan B. Peris Gisbert, Gerardo Stübing, Ramón Figuerola. Domenech, 1996)

El perfil de ácidos grasos (ver Tabla 4) se caracteriza por un alto contenido en ácidos grasos insaturados tales como ácido linolénico, linoleico, púnico, oleico, esteárico y palmítico.

Tabla 4 Composición de ácidos grasos (mg/100 g de semilla) del aceite extraído de la semilla de seis variedades de granada

Variedad	Mollar de elche	CIS 127	Katirbasi	Parfianka	Wonderful 1	Wonderful 2
Total Oilcontent (%)	5.33 ± 2.08	5.94 ± 0.95	13.7 ± 1.42	5.97 ± 0.88	8.6 ± 3.15	6.85±2.48
SFA						
HexadecanoicAcid (C16:0)	213±34	206±10	408±1	200±8	283±9	230±9
Heptadecanoicacid(C17:0)	4.6±1	3.6±0.2	7.3±0.5	3.1±0.2	5.2±0.5	4±0.1
Octadecanoicacid (C18:0)	89±1	107±2	215±2	84±3	149±4	116±1
Icosanoicacid (C20:0)	17±2	17±1	40±1	17±3	28±2	21±1
Docosanoicacid (C22:0)	6.8±1.4	5.2±0.2	23±8.3	12.2±7.4	17.4±13.2	104±6.1
Tetracosanoicacid (C24:0)	60±13	60±23	144±15	63±8	66±38	65±27
MUFA						
Cis_9_octadecenoic acid (C18:1(9))	190±33	262±15	611±21d	241±11	414±63	380±37
Cis-9-icosenoic acid (C20:1(9))	25±2	26±1	69±6d (0.5)	26± 1	47±3	42± 1
PUFA						
Cis,cis-9-12-octadecanoic acid (C18:2(9,12))	214±11	254±11	515±5	253±11	397±36	330±25
Cis,cis,cis-9,11,13-octadecatrienoic acid (C18:3(9,11,13))	4201±89	4862±21	10586±59	4545± 58	7028± 197	5342±41
OtherCLnA	325±26	182± 42	375±44	412± 99	27± 9	124±98
Fattyacid						
Total SFA	390	399	837	379	549	447
Total MUFA	215	288	679	268	462	422
Total PUFA	4740	5298	11475	5209	7452	5795
Σ Unsat	4955	5562	12.155	5477	9714	6217
SFA/ (PUFA + MUFA)	0.079	0.071	0.069	0.069	0.069	0.071

Fuente: (Fernandes et al., 2015)

El contenido total de lípidos de las semillas de granada varía entre 7,9 y 16 %. De este porcentaje los ácidos grasos conjugados del aceite de semillas de granada (PSO) comprende un 65-80 %, donde el más importante es el ácido púnico (cLnA cis9, trans11, cis13), catalítico (cLnA trans9, trans11, cis13), α -esteárico (cLnA cis9, trans11, trans13) y β - esteárico (cLnA trans9, trans11, trans13), el ácido oleico y palmítico en PSO. Además de los altos contenidos de cLnA, el PSO también contiene otros compuestos bioactivos que mostraron altos contenidos de tocoferoles; uno de ellos, el γ -tocoferol, fue 87,9–95,0 % del total de tocoferoles. Los principales fitoesteroles analizados son campesterol, estigmasterol, sitosterol, α -5-avenasterol y citrostadienol. Fenólicos, tocoferoles y fitoesteroles (Abbasi, H., Rezaei, K., Emamdjomeh, Z., Mousavi, 2008).

El aceite de semilla de granada (PSO) es un ingrediente nutracéutico atractivo que posee una composición fitoquímica enriquecida con alto contenido de ácido púnico y antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente orto-difenoles. El PSO se usa generalmente en productos de la industria cosmética debido a la baja toxicidad y la eficacia confirmada para reducir las irritaciones de la piel, para revitalizar la reducción de arrugas y arrugas en la piel. El aceite de granada inhibe dos enzimas inflamatorias, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, que pueden ayudar a proteger la piel contra las amenazas de la luz ultravioleta y la inflamación que aceleran el envejecimiento en la piel (Larrosa, García-Conesa, Espín, y Tomás-Barberán, 2010).

2.2.1.3.1.1 Ácido Púnico

El ácido púnico tiene muchas funciones destacadas relacionadas con la salud humana, además de poseer propiedades anticancerígenas y que ayudan a prevenir la diabetes, la hiperlipidemia, la obesidad y la aterosclerótica (Yamasaki et al., 2006).

El ácido púnico, que es un ácido graso de 18 carbonos con 3 enlaces dobles insaturados en forma de conjugado, constituye más del 21,5 % del ácido graso existente en los aceites examinados. En ambos casos se presenta que en el minuto 20:49 y 20:46 para las muestras 1 y 2, respectivamente, se indica un pico que indica la presencia de ácido púnico (C₁₈H₃₀O₂). Dado que el carbono 18 puede tener hasta 3 ramas C₁₈: 1, C₁₈: 2 y C₁₈: 3 (Pubchem, 2018).

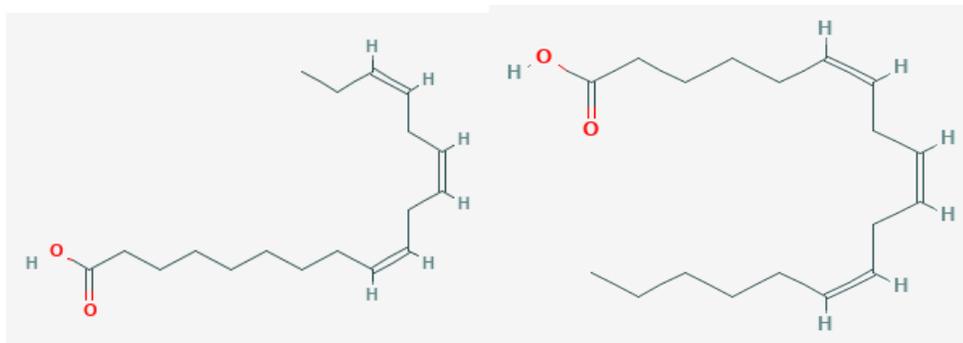


Figura 3. Ácido alfa linolénico (C18: 3 n3) (izquierda) y ácido gamma linolénico (C18: 3 n6) (derecha). Fuente: Pubchem (2018)

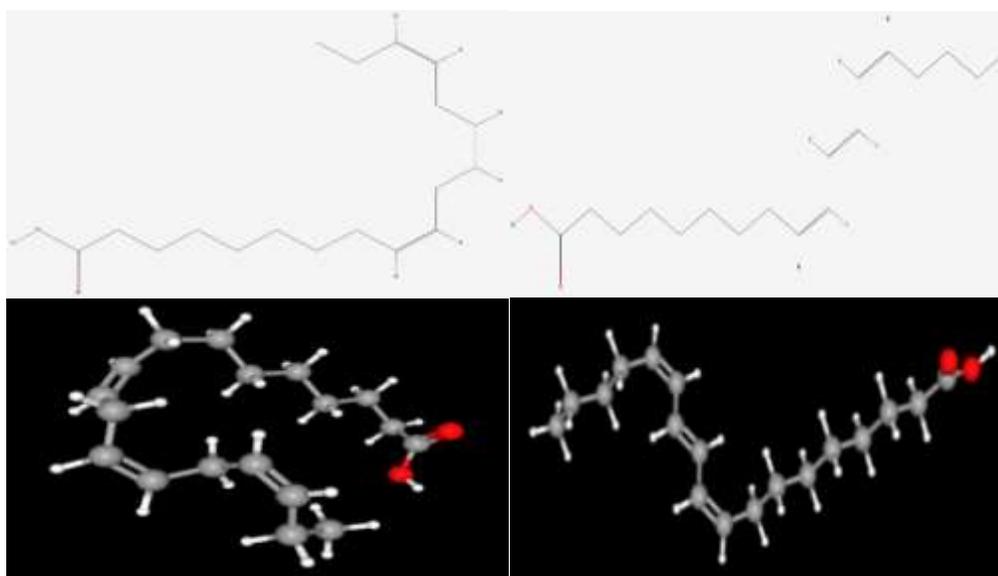


Figura 4. Ácido púnico, C18H30O2, C18:3 n5. Figura 5. Ácido linolénico, C18H30O2, C18:3. Fuente: Pubchem (2018).

La fracción de ácido linolénico se compone de cuatro picos cromatográficamente diferentes que se atribuyen a diferentes isómeros de ácido linolénico conjugado, donde el ácido púnico es el isómero principal.

El perfil de los compuestos bioactivos de PSO depende de las técnicas de extracción y las condiciones empleadas, que pueden proporcionar aceites que contienen compuestos con diversas características químicas, desde el triacilglicerol no polar que contiene cLnA hasta los compuestos fenólicos moderadamente polares. Convencionalmente, los aceites vegetales se extraen mediante prensado mecánico o utilizando solventes orgánicos, como el n-hexano. Sin embargo, las preocupaciones sobre los peligros ambientales y potenciales para la salud aumentan el interés por el uso de técnicas sostenibles que son reconocidas como económicamente viables y más seguras, es por eso que la importancia de las tecnologías de extracción más eficientes radica también en cuán amigables con el medio ambiente son, ya que al aprovechar estos desechos agroindustriales no solo recuperamos compuestos bioactivos de interés, también contribuimos a la reducción de la contaminación ambiental. En términos de eficiencia, existen varios métodos clásicos para extraer biocompuestos que también se eligen por su tiempo reducido; bajo costo; altos rendimientos, pureza, entre otros. (Ballard, Mallikarjunan, Zhou, y O'Keefe, 2010) (Hao, Han, Huang, Xue, y Deng, 2002). El etanol se ha utilizado como un disolvente alternativo al n-hexano debido a la buena seguridad operacional, baja toxicidad, fuentes renovables y por ser producido a gran escala.

2.2.1.3.2 Isoprenoides

Diversas clases de lípidos que pertenecen a este grupo se caracterizan por estar formados por unidades respectivas de isopropeno. (Stuchlí et al., 2002, citado por Navas Hernández, 2010). Clasifica a los isoprenoides en: isoprenoides mixtos, esteroides y terpenos. a) Isoprenoides Mixtos Los isoprenoides mixtos contienen una cadena lateral formada de unidades de isopreno unida a un anillo cromanol no terpenoide denominada fitil. A este grupo pertenecen los submiembros de la vitamina E, como los tocoferoles y tocotrienoles (Navas Hernández, 2010), en la Figura 6., podemos apreciar la estructura molecular de los tocoferoles. Los tocoferoles derivados de la vitamina E, son antioxidantes naturales solubles en lípidos que solo son producidos por las plantas. El término general "Vitamina E" se utiliza para designar a un grupo de ocho especies naturales de tocoferoles y tocotrienoles (α , β , γ y δ). Junto con las vitaminas A, D y K constituyen el grupo de las vitaminas liposolubles,

caracterizadas por ser derivados del núcleo isoprenoide, solubles en lípidos y disolventes orgánicos.

El grupo de compuestos isoprenoides son compuestos esenciales, puesto que el organismo no puede sintetizarlas, por lo que su aporte se realiza a través de la dieta en pequeñas cantidades.

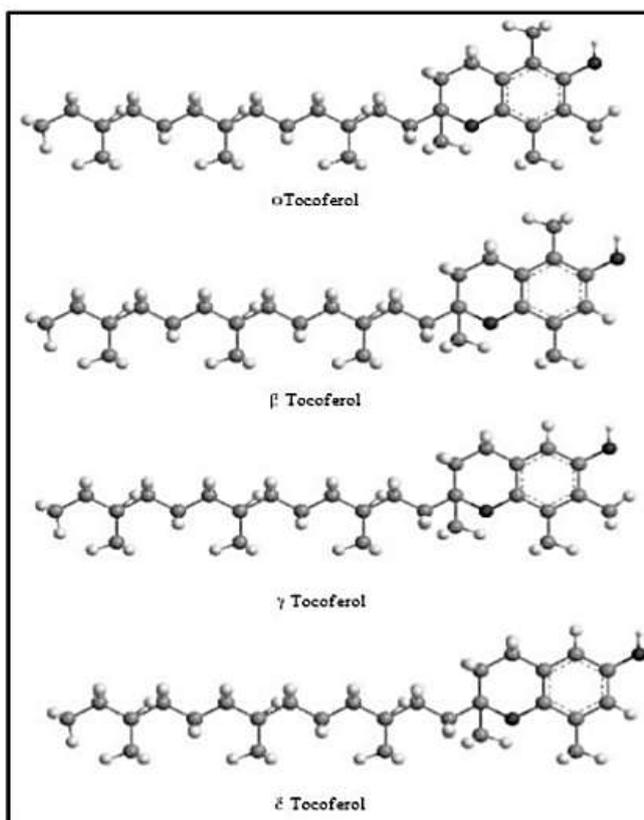


Figura 6. Estructura molecular de los tocoferoles

Fuente: Navas Hernández, (2010)

Navas Hernández, (2010) nos muestra la estructura química de la vitamina E consta de dos partes primaria: un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral. Estos ocho cromóforos se dividen en dos grupos fundamentales: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles (Figura 7.) que se diferencian en la saturación de la cadena lateral; los tocoferoles tienen una cadena saturada y los tocotrienoles una insaturada con tres dobles enlaces en los carbonos 3, 7 y 11. Dentro de cada grupo, los cromóforos difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo cromano, designándose como α , β , γ y δ .

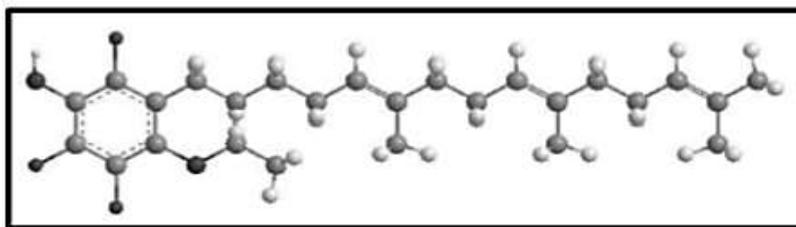


Figura 7. Estructura molecular de los tocotrienoles

Fuente: Navas Hernández, (2010)

El α -tocoferol que es la principal forma de la vitamina E actúa rompiendo las reacciones en cadena durante la peroxidación de los lípidos, también actúa en la neutralización de especies de oxígeno reactivo como por ejemplo el oxígeno singlete. Se considera que sirve como la primera línea de defensa de la peroxidación de los lípidos. Por otro lado, este compuesto también exhibe una acción antiinflamatoria por inhibición de la producción de radicales libre o superóxidos en los neutrofilos activados. (DC., 1993)

2.2.1.3 Tocoferoles

La Vitamina E, tocoferoles y tocotrienoles (Figura 8.) está conformada por ocho compuestos (tocoles), derivados de una estructura básica llamada tocol. Su estructura consta de dos partes primarias, un anillo complejo cromano, con un hidroxilo (6- hidroxicromano) y una larga cadena lateral de 16 carbonos constituidas por la unión de tres unidades de isopreno saturado. Estos ocho tocoles se dividen en dos grupos fundamentales, cuatro tocoferoles (α -, β -, γ - y δ -) y cuatro tocotrienoles (α -, β -, γ - y δ -) los que se diferencian en la saturación de la cadena lateral, los primeros tienen una cadena saturada y los segundos una insaturada con tres dobles enlaces (Bramley et al., 2000; Pita G., 1997).

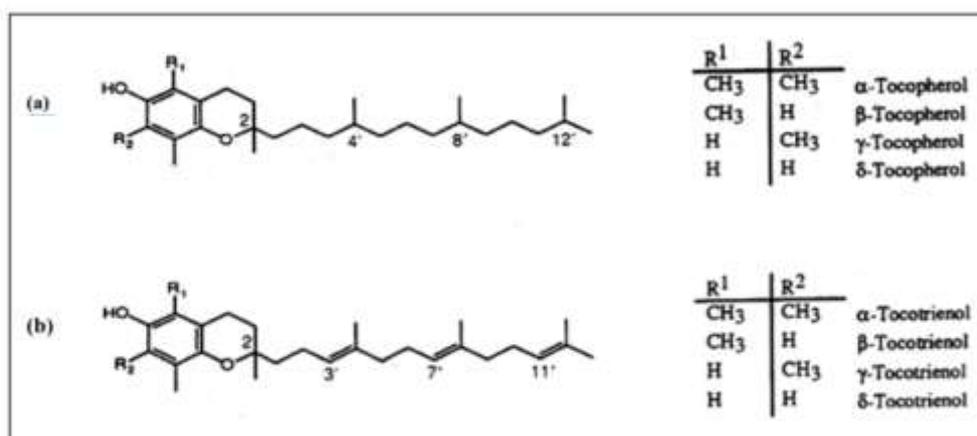


Figura 8. Estructura química de los Tocoferoles (a) y Tocotrienoles (b)

Fuente: CYBERLIPID CENTER (2004)

Los tocoferoles y tocotrienoles en su forma pura han sido descritos como sustancias viscosas de color amarillo pálido, que se descomponen fácilmente en presencia de luz, oxígeno, pH alcalino y ciertas trazas de minerales como hierro (Fe^{3+}) y cobre (Cu^{2+}). Insolubles en agua, medianamente solubles en solventes orgánicos y en aceites vegetales, se pueden aislar de la fracción insaponificable de estos últimos (BALL, 1988; BLANCO, 2001; Bramley et al., 2000). El rol principal de la vitamina E es la inhibición de los procesos de oxidación de lípidos en alimentos y sistemas biológicos. En las plantas son biosintetizados en los cloroplastos, por lo que cumpliría una función clave en la protección del complejo fotosintético y la protección de las semillas durante el almacenaje, la germinación, y el temprano desarrollo (SCHNEIDER, 2005).

2.2.1.3.3.1 Propiedades de la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles)

Considerado como un antioxidante natural que reacciona con los radicales libres solubles en lípidos de la membrana celular. De hecho, se ha indicado que los tocoferoles protegen a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la oxidación. Un estado de estrés oxidativo comprende la alteración en el estado de equilibrio del sistema pro-oxidante y el antioxidante en las células. Un aumento en la concentración de los radicales libres, pueden dañar de forma reversible o irreversible la mayoría de los constituyentes de las células incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres, lípidos y carbohidratos, lo que puede alterar la actividad celular a nivel de membrana, metabolismo o de expresión génica (Droge, 2002).

2.2.1.3.4 Esteroles

Los fitoesteroles y fitoestanoles son los miembros más importantes de este grupo cuya estructura es semejante al colesterol de origen animal, pero este último presenta una cadena lateral de 8 átomos de carbono, mientras que en la mayoría de los fitoesteroles la cadena es de 9 o más átomos de carbono. Estas moléculas no son sintetizadas por el ser humano, derivan exclusivamente de productos de origen vegetal. Los fitoesteroles son particularmente abundantes en el reino vegetal: están presentes en los frutos, semillas, hojas y tallos de prácticamente todos los vegetales conocidos, así como también en aceite de germen de maíz y trigo, girasol, soja, nueces y otros (Navas Hernández, 2010).

2.2.2 Operaciones unitarias dentro del estudio

2.2.2.1 Proceso de operación de secado en bandejas

El secado es un proceso de conservación de la composición de alimentos, por ende, tiene la finalidad de extender su vida útil, impidiendo cualquier actividad microbiana o enzimática al eliminar gran cantidad de agua en ellos. Surgió a partir de la necesidad de consumir alimentos susceptibles a descomponerse debido a su composición química y que se encuentren fuera de su época de cosecha o producción (Orozco, 2006). El secado consiste en separar pequeñas cantidades de agua u otro líquido de un material sólido con el fin de reducir el contenido de líquido residual. Los alimentos se ven sometidos a procesos de deterioro y para retardar los mismos se aplica el proceso de deshidratación que es un método de estabilización de alimentos que se basa en la reducción de la actividad de agua (A_w). A diferencia de los procesos de concentración o evaporación que consisten en disminuir también la actividad de agua, estos procesos disminuyen la cantidad en un 50%, el proceso de deshidratación busca hacerlo hasta en contenido de agua en un producto inferior al 10%.

2.2.2.1.1 Proceso de secado en bandejas

El secado en bandeja reduce la actividad de agua, conservando los alimentos, impidiendo así el crecimiento microbiano y las reacciones químicas que puedan deteriorar el producto. El efecto del calor sobre los microorganismos y las enzimas son también importantes en parte, para garantizar la conservación adecuada de los alimentos, procurando que la inactivación biológica sea lo más elevada posible en todos los niveles. Por otra parte, en el caso de los cultivos bacterianos y productos bioactivos, debe tenerse especial cuidado con que el daño producido en el producto durante el secado sea el mínimo. Así, el propósito final cual es la obtención de los biocompuestos a partir de productos deshidratados por secado en bandeja sea la más adecuada evitando efectos indeseables en el producto final esperado.

La inactivación de enzimas durante el secado por atomización se debe principalmente al efecto de las altas temperaturas, sin embargo en las bacterias la inactivación que tiene lugar durante el secado es debido a las altas temperaturas como a la deshidratación (Shafiur y Conrad, 2003).

2.2.2.1.2 Comportamiento de un proceso de secado en bandejas

El secado de sólidos incluye dos procesos fundamentales y simultáneos: la transferencia de calor, que permite la evaporación del líquido, y la transferencia de

masa, que permite la difusión del líquido dentro del sólido y del vapor de la superficie al ambiente. Los factores que regulan las velocidades de este proceso determinan la rapidez o el índice de secado (Geankoplis, 1999). El procedimiento típico consiste en determinar el contenido de humedad y graficar este en función del tiempo; posteriormente, obtener valores del contenido de humedad con respecto al tiempo (dX/dt) y así calcular la velocidad de secado.

2.2.2.2 Tecnología de fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Además, puede modificar rápidamente su densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los diversos procesos de extracción.

Los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes y bajo la combinación de parámetros de temperatura y presión (Brunner, 2005; Rozzi y Singh, 2002). En la Tabla 5 se muestran las propiedades críticas de algunos compuestos comúnmente empleados como fluidos supercríticos.

Tabla 5. Propiedades críticas de los FSC

Fluido	T_c (°C)	P_c (bar)	ρ (Kg/m ³)
Acetileno	36	62,47	232,14
Acetona	235	47,00	278,00
Agua	374	220,90	322,60
Dióxido de Carbono	31	73,86	467,60
Etano	32	48,71	135,75
Etanol	240,4	61,40	276,00
Etileno	9	50,40	195,80
Metano	-83	45,95	161,43
Metanol	239,4	80,90	272,00
Propano	97	42,47	225,64
Propileno	91,8	46,00	232,00

Fuente: Rozzi y Singh (2002)

El fluido supercrítico más utilizado es el CO₂ debido a que es no tóxico, inflamable, ni corrosivo, es incoloro, no es costoso, se logra eliminar fácilmente y no deja residuos. Sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto, se pueden separar compuestos termolábiles, con diferentes grados de pureza, y ayuda a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos del alimento cuando estos compuestos son extraídos (Brunner, 2005; Hurtado, 2002). El problema con muchos de los fluidos que aparecen en la Tabla 5, en comparación con el CO₂ es que hay ciertas dificultades en obtener solventes puros del fluido (Rozzi y Singh, 2002; Wark, 1985).

2.2.2.2.1 Extracción de biocompuestos por tecnología supercrítica

Los métodos tradicionales de extracción requieren altos tiempos de residencia y grandes cantidades de solvente; se basan en la selección del solvente asociado con el uso de calor y/o agitación e incluyen el método de extracción soxhlet, la hidrodestilación y maceración mezclada con agua, alcohol o grasa caliente. El método soxhlet es una técnica estándar y la principal referencia para evaluar el rendimiento de otros métodos de extracción sólido - líquido (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998). De un tiempo a esta parte se han desarrollado varias técnicas nuevas para la extracción de solutos de matrices sólidas, entre ellas se tiene la SFE (Brunner, 2005; Rozzi y Singh, 2002), que tiene como finalidad reducir el tiempo de extracción, disminuir el consumo de solvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad del extracto. Algunas de las ventajas más representativas del uso de CO₂ como disolvente en aplicaciones agroindustriales con FSC sobre extracciones comúnmente llevadas a cabo, como en equipo Soxhlet con hexano (ver anexos 1, figura 31) u otros disolventes similares son, el alto coeficiente de difusión y viscosidad más baja que los líquidos (Brunner, 2005); ausencia de tensión superficial, la cual aumenta la operación de extracción dada la rápida penetración de estos al interior de los poros de la matriz heterogénea (Sánchez, M. D. M., C. Mantell., M. Rodríguez., E. Martínez de la Ossa., 2005).

La selectividad durante la extracción con CO₂ puede ser manipulada dada la variación de las diferentes condiciones de operación temperatura y presión (ver Fig. 9) afectando la solubilidad de varios componentes en el fluido supercrítico (Tonthubthimthong, P., S. Chuaprasert., P, Douglas. y W, 2001). La SFE no deja residuos químicos. La extracción con CO₂ supercrítico permite su fácil recuperación por procesos de reciclaje. El CO₂ supercrítico también ha sido usado en innumerables aplicaciones industriales que incluyen diferentes campos como:

alimentos, agricultura, acuicultura, pesticidas, procesos microbianos, petroquímica y farmacéutica (Vagi, E., B. Simandi., 2005).

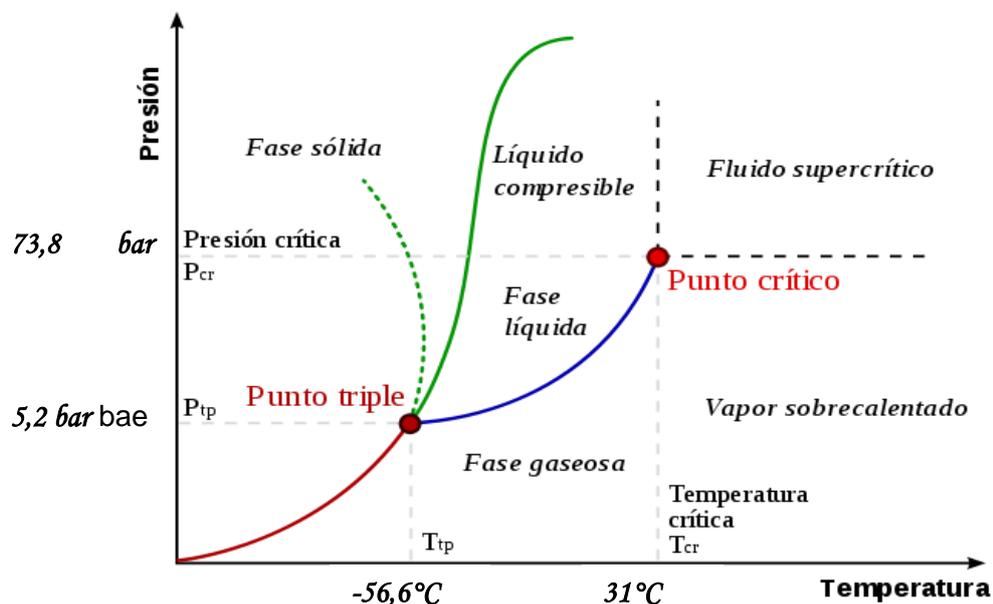


Fig. 9 Diagrama de punto triple del CO₂.

Elaboración propia (2020)

2.2.3.1 Extracción de compuestos no polares con CO₂ supercrítico

La SFE ha demostrado ser una excelente alternativa a las técnicas convencionales para obtener extractos de una variedad de materiales naturales. El dióxido de carbono (CO₂) es el fluido supercrítico más utilizado debido a sus múltiples ventajas con biocompuestos obtenidos de alto grado de pureza a temperatura y presión de 31,1 °C y 74 bar, respectivamente. Además, en función de la capacidad de ajuste de las propiedades del solvente, los procesos de extracción con CO₂ supercrítico (*sc - CO₂*) presentan una ventaja importante sobre los métodos de baja presión, es decir, la selectividad de *sc - CO₂* se puede ajustar variando la temperatura y la presión para obtener fracciones que contienen compuestos específicos (Ver Fig. 10). La recuperación de extractos activos de interés puede llevar a un producto con un alto valor económico y simplificar los pasos de fraccionamiento posteriores.

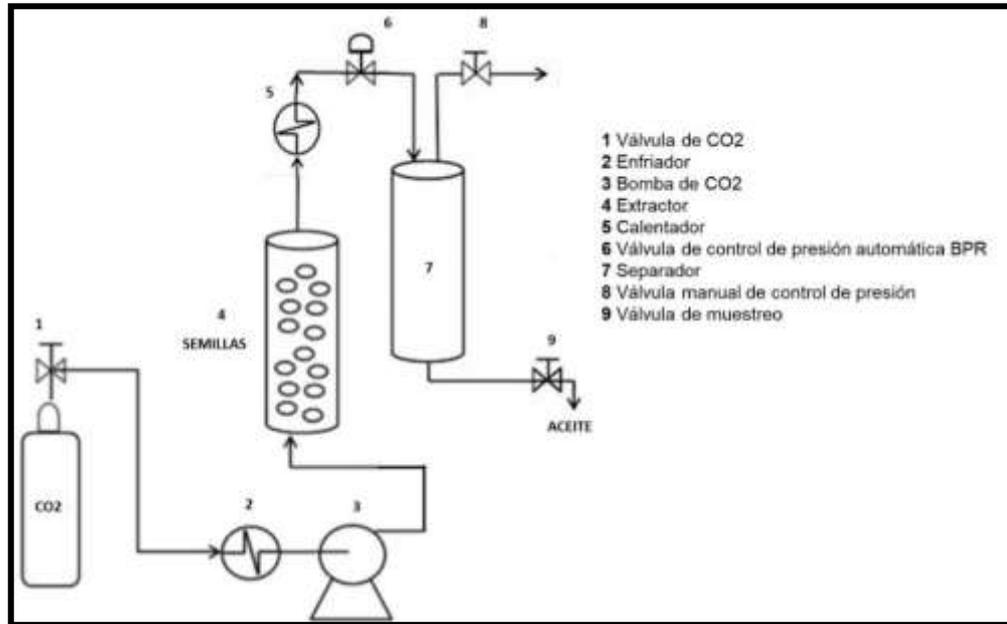


Fig. 10 Diagrama de extracción con CO₂ supercrítico $sc - CO_2$.

Fuente: Elaboración propia (2020)

2.2.3.2. Propiedades resaltantes de fluidos supercríticos

- Alta difusividad (como los gases)
- Baja viscosidad (como los gases)
- Tensión superficial cero
- Densidad ajustable (fuerza del solvente)
- No es tóxico (CO₂)
- Aptos para reciclar

En el caso de la extracción con CO₂ puro, las extracciones pueden ser más selectivas para compuestos no polares optimizando la presión y la temperatura. Así mismo el tiempo de extracción tendrá un curso de actividad que generará una curva en cuanto a la obtención de biocompuestos. Esta curva nos permitirá conocer la relación másica entre el volumen del solvente en las horas de extracción y el porcentaje de producto extraído (ver Fig. 11).



Fig. 11 Curso de la SFE. Elaboración propia (2020)

2.2.3.3 Rendimiento de extracción (e_{exp}) y cantidad relativa de solvente

$$e_{exp} = \frac{E}{N_m}; E = \text{cantidad de extracto (kg)}$$

$$q = \frac{M}{N_m}; M = \text{masa de solvente (kg)}$$

$$N_m = (1 - Cu)N; N_m = \text{masa de sólido insoluble}$$

Cu = Sólido contenido en el sólido no tratado su valor es igual al rendimiento de extracción asintótica en tiempo infinito. N = sólido cargado en el extractor.

El rendimiento de extracción también se puede definir como $(g_{aceite}/g_{sólido\ insoluble})$ y la cantidad relativa de solvente (passed solvent) = q ó $(kg_{CO2}/kg_{aceite\ insoluble})$.

2.3. Definición de términos

- **Fluido supercrítico.** Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido (Velasco, Villada, y Carrera, 2007).
- **Ácidos grasos.** Son ácidos orgánicos monoenoicos, que se encuentran presentes en las grasas, raramente libres, y casi siempre esterificando al

glicerol y eventualmente a otros alcoholes. Son generalmente de cadena lineal y tienen un número par de átomos de carbono (Calvo,2007).

- **Aceites vegetales.** Un **aceite vegetal** es un triglicérido extraído de una planta. Son sustancias obtenidas a partir de semillas o frutos, los que lo contienen, pero solamente los llamados oleaginosos sirven para la producción industrial de aceite. (Thomas, 2000)
- **Tocoferoles.** Son sustancias viscosas de color amarillo pálido, que se descomponen fácilmente en presencia de luz, oxígeno, pH alcalino y ciertas trazas de minerales Fe y Cu. Insolubles en agua, medianamente solubles en solventes orgánicos y en aceites vegetales, se pueden aislar de la fracción insaponificable de estos últimos (BALL, 1988; BLANCO, 2001; Bramley et al., 2000).
- **Esteroles.** Los esteroides vegetales o fitoesteroides poseen una estructura similar a la del colesterol, pero se diferencian de este en que incluyen un grupo metilo o etilo en el carbono 24, están presentes de manera natural en frutos secos, aceites vegetales (girasol, maíz, oliva) y en verduras, hortalizas, frutas, cereales y legumbres. (Klingberg et al., 2008; Ostlund RE Jr., 2002).
- **Ácido púnico.** Conocido como "ácido tricosenoico" con fórmula molecular $C_{18}H_{30}O_2$ mientras que su masa molar es 278.43 g / mol con punto de fusión de 44-45 °C. El ácido púnico es un isómero del ácido α -linolénico conjugado y un ácido graso poliinsaturado ω -5, por ejemplo, número de dobles enlaces y disposición atómica (Pereira de Melo, Illana y Carvalho, Eliane y Filho, 2014).
- **CO₂.** Es un gas inocuo que en condiciones supercríticas (CO₂ supercrítico) se convierte en un disolvente muy potente y sirve como elemento separador eficaz. Entre otras aplicaciones, la tecnología de fluidos supercríticos se dirige a la obtención de extractos herbales a partir de plantas aromáticas, la mejora de propiedades de alimentos (Ainia Centro Tecnológico, 2008).
- **Cromatografía de gases masas.** La cromatografía de gases-masas es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad. Esta técnica está indicada para la separación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño de la investigación

El estudio según el tipo de diseño es **Experimental**, ya que se realiza mediante la observación, registro y análisis de las variables intervinientes en la investigación sobre modelos y ambientes artificialmente creados para facilitar la manipulación de las mismas. El experimento provocado por el investigador, le permite introducir determinadas variables de estudio manipuladas por él, para controlar el aumento o disminución de esas variables y su efecto en las conductas observadas. Dankhe (1986).

3.2. Acciones y actividades

Se obtuvo la materia prima del distrito de Ite, región de Tacna, donde existe gran producción de granada variedad Wonderful con destino a mercado internacional, nacional y regional. El acondicionamiento de la fruta se dio de la siguiente forma, las granadas fueron lavadas, partidas en cuatro y se les retiró cáscara junto a los carpelos adheridos en ellas y arilos; éstos últimos fueron llevados a prensa de metal, con la finalidad de extraer el zumo. Luego se retiraron las semillas, se lavaron y secaron a 35-40 °C durante 8 horas, 1,5-2 m/s de velocidad de aire y una humedad relativa de 50-60 %. Fue necesario limpiar las semillas retirando el arilo y restos del zumo. Éstas volvieron a secarse en estufa a 40 °C durante 10 horas.

Para el análisis proximal en la caracterización humedad, cenizas, lípidos y proteínas en semillas de granada variedad Wonderful se llevó a cabo la metodología AOAC

Determinación de humedad

Se secó la placa petri a 102±2 °C durante 30 minutos, luego se situó en el desecador para que enfríe a temperatura ambiente por 15 min. Luego, se obtuvo el peso de la placa sin muestra (M_0). La muestra en la placa y pesar (M_1), un peso de muestra aproximado de 10 g. Luego se introdujo la placa en el desecador y se llevó a estufa a 102±2 °C por 3-4 horas para después dejarla enfriar. Se obtuvo el peso de la placa (M_2) y se aplicó la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{(M_1 - M_2) \times 100}{M_1 - M_0}$$

$$M_0 = \text{Peso de la placa}$$

$$M_1 = \text{Peso de muestra} + \text{peso de placa antes de secado}$$

$$M_2 = \text{Peso de muestra} + \text{peso de la placa después de secado}$$

Observaciones: Se repitió la desecación hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas no sea mayor de 0,5 mg.

Determinación de cenizas

Se calentó un crisol de porcelana limpio en un horno eléctrico a 550°C durante 3 horas, dejándolo reposar a temperatura ambiente durante 1 hora para pesarlo posteriormente. El procedimiento se repitió hasta obtener un peso constante. El tiempo de incineración fue de 1-2 horas. Luego, se pesó con precisión aproximadamente 3 g de muestra en el crisol de porcelana de peso constante conocido y se colocó el crisol de porcelana con la muestra en un horno eléctrico a 550°C, se incineró la muestra calentando el crisol con la tapa colocada hasta que se formen cenizas de color blanco o blanco grisáceo brillante. Una vez finalizado el proceso de incineración, se colocó el crisol de porcelana con la muestra en un desecador, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y para luego pesarlo. Se repitieron lo procedimientos anteriores hasta obtener un peso constante del crisol que contiene la muestra. El contenido de ceniza se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Contenido de cenizas en la muestra} = \frac{W_2 - W_1}{S} \times 100$$

W1: Peso del crisol de porcelana antes de la incineración (g)

W2: Peso del crisol de porcelana después de la incineración (g)

S: Peso de la muestra (g)

Determinación de lípidos

Se extrajeron aproximadamente 5 gr de semillas de granada molidas, estas muestras se transfirieron a un dedal de extracción de papel de filtro y se extrajeron con 200-500 ml de n-hexano durante 6-8 ciclos como máximo temperatura de 70 °C en un aparato Soxhlet. Una vez completada la extracción, se eliminó el n-hexano a 35 ° C bajo presión reducida utilizando un evaporador rotativo (Rotavapor R210,

Buchi, - Suiza). Posteriormente, el matraz se colocó en un horno de vacío. El rendimiento del aceite extraído se expresó en porcentaje, que se define como el peso del aceite extraído sobre el peso de la muestra tomada. La determinación se realizó por triplicado, 2 muestras pequeñas y una grande.

m = peso de la muestra

P1 = placa vacía

P2 = placa peso final

$$\% \text{ Contenido de lípidos} = \frac{P2 - P1}{m} \times 100$$

Determinación de proteínas

La concentración de proteína de cada fracción se determinó por el método de Bradford (1976). El procedimiento de extracción se basó en las diferencias en la solubilidad de las proteínas en varios solventes. Primero, la extracción de una muestra molida (250 mg) con agua destilada (5 ml, pH=6,5). La suspensión se agitó a temperatura de laboratorio durante 20 min y luego se centrifugó (10000 rpm durante 15 min). El sobrenadante se usó como el extracto 1 (fracción de albúmina). Luego de retirar los tubos de ensayo de la centrifuga, se tomó la fracción líquida que ha quedado sobrenadante para realizar diluciones. Las diluciones a realizar serán extraídas haciendo uso de la pipeta de la siguiente forma:

- 1/20 microlitros (de los 2 tratamiento con 3 repeticiones)
- 5/20 microlitros (de los 2 tratamiento con 3 repeticiones)
- 20/20 microlitros, sin dilución (de los 2 tratamientos con 3 repeticiones)
- Testigo con agua destilada

Luego se realizó la lectura de absorbancia respectiva en el lector de microplaca, posterior a esto se procedió a obtener un promedio de lectura neta para determinar así la concentración de proteína que expresaremos en mg/ml (p/v). La muestra insoluble restante se mezcló con 10 ml de solución acuosa de NaCl al 5% (p/v), se repitió el procedimiento de extracción y se recolectó el extracto 2 (fracción de globulina). Después de las siguientes extracciones con una solución acuosa al 70% (v/v) de etanol y una solución acuosa de NaOH al 0,2%, se obtuvo el extracto 3 (fracción de prolamina) y el extracto 4 (fracción de glutelina). Se realiza para finalizar, una suma de las cuatro fracciones, albúmina, globulina, prolamina y glutelina para obtener el contenido total de proteína.

En el tratamiento de las semillas (ver Fig. 12), éstas, limpias presentaron un peso promedio del 48 %. Posteriormente se almacenaron en condiciones oscuras a 4 °C hasta antes de su uso. Para proceder a la extracción, las semillas fueron molturadas en molino a graduación media obteniéndose un diámetro medio de partícula de $0,297 \text{ mm} \pm 0,03$ (ver anexos 1, figura 28 y 29).



Fig. 12 Diagrama de flujo del tratamiento de la materia prima (granada variedad Wonderful) para extracción de biocompuestos. Elaboración propia (2020)

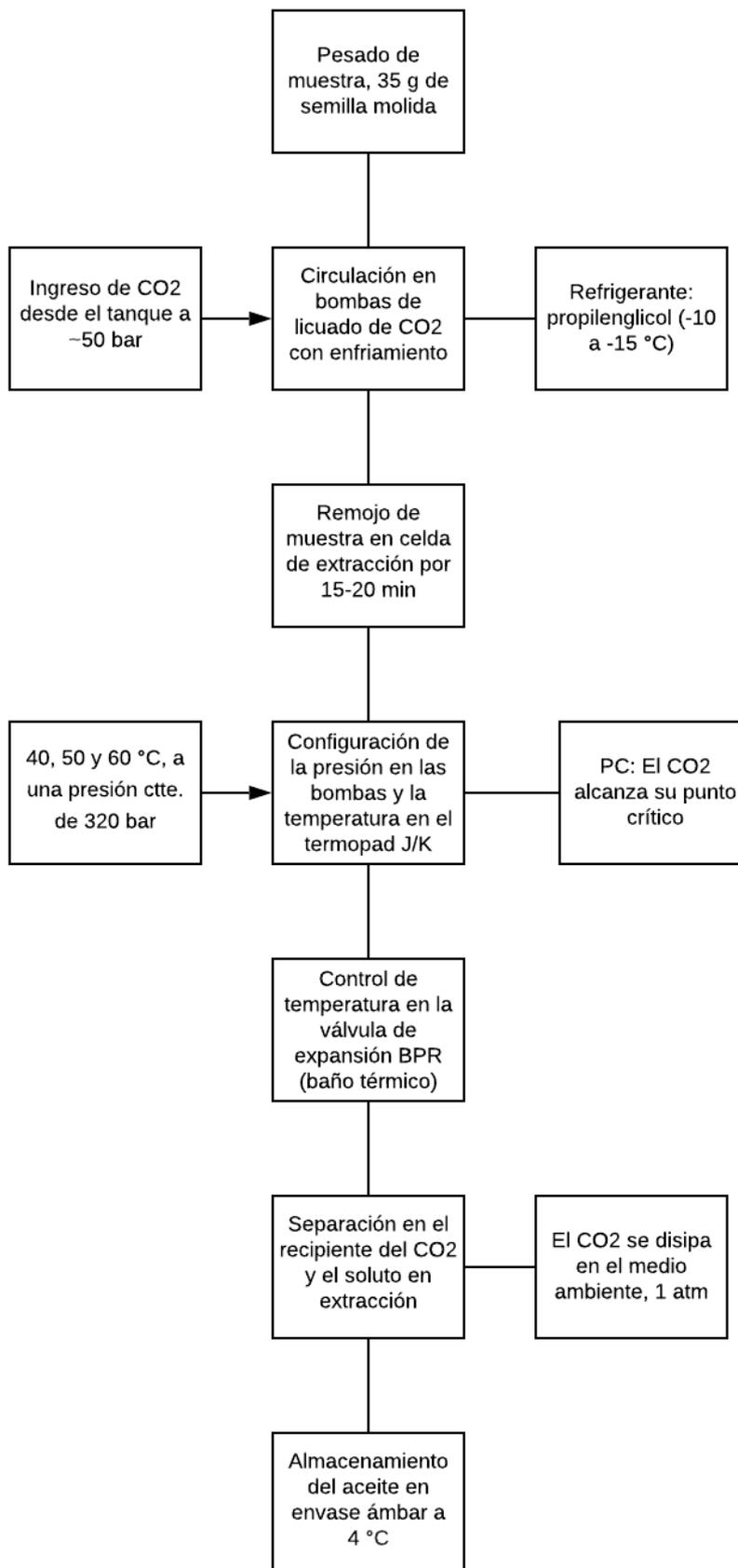


Fig. 13 Diagrama de flujo del proceso de extracción con $sc - CO_2$. Elaboración propia (2020)

Para el diseño experimental de Central Rotacional Compuesto se generó una tabla codificada de tratamientos en bloques para los parámetros de temperatura y tiempo.

Tabla 6. Tratamientos codificados en bloques para los parámetros de temperatura y tiempo

Orden Tratamiento	Orden Corrida	Tipo Pt	Bloques	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
3	1	1	1	40	300
6	2	-1	1	64	200
9	3	0	1	50	200
7	4	-1	1	50	59
8	5	-1	1	50	341
1	6	1	1	40	100
10	7	0	1	50	200
4	8	1	1	60	300
5	9	-1	1	36	200
12	10	0	1	50	200
13	11	0	1	50	200
11	12	0	1	50	200
2	13	1	1	60	100

Fuente: Elaboración propia (2020)

3.3. Materiales y/o instrumentos

Extracción con $sc - CO_2$

- Estufa de secado BINDER GmbH.
- Molino de café a nivel intermedio Hamilton Beach para la reducción de tamaño de partícula de las semillas limpias y secas.
- Papel filtro.
- Viales ámbar de vidrio para obtención de extractos.
- Pipetas de extracción.
- Dióxido de carbono con una pureza del 99,9 %, suministrado por PRAXAIR (San Luis Potosí, México). Helio al 99,99 % (San Luis Potosí, México). (ver anexos 1, figura 33)
- Bombas de circulación del CO₂. (ver anexos 1, figura 34)
- Equipo de extracción supercrítica PARR INSTRUMENT COMPANY, Moline Illinois USA 243AC T304 032687.
- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID) VARIAN CP-3800 GAS CHROMATOGRAPH.
- Cromatógrafo de gases masas AGILENT SERIES 6890 GC SYSTEM (Agilent Technologies 5975 C insert XL EI/CI MSD).

- Circulador/Enfriador baño Thermo NESLAB RTE-7
- Manómetro de presión Ashcroft AISI 316 tube – AISI 316 socket, Welded. (ver anexos 1, figura 36).
- Termómetro tipo K/J EXTECH. (ver anexos 1, figura 37)

3.4. Muestra de estudio

Las granadas variedad Wonderful obtenidas de la asociación de productores de granada en el distrito de Ite, región Tacna, fueron un total de 56,42 kg de fruta sin mercado destino al no cumplir con el total de estándares de calidad como calibre y características sensoriales para demanda de mercado internacional, nacional y regional de exportación, considerada parte de la producción excedente.

Se tomó esta muestra no probabilística y por conveniencia, de la cual derivó el 10 % correspondiente a la composición de la matriz vegetal, en este caso, las semillas solamente. De éstas se tomó 35 g para cada experimento por SFE. (ver anexos 2)

3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

La extracción de aceite de semillas de granada (ver Fig. 13) se llevó a cabo en un rango de temperaturas entre 40, 50 y 60 °C, una presión constante de 320 bar y un tiempo aproximado a los 300 minutos, o sea 5 horas de extracción. utilizando además un flujo de CO₂ de ~4,05 kg/h. En cada tratamiento se utilizó una muestra de 35 g de semilla de granada limpia, seca y molida, de un diámetro medio de partícula de 0,297 mm \pm 0,03. Los extractos se almacenaron en viales ámbar a 4 °C hasta su posterior análisis. Se realiza a continuación el proceso de remojo que consiste en dejar empapar de CO₂ las semillas molidas contenidas en el cartucho dentro de la celda de extracción por unos 10 min antes de abrir las válvulas que permitirán el paso del CO₂ a un determinado flujo. Esta extracción se realizó en un equipo de extracción PARR INSTRUMENT COMPANY, Moline Illinois USA 243AC T304 032687 (ver anexos 1, figura 35), el cual fue adaptado y el principio de extracción se muestra esquemáticamente. El equipo consta de un sistema de regulación y control de temperatura, presión y flujo de CO₂.

El perfil de ácidos grasos se determinó mediante el uso de un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID) VARIAN CP-3800 GAS

CHROMATOGRAPH (ver anexos 1, figura 40). Para ello se realiza la derivatización de una muestra que se llevó a cabo adicionando a 0,05 / 0,15 g de muestra de aceite, 0,25 μL de metóxido de sodio, y debe agitarse bien y llevar a estufa por 30 min. Luego agregar 0,25 μL de NaCl y 0,5 μL de hexano. Se inyecta posteriormente 2-5 μL del sobrenadante del vial al cromatógrafo. La lectura de curvas se realizó en 30 min desde inyección y estabilización del equipo. Para el análisis de cromatografía de gases masas se utilizó un cromatógrafo de gases AGILENT SERIES 6890 GC SYSTEM (Agilent Technologies 5975 C linsert XL EI/CI MSD) equipado con un inyector de split/splitless a temperatura de 250 °C, relación split 1:10. Los datos cromatográficos fueron obtenidos y procesados con el software NIST98. Para la separación de mezclas se utilizó una columna capilar HP5MS (J & W de Agilent Scientific. 30 m * 0,25 μm ID* 0,25 mm) con fase estacionaria de polietilenglicol. La temperatura del horno se programó de 313 K (5 min) hasta 523 K a 5 K/min. El gas portador y gas auxiliar empleado fue helio (99,99 %, Linde) con un caudal de 1 mL/min. El volumen inyectado fue de extracto de 1,0 μL . La cuantificación de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides, entre otros compuestos se realizó por porcentaje relativo de área. La lectura de curvas se realizó en 60 min desde inyección y estabilización del equipo.

Para el análisis de cromatografía de gases masas, en la determinación de la composición de tocoferoles se utilizó un cromatógrafo de gases AGILENT SERIES 6890 GC SYSTEM (Agilent Technologies 5975 C linsert XL EI/CI MSD) equipado con un inyector de split/splitless a temperatura de 523 K, relación split 1:10. Los datos cromatográficos fueron obtenidos y procesados con el software NIST98. Para la separación de mezclas se utilizó una columna capilar HP5MS (J & W de Agilent Scientific. 30 m * 0.25 μm ID* 0,25 mm) con fase estacionaria de polietilenglicol.

Los tocoferoles al ser compuestos de grupos metóxidos, de doble ligadura y mayor peso molecular que los ácidos grasos requieren de un detector con mayor sensibilidad. Por ello se empleó **MSD (Mass Selective Detector)** inerte 5975C de Agilent con su detector de triple eje le ofrece características de diseño innovadoras para aumentar la productividad de su laboratorio y las capacidades analíticas avanzadas que mejoran sus resultados y su confianza. Además de ofrecer una mejor resolución de MS y la menor desviación de masa disponible, el sistema ofrece una sensibilidad superior e integridad espectral.

Se empleó un diseño de rotación central compuesta con $2^2 +$ estrella o $2k$ con 5 puntos factoriales, 5 puntos estrellas y 5 repeticiones en el punto central para un total de 13 experimentos en el software estadístico MINITAB 18. Para la determinación del efecto sobre tres niveles de temperatura y tiempo a una presión constante de 320 bar; se tuvieron las variables respuesta: rendimiento basado en la cantidad de aceite de semillas de granada obtenido por unidad másica del material (semilla molida) en términos porcentuales; y la composición en ácidos grasos, tocoferoles y esteroides. Así como la relación de rendimiento entre unidad másica de CO₂ empleado por g de semilla de granada.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados de: Análisis proximal centesimal de semillas de granada, Determinación de parámetros, Rendimiento de extracción, Ecuación de optimización y Análisis de biocompuestos obtenidos.

Para la caracterización de las semillas y cáscaras de granada variedad Wonderful se realizó la determinación de humedad, cenizas, lípidos y proteínas mediante metodología AOAC que se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Análisis proximal para la caracterización de cáscaras y semillas de granada variedad Wonderful mediante metodología AOAC

Análisis en	Cantidad por 100 g de muestra	
	Semilla (g)	Cáscara (g)
base seca		
Humedad	67,2730 %	71,8932 %
Cenizas	3,0309 %	4,3313 %
Grasa cruda	18,3524 %	5,8863 %
Proteínas	17,9608 %	13,7479 %

Fuente: Elaboración propia (2020)

4.1 Extracción supercrítica

Para determinar los parámetros de temperatura y tiempo, se tomó como referencia lo expuesto en teoría, reconociendo además que el punto crítico del CO₂ se da a partir de los 31 °C. Por lo anterior mencionado, se tomó un valor bajo de 40 °C, uno intermedio de 50 °C y uno alto de 60 °C. En cuanto al tiempo de extracción, consideramos las 3 fases del desarrollo de la extracción supercrítica: equilibrio controlado, transición y difusión controlada, tomando un tiempo de 5 h para la extracción puesto que, al hacerse un experimento aleatorio, luego de 300 min la extracción ya no era cuantitativamente significativa. La presión se establece constante a 320 bar basado en los resultados obtenidos por Natolino y Da Porto, (2019). Se seleccionó el diseño Central Compuesto Rotacional para obtener el número de tratamientos a realizar según los parámetros seleccionados. La extracción supercrítica en términos de rendimiento, presenta la tabla de resultados en cuanto a la extracción de mayor eficiencia en cuanto a la relación de temperatura y tiempo a

una presión constante, así como también se presentan las propiedades fisicoquímicas del CO₂ en los parámetros seleccionados (ver Tabla 8.)

Tabla 8. Rendimiento en aceite de semillas de granada extraído con *sc* – CO₂ a presión constante de 320 bar.

Tratamiento	Densidad (g/cm ³)	Viscosidad (μPa/s)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Rendimiento (%)
1	0,9203	86,627	40	100	10,71
2	0,8439	96,513	60	100	13,12
3	0,9203	86,627	40	300	14,95
4	0,8439	96,513	60	300	19,53
5	0,9203	86,627	36	200	12,99
6	0,8439	96,513	64	200	16,86
7	0,8826	69,339	50	59	10,02
8	0,8826	69,339	50	341	15,45
9	0,8826	69,339	50	200	13,45
10	0,8826	69,339	50	200	13,52
11	0,8826	69,339	50	200	13,41
12	0,8826	69,339	50	200	13,48
13	0,8826	69,339	50	200	13,53

Fuente: Elaboración Propia (2020)

El mayor rendimiento de extracción fue del 19.53 %, con un total de 5,5057 g de aceite por 35 g de semillas de granada. (ver anexos 1, figura 39).

Para comprobar la influencia de los parámetros de experimentos en la superficie de respuesta, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) que se puede apreciar en la tabla 9.

Tabla 9: Análisis de varianza (ANOVA) para rendimiento en aceite de semillas de granada. Regresión de superficie de respuesta: Rendimiento (%), Temperatura (°C) y Tiempo (min).

Fuente	GL	Suma de Cuadrados Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	69,0047	13,8009	38,86	<0,001
Lineal	2	61,4107	30,7053	85,35	<0,001
Temperatura	1	19,4158	19,4158	53,97	<0,001
Tiempo	1	41,9949	41,9949	116,73	<0,001
Cuadrado	2	6,4168	3,2084	8,92	0,012
Temperatura (°C)	1	5,76454	5,76454	16,03	0,005
Temperatura (°C)					
Tiempo (min) Tiempo (min)	1	0,2371	0,2371	3,27	0,113
Temperatura Tiempo	1	1,1772	1,1772	3,27	0,113
Error	7	2,5183	0,3598		
Falta de ajuste	3	2,5084	0,8361	338,51	0,000
Error puro	4	0,0099	0,0025		0,000
Total	12				

Fuente: Minitab 18 (2020)

Tabla 10. Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)
0,599794	96,48 %	93,96 %

El valor R-cuadrado (ajustado) se muestra alto en cuanto al nivel de confiabilidad para el modelo que se propone.

4.2 Ecuación de optimización

En la siguiente tabla de coeficientes de regresión para el rendimiento se observa que las variables de temperatura y tiempo son significativas porque los p-valores de ambas son 0,000, al igual que la variable de tiempo² pues el valor de p es 0,005. A diferencia de la variable tiempo² la cual no tiene significancia en la variable respuesta del rendimiento.

Tabla 11. Coeficientes de regresión para rendimiento

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p
Constante	28,55	0,268	50,25	<0,001
Temperatura	0,863	0,212	7,35	<0,001
Tiempo (min)	0,0032	0,212	10,80	<0,001
Temperatura (°C)	0,00910	0,227	4,00	0,005
Temperatura (°C)				
Tiempo (min) Tiempo (min)	-0,000018	0,227	-0,81	0,444
Temperatura (°C) Tiempo (min)	0,000543	0,300	1,81	0,113

Fuente: Minitab 18 (2020)

Los valores de los coeficientes representan el modelamiento matemático a través de una regresión para optimizar el proceso de extracción de acuerdo a los parámetros establecidos de temperatura y tiempo como variables independientes, donde se busca conseguir así, un óptimo rendimiento como variable respuesta. La ecuación que se obtiene es la siguiente:

Ecuación del modelo matemático

Rendimiento (%)

$$\begin{aligned}
 &= 28,55 - 0,863 \text{ Temperatura}(\text{°C}) + 0,0032 \text{ Tiempo}(\text{min}) \\
 &+ 0,00910 \text{ Temperatura}(\text{°C})^2 - 0,000018 \text{ Tiempo}(\text{min})^2 \\
 &+ 0,000543 \text{ Temperatura}(\text{°C})\text{Tiempo}(\text{min})
 \end{aligned}$$

Esta ecuación nos sirve también para predecir un rendimiento esperado, el cual fuese de 27,7 % con temperaturas sobre los 60 °C y sobre las 5 y 6 horas de extracción.

En la figura 14 se muestra el diagrama de Pareto que presenta la interacción entre las variables en cuanto a los efectos significativos principalmente para los tres factores, A (temperatura), B (tiempo) y AA (temperatura*temperatura).

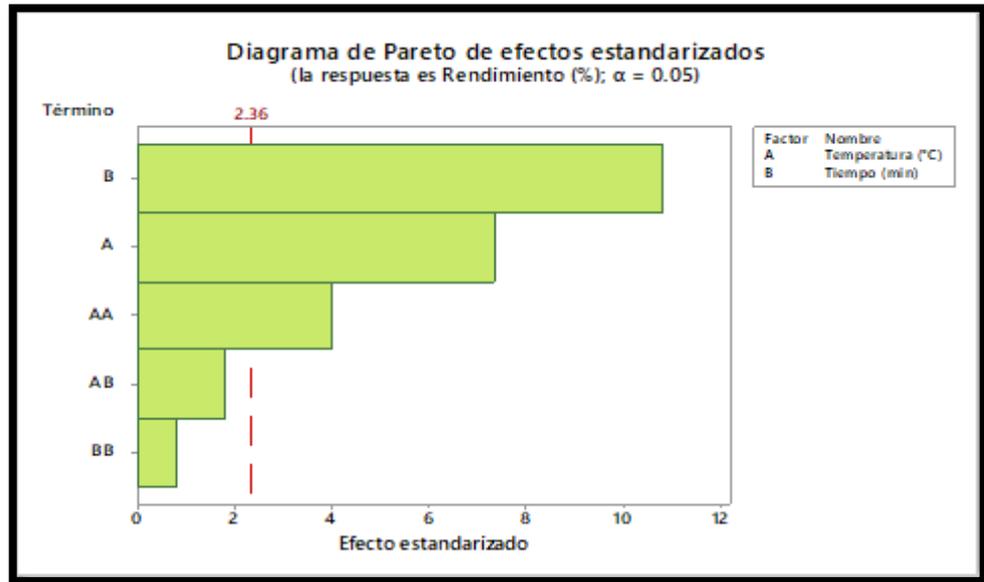


Fig. 14 Pareto de los efectos para Rendimiento (%).

Fuente: Minitab 18 (2020)

En cuanto a la gráfica de efectos principales para el rendimiento, en la figura 15, se observa que no existe interacción entre el tiempo y la temperatura, puesto que las curvas nunca se intersectarán entre sí.

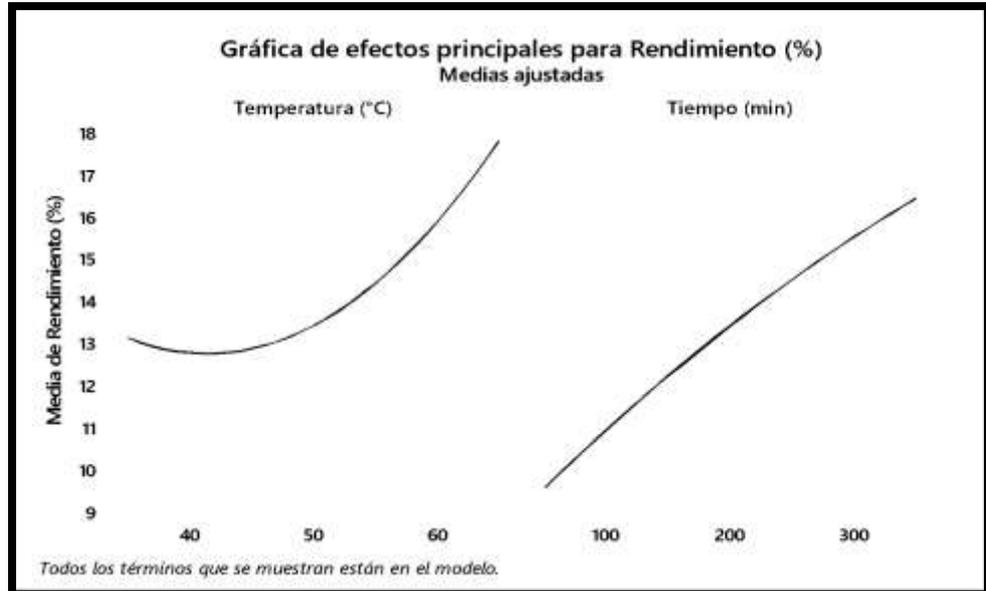


Fig. 15 Gráfica de los efectos principales para Rendimiento (%). Fuente: Minitab 18 (2020)

De este modo la ecuación del rendimiento se optimiza según la ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento (\%)} &= 28,55 - 0,863 \text{ Temperatura}(\text{°C}) + 0,0032 \text{ Tiempo}(\text{min}) \\ &+ 0,00910 \text{ Temperatura}(\text{°C})^2 \end{aligned}$$

En la figura 16 se observa la influencia de la temperatura y el tiempo sobre la variable respuesta de rendimiento. A medida que la temperatura aumenta, el rendimiento es mayor, y el tiempo a su vez, es progresivo pues el extracto va acumulándose en las fases de extracción desde la primera hora (60 min).

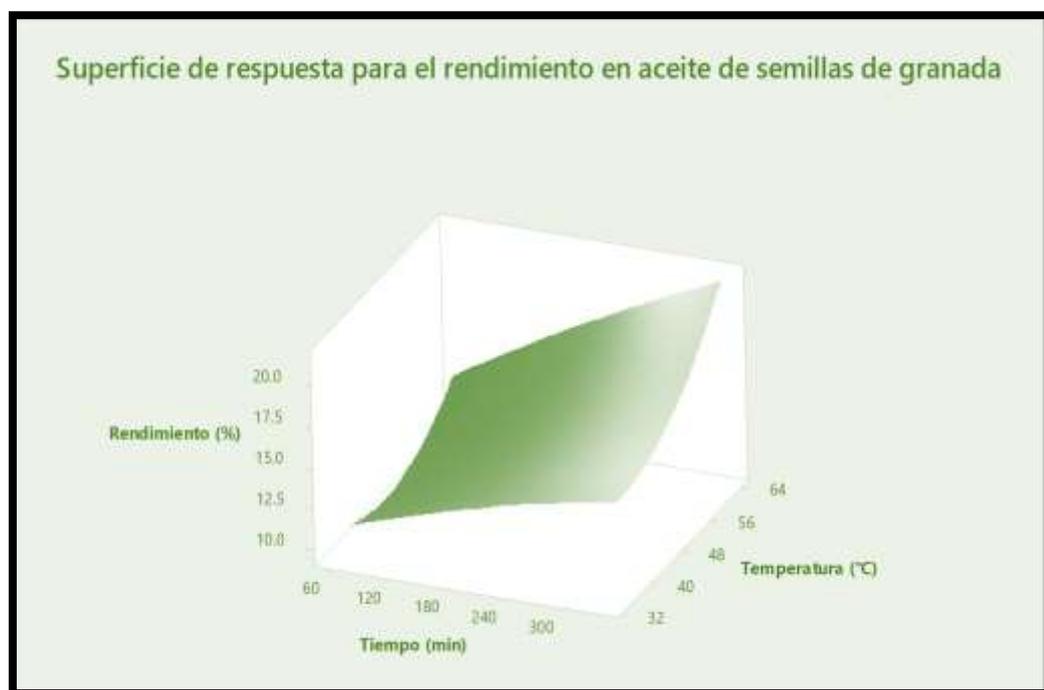


Fig. 16 Superficie de respuesta para el rendimiento de extracción (%).

Fuente: Minitab 18 (2020)

Del mismo modo se presenta en la figura 17 la gráfica de contorno para el rendimiento versus la temperatura y el tiempo. Donde se aprecian las zonas coloreadas en la leyenda que muestra al rendimiento de extracción por áreas sombreadas. Mientras la temperatura se incrementaba y el tiempo fue acumulando el aceite obtenido, la extracción fue también en alza, y se muestra una coloración que va desde azul hacia verde intenso. De mismo modo por encima de 60 °C y 300 min, se espera que la extracción sea mayor.

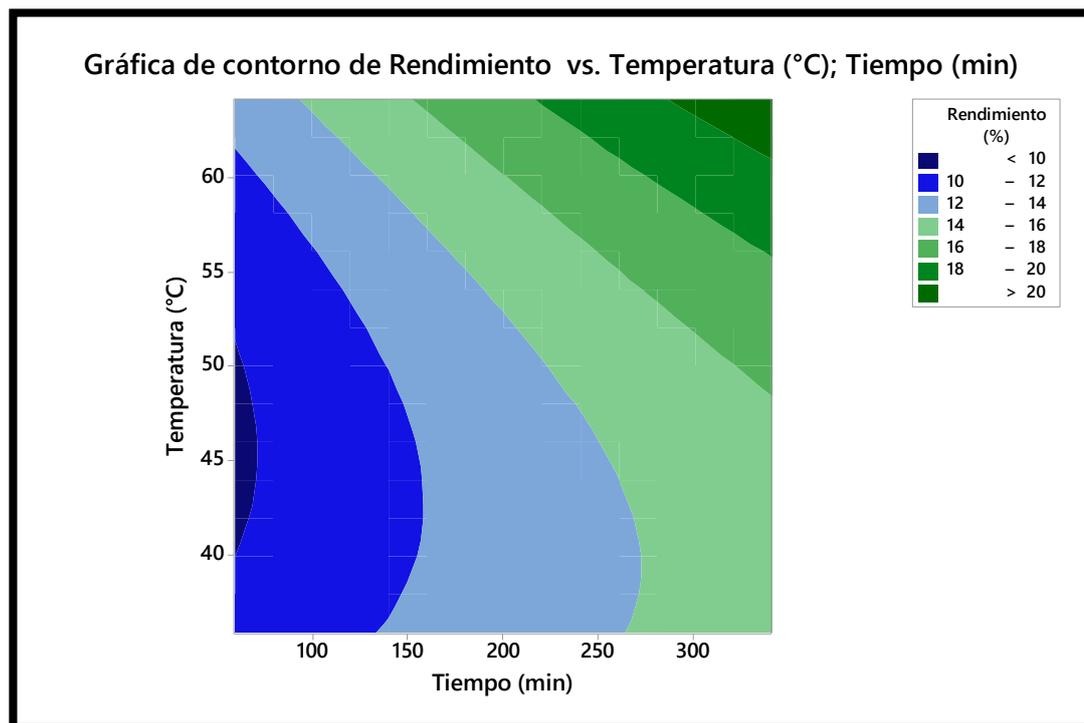


Fig. 17 Gráfica de contorno de rendimiento (%) vs. Temperatura (°C); Tiempo (min)
Fuente: Minitab 18 (2020)

4.3 Perfil de ácidos grasos

A continuación, se presentan los cromatogramas de las muestras 1– GCC1 a 40 °C, 2 – GCC2 a 50 °C y 3 – GCC3 a 60 °C a una presión constante de 320 bar y al finalizar su extracción en un tiempo de 300 minutos.

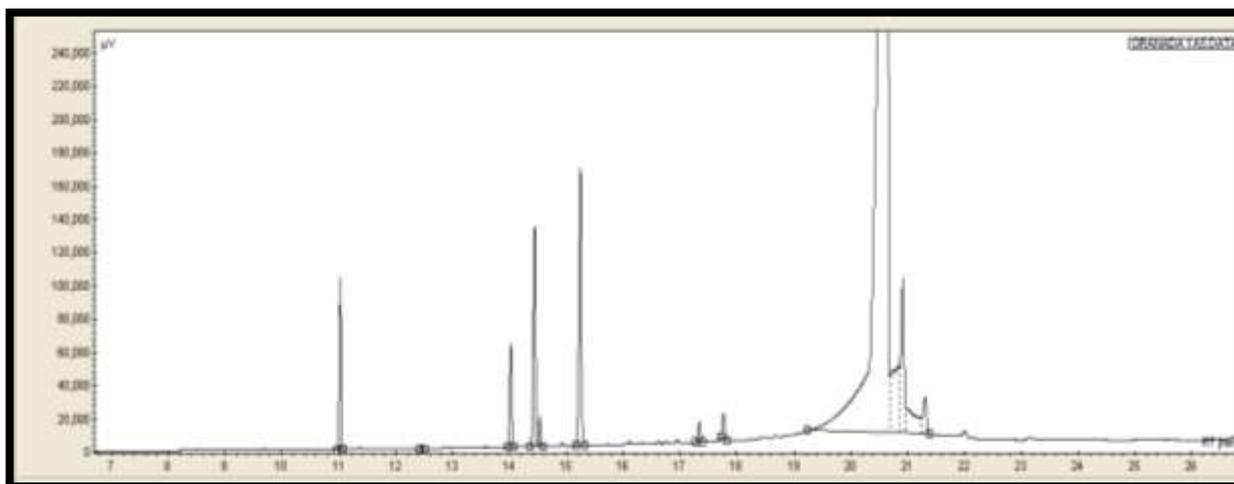


Fig. 18 Cromatograma del perfil de ácidos grasos muestra 1 – GCC1/ 320 bar 40 °C.
Fuente: (FID) VARIAN CP-3800 GAS CHROMATOGRAPH (2020).

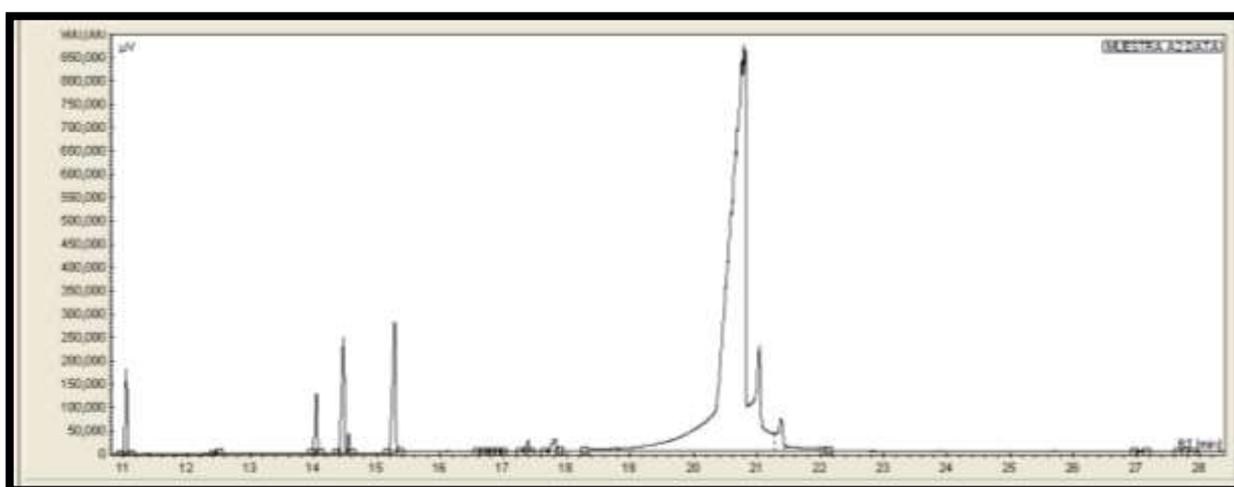


Fig. 19 Cromatograma del perfil de ácidos grasos muestra 2 – GCC2/ 320 bar 50 °C.
Fuente: (FID) VARIAN CP-3800 GAS CHROMATOGRAPH (2020).

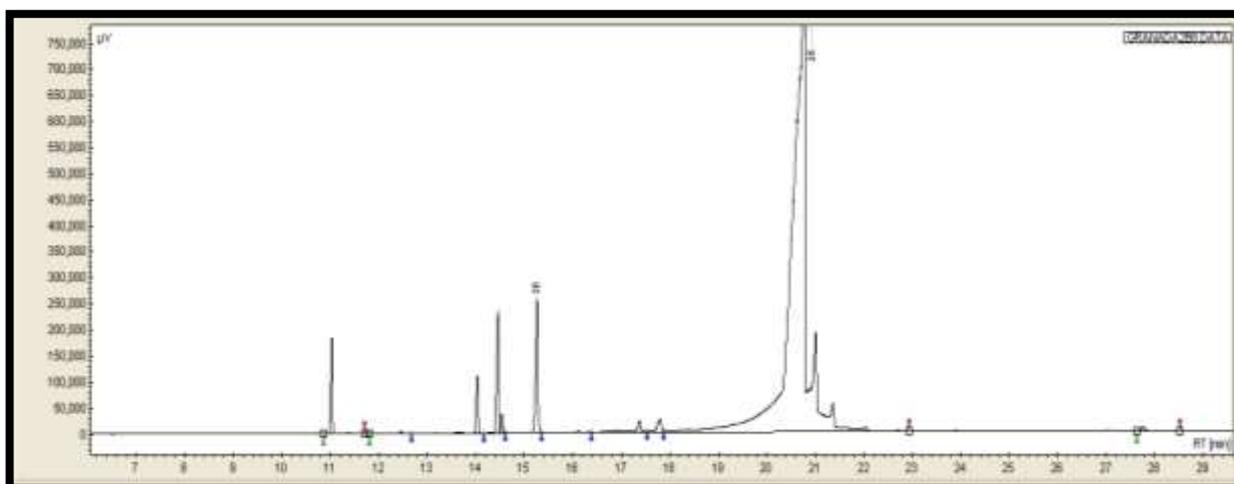


Fig. 20 Cromatograma del perfil de ácidos grasos muestra 3 – GCC3/ 320 bar 60 °C. Fuente:
(FID) VARIAN CP-3800 GAS CHROMATOGRAPH (2020).

Muestra 1 – GCC1/ 320 bar 40 °C

En el cromatograma GC1 observamos la presencia de los siguientes ácidos grasos en orden según el área representada en porcentaje, el compuesto mayoritario fue el ácido púnico o ácido Linolénico n5 (83,87 %), ácido oleico (6,01 %), ácido esteárico (3,64 %), ácido palmítico (2,04 %), ácido behénico (1,53 %), ácido gamma linolénico (1,02 %) y en menor proporción al ácido araquídico (0,78 %), ácido linoleico (0,62 %), ácido Cis-8, 11,14-Eicosatrienoico (0,44 %) y el ácido heptadecanoico (0,05 %).

Tabla 12. Perfil de ácidos grasos muestra 1 – GCC1/ 320 bar 40 °C.

Ácido graso	Fórmula	prom	DE
Palmítico	C16:0	2,04	0,21
Heptadecanoico	C17:0	0,05	0,02
Esteárico	C18:0	3,64	0,20
Oleico	C18:1	6,01	0,19
Linoleico	C18:2	0,62	0,35
Araquídico	C20:0	0,78	0,21
Gamma Linoleico	C18:3 n6	1,02	0,44
Púnico	C18:3 n5	83,87	3,83
Behénico	C22:0	1,53	2,16
Saturados		8,03	
Monoinsat		6,01	
Poliinsat		85,96	

Fuente: (FID) VARIAN CP-3800 GAS CHROMATOGRAPH (2020).

Muestra 2 – GCC2/ 320 bar 50 °C

En el cromatograma GC2 observamos la presencia de los siguientes ácidos grasos en orden según el área representada en porcentaje, el compuesto mayoritario fue el ácido púnico o ácido Linolénico n5 (85,63 %), ácido oleico (5,44 %), ácido esteárico (3,16 %), ácido palmítico (1,74 %), ácido behénico (1,89 %), ácido gamma linolénico (0,57 %) y en menor proporción al ácido araquídico (0,39 %), ácido linoleico (0,11 %), ácido Cis-8, 11,14-Eicosatrienoico (1,02 %) y el ácido heptadecanoico (0,04 %).

Tabla 13. Perfil de ácidos grasos muestra 2 – GCC2/ 320 bar 50 °C.

Ácido graso	Fórmula	%
Palmítico	C16:0	1,74
Heptadecanoico	C17:0	0,04
Esteárico	C18:0	3,16
Oleico	C18:1	5,44
Linoleico	C18:2	0,11
Araquídico	C20:0	0,39
Gamma Linoleico	C18:3 n6	0,57
Púnico	C18:3 n5	85,63
Behénico	C22:0	1,89
Saturados		7,23
Monoinsat		5,44
Poliinsat		87,33

Fuente: (FID) VARIAN CP-3800 GAS CHROMATOGRAPH (2020).

Muestra 3 – GCC2/ 320 bar 60 °C

En el cromatograma GC3 observamos la presencia de los siguientes ácidos grasos en orden según el área representada en porcentaje, el compuesto mayoritario fue el ácido púnico o ácido Linolénico n5 (86,97 %), ácido oleico (5,41 %), ácido esteárico (3,47 %), ácido palmítico (2,02 %), ácido araquídico (0,75 %), ácido gamma linolénico (0,74 %) y en menor proporción al ácido linoleico (0,30 %), ácido behénico (0,24 %) y el ácido heptadecanoico (0,09 %).

Tabla 14. Perfil de ácidos grasos muestra 3 – GCC3/ 320 bar 60 °C.

Ácido graso	Fórmula	prom	DE
Palmítico	C16:0	2,02	0,13
Heptadecanoico	C17:0	0,09	0,02
Esteárico	C18:0	3,47	0,10
Oleico	C18:1	5,41	0,11
Linoleico	C18:2	0,30	0,13
Araquídico	C20:0	0,75	0,18
Gamma Linoleico	C18:3 n6	0,74	0,03
Púnico	C18:3 n5	86,97	0,30
Behénico	C22:0	0,24	0,00
Saturados		6,57	
Monoinsat		5,41	
Poliinsat		88,02	

Fuente: (FID) VARIAN CP-3800 GAS CHROMATOGRAPH (2020).

4.4 Composición en tocoferoles y esteroides

A continuación, se muestran los cromatogramas de las muestras 1– GCC1/ 320 bar 40 °C, 2 – GCC2/ 320 bar 50 °C y 3 – GCC3/ 320 bar 60 °C respectivamente, así también como las tablas del contenido de tocoferoles de las tres muestras.

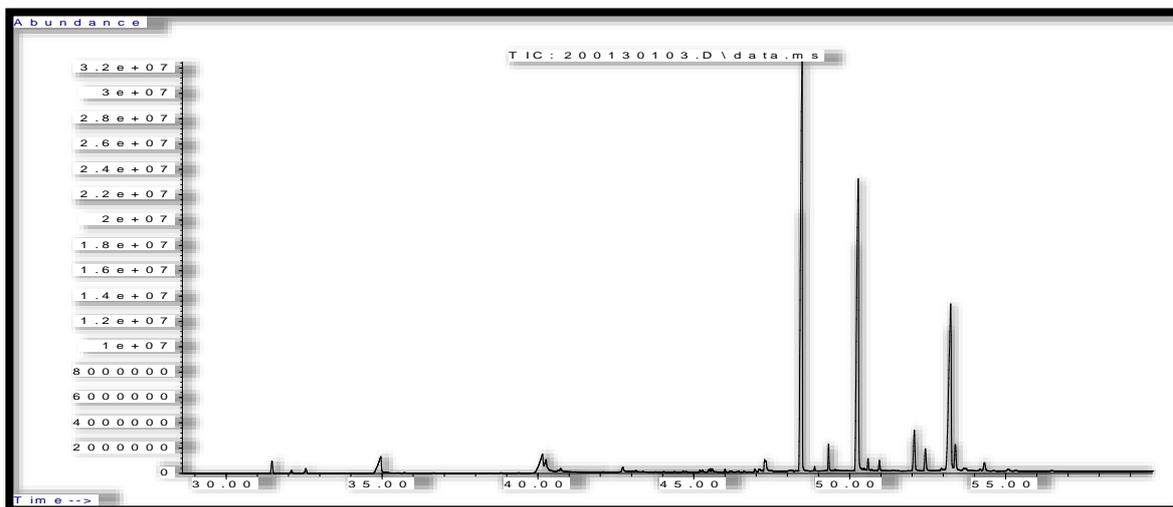


Fig. 21 Cromatograma de tocoferoles muestra 2 – GC2 (320 bar 50 °C). Fuente: MSD (Mass Selective Detector) (2020).

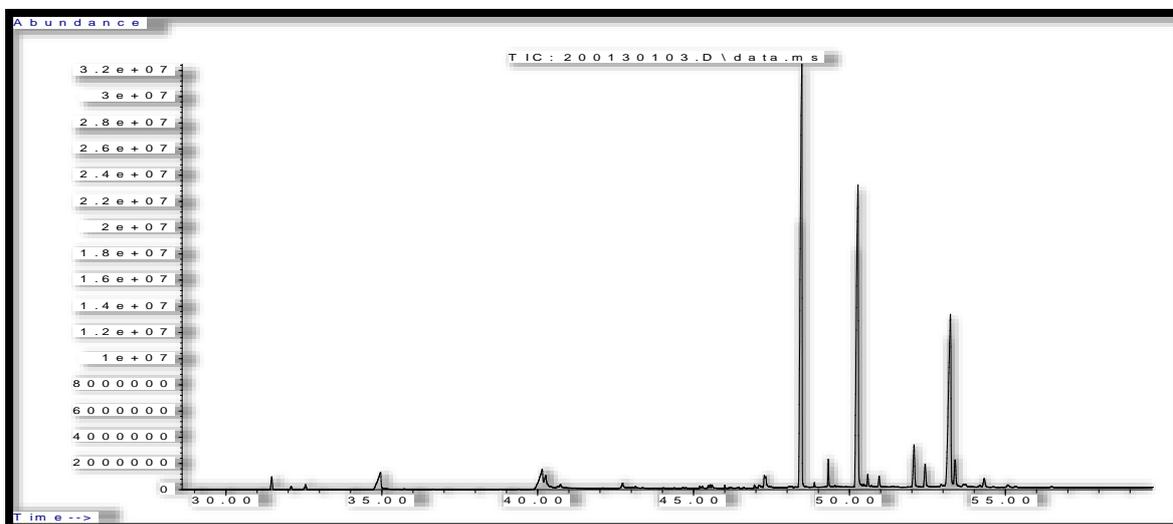


Fig. 22 Cromatograma de tocoferoles muestra 3 – GC3 (320 bar 60 °C). Fuente: MSD (Mass Selective Detector) (2020).

Composición de tocoferoles – GC2 (320 bar 50 °C)

En el cromatograma GC2 observamos la presencia de los siguientes tocoferoles según el área representada en porcentaje, el compuesto mayoritario fue el Gamma y beta tocoferol (31,4817 %), gamma y beta sitosterol (22,2393 %), el campesterol (3,4537 %), Stigmasterol (1,8670 %) y la vitamina E (0,6874 %). Cabe mencionar la presencia de Escualeno con 40, 2710 % como precursor principal de los tocoferoles.

Tabla 15. Perfil de tocoferoles muestra 2 – GC2 (320 bar 50 °C).

Pico del cromatograma	Tiempo Ret.		Area	Tiempo I	Tiempo F	Nombre del Compuesto	%	
50	48.463	VV	0.072	1,316,386,715.00	48.311	48.717	Squalene	40.2710
56	50.266	VV	0.073	1,029,079,822.00	50.057	50.419	Gamma y Beta-Tocoferol	31.4817
60	50.952	VV	0.062	22,469,291.00	50.864	51.085	Vitamina E	0.6874
62	52.072	VV	0.075	112,894,565.00	51.921	52.334	Campesterol	3.4537
63	52.429	VV	0.054	61,028,449.00	52.334	52.661	Stigmasterol	1.8670
65	53.234	VV	0.079	726,961,906.00	52.999	53.318	Gama y Beta-Sitosterol	22.2393
				3,268,820,748.00				
				1,952,434,033.00				

Fuente: MSD (Mass Selective Detector) (2020).

Composición de tocoferoles – GC3 (320 bar 60 °C)

En el cromatograma GC3 observamos la presencia de los siguientes tocoferoles según el área representada en porcentaje, el compuesto mayoritario fue el Gamma tocoferol (22,5959 %), gamma y beta sitoesterol (17,2797 %), el campesterol y gamma ergostenol (4,0219 %), Stigmasterol (2,9169 %) y la vitamina E (2,0438 %). Cabe mencionar la presencia de Escualeno con 46, 2937 % como precursor principal de los tocoferoles.

Tabla 16. Perfil de tocoferoles muestra 3 – GC3 (320 bar 60 °C).

Pico del cromatograma	Tiempo			Area	Tiempo		Nombre del Compuesto	%
	Ret.	VV	0.075		I	F		
58	48.464	VV	0.075	1,396,885,414.00	48.314	48.651	Squalene	46.2937
67	50.243	VV	0.063	681,819,872.00	50.074	50.37	Gama Tocoferol	22.5959
69	50.589	VV	0.169	146,291,707.00	50.538	50.894	Beta Sitosterol	4.8482
70	50.956	VV	0.078	61,669,237.00	50.894	51.037	Vitamina E	2.0438
73	52.072	VV	0.094	121,357,170.00	51.988	52.239	Campesterol y Gama Ergosterol	4.0219
75	52.431	VV	0.082	88,015,958.00	52.343	52.638	Stigmasterol	2.9169
77	53.214	VV	0.073	521,404,040.00	53.053	53.314	Gama y Beta Sitosterol - Stigmasterol	17.2797
				3,017,443,398.00				

Fuente: MSD (Mass Selective Detector) (2020).

Tabla 17. Resumen del perfil de ácidos grasos en muestras 1, 2 y 3.

Ácidos grasos (g/100 g)	<i>sc</i> – CO ₂ (320 bar, 40 °C; ~4,05 kg/h)	<i>sc</i> – CO ₂ (320 bar, 50 °C; ~4,05 kg/h)	<i>sc</i> – CO ₂ (320 bar, 60 °C; ~4,05 kg/h)
	<i>Púnico</i>	83.87±3.83	85.63±3.26
<i>Oleico</i>	6.01±0.19	5.44±0.12	5.41±0.11
<i>Estearico</i>	3.64±0.20	3.16±0.24	3.16±0.24
<i>Palmítico</i>	2.04±0.21	1.74±0.17	3.47±0.10
<i>Behénico</i>	1.53±2.16	1.89±2.13	2.02±0.13
<i>Gamma Linolenico</i>	1.02±0.44	0.57 ±0.37	0.74±0.03
<i>Araquídico</i>	0.78±0.21	0.39±0.28	0.75±0.18
<i>Linoleico</i>	0.62±0.35	0.11±0.42	0.30±0.13
<i>MUFA</i>	6.01	5.44	5.41
<i>PUFA</i>	85.96	87.33	88.02
<i>SFA</i>	8.03	7.23	6.57

Fuente: Elaboración propia (2020).

Tabla 18. Resumen del contenido de tocoferoles en muestras 2 y 3.

	<i>sc - CO₂</i> (320 bar, 50 °C; ~4,05 kg/h)	<i>sc - CO₂</i> (320 bar, 60 °C; ~4,05 kg/h)
Tocoferoles (mg/100 g aceite)		
<i>Gamma y beta</i> <i>tocoferol</i>	52.71	42.07
<i>Gamma y beta</i> <i>sitosterol</i>	37.23	41.20
<i>Campesterol</i>	5.78	7.49
<i>Stigmasterol</i>	3.13	5.43
<i>Vitamina E</i>	1.15	3.81

Fuente: Elaboración propia (2020).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Los análisis de composición centesimal (Ver Tabla 7), específicamente en semillas muestran una notoria variación en cuanto al porcentaje de humedad con 67,2730 %, cenizas con 3,03%, lípidos con 18,35 y proteínas con un 17,96%; de acuerdo a los valores que el presentado por Juan B. Peris Gisbert, Gerardo Stübing, Ramón Figuerola. Domenech (1996) que fueron respectivamente del 25,66%; 3,62%; 10,33% y 10,42%. Encontrándose una gran similitud en cuanto al contenido de cenizas y una gran diferencia en el porcentaje de humedad. El contenido de lípidos que se realizó mediante equipo Soxhlet tuvo un porcentaje mayor en comparación con dicho estudio. Así como el porcentaje de proteínas fue también mayor según lo que sostuvieron dichos autores.

En los resultados presentados en el cuadro ANOVA (ver Tabla 9), la hipótesis nula establece que los valores de temperaturas en tratamiento influyen en el rendimiento de extracción de aceite de semilla de granada. Entonces, puesto que el valor p es menor que el nivel de significancia de 0.05, se puede rechazar la hipótesis nula y concluir que las temperaturas de 40, 50 y 60 °C a presión constante de 320 bar sí presentan un nivel de significancia tal en los efectos de rendimiento de extracción de aceite de semilla de granada entre intervalos de tiempo de 100, 200 y 300 min, factor que interactúa en el aumento de extracción de aceite porque es progresivo a medida que transcurren las horas. A presión constante de 320 bar y la temperatura de 40; 50 y 60 °C, se presenta un aumento en el rendimiento de extracción de aceite de semilla de granada en ese orden. Esto se debe fundamentalmente a la densidad y viscosidad del $sc - CO_2$. A 40 °C la densidad es mayor y mientras aumenta la temperatura, esta disminuye, por lo tanto, su poder de disolución es menor, pero ocurre lo contrario con la viscosidad pues a la misma temperatura, esta es mayor y a 60 °C, es menor, por lo tanto, el fluido tiene mayor capacidad de movimiento, transportando los extractos con mayor facilidad. En ese sentido el rendimiento de extracción del aceite de semilla de granada fue mayor a una presión constante de 320 bar, una temperatura de 60 °C y un tiempo de 300 min (5 hrs.) con un 19,53 %.

En cuanto a los rendimientos de extracción que observa que los factores que influyen en estos resultados son la presión fundamentalmente y la temperatura, siendo también importante mencionar el flujo de CO₂ empleado, que determina la relación

másica entre la cantidad de disolvente a emplear por la cantidad de la materia prima en uso. Estas condiciones de presión y temperatura determinarán el mejor rendimiento de extracción además por la interacción de dos propiedades fisicoquímicas tales como la densidad y la viscosidad, considerando que el CO₂ a diferente presión y temperatura modifica en sí, estas propiedades, logrando variar la obtención de extracto en la experimentación. Al respecto, Verardo et al., (2014) determinaron el contenido total de PSO que varió entre 7.9 y 16 %, valor inferior al encontrado en el presente estudio, y lo que reportaron Natolino y Da Porto (2019) con su mayor rendimiento de extracción en 0,18 g aceite/g sólido insoluble, es decir, 18 % en condiciones similares, fue efectuado a 320 bar, 60 °C y 8 kg/h de flujo de CO₂.

En esa dirección resultados similares fueron reportados por Ahangari y Sargolzaei (2012) y Liu et al. (2009). Sin embargo, es para subrayar que el diseño Método de superficie de respuesta (RSM) aplicado por este último predijo un rendimiento máximo con un flujo de CO₂ de 20 kg/h, en lugar de 10 kg/h, según lo encontrado por Ahangari y Sargolzaei (2012) y 8 kg/h según resultados obtenidos por Natolino y Da Porto (2019); aun así, Liu et al. (2009) reportan un flujo de 15 L/h medido en una unidad de volumen por una unidad de masa. Se debe considerar que el volumen y la relación másica se da por interacción directa de la densidad que, en condiciones de presión sobre los 300 bar, la densidad es más cercana a 1. Es de notar que la tasa de flujo de disolvente es un factor involucrado en la estimación de costos de extracción del producto $sc - CO_2$, pues sostiene la cantidad de disolvente a emplear por materia prima empleada.

Liu et al., (2009) sostiene que a altas presiones, el comportamiento de la temperatura es mucho mejor en cuanto al rendimiento de extracción. A pesar de que a bajas temperaturas la densidad disminuye junto con su capacidad de disolución, a partir de 320 bar mientras más altas sean las temperaturas, mayor será el rendimiento de aceite obtenido. Esto se debe, al punto de cruce entre la compleja interacción de la presión y la temperatura, donde solo se refuerza el hecho de que la presión es la variable que tiene un efecto significativo sobre el rendimiento de extracción, dichos autores reportaron 13,94 % de rendimiento, inferior a lo obtenido en el presente estudio. Según Natolino y Da Porto (2019) un aumento de la temperatura de 40 °C a 60 °C y de la presión hasta 320 bar, conduce al rendimiento de extracción de 0,12 g de aceite/ g de sólido insoluble a 0,18 g de aceite/g de sólido insoluble. Esto indica que la presión de vapor de soluto juega un papel dominante en

la densidad de CO₂, finalmente según lo reportado a partir de 280 bar podría darse la presión de cruce a la cual cambia el efecto de la temperatura sobre la solubilidad del CO₂ pues además es donde convergen los rendimientos isotérmicos. Las temperaturas en manejo oscilan entre los 40 y 60 °C, viéndose directamente afectadas en su comportamiento por la presión. Ozkal, Yener, y Bayindirli, (2006) informaron también sobre el punto de cruce de la presión en la extracción de aceite de albaricoque entre 200 y 300 bar, Xu, H., et al., (2008) a aproximadamente 300 bar para el aceite de espino amarillo; Jokić et al., (2013) a 250 bar para el aceite de soja.

Por otro lado, respecto al modelamiento matemático, Liu et al., (2009) realizaron mediante regresión de coeficientes, la determinación de la ecuación de optimización, lo que les permitió obtener una predicción en el rendimiento esperado, el cual fue de 15,63 % en base seca bajo la condición de presión 379 bar y temperatura 47,0 °C y con una tasa de flujo de CO₂ de 21,3 L/h. En el presente estudio también se hizo una ecuación de optimización para predecir el rendimiento esperado, el cual se podría ser hasta de 27,7 %.

También Ahangari y Sargolzaei (2011) señalan que con extracciones de dióxido de carbono, a mayor presión tienen un efecto positivo, pero así mismo, en aumento de la temperatura se tuvo un efecto negativo en el rendimiento de extracción por la disminución de la densidad y por ende la disminución del poder de disolución, pero la viscosidad al disminuir en la misma línea secuencial de comportamiento tiene mayor capacidad de movimiento para transportar los solutos. El autor también reporta el rendimiento de extracción y la composición del aceite. Los experimentos de extracción que realizó con *sc - CO₂* y hexano por el método Soxhlet fueron con la finalidad de comparar rendimiento de extracción. En soxhlet, este fue de 22,31 % p / p. Mientras que con *sc - CO₂*, de 13,06 % p/p, inferior al rendimiento obtenido en el presente estudio, donde también se realizó extracción en equipo soxhlet (ver anexos 1, figura 32) que se realizó con la misma intención de comparar y tener una referencia para el rendimiento, el cual fue de 18,53 % en 7 h de extracción.

Las condiciones de extracción se establecieron teniendo en cuenta algunos estudios relacionados con la extracción de aceites de semillas de frutas (Cardoso, R., Rossi, M., Gimenez, L., Jagadevan, S., Machado Giufrida, 2013; Liu et al., 2009). El tiempo de extracción se fijó en 300 min, ya que bajo este tiempo se alcanza una cantidad aceptable de aceite sin tener un gasto excesivo de CO₂. El flujo se estimó en ~4,05 kg/h, obteniendo una relación disolvente/materia o solvent/feed en inglés S/F de ~20 Kg/35 g, que dependerá de la presión y la densidad correspondiente del

CO₂ (Kg CO₂/g semilla), cuyo valor, se encuentra dentro del rango recomendado en literatura (Ibáñez, E., Hurtado Benavides, A.; Señoráns, 2002; Pereira de Melo, Illana y Carvalho, Eliane y Filho, 2014).

El perfil de ácidos grasos del PSO presentado en las muestras GCC1, 2 y 3 es similar a lo reportado por Abbasi, Rezaei, y Rashidi, (2008) y Ahangari y Sargolzaei, (2012); encontrando al ácido púnico (C18:3) como ácido graso mayoritario, seguido del ácido esteárico (C18:0), palmítico (C16:0), oleico (C18:1), lignocérico (C24:0), araquídico (C20:0), el ácido linoleico (C18:2) y behénico (C22:0); este último en menor proporción.

Del mismo modo Liu et al., (2009) a condiciones de extracción supercrítica de 300 bar; 50 °C; 15 L/h, reportó al ácido púnico, linoleico, oleico, palmítico, esteárico, araquídico, gadoleico y palmitoleico; estos dos últimos no fueron encontrados en el presente estudio, pero cabe mencionar que el autor los encuentra en menor proporción sobre su perfil presentado. En cuanto al porcentaje de ácido púnico (Tabla 14) encontrado, este estudio presenta valores, que oscilan por encima del 59 %. Inferior a lo reportado en el presente estudio que fue del 83-86 %. Entre estos valores está lo reportado por Verardo et al. (2014), con un porcentaje de ácido púnico del rango de 74 a 85 %, además de tres ácidos grasos como el ácido oleico, linoleico y palmítico. Natolino y Da Porto (2019) A su vez reportó un 85,4 % de ácido púnico, valor similar al encontrado en el presente estudio.

En cuanto a los tocoferoles (Tabla 16) según el área representada en porcentaje, el compuesto mayoritario fue el Gamma tocoferol con un 22,5959 %, porcentaje menor al reportado por Verardo et al., (2014), que encontró entre 87,9 a 95,0 % del total de tocoferoles para el γ -tocopherol además del campesterol, estigmasterol y sitosterol; similar del contenido de tocoferoles encontrados en el presente estudio, donde también Liu et al., (2009), reportaron al γ -tocopherol como el más predominante en el PSO.

Durđević et al., (2017) realizó pretratamiento con microondas para romper la estructura molecular y facilitar la acción de los solventes de extracción en las semillas de granada obteniendo un rendimiento del 27,2 % con una potencia de 250 W durante 6 min. Aumentando la eficiencia de la extracción considerablemente.

CONCLUSIONES

- Se estudió la operación de extracción usando los parámetros de temperatura en 40 °C, 50 °C y 60 °C y el tiempo en intervalos de 1 a 5 h a presión constante de 320 con la finalidad de optimizar el rendimiento de extracción; los valores fueron fijados mediante un diseño central compuesto rotacional que generó un total de 13 experimentos.
- El mayor rendimiento de extracción se produjo al aplicar los parámetros de temperatura de 60 °C y una presión de 320 bar a un flujo de ~4,05 kg/h. Resultando un porcentaje de extracción de PSO del 19,53 %.
- Se determinó la ecuación del modelo matemático para optimizar el proceso de extracción. Ésta permite predecir un máximo de extracción de 27,7% cuando la temperatura está sobre los 60 °C y el tiempo fluctúa entre 5 y 6 h.
- En el perfil de ácidos grasos el compuesto mayoritario fue el ácido púnico o ácido Linolénico n5 (86.97 ± 0.30 %) ácido oleico (5.41 ± 0.11 %), ácido esteárico (3.47 ± 0.10 %), ácido palmítico (2.02 ± 0.13 %), ácido araquídico (0.75 ± 0.18 %), ácido γ linolénico (0.74 ± 0.03 %) y en menor proporción al ácido linoleico (0.30 ± 0.13 %), ácido behénico (0,24 %) y el ácido heptadecanoico (0,09 %). En cuanto al contenido de tocoferoles y esteroides, el compuesto mayoritario fue el γ tocoferol (22,5959 %), γ y β sitoesterol (17,2797 %), el campesterol y γ ergostenol (4,0219 %), estigmasterol (2,9169 %) y la vitamina E (2,0438 %). Destaca la presencia de escualeno con 46,2937 % como precursor principal de los tocoferoles.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que las semillas deben ser lavadas (no deben contener rastros de arilo), y secadas aproximadamente a 40 °C durante 10 horas para aumentar el rendimiento de extracción real y determinar los biocompuestos de interés presentes sin interferencia de otros compuestos que pudiesen existir en el arilo, los cuales se degradan por actividad enzimática de la fosfolipasa, que genera oxidación lipídica en las semillas.
- Debe realizarse un análisis de materia insaponificable en el extracto de aceite para obtener un rendimiento más exacto en cuanto al resultado de ácidos grasos.
- Se recomienda considerar el efecto de las propiedades fisicoquímicas de densidad y viscosidad en la extracción supercrítica de acuerdo a los parámetros establecidos de temperatura y presión del $sc - CO_2$.
- El escualeno como precursor de los tocoferoles, presentó un alto porcentaje en el PSO, lo cual supone un estudio para futuras investigaciones relacionadas a este compuesto.
- La aplicación de pretratamientos en la matriz vegetal, como el uso de microondas o ultrasonido, puede resultar en un mayor rendimiento en la obtención de biocompuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbasi, H., Rezaei, K., Emamdjomeh, Z., Mousavi, S. M. E. (2008). Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 110(5), 435–440.
- Abbasi, H., Rezaei, K., & Rashidi, L. (2008). Extraction of Essential Oils From the Seeds of Pomegranate Using Organic Solvents and Supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(1), 83–89. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1158-x>
- Ahangari, B., & Sargolzaei, J. (2011). RETRACTED ARTICLE: Supercritical Fluid Extraction of Oils from Pomegranate Seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(11), 1415–1415. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1789-9>
- Ahangari, B., & Sargolzaei, J. (2012). Extraction of pomegranate seed oil using subcritical propane and supercritical carbon dioxide. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*, 46(3), 258–265. <https://doi.org/10.1134/S0040579512030013>
- Al-Maiman, S. A., & Ahmad, D. (2002). Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit maturation. *Food Chemistry*, 76(4), 437–441. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00301-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00301-6)
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- BALL, G. (1988). Fat-soluble Vitamin assays in food analysis, An comprehensive review. *Elsevier Science Publishers. New York. USA.*, 326.
- Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., & O'Keefe, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120(4), 1185–1192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.063>
- BLANCO, A. (2001). Vitaminas. In: Química biológica. *El Ateneo. Argentina.*, 605.
- Boussetta T, Raad H, Letteron P, Gougerot-Pocidallo MA, Marie JC, D. F. y E.-B. J. (2009). Punicic acid, a conjugated linolenic acid, inhibits TNF α -induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in

rats. *PLoS One* 4(7):6458.

- Bramley, P. M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F. J., Manios, Y., Roxborough, H. E., ... Wagner, K. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 913–938. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<913::AID-JSFA600>3.3.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<913::AID-JSFA600>3.3.CO;2-V)
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67(1–2), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060>
- Cabrera, E., León, V., Montano, A. & Dopico, D. (2016). Caracterización de residuos agroindustriales con vistas a su aprovechamiento. *Centro Azúcar* 43, 27-35., 43, 27–35.
- Cam M, Erdogan F, Aslan D, D. M. pomegranate by-products. J. F. S. (2013). Enrichment of functional properties of ice cream with pomegranate by-products. *J Food Sci.*, 78, 1543–50.
- Cardoso, R., Rossi, M., Gimenez, L., Jagadevan, S., Machado Giufrida, W. y S. D. (2013). Extraction of passion fruit seed oil using supercritical CO₂: a study of mass transfer and rheological property by Bayesian inference. *Grasas y Aceites* 64(4), 400–406.
- Casas, L. & S. C. (2014). Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales. *Revista Digital Universitaria*, 15 (12), 1–15.
- Coursodon-Boyiddle, C. F., Snarrenberg, C. L., Adkins-Rieck, C. K., Bassaganya-Riera, J., Hontecillas, R., Lawrence, P., ... Dvorak, B. (2012). Pomegranate seed oil reduces intestinal damage in a rat model of necrotizing enterocolitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(6), G744–G751. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00248.2012>
- Cury, K., Aguas, Y., Martínez, A., Olivero, R. & Chams, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 9, 122–132.
- DC., L. (1993). The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol.*, 23(2), 147-69.
- de O. Silva, L., Ranquine, L. G., Monteiro, M., & Torres, A. G. (2019). Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil enriched with conjugated linolenic acid (cLnA), phenolic compounds and tocopherols: Improved extraction of a specialty oil by

- supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 147, 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.02.019>
- Dorado, D. J., Hurtado-Benavides, A. M., & Martínez-Correa, H. A. (2016). Extracción con CO₂ Supercrítico de Aceite de Semillas de Guanábana (*Annona muricata*): Cinética, Perfil de Ácidos Grasos y Esteroles. *Información Tecnológica*, 27(5), 37–48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000500005>
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Review*, 82(1), 47–95.
- Durđević, S., Milovanović, S., Šavikin, K., Ristić, M., Menković, N., Pljevljakušić, D., ... Bogdanović, A. (2017). Improvement of supercritical CO₂ and n-hexane extraction of wild growing pomegranate seed oil by microwave pretreatment. *Industrial Crops and Products*, 104, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.024>
- Eikani, M. H., Golmohammad, F., & Homami, S. S. (2012). Extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using superheated hexane. *Food and Bioprocess Processing*, 90(1), 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.002>
- Esquivel-Hernández, D. A., Ibarra-Garza, I. P., Rodríguez-Rodríguez, J., Cuéllar-Bermúdez, S. P., Rostro-Alanis, M. de J., Alemán-Nava, G. S., ... Parra-Saldívar, R. (2017). Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11(1), 215–231. <https://doi.org/10.1002/bbb.1735>
- Fernandes, L., Pereira, J. A., López-Cortés, I., Salazar, D. M., Ramalhosa, E., & Casal, S. (2015). Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.006>
- Geankoplis, C. J. (1999). *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias. Compañía Editorial Continental. México., 3era Edici.*
- Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2010). A new technique for spray drying orange juice concentrate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.12.001>
- Gutiérrez Estrada Julissa Yubicsa & Terrones Blas Lizbeth Janira. (2016). *CARACTERIZACION FISICOQUIMICA Y ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL*

ACEITE DE SEMILLA DE GRANADA (Púnica Granatum).

- Hao, J., Han, W., Huang, S., Xue, B., & Deng, X. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology*, 28(3), 191–196. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(02\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(02)00043-6)
- Hurtado, B. A. M. (2002). *Estudio del proceso de extracción de componentes minoritarios de aceite de oliva con CO2 supercrítico en contracorriente.*
- Ibáñez, E., Hurtado Benavides, A.; Señoráns, F. y G. R. (2002). Concentration of Sterols and Tocopherols from Olive Oil with Supercritical Carbon Dioxide. *JAACS*: 79(12), 1255–1260.
- Jing, P., Ye, T., Shi, H., Sheng, Y., Slavin, M., Gao, B., ... Yu, L. (Lucy). (2012). Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. *Food Chemistry*, 132(3), 1457–1464. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.002>
- Jokić, S., Sudar, R., Svilović, S., Vidović, S., Bilić, M., Velić, D., & Jurković, V. (2013). Fatty acid composition of oil obtained from soybeans by extraction with supercritical carbon dioxide. *Czech Journal of Food Sciences*, 31(No. 2), 116–125. <https://doi.org/10.17221/8/2012-CJFS>
- JS., J. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev.*, 13(2):128-.
- Juan B. Peris Gisbert, Gerardo Stübing, Ramón Figuerola. Domenech, F. (1996). *Guía de Las Plantas Medicinales de la Comunidad Valenciana.*
- Kaufman, M., & Wiesman, Z. (2007). Pomegranate Oil Analysis with Emphasis on MALDI-TOF/MS Triacylglycerol Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10405–10413. <https://doi.org/10.1021/jf072741q>
- Kinami, T., Horii, N., Narayan, B., Arato, S., Hosokawa, M., Miyashita, K., ... Shirasawa, S. (2007). Occurrence of Conjugated Linolenic Acids in Purified Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(1), 23–29. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1005-5>
- Klingberg, S., Ellegård, L., Johansson, I., Hallmans, G., Weinehall, L., Andersson, H., & Winkvist, A. (2008). Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(4), 993–1001. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.993>

- Lansky EP, N. R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.*, 109(2), 177–206.
- Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 513–539. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.005>
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>
- Liu, G., Xu, X., Hao, Q., & Gao, Y. (2009). Supercritical CO₂ extraction optimization of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 42(9), 1491–1495. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.04.011>
- LIU, Y., SHI, J., & LANGRISH, T. (2006). Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical Engineering Journal*, 120(3), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.02.015>
- Llerena Huaracha, G. C. (2017). *Efecto de la intensidad lumínica y espectro de luz en calidad del fruto de granado (punica granatum) var. wonderful en la irrigación San Camilo – Arequipa.*
- Martínez, J. J., Melgarejo, P., Hernández, F., Salazar, D. M., & Martínez, R. (2006). Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. 110, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.018>
- McFarlin BK, S. K. y K. M. (2008). Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice. *Brith J Nutr*, 102, 54–59.
- Melgarejo, P., Salazar, D. M., Amorós, A., & Artés, F. (1995). Total lipids content and fatty acid composition of seed oils from six pomegranate cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69(2), 253–256. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740690216>
- Mirdehghan, S. H., & Rahemi, M. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 111(2), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.001>

- Mirmiran, P., Fazeli, M. R., Asghari, G., Shafiee, A., & Azizi, F. (2010). Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *British Journal of Nutrition*, 104(3), 402–406. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000504>
- Mohagheghi M, Rezaei K, Labbafi M, M. M. (2011). Pomegranate seed oil as a functional ingredient in beverages. 2011;113:730–6. *Eur J Lipid Sci Technol*, 113, 730–736.
- Natolino, A., & Da Porto, C. (2019). Supercritical carbon dioxide extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed oil: Kinetic modelling and solubility evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 151, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.05.002>
- Navas Hernández, P. B. (2010). *Componentes minoritarios y propiedades antioxidantes de aceites vírgenes y tortas residuales obtenidos por presión en frío a partir de fuentes vegetales convencionales y no convencionales. RUIDERA (Repositorio Universitario Institucional de Recursos Abier.*
- Ostlund RE Jr. (2002). Phytosterols in human nutrition. *Nnu ARev Nutr.*, 22, 533–549.
- Ozkal, S. G., Yener, M. E., & Bayindirli, L. (2006). The solubility of apricot kernel oil in supercritical carbon dioxide. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(4), 399–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01085.x>
- Pereira de Melo, Illana & Carvalho, Eliane & Filho, J. (2014). Pomegranate Seed Oil (*Punica Granatum L.*): A Source of Punicic Acid (Conjugated α -Linolenic Acid). *Journal of Human Nutrition & Food Science.*
- Pita G. (1997). Funciones de la Vitamina E en la Nutrición Humana. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*, 11, 46–57.
- Rodrigues, V. M., Sousa, E. M. B. D., Monteiro, A. R., Chiavone-Filho, O., Marques, M. O. M., & Meireles, M. A. A. (2002). Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure+solute+solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 22(1), 21–36. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(01\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(01)00108-5)
- Rozzi, N. L., & Singh, R. K. (2002). Supercritical Fluids and the Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(1), 33–44. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00005.x>
- Sánchez, M. D. M., C. Mantell., M. Rodríguez., E. Martínez de la Ossa., L. M. L. y O.

- M. (2005). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylla from *Nannochloropsis gaditana*. *J. Food Eng*, 66, 245–251.
- SCHNEIDER, C. (2005). Review chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 7 – 30.
- Shafiur & Conrad. (2003). Manual de conservación de los alimentos. *Editorial Acribia*.
- Silva, L. M. R. da, Figueiredo, E. A. T. de, Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., Figueiredo, R. W. de, Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>
- Tezcan, F., Gültekin-Özgüven, M., Diken, T., Özçelik, B., & Erim, F. B. (2009). Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115(3), 873–877. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.103>
- Thomas, A. (2000). Fats and Fatty Oils. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. https://doi.org/10.1002/14356007.a10_173
- Tonthubthimthong, P., S. Chuaprasert., P, Douglas. y W, L. (2001). Supercritical CO2 extraction of nimbin from neem seeds an experimental study. *J. Food Eng*, 47, 289–293.
- Uribe Lescano, J. A. (2016). Estudio de prefactibilidad para la instalación de una empresa productora de granada (*Punica granatum* L. var. Wonderful) para su comercialización en el mercado internacional. *Repositorio UNALM*.
- Vagi, E., B. Simandi., A. S. y E. H. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, 38, 51–57.
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, 18(1). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642007000100009>
- Verardo, V., Garcia-Salas, P., Baldi, E., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., & Caboni, M. F. (2014). Pomegranate seeds as a source of nutraceutical oil naturally rich in bioactive lipids. *Food Research International*, 65, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.044>
- Wark, K. (1985). Termodinámica. *McGraw-Hill Inc., México, D. F., México, 4a edición*,

792.

Xu, H., Yang, J., Wang, Y., Jiang, Q., Chen, H., and Song, H. (2008). Exposure to 17 α -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 88(1), 1-8.

Yamasaki, M., Kitagawa, T., Koyanagi, N., Chujo, H., Maeda, H., Kohno-Murase, J., ... Yamada, K. (2006). Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutrition*, 22(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.03.009>

www.freshplaza.es. (2020). Recuperado 6 de junio de 2020, de Freshplaza website: <https://www.freshplaza.es/article/9133461/peru-las-exportaciones-de-granada-wonderful-aumentan-un-13/>

www.freshplaza.es. (2019). Recuperado 6 de junio de 2020, de Freshplaza website: <https://www.freshplaza.es/article/9200452/la-produccion-de-granada-en-peru-se-multiplico-por-5-entre-2014-y-2018/>

ANEXOS 1

ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA



Figura 23. Granada Wonderful de Ite (Distrito).



Figura 24. Acondimio de MP.



Figura 25. Arilos de granada.



Figura 26. Secado en bandejas de semillas de granada.



Figura 27. Semillas de granada sin arilo.



Figura 28. Estufa de secado.



Figura 29. Semillas de granada limpias y secas.



Figura 30. Semillas de granada molidas y pesadas en papel filtro.

EXTRACCIÓN EN EQUIPO SOXHLET



Figura 31. Extracción Soxhlet.



Figura 32. Aceite de semilla de granada obtenido por método Soxhlet.

EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA



Figura 33. Tanque de CO2.



Figura 34. Bombas de circulación de CO2

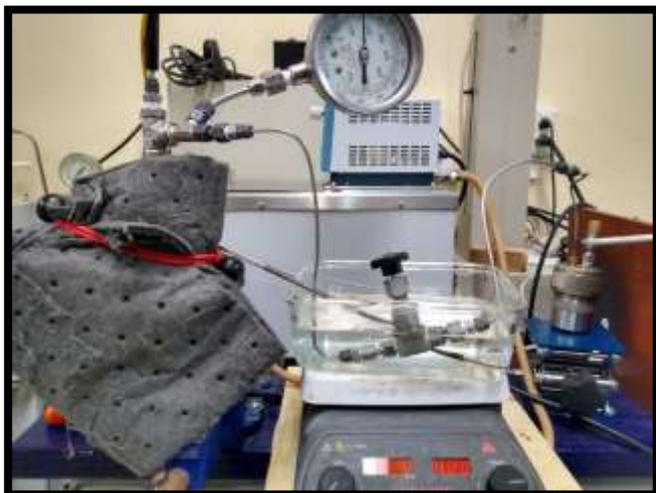


Figura 35. Equipo de extracción supercrítica (adaptado) para 50 g de muestra.



Figura 36. Válvula de expansión del CO₂ a temperatura óptima y manómetro.



Figura 37. Termómetro tipo K/J EXTECH.



Figura 38. Celda de extracción con aislamiento integrado.



Figura 39. Aceite de semilla de granada obtenido por $sc - CO_2$ con SFE.



Figura 40. Cromatógrafo MSD – Mass Selective Detection.

ANEXO 2

BALANCE DE MATERIA

Cálculo de rendimiento esperado de aceite por distribución porcentual

Total del peso de fruta: 56,42 kg – 100 %

Peso de las cáscaras y membranas carpelares: 20,58 kg – representa el 50 %

Peso de la matriz vegetal y semillas – 50 %

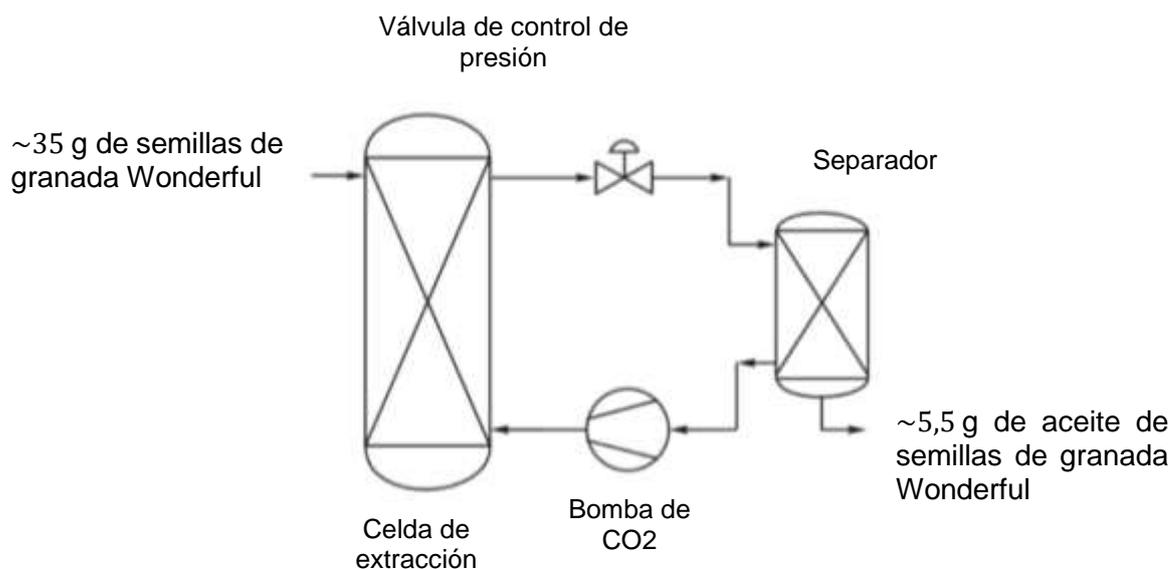
Peso de arilos y semillas sin prensar: 35,84 kg – representa el 40 %

Peso de solo semillas: 10,78 kg – representa el 10 %

Según la bibliografía referida por diversos autores, el rendimiento de aceite de semilla de granada oscila entre el 12-20 %. Por lo tanto, se obtiene 1,2 % de aceite de semilla de granada por kg de fruta, eso equivale aproximadamente entre 12 y 20 g de aceite de semilla de granada por kg de fruta.

Peso de las semillas limpias y secas: 5,1769 kg del peso de la fruta total.

➤ En el presente estudio se obtuvo como rendimiento mayor el 19,53 % de aceite de semilla de granada.



Aproximadamente 30 g de semilla de granada quedaron luego de 5 h de extracción, hasta que la curva exponencial se detuvo y con ella el aceite en obtención.

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<ul style="list-style-type: none"> • ¿Es posible extraer biocompuestos lipídicos a partir de semillas de granada, tales como, ácidos grasos, tocoferoles y esteroides, mediante la tecnología supercrítica con CO₂? <p>PROBLEMAS ESPECIFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuáles son los parámetros en; temperatura, presión y proporción de solvente sc-CO₂ a emplear para optimizar el proceso? • ¿Cuál es el rendimiento que se obtiene mediante el método de extracción dinámica de biocompuestos a partir de las semillas de granada? • ¿Qué metodología permite realizar el análisis de las muestras de compuestos bioactivos, su identificación y cuantificación? • ¿Qué características tienen las curvas de extracción según los grupos de biocompuestos lipídicos? 	<p>Extraer de forma sucesiva y exhaustiva de semillas de granada, de compuestos bioactivos tales como, ácidos grasos, tocoferoles y esteroides, mediante tecnología supercrítica con CO₂.</p> <p>OBJETIVOS ESPECIFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar los parámetros de temperatura, presión y proporción de solvente sc-CO₂ a emplear para optimizar el proceso. • Determinar el rendimiento de aceite mediante un método de extracción dinámica de biocompuestos a partir de las semillas de granada. • Analizar las muestras de compuestos bioactivos para la identificación y cuantificación de los mismos. • Determinar las características que tienen las curvas de extracción según los grupos de biocompuestos lipídicos. 	<p style="text-align: center;">HIPOTESIS GENERAL</p> <p style="text-align: center;">El empleo de sc- CO₂ favorece la extracción de biocompuestos lipídicos asociados al aceite de semilla de granada.</p> <p style="text-align: center;">HIPOTESIS ESPECIFICA</p> <p style="text-align: center;">H1: En la extracción con sc-CO₂ de biocompuestos activos de matrices vegetales, se favorecerá la extracción de compuestos no polares como aceites, pero también se extraerán compuestos solubles en ese aceite. Así mismo el rendimiento de extracción se verá sujeto a las variables de temperatura, presión y caudal según los tratamientos planteados en el diseño experimental.</p>	<p style="text-align: center;">VARIABLE INDEPENDIENTE</p> <p>Parámetros de control en el proceso de extracción exhaustiva.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Temperatura, tiempo y presión <p>Se encontró los siguientes parámetros a controlar en su obtención: temperatura (°C), presión (bar) y proporción del solvente sc- CO₂ (Kg de CO₂/g de muestra insoluble). Este último está determinado por el caudal de CO₂ en ml/min.</p> <p style="text-align: center;">VARIABLE DEPENDIENTE</p> <p>Rendimiento (g de aceite/ g de muestra) y análisis de extractos de interés obtenidos mediante curvas y superficie respuesta.</p>	<p style="text-align: center;">TIPO DE INVESTIGACIÓN</p> <p style="text-align: center;">Experimental</p> <p style="text-align: center;">DISEÑO DE INVESTIGACIÓN</p> <p>Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR) con 2² + estrella o 2k con 5 puntos factoriales, 5 puntos estrellas y 5 repeticiones en el punto central para un total de 13 experimentos en el software estadístico MINITAB 18. Los niveles de extracción de aceite de semillas de granada se llevó a cabo en un rango de temperaturas entre 40, 50 y 60 °C, a presión constante de 320 bar y un tiempo entre 60 y 300 minutos, utilizando un flujo de ~4,05 kg/h de CO₂.</p>