

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS  
OBTENIDOS CON CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO A PARTIR DE RESIDUOS DE LA  
INDUSTRIA DE PALMA DE ACEITE ( *Elaeis guineensis* Yaq)**

**TESIS**

**Presentada como requisito parcial**

**Para optar al título de**

**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Bogotá D.C.**

**Julio de 2009**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y responsable la justicia".

Artículo 23 de la Resolución No13

## **DEDICATORIA**

*A Jairo, Felipe y Natalia por prestarme para este trabajo el tiempo que les pertenece.*

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS  
OBTENIDOS CON CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO A PARTIR DE RESIDUOS DE LA  
INDUSTRIA DE PALMA DE ACEITE (*Elaeis guineensis* yaq)**

**LIGIA INÉS RODRÍGUEZ PIEDRAHITA**

**APROBADO**

---

Carlos Corredor PhD.  
Director

---

Ludis Morales PhD.  
Jurado 1

---

Yadira Cortes M.Sc  
Jurado 2

---

Gerardo González PhD.  
Jurado 3

## **AGRADECIMIENTOS**

Dr. Carlos Corredor por sus enseñanzas, orientación y enorme paciencia.

Dra. Yadira Cortes por el apoyo logístico en el desarrollo de la parte experimental.

Dra. Martha Guerra por su orientación y apoyo en los temas de Bioquímica clínica.

Dr. Pedro Monterrey por su invaluable colaboración en los temas estadísticos.

A los donantes voluntarios por facilitar su sangre para los propósitos del estudio.

A Colciencias y la Universidad Jorge Tadeo Lozano por la financiación del proyecto que dio origen a esta tesis bajo en contrato 580-2004.

A Fausto Prada del Centro de Investigaciones en palma de aceite por el apoyo en las determinaciones de vitamina E por HPLC.

A todos aquellos que de una u otra forma me apoyaron en el desarrollo de este trabajo.

## Contenido

1	INTRODUCCIÓN .....	14
2	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	18
2.1	Extracción supercrítica.....	28
2.1.1	Fluido Supercrítico.....	28
2.1.2	Mecanismo de Extracción.....	30
2.1.3	Ventajas de la extracción con fluidos supercríticos .....	32
2.2	La industria de Palma en Colombia .....	18
2.3	Proceso productivo del aceite de Palma.....	19
2.4	Subproductos de la industria de palma de aceite: .....	25
2.5	Características químicas de la Vitamina E.....	28
2.5.1	Efectos sobre la Salud .....	35
2.6	Mecanismo general de los procesos oxidativos .....	35
2.7	Medición de la actividad antioxidante .....	38
2.8	Medición de la capacidad de atrapar radicales libres.....	40
3	OBJETIVOS .....	41
3.1	Objetivo general .....	41
3.2	Objetivos específicos .....	41
4	METODOLOGÍA .....	42
4.1	Reactivos y equipos.....	42
4.2	Toma de muestras de material vegetal.....	43
4.3	Extracción supercrítica.....	44
4.3.1	Procedimiento de extracción.....	45
4.3.2	Acondicionamiento del material vegetal para la extracción .....	46
4.4	Evaluación del contenido de vitamina E:.....	46
4.5	Análisis de la capacidad protectora in vitro de los tocoferoles y tocotrienoles presentes en los extractos sobre la oxidación de la LDL.....	48
4.5.1	Toma de muestra.....	48
4.5.2	Obtención de las fracciones de lipoproteínas LDL.....	49
4.5.3	Oxidación in vitro de la fracción lipoproteínas de baja densidad (LDL) 49	
4.5.4	Expresión de los resultados.....	50

4.6	Actividad antioxidante frente a generadores de radicales libres.....	50
4.7	Manejo estadístico de los resultados.....	52
5	RESULTADOS.....	53
5.1	Contenido de Vitamina E en el aceite rojo de la Fibra.....	53
5.2	Distribución de los isómeros de vitamina E en los extractos vegetales.....	55
5.3	Contenido de vitamina E en el extracto de foliolos.....	58
5.4	Resultados de extracción supercrítica.....	62
5.4.1	Recuperación de aceite rojo a partir de fibra seca.....	62
5.4.2	Concentración de vitamina E en el aceite rojo extraído de la fibra....	64
5.4.3	Concentración de vitamina E en los extractos de foliolos.....	65
5.5	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SOBRE LDL.....	67
5.5.1	Caracterización de las muestras de sangre.....	67
5.5.2	Determinación del tiempo de latencia.....	68
5.5.3	Tiempo de latencia de las LDL frente a los tratamientos.....	68
5.5.4	Comportamiento de las cinéticas de oxidación de las LDL enriquecidas con los distintos extractos.....	74
5.6	Actividad antioxidante frente a DPPH.....	75
5.6.1	Actividad antioxidante frente a DPPH de vitamina E comercial.....	75
5.6.2	Actividad antioxidante frente a DPPH de extractos de fibra obtenidos por extracción supercrítica.....	77
5.6.3	Actividad antioxidante frente a DPPH de extractos de foliolos obtenidos por extracción supercrítica.....	80
6	CONCLUSIONES.....	83
7	BIBLIOGRAFIA.....	85

## Índice de tablas

Tabla 1 Valores Aproximados de Densidades, Viscosidades, Coeficientes de Difusión de Gases, Fluidos Supercríticos y Líquidos. ....	29
Tabla 2, Resultados obtenidos de la extracción con fluidos supercríticos de diferentes materiales vegetales. ....	33
Tabla 3 Determinación del estado oxidativo .....	37
Tabla 4 Plantaciones que participaron en el muestreo .....	44
Tabla 5 Condiciones de la fase móvil en el análisis de vitamina E por HPLC .....	47
Tabla 6. Contenido de aceite rojo y tocoferoles y tocotrienoles en fibra de palma .....	54
Tabla 7. ANOVA para Tocoferoles totales según Región de origen .....	55
Tabla 8. ANOVA para Tocotrienoles totales según Región de origen .....	55
Tabla 9. Distribución porcentual de los isómeros.....	57
Tabla 10. Contenido de vitamina E como $\alpha$ -tocoferol para las diferentes hojas y zonas.. ....	60
Tabla 11. Resultados del análisis estadístico realizado a los resultados de análisis de vitamina E en foliolos. ....	60
Tabla 12 Vitamina E por zona de la hoja .....	61
Tabla 13. Contenido de $\alpha$ -Tocoferol por numero de hoja.....	61
Tabla 14 Porcentaje de extracto recuperado sobre muestra seca.....	63
Tabla 15 ANOVA para la recuperación según tipo de extracción .....	63
Tabla 16 Contraste Múltiple de Rango para recuperación según tipo de extracción .....	63
Tabla 17 Concentración de vitamina E en el aceite rojo obtenido con CO <sub>2</sub> supercrítico a partir de fibra. ....	64

Tabla 18 Resumen Estadístico para Tocoferoles y tocotrienoles totales recuperados por CO2 supercrítico a partir de fibra seca. ....	65
Tabla 19 Datos de extracción de folíolos .....	66
Tabla 20 Resumen Estadístico para recuperación de extractos.....	66
Tabla 21 Determinación de la química sanguínea .....	67
Tabla 22 Determinación del contenido de proteína en las LDL aisladas .....	68
Tabla 23 Fase de latencia para las LDL puras y con extractos de fibra y de folíolos.....	69
Tabla 24 Descripción de los tiempos de latencia en cada uno de los tratamientos .....	70
Tabla 25 Caracterización numérica de las diferencias.....	71
Tabla 26 Respuesta de la vitamina E comercial frente al DPPH .....	76
Tabla 27 Respuesta del extracto de la fibra frente al DPPH.....	78
Tabla 28 Caracterización del extracto supercrítico utilizado en la evaluación .....	78
Tabla 29 Respuesta del extracto de folíolos frente al DPPH .....	80
Tabla 30 Comparación del comportamiento de los extractos frente al DPPH .....	82

### **Índice de graficas e ilustraciones**

Grafica 1. Distribución por isómeros en cada una de las regiones evaluadas	57
Grafica 2 Distribución de los resultados de tiempo de latencia en cada tratamiento .....	70
Grafica 3 Cinética de oxidación comparada para los tratamientos .....	74
Grafica 4 Correlación concentración de Alfa tocoferol/ Porcentaje de decoloración .....	77

Grafica 5 Correlación de la concentración de aceite rojo/ Porcentaje de decoloración .....	79
Grafica 6 Correlación de la concentración de extracto de foliolos/ Porcentaje de decoloración .....	81
Ilustración 1 Equipo de Extracción proyecto Colciencias 580-2002.....	45
Ilustración 2 Evolución de la Absorbancia con el tiempo .....	50

### **Índice de Anexos**

ANEXO 1 Contenido de Vitamina E. por región.....	91
ANEXO 2 Comportamiento de la densidad del CO2 con la temperatura.....	97
ANEXO 3 Recuperación de extracto con base en el peso seco de fibra y foliolos.....	98
ANEXO 4 Concentración de tocoferoles y tocotrienoles en los extractos de fibra recuperados expresada en ppm .....	104
ANEXO 5 Comparación extracción soxhlet y extracción supercrítica a 4500psi .....	107
ANEXO 6 Calculo del tiempo de latencia.....	110
ANEXO 7 Estadística tiempo de latencia.....	112
ANEXO 8 Ensayos de Actividad Antioxidante frente a DPPH .....	119
ANEXO 9 Ficha Técnica Vitamina E Comercial.....	121
ANEXO 10 Galería fotográfica.....	122
ANEXO 11 Cromatogramas.....	124
ANEXO 12 Protocolo de muestreo foliolos y fibra.....	125

## Glosario

AOCS: American oil chemistry society

Bar: Bares, unidad de presión

CENIPALMA: Centro de investigaciones en Palma de Aceite

Col-S: Esteres de colesterol

Detector FL: Detector de fluorescencia

DMS: Dimetil sulfóxido

DPPH: Radical libre, *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*

Ec50: Equivalente de actividad al 50%

EDTA: Acido di etil amino tetra acético

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA) es una enzima de control en la síntesis de colesterol.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

Lag: en cinéticas de oxidación fase de latencia

LDL: Lipoproteínas de baja densidad ("Low Density Lipoproteins")

Log: en cinéticas de oxidación fase de incremento logarítmico

MeOH: Metanol

Mpa: Mega pascales, unidad de presión

PC: punto crítico en el diagrama de fases.

PT: Punto triple en el diagrama de fases

PUFAS( $\omega$ -3): Ácidos grasos poliinsaturados con el último doble enlace en el carbono  $\omega$ -3.

SC-CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono en estado supercrítico

SFE: Extracción con fluidos supercríticos

T3F( $\alpha\beta\gamma\delta$ ) Tocotrienoles

TEA: Tasa de extracción de aceite

TF( $\alpha\beta\gamma\delta$ ) Tocoferoles

$\alpha$ -TF: Alfa tocoferol

## RESUMEN

Esta investigación está enmarcada en el área de lípidos y salud y su objetivo fue recuperar sustancias de alto valor como tocoferoles y tocotrienoles mediante extracción con CO<sub>2</sub> súper crítico (SFE CO<sub>2</sub>) a partir de subproductos de la industria de aceite de Palma. Las Hojas y fibras residuales de la producción de aceite de palma son una buena fuente de vitamina E, ya que contienen más de 5 % de aceite residual, con 2000 ppm de vit. E.

Para evaluar la actividad antioxidante se uso un modelo *in vitro* con sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) para oxidar las LDL de donantes voluntarios que se incubaron con el inductor de la oxidación y el antioxidante o mezcla en estudio. Los ácidos grasos presentes en la partícula LDL se oxidan formando dienos conjugados, los que se detectan y se cuantifican por espectrofotometría a 234 nm. Los resultados mostraron que el extracto de la fibra prensada en concentraciones de 40µM/l fue capaz de limitar la oxidación de las LDL elevando el tiempo de latencia un 54% respecto al tiempo de latencia para las LDL sin tratamiento y un 32% respecto a las LDL enriquecidas con una concentración equivalente de Alfa tocoferol de vitamina E comercial.

En el ensayo *in-vitro* con el radical libre DPPH (1,1-difenil-2- picril hidrazilo), los extractos de fibra y folíolos se comportaron como agentes captadores de radicales libres, con porcentajes de inhibición variables en función de la concentración de los compuestos activos.

## 1 INTRODUCCIÓN

Con el propósito de conocer el potencial de antioxidantes presentes en los residuos agroindustriales de palma producida en Colombia, se realizó la estimación a nivel regional y nacional del potencial de recuperación de Tocoferoles y Tocotrienoles a partir de la fibra extraída de palma y de foliolos, en las cuatro regiones palmeras tomando como base de selección de las plantaciones a muestrear, su nivel de participación por producción del promedio regional y nacional y el interés manifestado por cada una.

Se analizó la distribución porcentual de los distintos isómeros de la vitamina E en las distintas muestras evaluadas y se observó, que mientras el aceite crudo de palma tiene un 20% de tocoferoles y un 80% de tocotrienoles (Szulczewska, *et al* 2004), el aceite rojo proveniente de la fibra tiene una distribución de 50:50 con un contenido comparativamente superior de  $\alpha$ Tocoferol dentro de los Tocoferoles totales.

La fibra prensada de palma es un subproducto del proceso de extracción después del proceso de prensado por tornillo de las frutas durante la producción de aceite crudo de palma. La fibra de prensa es normalmente quemada en las calderas como combustible en la generación de vapor y electricidad necesarios por la operación de extracción. Sin embargo, y tal como lo demostró este estudio, es fuente promisoría de vitamina E y otros compuestos de gran interés nutricional. El aceite rojo contenido en la fibra puede ser recuperado por extracción con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico, con menor eficiencia en la extracción, pero con un extracto más concentrado en Tocoferoles y tocotrienoles, sin trazas de solventes orgánicos.

La extracción con fluido supercrítico es una tecnología nueva de aislamiento por contacto en equilibrio, la cual se basa en las propiedades físico-

químicas de un fluido supercrítico, en este caso CO<sub>2</sub>, donde básicamente se manejan las variables de proceso que intervienen en la solubilidad, como son presión, temperatura, porcentaje del co-solvente y preparación de la muestra.

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos se escogió la evaluación del efecto sobre las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que son los mayores transportadores de colesterol en la sangre y representan el mayor indicador de riesgo de desarrollar aterosclerosis y problemas cardiacos. (Stoker y Keaney 2004).

Existe una teoría que sugiere que los depósitos de colesterol, lípidos y demás constituyentes de la lesión ateromatosa en la intima de los vasos sanguíneos es causada por la LDL oxidada (Steinberg, 1991, Witson,1994;Obregón 1998). Durante el tránsito de las LDL en la pared arterial, se exponen a un variado tipo de de agentes oxidantes y su estabilidad depende entonces del balance y la eficiencia de los mecanismos de defensa constituidos por los antioxidantes ligados a la Lipoproteínas. (Lendon CL *et al* 1991; Davies MJ *et al* 1993; WC, JD, *et al.*, 2007)

Más recientemente, la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox), la cual está involucrada directamente en la formación de la placa de ateroma, ha sido asociada al proceso de inestabilidad y extensión de la aterosclerosis coronaria. (Meisinger, 2005; Armstrong E, 2006) Sin embargo, existen pocos datos clínicos que la relacionen con el pronóstico tras un síndrome coronario agudo (Gómez M *et al.*, 2009).

Del extracto natural obtenido, se espera que la mayor actividad antioxidante sea debida al contenido de vitamina E. (*Elaeis guinensis* Yaq) (Sundram *et al* 1992;Cho *et al* 1998; Mei Han Ng *et al* 2004)

La vitamina E en estado natural tiene cerca de ocho diferentes formas de isómeros, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Todos los isómeros tienen anillos aromáticos con un grupo hidroxilo el cual puede donar un átomo de hidrógeno para reducir los radicales libres de los materiales que componen las membranas biológicas hidrófobas de las paredes de las células. Existen formas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y delta ( $\delta$ ) para ambos isómeros, y se determina por el número de grupos metílicos en el anillo cromático. Cada una de las formas tiene su propia actividad biológica

Muchos estudios han mostrado el efecto de la Vitamina E, en forma de  $\alpha$ -tocoferol, como un inhibidor de la oxidación de las LDL en el plasma (Jialal *et al.*, 1991; Stephens *et al.*, 1996; Kushi *et al.* 1996; Schwenke *et al.*, 2002). En estos estudios las LDL de pacientes tratados con  $\alpha$ -tocoferol son oxidadas *in vitro* de manera comparativa con LDL de pacientes sin tratamiento, observando un sensible aumento en el tiempo de latencia en la fase inicial del proceso oxidativo

En cuanto a los tocotrienoles, que son los isómeros insaturados de la vitamina E, cuyas fuentes naturales son más escasas y que representa alrededor del 40% de la vitamina E en el aceite de palma, se han identificado como reductores del colesterol sérico, reducen la actividad de la HMG-CoA reductasa (Khor *et al.* 1995), suprimen la agregación plaquetaria *in vitro* e inhiben efectivamente en cultivo de células la proliferación de células de cáncer de pulmón.(Parker *et al.*, 1993; Qureshi *et al.*, 1997). Adicionalmente, el  $\alpha$ -tocotrienol tiene una alta actividad antioxidante en microsomas de hígado, aun mayor que la reportada para  $\alpha$ -tocoferol (Serbinova, *et al.*, 1991; Schwenke *et al.* 2002; Sylvester *et al.* 2003).

Los tocotrienoles también juegan un rol importante en la prevención del desbalance metabólico en los huesos debido al efecto de los radicales libres.(Maniam,S *et al.*, 2008)

En este estudio, una vez recuperados los extractos, se investigó su efecto sobre la susceptibilidad de las LDL a la oxidación inducida por cobre (II), según la metodología descrita por Estebahuer *et al*, en 1986.

También se investigó de manera comparativa el efecto de la vitamina E comercial y la capacidad antioxidante de los extractos ricos en tocoferoles-tocotrienoles en sistemas químicos generadores de radicales libres como el *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*. (DPPH) (Brand-Williams, *et al* 1995)

## **2 ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS**

### **2.1 La industria de Palma en Colombia**

La expansión del cultivo en Colombia ha mantenido un crecimiento sostenido. A mediados de la década de 1960 existían 18.000 hectáreas en producción y en 2007 aparecen registradas alrededor de 225.901 hectáreas sembradas de palma de aceite en 73 municipios, las cuales generan 898.359 toneladas de aceite de palma y 70.000 de aceite de palmiste; del aceite de palma producido actualmente se exporta el 25% y el 50% del aceite de palmiste. El gremio palmicultor ha proyectado en su visión 2020 contar para este año, con un área sembrada de 636.000 hectáreas correspondientes a 3.5 millones de toneladas de aceite de palma (Fedepalma).

Colombia es el primer productor de palma de aceite en América Latina y el cuarto en el mundo, con cuatro zonas productivas claramente identificadas:

**Norte** - Magdalena, Norte del Cesar, Atlántico, Guajira

**Central** - Santander, Norte de Santander, sur del Cesar, Bolívar

**Oriental** - Meta, Cundinamarca, Casanare, Caquetá

**Occidental** - Nariño

*Fuente: [www.fedepalma.org](http://www.fedepalma.org)*



**Figura 1** Mapa de las zonas de producción

Los departamentos que poseen más área sembrada en palma de aceite son en su orden: Meta (1), Cesar (2), Santander (3), Magdalena (4), Nariño (5), Casanare (6), Bolívar (7), Cundinamarca (8) y Norte de Santander (9).

## **2.2 Proceso productivo del aceite de Palma**

### **Recepción del fruto:**

Los racimos que llegan a las instalaciones de la planta de beneficio son pesados y según los criterios de la empresa se establece el tipo de control para evaluar la calidad del fruto. Los racimos generalmente se descargan en una plataforma de recibo y mediante un sistema de tolvas se alimentan las vagonetas. Una vez cargadas, estas se trasladan por medio de rieles a la zona de esterilización.

### **Esterilización:**

Es la segunda etapa del proceso en la cual los racimos sufren un tratamiento térmico por medio de vapor directo hasta alcanzar una presión y temperatura dadas en un tiempo establecido según las características de madurez del fruto. El correcto esterilizado de los racimos es fundamental para las etapas posteriores del proceso y en gran medida la Tasa de Extracción de aceite (TEA) depende de esta etapa.

Objetivos de la esterilización son:

- Inactivar la enzima lipasa, responsable de la hidrólisis del aceite en ácidos grasos y glicerol (Desacelera la acidificación del fruto).
- Secar el punto de unión de la fruta y el raquis para facilitar la separación en el desfrutado.
- Ablandar el mesocarpio para permitir el rompimiento de las celdas que contienen el aceite, durante la digestión y el prensado.
- Reducir el tamaño de la almendra dentro de la nuez lo que facilita su desprendimiento de la cáscara en el momento del rompimiento.
- Coagular las proteínas y el material mucilaginoso para evitar la formación de emulsiones que impiden el clarificado del aceite.

### **Desfrutamiento:**

Es la sección en que el fruto, después de cocido, es desprendido del raquis o tuzza mecánicamente mediante desgranadoras rotativas, que golpean repetidamente el racimo para desprender los frutos y permitir su procesamiento posterior.

**Digestión:**

Los digestores son cilindros compuestos por un eje vertical rotativo con brazos agitadores en donde la fruta es malaxada ó macerada y calentada separándola del mesocarpio y rompiendo las celdas que contienen el aceite, preparándola para el paso siguiente que es el prensado.

Los digestores están equipados con un sistema de inyección directa de vapor ó camisas para mantener una temperatura de 90 a 95°C.

**Prensado:**

El fruto digerido, alimenta por gravedad a un conjunto de prensas que trabajan entre 90 y 100 bares contra la presión de unos conos ubicados a la salida, que ejercen la acción de prensado extrayendo el aceite del mesocarpio. El objetivo de esta etapa es romper, mediante calor y presión las celdas que contienen el aceite del mesocarpio. La presión aplicada debe ser tal que se extraiga la mayor cantidad de aceite y se minimice la rotura de nueces y almendras.

**Desfibrado:**

Está compuesto por el sinfín rompedor de torta la cual es un transportador de paletas que se ha diseñado especialmente para lograr una separación efectiva entre las nueces y las fibras que salen de las prensas mezcladas y comprimidas. El equipo logra esto por medio de sus paletas que actuando a

gran velocidad como palas sacuden y desparraman la torta de fibras y nueces procedentes de las prensas en un trayecto largo, separándola y preparando la fibra para su utilización posterior como combustible y las nueces para ser procesadas en la obtención de almendra de palmiste.

### **Clarificación:**

La clarificación es una etapa de purificación del aceite crudo extraído de las prensas, con el fin de eliminar agua, lodo y materia celular. El aceite crudo de palma que entra a clarificación, teóricamente debe contener 35% aceite, 5% lodos ligeros, 35% agua y 25% lodos pesados. El proceso de clarificación se lleva a cabo en varias etapas, donde predomina el consumo de vapor como fuente calórica.

El recorrido del aceite en el proceso de clarificación mencionando los equipos es el siguiente:

**Desarenador:** Es un tanque con conos de drenaje en donde se sedimentan los volúmenes de arena. Antes de llegar el aceite al desarenador, se adiciona agua a 90-95°C para diluir el lodo en el volumen requerido, facilitando su separación.

**Tamiz:** Recibe el aceite proveniente del desarenador, lo pasa por mallas para retirarle el material celular. La mayoría de las plantas cuentan con uno o dos tamices vibratorios 30 o 40 mesh.

**Tanque de aceite bruto.:** Se encarga de recolectar el aceite de prensas ya tamizado, el aceite de recuperación para bombearlo al separador primario.

**Columna Precalentadora :** Tiene la función de precalentar el crudo entre 90-95°C; esto se logra inyectando vapor directo. La oxidación del aceite comienza más o menos a los 110°C y por esto la temperatura ideal es de 90-95°C.

**Separador Primario ó Clarificador Horizontal Continuo:** En este equipo ocurre la separación por decantación del aceite, gracias a la diferencia de

densidades que existe en los componentes (aceite < lodos ligeros < agua < lodos pesados) y a la temperatura que disminuye la viscosidad del aceite para facilitar su separación de los lodos. El aceite recuperado contiene algo de humedad y lodos livianos que es necesario eliminar. Cuando se inicia el proceso después de una interrupción, se inyecta vapor por serpentín para mantener la temperatura adecuada para fluidizar el aceite (90-95°C ). Los lodos pesados pasan al tanque de lodos.

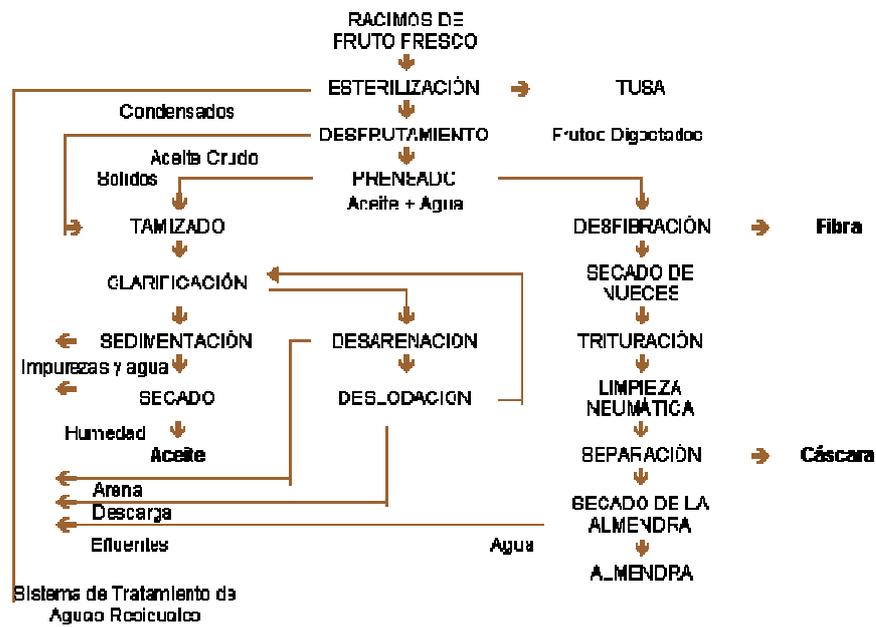
Tanque de lodos: Almacena los lodos separados en la etapa primaria. Teóricamente los lodos contienen un 10% de aceite, por lo que debe someterse a un proceso de separación mecánico que son las centrífugas desladoras. El tanque de lodos tiene dos compartimientos, el inferior se encarga de almacenar el lodo y por medio de bombas se pasa al ciclón desarenador para posteriormente pasarlo a las centrífugas

Tanque sedimentador. Se encarga de sedimentar las partículas livianas contenidas en el aceite resultante del separador primario, y de disminuir el porcentaje de humedad. El aceite sale del separador primario con 0.4-0.5 % de humedad.

Secador de Vacío. Baja la humedad del aceite hasta 0.1% para evitar que el aceite se oxide por la formación de peróxidos . El vacío es creado por un sistema de eyectores con la ayuda de vapor de agua.

El aceite clarificado y libre de humedad se almacena en tanques para su posterior distribución.

En la figura 5 se puede observar el diagrama de flujo del proceso de extracción indicando los subproductos de interés en el desarrollo del presente estudio.

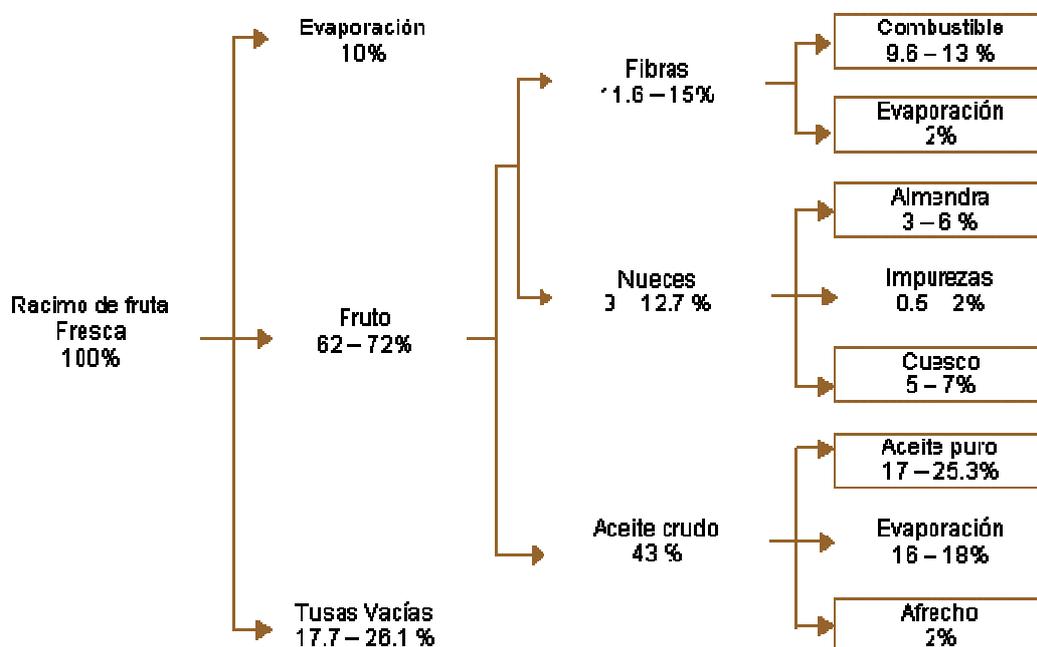


**Figura 2** Diagrama de flujo del proceso de extracción

Fuente: [www.fedpalma.org](http://www.fedpalma.org)

### 2.3 Subproductos de la industria de palma de aceite:

Los subproductos generados por el proceso de extracción son de gran importancia por su composición, para ser utilizados en su totalidad como bio abonos y como combustibles principalmente. La porción equivalente en porcentajes, sus características y valores se presentan en el siguiente esquema:



**Figura 3** Balance de materiales en el proceso de extracción

Las hojas y la fibra prensada de la palma de aceite son subproductos de la plantación y de las plantas de beneficio y han sido identificadas como materiales promisorios para la extracción de vitamina E. Estudios de laboratorio han confirmado que en las hojas de la palma de aceite se

encuentra un 0.5% (base seca) de vitamina E casi en su totalidad como  $\alpha$ -tocoferol (isómero con mayor actividad) (Sundram, K. *et al.*, 1992).

En estudios preliminares realizados por Cenipalma se ha encontrado en extractos de frutos inmaduros de palma de aceite concentraciones de vitamina E en su mayor parte como  $\alpha$ -tocoferol superiores a 10.000 ppm. Así mismo, en el aceite residual extraído de la fibra se han detectado concentraciones de vitamina E hasta de 6000 ppm; a diferencia de la vitamina E encontrada en las hojas, la encontrada en el aceite residual de fibra está constituida en aproximadamente un 50% por tocotrienoles y 50% de tocoferoles.

Conforme a las prácticas actuales de cosecha, anualmente una hectárea de palma adulta puede producir 2400 kilogramos de foliolos en base seca, de los cuales a su vez pueden extraer cerca de 12 kilogramos de  $\alpha$ -tocoferol. Y con una producción media de fruta de 17.15 ton/ha (Fedepalma, 2004) y un porcentaje de fibra del 13% a partir de la fibra con un aceite residual del 7%, se pueden extraer alrededor de 0.13 ton de aceite por ha/año con una concentración aproximada de vitamina E de 6000 ppm. (Urrego *et al* 2004)

Sundram K. y Gapor, A. 1992, reportan que la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico a 313K y 2843 psi de hojas secas de palma, produce un 90% de extracción del tocoferol presente en las hojas.

Birtigh *et al* (1995) encontró que de la fibra residual del proceso de obtención del aceite de palma tratado con CO<sub>2</sub> supercrítico puede extraerse carotenos, tocoferoles y tocotrienoles.

Si además del proceso de extracción se considera el proceso de refinación se obtienen otros subproductos de gran interés desde el punto de vista de

recuperación de sustancias con actividad biológica, el proceso de refinación física genera por destilación en alto vacío un producto denominado ácidos grasos destilados que arrastran en el proceso una cantidad importante de los componentes menores de la palma, como carotenos, tocoferoles, tocotrienoles y fitoesteroles entre otros.(Gapor *et al* 1.995)



*Residuos de mesocarpio en planta extractora*



*Fibra presada*



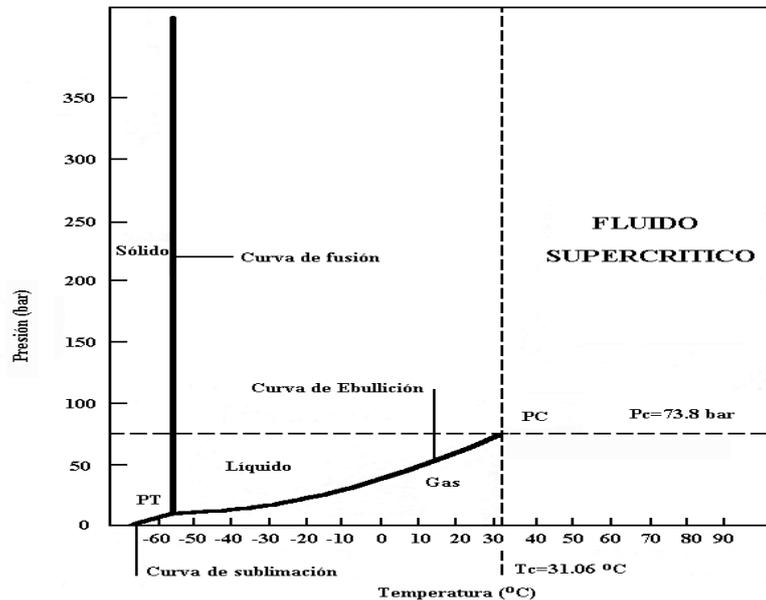
*Aceite rojo de fibra obtenido con CO<sub>2</sub> Supercritico*

## **2.4 Extracción supercrítica.**

### **2.4.1 Fluido Supercrítico**

Un fluido supercrítico es una sustancia que se encuentra en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico con propiedades intermedias entre líquido y gas. En un el diagrama de fases hay un punto de coexistencia de tres fases, llamado punto triple (PT) (figura 1). El cambio de fase se asocia a un cambio brusco de entalpia y densidad. Por encima del punto crítico (PC) este cambio no se produce; por tanto, se puede definir este punto como aquel por encima del cual no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar (Çengel Y; Boles M, 1996).

Desde el punto de vista de la Extracción con fluidos supercríticos (SFE) el fluido se define como un gas pesado con poder de solvencia dependiente de la densidad. Por este motivo, el poder solvente de un fluido supercrítico (FSC) es altamente dependiente de su temperatura y presión(anexo 2) (Tzia and Liadakis ,2003).



Fuente:<http://termo.esiqje.ipn.mx/spanish/labtermo/>

**Figura4** Zona de localización de un Fluido Supercrítico (CO<sub>2</sub>).

En un fluido supercrítico no se distinguen el estado líquido ni el gaseoso debido a que los dos estados desaparecen para formar una sola fase. Esto le permite tener propiedades tanto de líquido como de gas; algunas de estas propiedades se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1** Valores Aproximados de Densidades, Viscosidades, Coeficientes de Difusión de Gases, Fluidos Supercríticos y Líquidos.

Fluido	Densidad g/cm <sup>3</sup>	Viscosidad g/cm.s <sup>-1</sup>	Coefficiente de Difusión cm <sup>2</sup> /s
Gas	0.6 – 2*10 <sup>-3</sup>	1 – 3*10 <sup>-4</sup>	0.1 – 1
Fluido Supercrítico	0.2 – 0.9	1 - 3*10 <sup>-3</sup>	0.1 – 5*10 <sup>-4</sup>
Líquidos	0.6 – 1.6	0.2 – 3*10 <sup>-2</sup>	0.2 – 3*10 <sup>-5</sup>

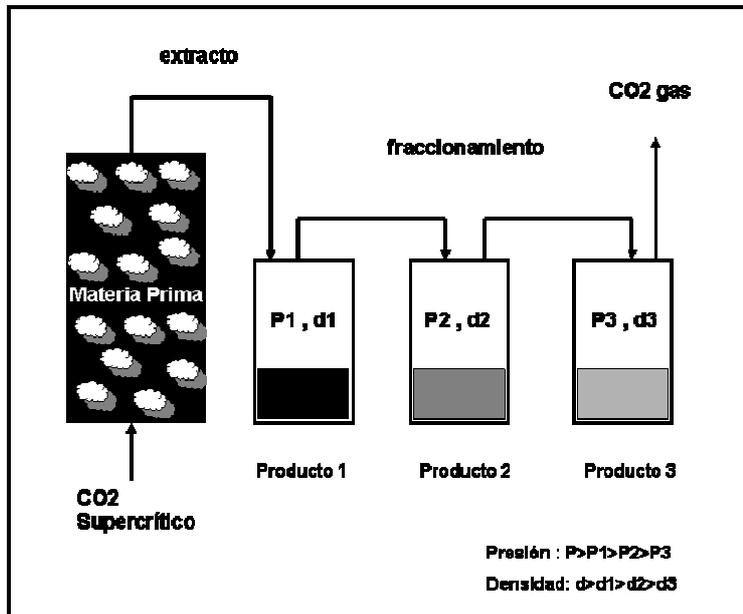
Fuente : EU Franck. 1984

#### 2.4.2 Mecanismo de Extracción

La extracción con fluido supercrítico es una tecnología de aislamiento por contacto en equilibrio, que se basa en las propiedades físico-químicas del fluido supercrítico, en este caso CO<sub>2</sub>, en la que se manejan las siguientes variables de proceso que intervienen en la solubilidad: presión, temperatura, porcentaje del co-solvente y preparación de la muestra. Aquí se hace uso del aumento del poder de solvatación cuando los fluidos se encuentran por encima de su presión y su temperatura crítica, para fraccionar mezclas de compuestos o separar compuestos orgánicos de componentes inorgánicos (Brunner. 1994).

El proceso se inicia con la alimentación; generalmente un sólido molido se carga al extractor y el CO<sub>2</sub> es alimentado al extractor a través de una bomba de alta presión (100 a 400 Bar). El CO<sub>2</sub> comprimido se calienta en un intercambiador de calor hasta la temperatura de extracción (30 a 60 °C). Luego ingresa al extractor y procede a extraer la esencia de la matriz herbácea cargada. La mezcla CO<sub>2</sub>-extracto es enviada a un separador (150 a 50 Bar) con un previo paso a través de una válvula de expansión. A la temperatura y presión reducidas, el extracto precipita espontáneamente en el separador, mientras el CO<sub>2</sub>, libre de cualquier extracto, es reciclado al proceso.

En algunas ocasiones se mezclan otras sustancias o cosolventes con el CO<sub>2</sub> de alta presión para aumentar el poder de solvencia o la selectividad de la separación para componentes específicos. La separación se produce comúnmente en etapas, manteniendo condiciones diferentes en dos o tres separadores para fraccionar el extracto, dependiendo de las solubilidades de los componentes y las especificaciones deseadas de los productos (Brunner, 2004).



**Figura 5** Esquema del proceso de extracción

La figura 2 muestra un diagrama esquemático del proceso de SFE. Los cuatro pasos principales involucrados son: *Extracción*, *Expansión*, *Separación* y *Compresión del solvente*. Los cuatro equipos críticos del proceso son: Un extractor de alta presión, una válvula de expansión, un separador de baja presión y una bomba para elevar la presión del solvente reciclado. (Kiran, 2000)



**Figura6** Equipo de extracción de laboratorio

### 2.4.3 Ventajas de la extracción con fluidos supercríticos

En los últimos tiempos la extracción con fluido supercrítico ha alcanzado un mayor auge por la aplicación que se ha encontrado en la industria. Entre las principales aplicaciones se encuentra el descafeinado del té y café, extracción de lúpulos, aromas, sabores, perfumes y especias, extracción de aceites vegetales y grasas de semillas, extracción de glucosa y celulosa entre otros (Brunner 2004).

Adicionalmente el dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) es abundante, barato, fácil de transportar, está disponible en altos grados de pureza, no es inflamable ni tóxico, se produce naturalmente y es metabolizado por los organismos vivos. El SC-CO<sub>2</sub> es un solvente conveniente para el aislamiento de sustancias deseadas de la matriz natural, porque tiene una temperatura crítica baja, es un solvente limpio, no causa ningún problema residual y es inodoro e incoloro. Sin embargo las limitaciones existentes se deben a los altos costos de los equipos: se necesita una infraestructura especial y segura para el trabajo en las condiciones requeridas (Sotelo y Ovejero, 2003).

El CO<sub>2</sub> tiene limitaciones en cuanto a la extracción de compuestos polares, pero este inconveniente se puede resolver añadiendo etanol como modificador de la polaridad, tal como se hizo en este estudio.

La tecnología de fluidos supercríticos se ha empleado por ejemplo para extraer tocoferoles de materiales como hojas de olivo, aceite de palma y salvado de arroz o soya obteniéndose factores de enriquecimiento superiores a cuatro con respecto a la extracción con solventes orgánicos tradicionales (De Lucas, A, *et al.*, 2002).

En la Tabla 2, se reportan los resultados obtenidos de la extracción con fluidos supercríticos de diferentes matrices vegetales.

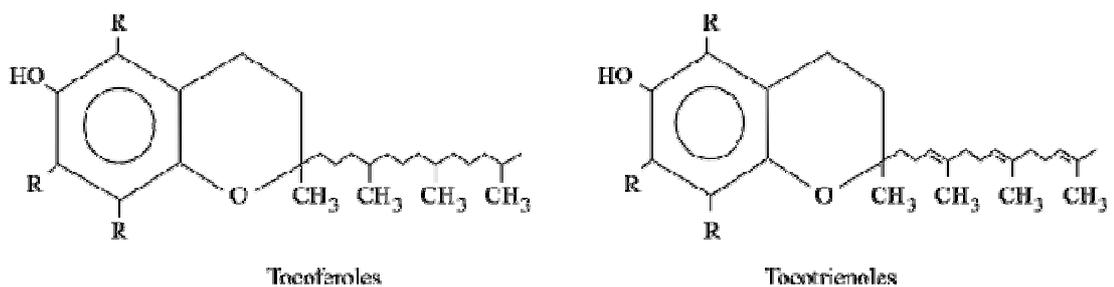
**Tabla 2,** Resultados obtenidos de la extracción con fluidos supercríticos de diferentes materiales vegetales.

<b>Material vegetal</b>	<b>Técnica</b>	<b>Condiciones óptimas</b>	<b>% p/p de tocoferol en las fracciones obtenidas</b>	<b>Autor</b>
Hojas de palma	SC-CO <sub>2</sub>	30 Mpa, 343K	11.3	Brunner <i>et al.</i> , 1995
Salvado de arroz	SC-CO <sub>2</sub>	25 Mpa, 313K	0.6	King <i>et al.</i> , 1996
Lodos de soya	SC-NO <sub>2</sub>	15.2MPa, 323K	10.4	
Germen de trigo	Esterificación - SC-CO <sub>2</sub>	35.5MPa, 318K	40.0	Lee <i>et al.</i> , 1991
	SC-CO <sub>2</sub> - cromatografía a SC preparativa	25 MPa	95	Sayto and Yamamuchi, 1990
Hojas de olivo	SC-CO <sub>2</sub>	25 MPa, 313K	74.5	De Lucas, A <i>et al.</i> , 2002
	SC-CO <sub>2</sub>	25 MPa, 313K	97.1	

## 2.5 Características químicas de la Vitamina E

La Vitamina E es un nombre genérico que engloba un grupo de compuestos solubles en lípidos que tienen poder antioxidante, puesto que previene la fase de propagación de las reacciones de formación de radicales. Análisis de las estructuras han demostrado que dichas moléculas se dividen en dos grupos: cuatro tocoferoles (TF) ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) y cuatro tocotrienoles (T3E) ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) que se diferencian entre sí debido a que la cadena lateral en C2 del cromanol en TF es un fitilo mientras que en T3E es un isoprenoide

insaturado. Esta diferencia les da características funcionales específicas y diferentes tipos de actividad. La diferencia entre los cuatro TF y T3E radica en el número y la posición de grupos metilo del anillo cromanol ( $\alpha$  - tiene 3,  $\beta$  y  $\gamma$  - tienen 2, mientras que  $\delta$  - tiene 1). (Bender,1992). (Figura 7)



**Figura 7:** Estructura química del tocoferol y tocotrienol

Mientras que los TF se encuentran principalmente en aceites vegetales (canola, soya, trigo, girasol), los T3E se han reportado en cereales (avena, cebada, centeno y arroz) y en aceite de palma.

Aun cuando los TF y T3E comparten algunas funciones tales como la antioxidante, los T3E han mostrado funciones muy importantes y algunas veces únicas. Los T3E han probado ser un antioxidante más potente que los TF (40-60x), así mismo han demostrado tener efecto sobre la aterosclerosis, niveles plasmáticos de colesterol y otros lípidos sanguíneos relacionados con la enfermedad cardiovascular (ECV). A nivel de terapia contra el cáncer, han demostrado poseer mejor actividad antitumoral que los TF. Así mismo, confieren mejor protección contra la muerte neuronal, llevando a pensar que

tienen un gran potencial en el manejo no solo de la enfermedad de Alzheimer, sino de otras enfermedades neurodegenerativas. (Morris *et al* 2005)

### 2.5.1 Efectos sobre la Salud

Se han estudiado en detalle los beneficios de la vitamina E en la prevención de la ECV y diversos estudios epidemiológicos (Stephens 1996) han mostrado una relación inversa entre su ingesta y la ECV, mientras que la ingesta de otros antioxidantes dietarios como vitamina C y el  $\beta$ -caroteno no muestran la misma correlación, lo que sugiere que la vitamina E juega un papel específico e importante que va mas allá de la simple función antioxidante. Sin embargo estos estudios no han podido demostrar una relación significativa entre niveles plasmáticos de vitamina E (vista como  $\alpha$ -TF) y las muertes por ECV. Últimamente hay reportes que sugieren que en algunos casos el tocoferol puede tener efectos deletéreos de la salud (Miller *et al* 2005)

La acción del  $\alpha$ -T3E en la reducción del CoIS podría deberse a su inhibición de la HMG-CoA reductasa. En 1994, Correll *et al.* encontraron que el farnesol incrementa la degradación de la HMG-CoA reductasa, es posible que los T3E ejerzan su actividad a través de la similaridad farnesol. (Khor *et al* 1999)

## 2.6 Mecanismo general de los procesos oxidativos

La oxidación lipídica es un proceso complejo que implica numerosas reacciones que dan lugar a una variedad de cambios físicos y químicos. La naturaleza y extensión de estos cambios se ven influenciadas por un gran número de variables (luz, aire, temperatura, pH, etc.).(Rojano *et al* 2008)

Para explicar los resultados experimentales, se ha postulado un mecanismo simplificado por radicales libres en tres etapas: iniciación (lag), propagación (log) y terminación.

Puesto que la evolución de la reacción  $RH + O_2 \rightarrow$  radicales libres, es difícil termodinámicamente, la producción de los primeros radicales necesarios para iniciar la propagación de la reacción se consigue normalmente por medio de un catalizador. Se ha propuesto que la etapa de iniciación tiene lugar por descomposición de un hidroperóxido mediante un catalizador metálico o por exposición a la luz.

Una vez formado un número suficiente de radicales libres ( $R\cdot$ ), la reacción en cadena se propaga al captar átomos de hidrógeno en las posiciones  $\alpha$  de los dobles enlaces. En estas posiciones, después de la adición de oxígeno, se forman los radicales peróxidos ( $ROO\cdot$ ), que a su vez captan hidrógeno de los grupos  $\alpha$ -metilénicos  $RH$  de otras moléculas para dar hidroperóxidos  $ROOH$  y grupos  $R\cdot$ ; estos a su vez reaccionan con el oxígeno repitiéndose nuevamente la secuencia de reacción descrita. (Ozilgen, S. y Ozilgen, M. 1990)

Los hidroperóxidos, productos primarios de la oxidación lipídica, son relativamente inestables, e intervienen en numerosas y complejas reacciones de ruptura e interacción con compuestos de distintos pesos moleculares, capaces de producir aldehídos, cetonas, polímeros y otros compuestos que se han usado como indicadores de deterioro oxidativo.

De acuerdo a los mecanismos de reacción, la velocidad de oxidación de lípidos global podría ser alta cuando grandes cantidades de radicales libres se encuentran en la etapa de propagación. En los estados tempranos, las reacciones de iniciación y propagación son las dominantes, mientras que los estados posteriores, debido al incremento de la concentración de radicales

libres, las reacciones de terminación comienzan a tener importancia. En los estados finales, la probabilidad de ocurrencia de las reacciones de iniciación y de propagación es baja debido a la disminución de la concentración de los sustratos (ácidos grasos con dobles enlaces). (Ozilgen, S. y Ozilgen, M. 1990)

La autoxidación de los lípidos ocurre fundamentalmente debido a los ácidos grasos insaturados a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres, que tiene las fases de iniciación, propagación y terminación. En la etapa de iniciación el radical lipídico,  $R^{\bullet}$  se forma a partir del lípido (RH), usualmente por el ataque de radicales, luz, calor, irradiaciones o por trazas de metales. El radical lipídico ( $R^{\bullet}$ ) formado reacciona rápidamente con oxígeno para dar un radical peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ), el cual ataca otra molécula de lípido (RH) y sustrae un átomo de hidrógeno para formar un hidroperóxido lipídico (ROOH), y un nuevo radical lipídico, que inicia de nuevo la secuencia de propagación. De esta manera, muchas moléculas de lípidos pueden ser oxidadas hasta hidroperóxidos por muchas formas de iniciación. El ciclo de propagación es interrumpido por las reacciones de terminación, en las cuales hay consumo de los radicales. Las interacciones bimoleculares de radicales libres originan productos no-radicales muy estables. (Rodríguez. 2007)

**Tabla 3** Determinación del estado oxidativo

<b>Productos</b>	<b>Método analítico</b>
Dienos conjugados	Esp. UV $\lambda$ 234 nm
Hidroperóxidos	Valor Totox (2 Índice de peróxidos + valor de anisidina)
Peróxido	Titulación Yodo
Ácidos grasos C18:3/C16:0	Pérdida de peso bajo condiciones controladas Cromatografía de gases
Radical catión ABTS $\bullet+$	Esp. Vis $\lambda$ 734nm
DPPH	Esp. Vis $\lambda$ 517nm , t: 30' c/6s

•OH•	Espectrometría de resonancia de rotación de espín
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Esp. UV λ 230nm

## 2.7 Medición de la actividad antioxidante

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en la verificación de la reacción de un agente oxidante sobre un extracto oxidable, la inhibición de este fenómeno es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto evaluado (Antolowich *et al* 2002)

Muchos procedimientos usan una oxidación acelerada involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba; tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación foto sensibilizada por oxígeno singlete (Antolowich *et al* 2002), y fuentes de radicales libres (Li y Cheng 2003)

La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), encargadas de transportar colesterol hacia los tejidos, es clave en el desarrollo de la aterosclerosis. (Witztum 1993) Por esto, se utiliza la medición del efecto de distintos compuestos y mezclas complejas sobre la oxidación de las LDL mediante un sistema *in vitro* que permite evaluar la capacidad antioxidante.

Para ello, se aíslan LDL de sangre y se incuban con un inductor de la oxidación, como el sulfato de cobre, y el antioxidante o mezcla en estudio. Los ácidos grasos presentes en la partícula LDL comienzan a oxidarse formándose los dienos conjugados, que son productos intermedios de oxidación. Estos se detectan y se cuantifican espectrofotométricamente a 234 nm ( Esterbawer H *et al* 1986). El control se realiza incubando las LDL

con el inductor de la oxidación en ausencia del antioxidante. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la oxidación de las LDL respecto al control, luego de transcurridas 2 horas de la reacción, o como el tiempo que demoran las LDL en superar la fase de latencia o tiempo lag, cuantificando el retardo en el tiempo que produce el antioxidante respecto del control sin agente antioxidante.

La oxidación pasa por tres fases consecutivas, la fase de latencia (lag) que se caracteriza por una degradación mínima de los PUFAs y una pérdida de los antioxidantes; después los PUFAs se oxidan a hidroperóxidos lipídicos que sólo son productos intermedios (fase de propagación-log). Estos productos se descomponen en derivados de aldehídos, acompañados por grandes cambios en la partícula de LDLs (fase de descomposición). La duración de la fase lag muestra una relación lineal con el contenido de alfa-tocoferol en las LDLs. (Esterbauer H *et al* 1992)

Como se sabe, las lipoproteínas de baja densidad están compuestas por alrededor de 3000 ácidos grasos (50% poliinsaturado) y una molécula simple de apolipoproteína B100 (500 kDa). Aparentemente la oxidabilidad de las LDL con antioxidantes propios representa un parámetro muy sensible al cambio en la composición de los ácidos grasos en la LDL, donde la resistencia global a la oxidación de LDL es una combinación de la contribución individual de diferentes factores como la composición total de lípidos, la densidad de la LDL y el contenido de antioxidantes. (Kontush *et al* 2002)

Giacopini *et al* 2002 encontró que el alfa-tocoferol es sólo un contribuyente menor a la resistencia a la oxidación de las LDL aisladas bajo condiciones oxidativas usando de 7.5 a 14  $\mu\text{mol}$   $\text{Cu}^{2+}$  por cada  $\mu\text{mol}$  LDL.

## 2.8 Medición de la capacidad de atrapar radicales libres

Los radicales libres y otras especies oxidadas se forman metabólicamente como intermediarios parcialmente reducidos, son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado y por lo tanto con propiedades paramagnéticas que les confieren una alta e indiscriminada reactividad .(Halliwell y Gutedrich 1999)

La evaluación de actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida por la captura de estos.

El ensayo *in-vitro* con el radical libre DPPH (1,1-difenil-2- picril hidrazilo), se considera representativo entre los métodos que emplean modelos radicales en la evaluación de la actividad antioxidante debido a su estabilidad. (Brand Williams *et al* 1995)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Determinar la capacidad protectora de los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de los residuos de Palma de aceite, frente a la oxidación inducida *in vitro* de la Lipoproteínas de baja densidad.

#### 3.2 Objetivos específicos

Establecer los contenidos medios de tocoferoles y tocotrienoles en las muestras de fibra prensada y foliolos recolectados en plantas extractoras de aceite de palma.

Recuperar por extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico sustancias con actividad antioxidante a partir de los residuos de Palma de aceite.

Determinar la capacidad protectora *in vitro* de los tocoferoles y tocotrienoles presentes en los extractos supercríticos sobre la oxidación de la LDL.

Comparar la capacidad antioxidante de los extractos de fibra y foliolos con la vitamina E comercial en un sistema generador de radicales libres.

## **4 METODOLOGÍA**

### **4.1 Reactivos y equipos**

#### **Reactivos**

CO<sub>2</sub> pureza 99% Cryogas

Metanol reactivo para HPLC Merck

Etol (J. T. Baker, grado HPLC

SERA-PAK<sup>®</sup> Kit para cuantificación de colesterol Merck.

Reactivo de precipitación de LDL (0,68g/l de Heparina correspondiente a 1000.000 UI/l, 64mmol/l de citrato sódico.

Solución de reacción para la determinación de colesterol Ecoline<sup>®</sup> 25

Solución patrón de colesterol de MERK system solution.

Sulfato de cobre pentahidratado de Biomedical

1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), SIGMA

α-Tocoferol 99,5% de SIGMA.

Solución de buffer de fosfatos 0,01M, pH 7,4 y NaCl 0,16 M. (A partir de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O).

Dimetil sulfoxido DMSO

#### **Equipos:**

Estufa Memmert 845 Schwabach

Molino de martillos Raymon N82

Celdas de cuarzo

Espectrofotómetro Helios β No. UVB 052205

Extractor Soxhlet de alta presión J&W Scientific, Folsom, C.A., USA.

Baño circulatorio Fisher Scientific, model 901.

Balanza Analítica AG 258 (Mettler Toledo, ± 0.0001 g)

HPLC (Merck-Hitachi, Serie Lachrom), detector de fluorescencia - FL (Merck-Hitachi, L-7485)

Pipetas de volumen variable 10-1000  $\mu$ L SHOTT.

#### **4.2 Toma de muestras de material vegetal**

La estimación a nivel regional y nacional del potencial de recuperación de tocoferoles y tocotrienoles a partir de la fibra extraída de palma y de foliolos se llevó a cabo en las cuatro regiones palmeras tomando como base de selección de las plantaciones a muestrear, su nivel de participación por producción del promedio regional y nacional y el interés manifestado por cada una.

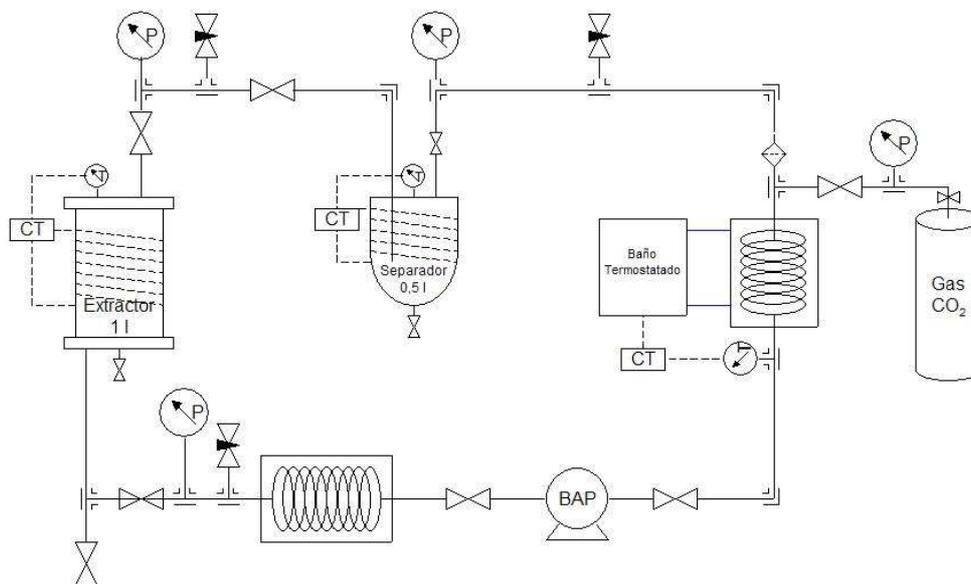
En la Tabla 4 se muestran las plantaciones que participaron, y las muestras que fueron evaluadas. Una vez enviada la carta de presentación del proyecto a diferentes plantaciones del país, se recibió el compromiso de participación de cuatro (4) de ellas, una (1) de la zona central, una (1) de la zona norte, una (1) de la zona oriental y una (1) de la zona occidental, en cada una de estas plantaciones se aplicó un protocolo de recolección de muestras con el fin de garantizar su homogeneidad y otorgar así confiabilidad a los resultados del proyecto.(anexo 12)

**Tabla 4** Plantaciones que participaron en el muestreo

Región	Norte	Central	Oriental	Occidental
Departamento	Cesar	Santander	Meta	Nariño
Municipio	Copey	Puerto wilches	Cumaral	Tumaco
Código	A	B	C	D
No. Muestras	18	14	17	13

### 4.3 Extracción supercrítica

La figura 8 muestra un diagrama esquemático del proceso de EFS. Los cuatro principales pasos involucrados son: *Extracción*, *Expansión*, *Separación* y *Compresión del solvente*. Los cuatro equipos críticos del proceso son: Un extractor de alta presión, una válvula de reducción, un separador de baja presión y una bomba para elevar la presión del solvente reciclado.



**Figura 8** Diagrama básico del proceso de EFS

La fibra prensada para los ensayos de extracción supercrítica se obtuvo de dos plantaciones que en los datos recolectados de la caracterización nacional mostraron menores coeficientes de variación en su composición y mayores contenidos de tocoferoles y tocotrienoles.

Los foliolos usados en este proyecto se recolectaron en las mismas plantaciones usadas para las extracciones en fibra. El CO<sub>2</sub> con 99.9% de pureza se obtuvo de CRYOGAS.

Para evitar el deterioro del material la fibra y los foliolos se empacaron al vacío hasta su extracción.

El equipo de extracción supercrítica usado fue el construido en el desarrollo del proyecto Colciencias 580-2002, con la adición de una Bomba de alta presión de hasta 20ml/min.



**Ilustración 1** Equipo de Extracción construido en el proyecto Colciencias 580-2002

#### 4.3.1 Procedimiento de extracción

La fibra prensada de palma (500g) se cargó al recipiente de extracción de 1.6Lts y el CO<sub>2</sub> se alimentó bombeándolo a 20 ml/min de manera continua

durante 3 horas a presiones 1500psi, 3000 psi y 4500 psi con la adición de 3% de etanol como cosolvente en todos los casos.

Los extractos se recolectaron con intervalos de 30 minutos en la válvula de expansión de recipiente separador y se reservaron para análisis cromatográfico de su contenido de tocoferoles / tocotrienoles.

#### 4.3.2 Acondicionamiento del material vegetal para la extracción

La fibra y los foliolos se acondicionaron primero secándolos hasta peso constante a 60 °C en una estufa con aire caliente y moliéndolos en un molino de martillos con un tamaño de malla de 1,4 mm. Se secaron con el fin de disminuir la actividad de agua y la molienda se utilizó para aumentar la superficie de contacto del agente separador, CO<sub>2</sub> supercrítico y homogenizar la muestra.

#### 4.4 Evaluación del contenido de vitamina E:

El análisis del contenido potencial de vitamina E (Tocoferoles y Tocotrienoles) en el material vegetal se basó en la metodología descrita por Pascal *et al.*, 2004, con modificaciones hechas en el Laboratorio de Caracterización de Aceites de CENIPALMA. Se pesaron 150 mg de arena blanca previamente lavada y seca. Se tomó el material vegetal y se cortó en trozos pequeños, se homogenizó y se pesó con precisión de 0.1 mg una muestra de  $125 \pm 25$  mg.

El material se maceró con la arena hasta pulverización. Se adicionaron 2 mL de cloroformo y se continuó la maceración. El contenido se trasvasó cuantitativamente a un tubo tapa azul de 13 mL y se realizaron extracciones con 2 mL hasta completar un volumen de 10 mL. Se agitó en *vortex* por 30 segundos para homogenizar la solución y se centrifugó a 4000 rpm por 2

minutos. 1 mL de la solución se filtró en membrana de 0.45 mm y 20 µL de la solución filtrada se inyectaron al cromatógrafo para su respectivo análisis.

Este se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC (Merck-Hitachi, Serie Lachrom), empleando un detector de fluorescencia - FL (Merck-Hitachi, L-7485) y una columna Merck (Chromolith RP-18e 2µm 4.6 x 50 mm). Como fase móvil se usó una mezcla de MeOH: H<sub>2</sub>O con flujo 1,6 mL/min de acuerdo con la programación de gradiente que se ilustra en la tabla 5.

**Tabla 5** Condiciones de la fase móvil en el análisis de tocoferoles y tocotrienoles por HPLC

Tiempo, min	Metanol, %	Agua, %
0	80	20
8.5	100	0
15	100	0
17	80	20

Para la cuantificación de α-tocoferol se empleó el método de estándar externo. Se utilizó un patrón certificado SIGMA, lote 119H0889. La curva de calibración se realizó con cinco puntos en concentraciones desde 0.5 hasta 10 mg /L y presentó un  $R^2 = 0.9997$ .

Para la cuantificación de tocotrienoles y la identificación y cuantificación de los isómeros de la vitamina E se usó un patrón secundario *Tocomin*® mezcla de tocoferoles y tocotrienoles que es obtenido por destilación molecular a partir de aceite de palma, producido y comercializado por Carotech industries de Malasia, del cual se conoce la composición en ppm de isómeros de la vitamina E.

Para el análisis del contenido de vitamina E en los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico, se procedió a la preparación de soluciones de los extractos en Cloroformo, para su inyección en el cromatógrafo, los parámetros de

elusión, arreglo de solventes y condiciones de detección son los mismos que los que se emplearon para la cuantificación en el material vegetal.

#### **4.5 Análisis de la capacidad protectora *in vitro* de los tocoferoles y tocotrienoles presentes en los extractos sobre la oxidación de la LDL.**

Para medir el efecto de los extractos sobre la oxidación de las LDL se empleo un sistema *in vitro* propuesto por Estebahuer en 1986, con algunas modificaciones encaminadas a obviar el paso correspondiente a la diálisis de las muestras. Para ello, se aíslan LDL de sangre y se incuban con un inductor de la oxidación, sulfato de cobre  $\text{Cu}^{+2}$ , y el antioxidante o mezcla en estudio.

Los ácidos grasos presentes en la partícula LDL comienzan a oxidarse formándose los dienos conjugados, que son productos intermedios de oxidación. Estos se detectan y se cuantifican en un espectrofotómetro a 234nm. El control se realiza incubando las LDL con el inductor de la oxidación en ausencia del antioxidante. Los resultados se expresan como tiempo de latencia (lag) y tasa de cambio como  $\Delta$  Absorbancia /mn respecto al control.

##### **4.5.1 Toma de muestra**

Este estudio fue realizado en una población masculina sana, entre 25-45 años (n=10) de donantes voluntarios, no fumadores y sin tratamiento previo de antioxidante. Dichos individuos fueron escogidos al azar.

Para la evaluación del potencial de oxidación, a los pacientes se les extrajeron 10 ml de sangre periférica en ayunas de 14 horas, (en tubos vacutainer sin EDTA) y fueron centrifugados a 3.000g por 20 min. Se

determinaron valores básales en suero de colesterol, triacilglicéridos, HDL-Colesterol (SERA-PAK<sup>®</sup>), y LDL-Colesterol utilizando la fórmula de Friedwald:

LDL-Colesterol = Colesterol total – (triglicéridos / 5) – HDL-Colesterol.

#### 4.5.2 Obtención de las fracciones de lipoproteínas LDL

Las diferentes fracciones de lipoproteínas del suero fueron obtenidas por precipitación diferencial con reactivo ECOLINE<sup>®</sup> 100.000 U/L de Heparina.

Se tomaron 4 ml de suero y se le agregó un volumen igual (1:1) de reactivo de precipitación, centrifugándose a 26.000g por 30 min a temperatura ambiente. Se tomó el precipitado del tubo y se resolubilizó en buffer fosfato de pH 6.4 para la posterior determinación de la concentración de proteína.

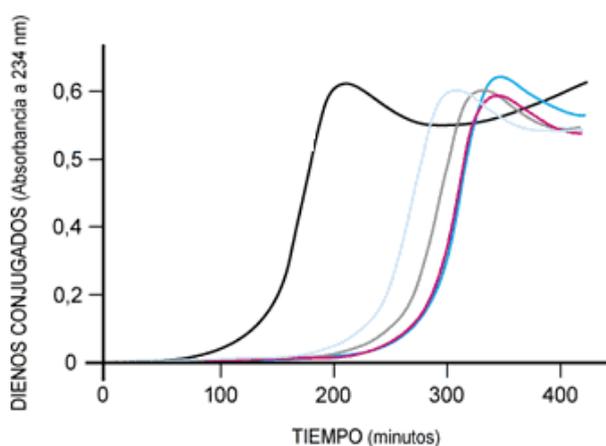
#### 4.5.3 Oxidación *in vitro* de la fracción lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Las fracciones de LDL fueron oxidadas *in vitro* por el método propuesto por Estebahuer *et al*, en 1986. La oxidación de las LDL se activó por la adición de Cu<sup>+2</sup> en solución de concentración 20µM/l en ausencia o presencia del extracto antioxidante a evaluar, el cual se preparó en *dimetil sulfóxido* (DMS) a una concentración equivalente, en todos los casos a 40 µM /L de α-Tocoferol.

La oxidación de las LDL se monitoreó de manera continua por lecturas de la absorbancia a 234 nm directamente sobre el carrusel del espectrofotómetro Spectronic Helios β. UV-Vis de haz sencillo, con 7 cubetas programables, mantenido a 37°C con baño serológico.

#### 4.5.4 Expresión de los resultados

Los resultados se expresan de forma grafica como la tasa de variación de la absorbancia contra el tiempo, y en la intersección de las dos pendientes de la grafica en las fases de latencia (lag) y fase logarítmica (log) se determina el tiempo total de latencia. En la ilustración 2 se muestran curvas típicas de evolución de la absorbancia como una media del incremento de los dienos conjugados en las tres fases descritas en la cinética de oxidación.



**Ilustración 2** Evolución de la Absorbancia con el tiempo

En el anexo 6 se ilustran los cálculos para el tiempo de latencias con base en las ecuaciones de la curva en la zona de inducción (lag) y propagación (log)

#### **4.6 Actividad antioxidante frente a generadores de radicales libres**

La actividad antioxidante fue evaluada mediante un ensayo espectrofotométrico a partir del método planteado por Brand-Williams en 1995. Para cada uno de los extractos se prepararon soluciones concentradas a partir de las cuales se lograron las diluciones adecuadas para ser mezcladas en proporción 1:2 (v/v) con la solución metanólica de

DPPH ( $5,07 \times 10^{-5} \text{M}$ ). La concentración de la solución de DPPH fue ajustada en el rango ( $3,8 \times 10^{-5} - 6,3 \times 10^{-5} \text{M}$ ), de acuerdo con la ecuación:

$$A_{\lambda 550} = 20,36 [DPPH] + 0,02338$$

La lectura de absorbancia a 550 nm fue tomada exactamente veinticinco minutos después de iniciada la reacción y la decoloración fue comparada con una solución que contenía la misma proporción (1:2) de metanol y DPPH.

El porcentaje de decoloración del DPPH fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{Decoloración} = 1 - \frac{(A_m - A_{bm}) \times 1000}{(A_{bDPPH})}$$

Donde  $A_m$ : Absorbancia de la muestra,  $A_{bm}$ : Absorbancia del blanco de la muestra y  $A_{bDPPH}$ : Absorbancia del blanco del DPPH.

Se preparó una solución patrón de 2000 ppm del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) en metanol grado analítico, la cual se almacenó a  $0^\circ \text{C}$ , en recipiente ámbar recubierto con papel aluminio para mayor protección contra luz. Para efectos de esta evaluación se preparó una solución de trabajo de DPPH diariamente, a partir de la solución patrón, almacenada en recipiente ámbar recubierto con papel aluminio y conservada en baño de hielo.

Se realizó seguimiento de la inhibición de soluciones entre 10 y 40 ppm de los extractos de fibra y entre 150 y 750 ppm para los extractos de folíolos, con la solución de trabajo del radical libre DPPH, a través de la lectura espectrofotométrica en el rango visible a 550nm; para cada extracto se graficó el porcentaje de decrecimiento de la absorbancia en el medio de reacción contra la concentración del extracto con el fin de determinar la correlación y la ecuación de la curva usando la herramienta Excel, con la cual se calcula la inhibición del 50% como una forma de expresión de los resultados ( $EC_{50}$ ).

#### **4.7 Manejo estadístico de los resultados**

Para todos los ensayos se utilizó el programa estadístico statgraphics plus 5.1; el análisis de ANOVA se corrió previa verificación de la normalidad e independencia.

En el caso de los análisis del efecto antioxidante sobre las LDLs como se reconoce ampliamente en la literatura, la susceptibilidad individual de las LDL de cada uno de los donantes hace que en la evaluación realizada el comportamiento de los datos no se ajuste a una distribución normal de gauss. Por lo tanto para evaluar el efecto de los tratamientos se acudió a pruebas estadísticas que no se basan en ninguna suposición en cuanto a la distribución de probabilidad a partir de la que fueron obtenidos los datos. Por lo tanto se aplicaron pruebas no paramétricas.

En estos casos se emplea como parámetro de centralización la mediana, que es aquel punto para el que el valor de X está el 50% de las veces por debajo y el 50% por encima.

La prueba de Friedman es el equivalente a la prueba ANOVA para dos factores en la versión no paramétrica. El método consiste en ordenar los datos por filas o bloques, reemplazándolos por su respectivo orden. En esta prueba se consideran k muestras relacionadas que corresponden a k tratamientos referentes a los mismos bloques, con el fin de demostrar una diferencia entre los tratamientos.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Contenido de Vitamina E en el aceite rojo de la Fibra**

Con el propósito de conocer el potencial de recuperación de un extracto con actividad antioxidante a partir del aceite rojo residual en el bagazo (fibra) de palma, se recolectaron muestras de las cuatro regiones productoras y se determinaron los porcentajes de aceite residual por el método AOCS Aa 4-38, y contenido de tocoferoles y tocotrienoles totales por HPLC en el laboratorio de análisis de aceites de Cenipalma según el método descrito.

Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza de un solo factor donde se encontró que existen diferencias significativas en contenidos promedios de aceite rojo residual y contenido de tocoferoles y tocotrienoles, entre las diferentes plantaciones evaluadas por lo que se descartó la posibilidad de obtener un valor representativo del contenido promedio a nivel nacional.

Los resultados a nivel individual de las plantaciones agrupadas por región de los contenidos de aceite, tocoferoles y tocotrienoles fueron sometidos a evaluaciones estadísticas exploratorias cuyo resumen se muestra en la Tabla 6, donde se destaca una variación en los valores medios de porcentaje de aceite y variaciones en el contenido de tocoferoles y tocotrienoles.

Tal como se observa en la tabla 6, las muestras recolectadas presentan una gran dispersión en los resultados, indicando que la fibra es un material muy heterogéneo y que debido a la variedad de material genético que llega en un momento dado a la plataforma de fruta en una planta de proceso, unido a los distintos grados de madurez y condiciones de procesamiento, los contenidos promedios de tocoferoles y tocotrienoles varían en un amplio rango. De manera preliminar se puede indicar que las muestras recolectadas en la zona central muestran un mayor contenido promedio en lo referente a Vitamina E total o a la suma de los isómeros. (Sundram and Gapor 1.992).

Con base en esta información se escogió la zona central como fuente del material vegetal usado en la extracción supercrítica y en la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos. Los datos crudos del muestreo y la estadística correspondiente se encuentran en el anexo 1.

**Tabla 6.** Contenido de aceite rojo y tocoferoles y tocotrienoles en fibra de palma

<b>Origen</b> <b>*</b>	<b>Aceite residual</b>	<b>β+γ</b> <b>Tocoferol</b>	<b>α-</b> <b>Tocoferol</b>	<b>δ-</b> <b>Tocoferol</b>	<b>β+γ</b> <b>Tocotrienol</b>	<b>α-</b> <b>Tocotienol</b>	<b>δ-</b> <b>Tocotrienol</b>	<b>V. E</b> <b>Total</b>
Zona Norte	7.3%	120	268	7	203	127	52	778
Zona Central	6.5%	282	446	9	197	450	125	1510
Zona Oriental	7.1%	242	242	n.d	270	255	64	1073
Zona Occidental	8.0%	122	528	n.d.	113	450	129	1342

\* Los valores corresponden al promedio de 16 muestras por región

Tabla 7. ANOVA para Tocoferoles totales según Región de origen

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,14971E6	3	383235,0	1144,76	0,0000
Intra grupos	20086,4	60	334,774		
Total (Corr.)	1,16979E6	63			

Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 regiones evaluadas a un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 8. ANOVA para Tocotrienoles totales según Región de origen

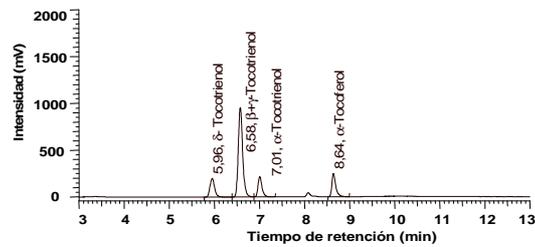
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,34211E6	3	447371,0	4366,11	0,0000
Intra grupos	6147,88	61	102,465		
Total (Corr.)	1,34826E6	63			

Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 regiones evaluadas a un nivel de confianza del 95,0%.

## 5.2 Distribución de los isómeros de vitamina E en los extractos vegetales

Para ilustrar la composición de tocoferoles y tocotrienoles, en la figura 9 puede observarse un cromatograma donde se registran 6 picos que corresponden a los ocho isómeros de la vitamina E, ya que los isómeros  $\beta+\gamma$  tocoferol y tocotrienol no se separan por el método usado.

## Perfil vitamina E en extractos SFE de fibras

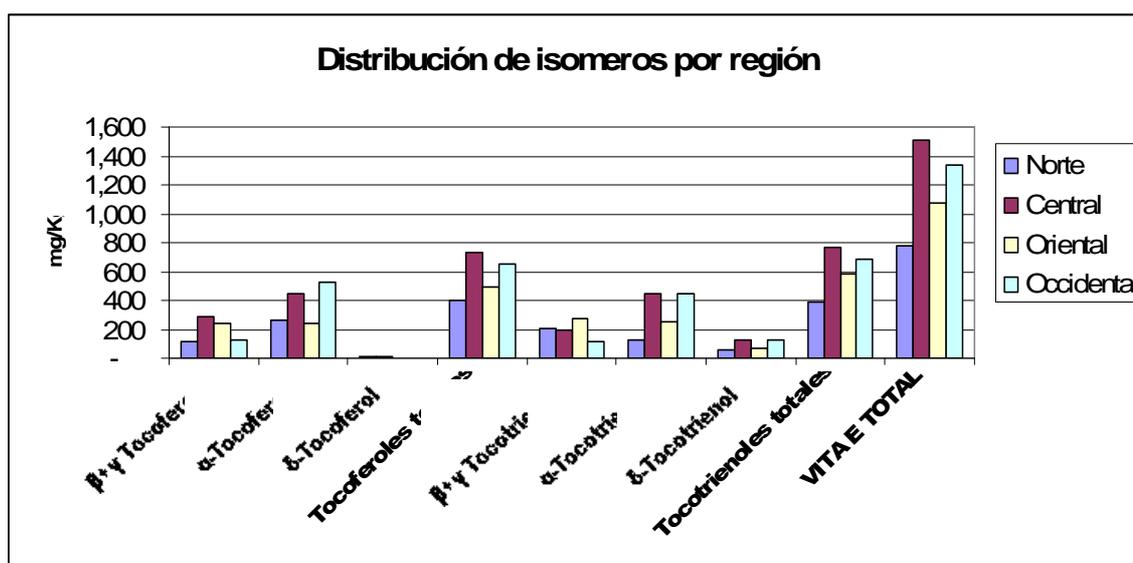


**Figura 9.** Cromatograma obtenido en la determinación de vitamina E en aceite rojo extraído de fibra residual. HPLC/FL, Chromolith RP-18e 2 $\mu$ m 4.6 x 50 mm.

Cuando se analiza la distribución porcentual de los isómeros de la vitamina E en las distintas muestras evaluadas se observa que mientras el aceite rojo de palma tiene un 20% de tocoferoles y un 80% de tocotrienoles (Szulczewska,*et al* 2004), el aceite proveniente de la fibra tiene una distribución de 50:50 con un contenido comparativamente superior de tocoferoles totales, particularmente  $\alpha$ - tocoferol.

Tabla 9. Distribución porcentual de los isómeros

Isómeros	Zona Norte		Zona Central		Zona Oriental		Zona Occidental		Aceite de Palma (Szulczewska et al 2004)		Aceite de Palma Nacional (Corredor et al 2003)	
	ppm	%	ppm	%	ppm	%	ppm	%	ppm	%	ppm	%
β+γ-Tocoferol	120	15	282	21	242	23	122	9	8	1	11	1
α-Tocoferol	268	34	446	34	242	23	528	39	169	15	237	17
δ-Tocoferol	7	1	9	1	nd	0	nd	0	3	0,2	17	1
<b>Tocoferoles totales</b>	<b>396</b>	<b>51</b>	<b>738</b>	<b>56</b>	<b>483</b>	<b>45</b>	<b>650</b>	<b>48</b>	<b>180</b>	<b>16</b>	<b>267</b>	<b>19</b>
β+γ-Tocotrienol	203	26	197	15	270	25	113	8	636	56	848	60
α-Tocotrienol	127	16	450	20	255	24	450	34	232	20	240	17
δ-Tocotrienol	52	7	125	9	64	6	129	10	88	8	62	4
<b>Tocotrienoles totales</b>	<b>382</b>	<b>49</b>	<b>772</b>	<b>44</b>	<b>590</b>	<b>55</b>	<b>692</b>	<b>52</b>	<b>956</b>	<b>84</b>	<b>1150</b>	<b>81</b>
<b>Vitamina E Total</b>	<b>778</b>		<b>1510</b>		<b>1073</b>		<b>1342</b>		<b>1136</b>		<b>1417</b>	



Grafica 1. Distribución por isómeros en cada una de las regiones evaluadas

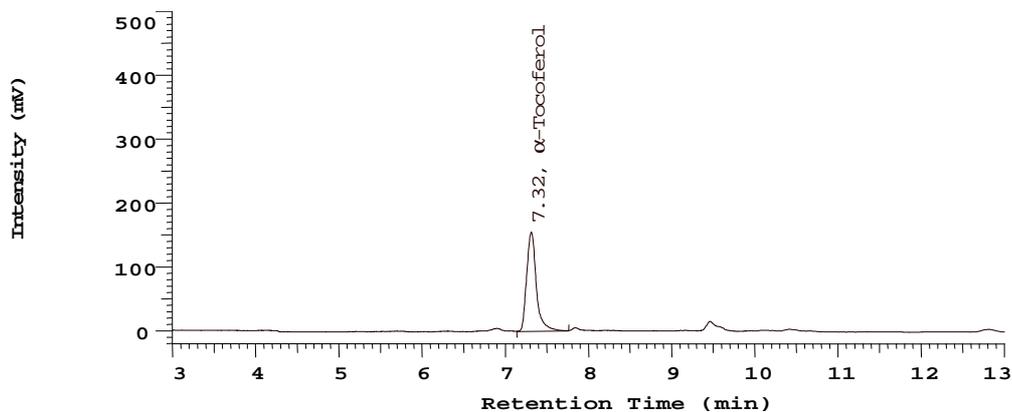
Estos datos difieren de los reportados en 2008 por Lik Nang *et al* del análisis de fibra proveniente de Malasia donde la proporción de estos contenidos es de 60:40.

El fenómeno de enriquecimiento del aceite rojo residual proveniente de la fibra especialmente en alfa tocoferol con relación al aceite crudo obtenido en la primera presión, ha sido reportado por otros autores como Lau *et al* en 2006. Esto puede deberse a la asociación de la vitamina E en la membranas de las células mas internas del mesocarpio, las que no están disponibles para ser extraídas por los procesos mecánicos en las prensas de tornillo.

### **5.3 Contenido de vitamina E en el extracto de foliolos**

Con el propósito de determinar el potencial de recuperación de vitamina E a partir de los foliolos de palma se exploraron las porciones de la hoja en sus secciones apical, media y basal y de igual forma si la edad de la hoja tenía un efecto sobre los contenidos.

En la determinación de vitamina E en foliolos de palma de aceite se esperaba encontrar varios o todos los isómeros ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tocotrienoles y  $\alpha, \beta, \delta, \gamma$ -tocoferoles). Sin embargo, solo se detectó el isómero  $\alpha$ -tocoferol (Figura 10). En la metodología se estudió la posible variación del contenido de vitamina E en muestras secas y se determinó la reproducibilidad de la metodología usando como parámetro la desviación estándar y la desviación estándar relativa entre las mediciones.



**Figura 10.** Cromatograma obtenido en la determinación de vitamina E en folíolos. HPLC/FL, Chromolith RP-18e 2 $\mu$ m 4.6 x 50 mm.

Con la metodología establecida, se procedió a evaluar la repetitividad en el procedimiento para determinar vitamina E. Para ello se realizaron determinaciones ( $n = 5$ ) usando el mismo folíolo, que en este caso fue del medio de la hoja 7. Las determinaciones mostraron los siguientes valores de vitamina E 159, 174, 150, 152 y 165 mg /kg en el folíolo. El promedio de las mediciones más o menos la desviación estándar (SD) fue de  $160 \pm 10$ . Estos valores están de acuerdo con las determinaciones de  $\alpha$ -tocoferol realizadas por Pascal *et al.*, 2004.

Los análisis de varianza evidenciaron que existen diferencias altamente significativas para los contenidos de vitamina E entre las zonas de la hoja (apical, medio y basal), así como entre las diferentes hojas (1, 3, 7 y 9).

Tabla 10. Contenido de vitamina E como  $\alpha$ -tocoferol para las diferentes hojas y zonas. Los resultados son el promedio  $\pm$  SD, n = 3 son los diferentes foliolos en la zona de muestreo.

Hoja	Zona	$\alpha$ -tocoferol, mg / kg foliolo fresco
1	Apical	22 $\pm$ 4.9
1	Media	14 $\pm$ 5.3
1	Basal	20 $\pm$ 1.2
3	Apical	74 $\pm$ 14.3
3	Media	62 $\pm$ 1.9
3	Basal	54 $\pm$ 3.5
7	Apical	181 $\pm$ 21.7
7	Media	140 $\pm$ 12.2
7	Basal	93 $\pm$ 12.3
9	Apical	266 $\pm$ 44.2
9	Media	110 $\pm$ 50.7
9	Basal	59 $\pm$ 6.7

**Tabla 11.** Resultados del análisis estadístico realizado a los resultados de análisis de vitamina E en foliolos.

Fuente	Grados de libertad	F	P
Foliolo	2		
Zona	2	48.6	0.00
Hoja	3	83.9	0.00
Zona x hoja	6	16.0	0.00
Total	34		
Media general	91.7		
CV, %	21.38		

Igualmente, se evidencian diferencias significativas para la interacción, lo que indica una dependencia entre las zonas de muestreo y las hojas muestreadas, es decir, no son independientes los contenidos de vitamina E en las diferentes hojas ni en las partes de ellas donde se realizó el muestreo.

**Tabla 12** Vitamina E por zona de la hoja

ZONA DE LA HOJA	Media
Apical	136.87
Media	81.75
Basal	56.58

Para las zonas de muestreo en la hoja existieron diferencias significativas, encontrando el mayor contenido en la zona apical y el menor contenido en la parte basal.

**Tabla 13.** Contenido de  $\alpha$ -Tocoferol por numero de hoja

HOJA	mg/Kg de foliolos secos
9	146.27
7	138.22
3	63.56
1	18.89

Con base en los resultados se escogieron las hojas 9 para muestreo del material necesario para la extracción supercrítica, por tener el mayor contenido de  $\alpha$ -tocoferol. La toma de muestra se describe en el anexo 12.

## 5.4 Resultados de extracción supercrítica

### 5.4.1 Recuperación de aceite rojo a partir de fibra seca

Con base en los resultados reportados por otros autores como Brunner *et al* 1995; Choo *et al* 1996; Lau *et al* 2006, se escogieron las condiciones de proceso descritas en la metodología, la técnica de extracción usada en este estudio es un proceso isotérmico a 40°C, con la adición de 3% de Etanol, donde se vario la presión del CO<sub>2</sub> en un rango entre 1500 y 4500 psi, lo que trae como consecuencia un cambio en propiedades como la densidad (anexo2) del CO<sub>2</sub>, el volumen específico y por lo tanto la relación de masa entre el solvente y el soluto afectando el fenómeno de transferencia de masa en la extracción.

En esta dirección, Lik Nang en 2008 reporta un incremento de la solubilidad del aceite de palma en el CO<sub>2</sub> que pasa de 0.5 mg de aceite/gr. de CO<sub>2</sub> a 10 Mpa (aproximadamente 1500 psi) a 2.5 mg de aceite/gr. de CO<sub>2</sub> a 40 Mpa (aproximadamente 4500 psi).

En la tabla 14 se aprecian los resultados de extracción de aceite rojo a partir de la fibra seca en las diferentes condiciones de presión, comparando los resultados con el método tradicional de extracción con hexano para el mismo material. En el anexo 3 se encuentran los datos crudos de las extracciones y la estadística correspondiente.

**Tabla 14** Porcentaje de extracto recuperado sobre muestra seca

Presión de extracción en psi	Temperatura de extracción °C	Peso de fibra seca en gr.	Peso de extracto recuperado en gr.	% de Extracto	% de aceite por método Soxhlet con hexano	% de recuperación
1500	40	502.5	4.47	0.89%	8.9	10%
3000	40	500.8	7.93	1.58%	8.8	18%
4500	40	501.2	21.55	4.3%	8.6	50%

Quando se comparan los rendimientos de extracción por el método soxhlet con hexano y la extracción supercrítica a 4500 psi se encuentra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos de extracción en un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 15** ANOVA para la recuperación según tipo de extracción

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	116,6	1	116,6	1266,25	0,0000
Dentro de los grupos	2,02583	22	0,0920833		
Total	118,626	23			

**Tabla 16** Contraste Múltiple de Rango para recuperación según tipo de extracción

Método: 95,0 porcentaje LSD			
Nivel	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2-Supercrítica	12	4,30833	X
1- Soxhlet	12	8,71667	X
Contraste	Diferencias		+/- Límites
1 - 2	*4,40833		0,25692

\* indica una diferencia significativa.

#### 5.4.2 Concentración de vitamina E en el aceite rojo extraído de la fibra

La presencia de un 3% de etanol modifica la polaridad del CO<sub>2</sub>, permitiendo la salida a baja presión de los Tocoferoles- Tocotrienoles pues resultan más solubles que los triglicéridos en el CO<sub>2</sub> a las condiciones descritas, tal como lo confirman otros estudios que describen el fraccionamiento de aceites por CO<sub>2</sub> supercrítico, valiéndose de estas diferencias de solubilidad (Mendes *et al.*, 2002 ; Mendes *et al.*, 2005 y Lik Nang 2008).

En este estudio, como en otros consultados, se da un efecto de dilución pues el porcentaje de recuperación de aceite rojo se correlaciona de manera inversa a la concentración de vitamina E en los extractos, tal como se observa en la tabla 17 donde la concentración de tocoferoles y tocotrienoles en el extracto obtenido a 1500 psi es aproximadamente 2.5 veces la concentración en el extracto obtenido a 4500 psi.

Los datos crudos de extracción y la estadística correspondiente se encuentran en el anexo 4.

**Tabla 17** Concentración de vitamina E en el aceite rojo obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de fibra.

Presión de extracción en psi	Gramos de fibra en el extractor	Gramos de extracto recuperado n = 12	% de Extracto recuperado con CO <sub>2</sub>	mg de TyT3/kg de extracto supercrítico	mg de TyT3/kg de extracto en cloroformo
1500	500	4,5	0.89%	2630	1785
3000	500	7,9	1.58%	1393	1785
4500	500	21,5	4.3%	1092	1785

La mayor solubilidad de los tocoferoles y tocotrienoles en el CO<sub>2</sub> a más baja presión potencialmente permitiría la obtención de extractos enriquecidos.

Cuando se evalúan los resultados de extracción de tocoferoles y tocotrienoles en cada una de las presiones de trabajo se encuentra que existen diferencias significativas en el porcentaje de recuperación bajo cada condición de estudio en un nivel de confianza de 95%, estos datos se evidencian en la tabla 18.

**Tabla 18** Resumen Estadístico para Tocoferoles y tocotrienoles totales recuperados por CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de fibra seca.

PRESIÓN	Frecuencia	Media	Varianza	Desviación típica
1500	12	2630,17	7683,61	87,6562
3000	12	1392,5	2308,09	48,0426
4500	12	1091,58	1708,63	41,3356
Total	36	1704,75	459632,0	677,962

#### Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,59584E7	2	7,97922E6	2045,90	0,0000
Intra grupos	128704,0	33	3900,11		
Total (Corr.)	1,60871E7	35			

#### 5.4.3 Concentración de vitamina E en los extractos de folíolos

Los folíolos por su parte presentan un mal comportamiento frente a la extracción supercrítica, reportando extractos de muy baja concentración comparada con la obtenida por agotamiento con cloroformo, debido posiblemente a un fenómeno de compatibilidad de los otros componentes que co-eluyen con el tocoferol a las condiciones de extracción supercrítica empleada en este estudio.

**Tabla 19** Datos de extracción de foliolos

Presión de extracción en psi	Temperatura de extracción °C	% de Extracto recuperado con Cloroformo	% de Extracto recuperado con CO2	mg de $\alpha$ tocoferol/kg de extracto supercrítico	mg de $\alpha$ tocoferol/kg de extracto en cloroformo
1500	40	1.5	0.34	132	260
3000	40	1.5	0.46	88	260
4500	40	1.5	0.48	90	260

Como se ve en la tabla 19 la concentración de tocoferoles en el extracto disminuye al aumentar la presión por el fenómeno de coelución descrito, resultados parecidos fueron obtenidos por Birtigh *et al* en 1995.

Cuando se comparan los datos de recuperación de extracto por soxhlet y extracción supercrítica se encuentra que existen diferencias significativas con un nivel de confianza de 95%.

**Tabla 20** Resumen Estadístico para recuperación de extractos

TIPO DE EXTRACCIÓN	Frecuencia	Media	Varianza	Desviación típica
1	12	1,53333	0,0206061	0,143548
2	12	0,491667	0,00628788	0,0792961
Total	24	1,0125	0,295924	0,543989

## Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	6,51042	1	6,51042	484,15	0,0000
Intra grupos	0,295833	22	0,013447		
Total (Corr.)	6,80625	23			

## 5.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SOBRE LDL

### 5.5.1 Caracterización de las muestras de sangre

Una vez obtenidas las muestras de sangre de los donantes según los protocolos de laboratorio de bioquímica clínica de la Universidad Javeriana, se procedió a la determinación de las variables bioquímicas de interés.

En la tabla 21, se muestran los valores promedios del colesterol total y de las fracciones de alta y baja densidad. Con estos datos se ajustó la concentración de LDL en la solución de estudio de la oxidación para la muestra de cada donante a un valor equivalente a 0,12 mg de colesterol/ml por resolubilización de las LDL en buffer fosfato.

**Tabla 21** Determinación de la química sanguínea

<b>Donantes masculinos</b>	<b>Colesterol (mg/dL)</b>	<b>Triacilglicéridos (mg/dL)</b>	<b>HDL (mg/dL)</b>	<b>LDL (mg/dL)</b>
<b>(n = 10)</b>	167 ± 21	136 ± 28	46 ± 9	96 ± 22

Los resultados están expresados como la media y la desviación estándar.

Como evaluación complementaria de las características de las soluciones de LDL objeto del estudio de cinética de oxidación, se determinó por el método Lowry con un patrón de albúmina bovina la concentración de proteína. En la tabla 22 se muestran estos resultados.

**Tabla 22** Determinación del contenido de proteína en las LDL aisladas

<b>Donantes masculinos</b>	<b>Proteína (mg/dL)</b>
<b>(n = 10)</b>	54± 14

Los resultados están expresados como la media y la desviación estándar.

### 5.5.2 Determinación del tiempo de latencia

La cinética de oxidación muestra tres fases consecutivas, una fase lag o fase de latencia durante la cual la absorción del dieno aumenta lentamente, una fase de propagación con un rápido incremento de la absorción del dieno y finalmente una fase de descomposición. La duración de la fase lag está determinada por los antioxidantes endógenos contenidos en la LDLs (Vit E, Carotenoides, Retinilestearato). (Kontush *et al* 2002)

Una vez recogidos los valores de absorbancia a 234 nm de las muestras de LDL en buffer fosfato con y sin la adición de los extractos antioxidantes en presencia del agente inductor, se procedió a graficar estos resultados obteniendo mediante la herramienta Excel las rectas de ajuste en las dos fases principales, la de latencia lag y la de propagación. Estos cálculos se ilustran en el anexo 6.

### 5.5.3 Tiempo de latencia de las LDL frente a los tratamientos

En la tabla 23 se observan los valores promedio del tiempo de latencia determinado como la intersección de la pendiente de la porción de la curva de la fase de latencia y la pendiente de la porción de la curva correspondiente a la propagación, expresado en minutos para el total de los donantes cuyas determinaciones se realizaron por triplicado, frente a cada

uno de los extractos evaluados. Los datos crudos y la estadística correspondiente se encuentran en el anexo 7.

**Tabla 23** Fase de latencia para las LDL puras y con extractos de fibra y de foliolos.

Donantes masculinos	t lag en min. LDL nativa	t lag en min. LDL/ extracto de fibra(40µM/L de α-TF)	Tiempo lag en min. LDL/ extracto de foliolos(40µM/L de α-TF)	Tiempo lag en min LDL / Vit.E. comercial (40µM/L de α-TF)
(n = 30)	83,8 ± 6,6	131,5 ± 26,7	92,7 ± 8,8	98,8 ± 14,3

Como referencia se tomaron los datos de tiempo de latencia para muestras incubadas con vitamina E (acetato de α-Tocoferol) obtenida de BASF.(anexo 9)

Como se reconoce ampliamente en la literatura, la susceptibilidad individual de las LDL de cada uno de los donantes hace que en la evaluación realizada el comportamiento de los datos no se ajuste a una distribución normal de gauss. Por lo tanto, para evaluar el efecto de los tratamientos se acudió a pruebas estadísticas que no se basan en ninguna suposición en cuanto a la distribución de probabilidad a partir de la que fueron obtenidos los datos; por lo tanto, se aplicaron pruebas no paramétricas.

Para este efecto se definieron los tratamientos así:

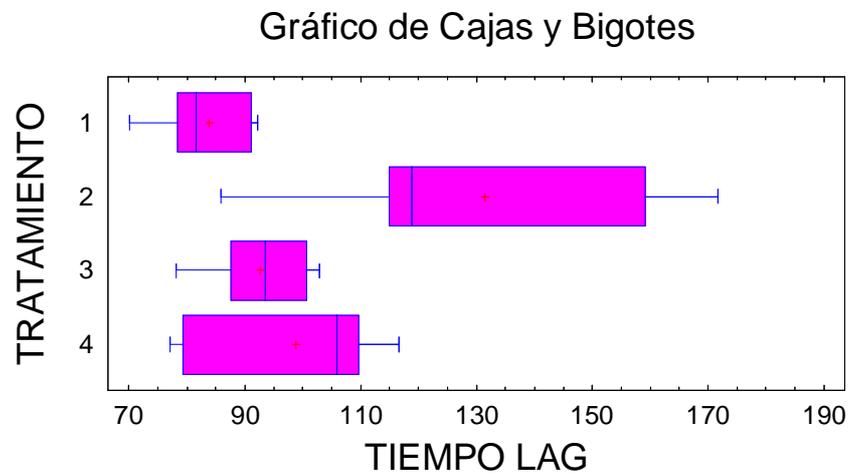
Tratamientos:

T1: LDL Nativa

T2: LDL+Extracto fibra

T3: LDL+Extracto foliolos

T4: LDL+vita E comercial



Grafica 2 Distribución de los resultados de tiempo de latencia en cada tratamiento

Las semejanzas y diferencias se ven en la tabla 24. Como los datos tienen un pareamiento, que es importante, se comparan los tratamientos utilizando la prueba no paramétrica de Friedman. El valor  $P = 0.000$  permite afirmar que los tiempos de latencia son diferentes al comparar los tratamientos.

Tabla 24 Descripción de los tiempos de latencia en cada uno de los tratamientos

Tratamiento	n	media	Desviación estándar	mínimo	máximo	Percentiles		
						25	50	75
T1	10	83.2	6,6	80.27	88.20	80.93	82.2	86.49
T2	10	131,5	26,7	114.47	142.93	119.9	131.6	137.43
T3	10	92,7	8,8	86.30	99.64	86.84	91.9	96.15
T4	10	98,8	14,3	90.40	104.10	91.33	97.25	93.16

Se aplica la prueba de pareamiento de Wilcoxon para cada una de las seis comparaciones entre los tratamientos. En cada uno de los casos se puede aceptar la existencia de diferencias (significativas) entre los tiempos de latencia. La caracterización numérica se muestra en la tabla 25.

**Tabla 25** Caracterización numérica de las diferencias

Contraste Múltiple de Rangos para TIEMPO LAG según TRATAMIENTO

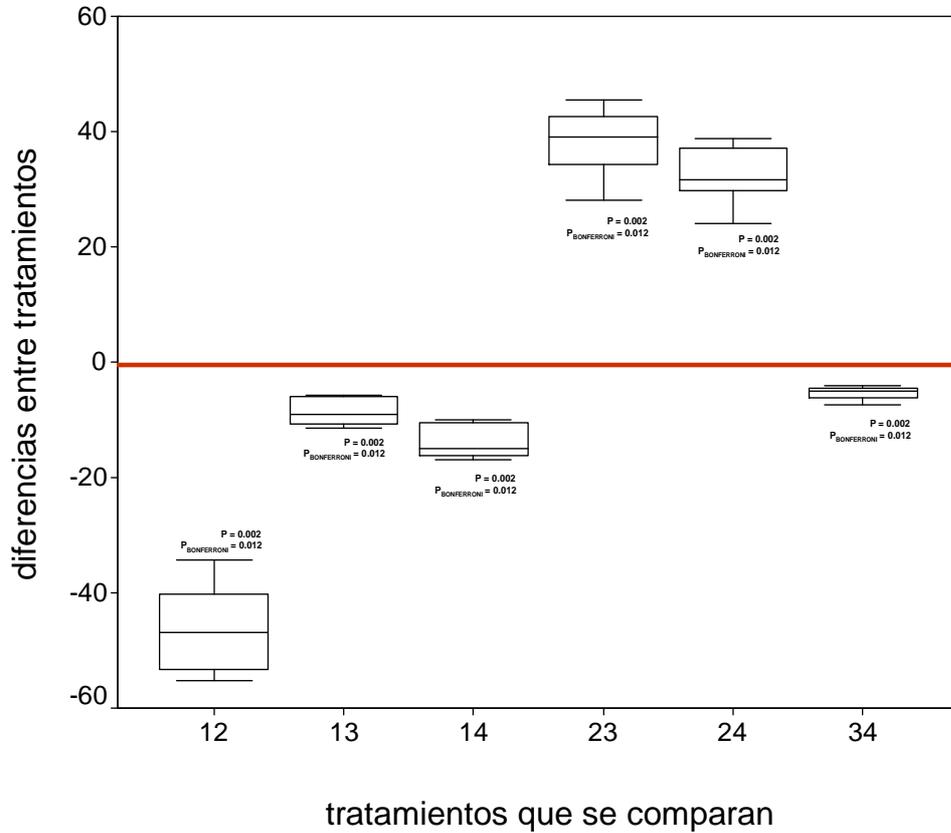
Método: 95,0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	30	83,7843	1,7554	X
3	30	92,7033	1,7554	X
4	30	98,8093	1,7554	X
2	30	131,45	1,7554	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-47,666	4,9213
1 - 3	*-8,919	4,9213
1 - 4	*-15,025	4,9213
2 - 3	*38,747	4,9213
2 - 4	*32,641	4,9213
3 - 4	*-6,106	4,9213

\* indica una diferencia significativa.

Gráficamente:



En el presente estudio de manera preliminar se demuestra que los extractos de fibra en concentraciones de  $40\mu\text{M/l}$  son capaces de limitar la oxidación de las LDL elevando el tiempo de latencia un 54% respecto al tiempo de latencia para las LDLs sin tratamiento, y un 32% respecto a las LDL enriquecidas con una concentración equivalente de Alfa tocoferol en vitamina E comercial.

El efecto complementario sobre la actividad antioxidante de la vitamina E comercial que solamente contiene Alfa tocoferol en forma de acetato, podría explicarse por el contenido de trocotrienoles en los extractos naturales de la fibra, que en la caracterización representan el 50% del total de los isómeros.

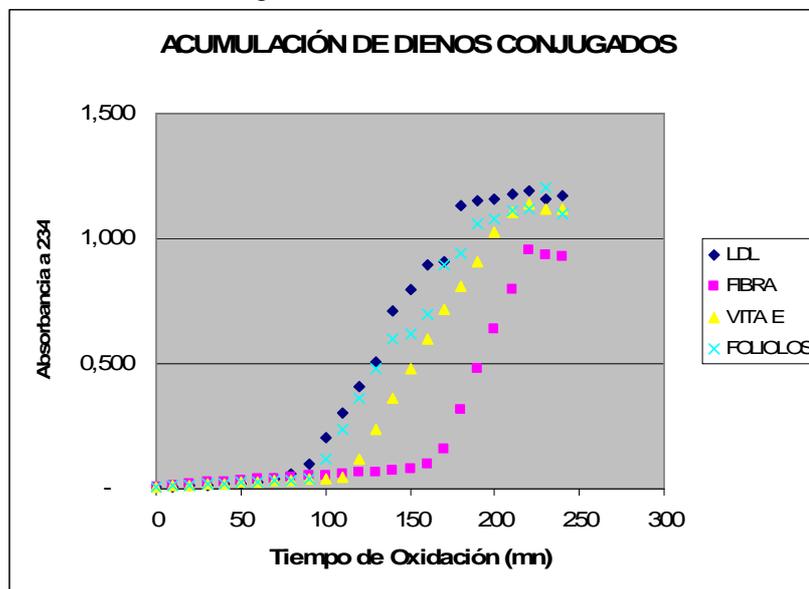
Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el extracto de foliolos tiene efecto antioxidante a la concentración evaluada, equivalente al de la vitamina E comercial, en concordancia con los datos de composición que muestran la presencia solamente de alfa tocoferol.

En este estudio y tal como lo han demostrado otros autores, se encontró una marcada diferencia en el grado de oxidación entre muestras sometidas a las mismas condiciones oxidativas atribuibles a una diferencia en la composición de los ácidos grasos y en el contenido de antioxidantes endógenos para cada uno de los individuos donantes en el presente estudio. Estas diferencias no se probaron analíticamente pero estudios como el de Giacomini en 2002 mostraron estas correlaciones.

#### 5.5.4 Comportamiento de las cinéticas de oxidación de las LDL enriquecidas con los distintos extractos

Cuando se superponen los comportamientos de las cinéticas de oxidación para cada uno de los casos de estudio, se encuentra que además de tener un efecto sobre la fase de latencia, que es aquella en donde se consumen los antioxidantes, la adición de los extractos de fibra tiene un efecto remanente que disminuye la velocidad de la fase de propagación. Esto puede deberse a otros componentes en el extracto de la fibra que actúan también como agentes co-antioxidantes tales como la ubiquinona, los fitoesteroles y el caroteno, que si bien no se determinaron en este estudio, su presencia en el aceite rojo de palma es ampliamente conocida.(Choo *et al* 1998)

Este efecto se ilustra en la grafica 3



**Grafica 3** Cinética de oxidación comparada para los tratamientos

## **5.6 Actividad antioxidante frente a DPPH**

La actividad captadora de radicales libres de los extractos fue medida por espectrofotometría utilizando el DPPH, que es un radical libre de coloración violeta en solución metanólica, que absorbe fuertemente a 550 nm.

El radical se estabiliza en presencia de antioxidantes primarios, resultando en una decoloración proporcional al número de electrones donados, de manera que la interacción de los extractos antioxidantes con el DPPH dependerá de la concentración de compuestos activos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de extracto usados en el ensayo, con la correspondiente correlación de concentración y porcentaje de decoloración, para establecer la concentración equivalente a la decoloración del 50% del DPPH (Ec50), como la forma más común de expresión de los resultados.

Con el objeto de expresar los resultados con relación a un patrón conocido se evaluaron primero los porcentajes de inhibición de la generación de los radicales libres por diferentes concentraciones de vitamina E comercial en forma de acetato de Alfa tocoferol al 20%.

### **5.6.1 Actividad antioxidante frente a DPPH de vitamina E comercial**

A partir de una solución patrón de vitamina E comercial (BASF, en el anexo 9 ficha técnica) en forma de acetato de alfa tocoferol con una concentración del 20%, se prepararon diluciones en un rango entre 0.6 y 1.6 mg de alfa

tocoferol/L y se mezclaron en una proporción de 1:2 con la solución de DPPH con una concentración de 14.6 mg/L. En la tabla 26 se muestran los datos de absorbancia de la solución de DPPH, la absorbancia de las muestras con las diferentes concentraciones de alfa tocoferol y los porcentajes de decoloración.

**Tabla 26** Respuesta de la vitamina E comercial frente al DPPH

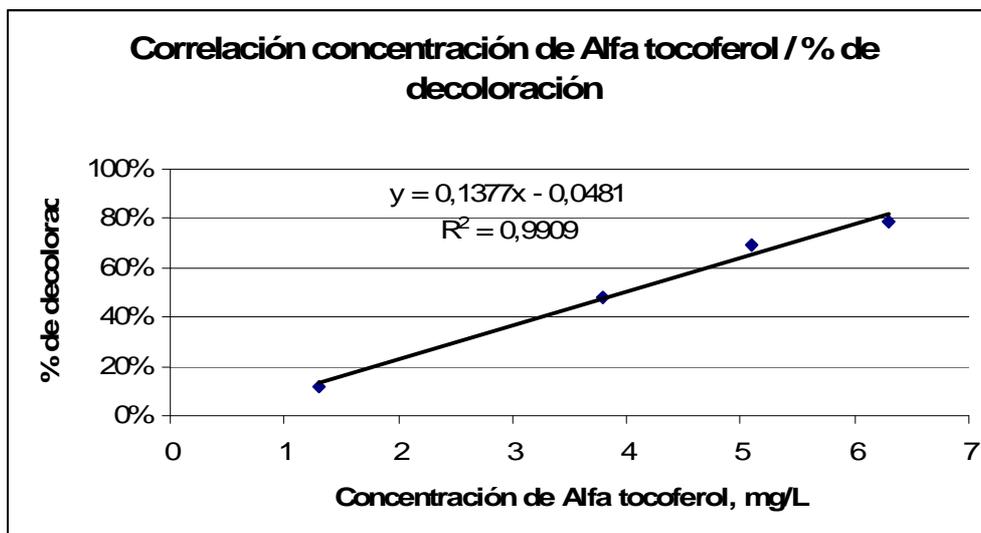
<b>Concentración de Vit.E Comercial mg/L</b>	<b>Concentración alfa tocoferol mg/L</b>	<b>Absorbancia de las muestras(promedio de 3 determinaciones)</b>	<b>% de decoloración</b>
0	0	0.336*	0
1.3	0,26	0.296	11.9
3.8	0,76	0.178	48.2
5.1	1,02	0.110	69.0
6.3	1,26	0.066	78.9

\* Corresponde a la absorbancia del patrón de DPPH

Con el propósito de establecer la correlación y la ecuación de la recta que permita calcular el valor de concentración para un porcentaje de decoloración del 50%, los datos obtenidos se graficaron y se aplicó una técnica de mínimos cuadrados, para encontrar la función de mejor ajuste con un criterio de mínimo error cuadrático. Es decir minimiza la suma de cuadrados de las diferencias ordenadas entre los datos que genera la función propuesta (Ecuación de la recta) y los datos experimentales.

En la gráfica 4 se presentan los resultados de esta correlación, con base en la ecuación de la recta se calculó el valor  $E_{c50}$  para la vitamina E comercial como 3.9 mg/L es decir 0,78 mg/L de alfa tocoferol.

En el anexo 8 se encuentran los datos crudos para los distintos materiales evaluados.



**Grafica 4** Correlación concentración de Alfa tocoferol/ Porcentaje de decoloración

#### 5.6.2 Actividad antioxidante frente a DPPH de extractos de fibra obtenidos por extracción supercrítica

Para evaluar la actividad antioxidante de los extractos de fibra frente al DPPH se prepararon soluciones entre 3 y 14 mg/L de extracto (aceite rojo) obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico, y se mezclaron en una proporción de 1:2 con la solución de DPPH con una concentración de 14.6 mg/L.

En la tabla 27 se muestran los porcentajes de decoloración de cada una de las concentraciones empleadas.

**Tabla 27** Respuesta del extracto de la fibra frente al DPPH

Concentración Extracto de fibra mg/L	Concentración equivalente de alfa tocoferol mg/L *	Absorbancia de las muestras (promedio de 3 determinaciones)	% de decoloración
0	0	0.336	0
3.5	0,046	0.252	25.9
7.1	0,093	0.180	47.6
10.6	0,139	0.113	68.2
14.1	0,185	0.065	82.7

\* Concentración equivalente de alfa tocoferol es la concentración correspondiente a la densidad óptica determinada para cada muestra de ensayo en la curva patrón de alfa tocoferol.

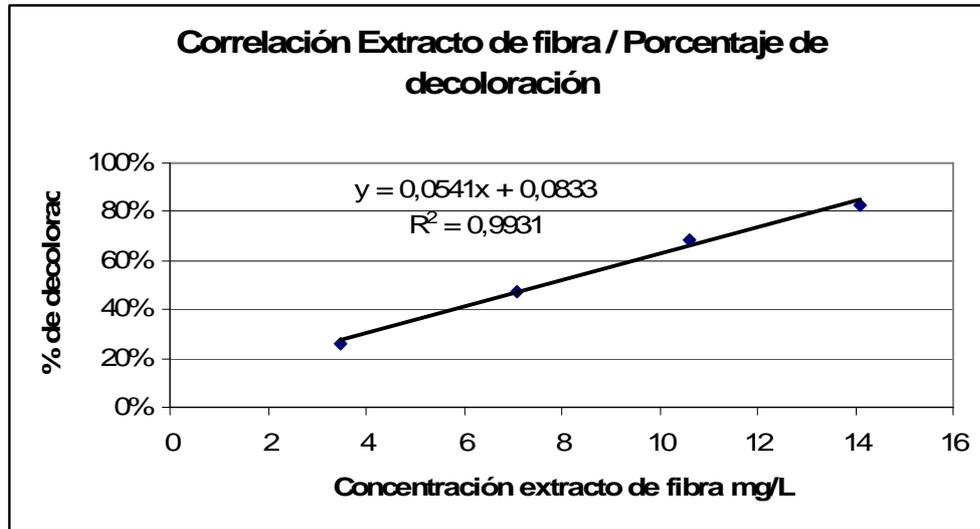
En la tabla 28 aparecen los datos de composición de vitámeros de la vitamina E en el extracto de fibra utilizado.

**Tabla 28** Caracterización del extracto supercrítico utilizado en la evaluación

Origen	$\beta$ + $\gamma$ Tocoferol	$\alpha$ - Tocoferol	$\delta$ - Tocoferol	$\beta$ + $\gamma$ Tocotrienol	$\alpha$ - Tocotienol	$\delta$ - Tocotrienol	V. E Total Mg/Kg
Zona Central	485	768	15	339	775	215	2600

En la grafica 5 se muestra la correlación de la concentración de los extractos y la respuesta de decoloración, con la cual se estableció la recta de mejor ajuste.

**CORRELACIÓN DE LA RESPUESTA DE DECOLORACIÓN Vs LA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO PROVENIENTE DE LA FIBRA**



**Grafica 5** Correlación de la concentración de extracto de fibra/ Porcentaje de decoloración

Con base en la ecuación generada se calculó el valor  $E_{c50}$  para el aceite rojo proveniente de la fibra como 7.9 mg/L.

Todas las muestras evaluadas tienen el mismo comportamiento en la correlación de la concentración y el porcentaje de inhibición mostrando un ajuste mayor al 99%. Cuando se comparan los resultados obtenidos por los extractos de fibra frente al comportamiento de la vitamina E comercial evaluado bajo las mismas condiciones, la actividad es equivalente al 46 % (3,9mg / 7.9mg). Este valor permite pensar en los extractos de fibra como una fuente promisorio de vitámeros de vitamina E, en la cual por lo menos el 50% corresponde a tocotrienol.

### 5.6.3 Actividad antioxidante frente a DPPH de extractos de foliolo obtenidos por extracción supercrítica

Al ser los extractos de foliolo más pobres en antioxidantes según los resultados de caracterización, se prepararon soluciones entre 25 y 350 mg/L del extracto obtenido a partir de los foliolo. El contenido de alfa tocoferol en los extractos de foliolo utilizados fue de 132 mg/kg.

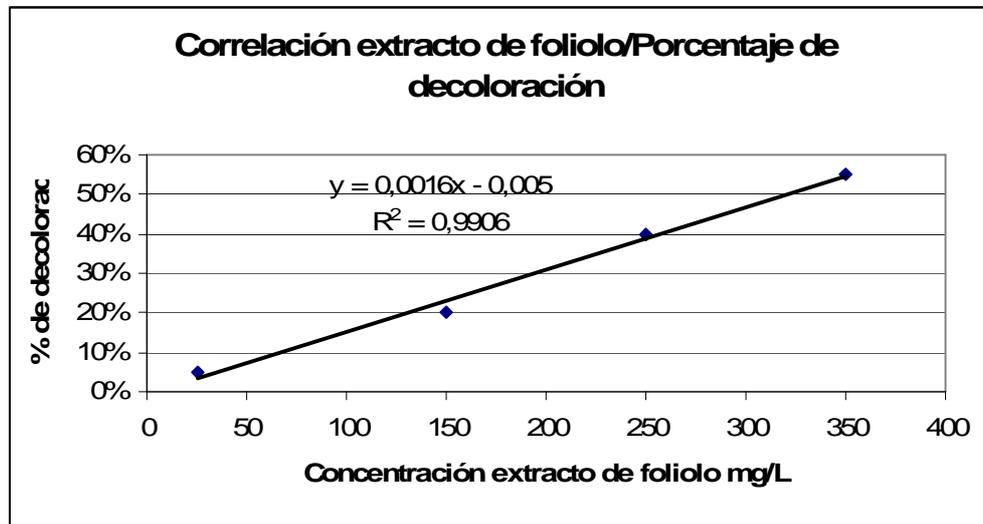
En la tabla 29 aparecen los resultados de actividad antioxidante.

**Tabla 29** Respuesta del extracto de foliolo frente al DPPH

Concentración extracto mg/L	Concentración alfa tocoferol mg/L	Absorbancia de las muestras (promedio de 3 determinaciones)	% de decoloración
0	0	0.336*	0
25	0,04	0,347	5.0
150	0,24	0.292	20.0
250	0,40	0.219	40.0
350	0,56	0.164	55.0

\* Corresponde al blanco de DPPH

**CORRELACIÓN DE LA RESPUESTA DE DECOLORACIÓN Vs LA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO PROVENIENTE DE LOS FOLIOLOS**



**Grafica 6** Correlación de la concentración de extracto de foliolos/ Porcentaje de decoloración

La concentración de extracto de foliolo capaz de decolorar el 50 % del DPPH es de 309 mg/L. Cuando se observa la actividad de los extractos de foliolo frente a la actividad de la vitamina E comercial en condiciones equivalentes, este solamente exhibe una actividad del 1.2 % (3.9mg/309mg) de la actividad de la vitamina E comercial, por lo tanto los extractos de foliolo presentan una pobre actividad y no podrían considerarse como una buena fuente de antioxidantes con propósitos comerciales.

Como otra forma de expresión de los resultados se calcularon los valores equivalentes de Alfa tocoferol para las concentraciones Vitamina E comercial, extracto de fibra y extracto de foliolos necesarios para alcanzar un porcentaje de decoloración del 50% del radical DPPH (EC50).

En la tabla 30 se ilustran estos resultados.

**Tabla 30** Comparación del comportamiento de los extractos frente al DPPH

Muestra	EC50(mg/L extracto)	Contenido de Alfa tocoferol en mg	Contenido de Tocotrienoles en mg	Porcentaje de Actividad con relación a la Vit E
Vita E comercial	3,6	0,78	-	100%
Extracto de Fibra	7,9	0,11	0,12	46%
Extracto de foliolo	309	0,50	-	1,2%

Cuando se correlacionan los contenidos de alfa tocoferol, con la actividad antioxidante de los extractos, se observa que para una misma actividad(EC50) en el extracto de fibra el contenido de alfa tocoferol equivalente es de 0,11mg contra 0,78 mg en la vitamina E comercial, lo que indicaría una actividad antioxidante complementaria en el extracto de fibra, que estaría dada por el contenido de tocotrienoles y los demás agentes antioxidantes presentes en el extracto natural y que coeluyen en la extracción supercrítica.

El porcentaje de actividad frente a la vitamina E comercial, indica que para alcanzar un mismo nivel de actividad antioxidante (EC50) la cantidad de extracto a utilizar es proporcionalmente superior en los extractos, acorde a la composición original.

Estos resultados confirman los resultados obtenidos en el sistema biológico de evaluación constituido por las LDL de donantes voluntarios, donde el extracto de fibra efectivamente presenta una actividad superior al alfa tocoferol y al extracto de foliolos a pesar de que en las condiciones de ensayo la concentración de alfa tocoferol se ajusto en todos los casos a un valor de 40µM. Esto atribuible a los demás agentes antioxidantes presentes en la fibra.

## 6 CONCLUSIONES

La fibra residual de palma es un material muy heterogéneo, debido a la variedad de material genético que llega en un momento dado a la plataforma de fruta en una planta de proceso, unido a los distintos grados de madurez y condiciones de procesamiento; esto se refleja en los contenidos promedios de tocoferoles y tocotrienoles que varían en un amplio rango.

Cuando se analiza la distribución porcentual de los isómeros de la vitamina E en las distintas muestras evaluadas se observa que mientras el aceite crudo de palma tiene un 20% de tocoferoles y un 80% de tocotrienoles, el aceite rojo proveniente de la fibra residual tiene una distribución de 50:50 con un contenido comparativamente superior de tocoferoles totales.

El fenómeno de enriquecimiento del aceite rojo residual proveniente de la fibra especialmente en alfa tocoferol con relación al aceite crudo obtenido en la primera presión, ha sido reportado por otros autores como Lau *et al* en 2006. Esto puede deberse a la asociación de la vitamina E en la membranas de las células mas internas del mesocarpio, las que no están disponibles para ser extraídas por los procesos mecánicos en las prensas de tornillo.

La recuperación de aceite rojo a partir de la fibra se correlaciona inversamente con la concentración de tocoferoles y tocotrienoles en los extractos. Así, al aumentar la recuperación de aceite rojo 5 veces, la concentración de tocoferoles- tocotrienoles en el extracto es 2.5 veces menor.

En el presente estudio de manera preliminar se demuestra que los extractos de fibra en concentraciones equivalentes de 40 $\mu$ M/l de  $\alpha$ -Tocoferol, tienen actividad antioxidante, pues son capaces de limitar la oxidación de las LDL

elevando el tiempo de latencia un 54% respecto al tiempo de latencia para las LDLs sin tratamiento, y un 32% respecto a las LDL enriquecidas con una concentración equivalente de vitamina E comercial.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el extracto de foliolos tiene un efecto antioxidante, pero en el nivel utilizado su actividad es limitada, en concordancia con los datos de composición que muestran bajas concentraciones de alfa tocoferol.

Se encontró una marcada diferencia en el grado de oxidación entre muestras sometidas a las mismas condiciones oxidativas atribuibles a una diferencia en la composición de los ácidos grasos y en el contenido de antioxidantes endógenos para cada uno de los individuos donantes en el presente estudio. Estas diferencias no se probaron analíticamente pero estudios como el de Giacopini en 2002 mostraron estas correlaciones.

Los extractos de fibra y foliolos se comportan frente al DPPH como agentes captadores de radicales libres, con porcentajes de inhibición variables.

El extracto de fibra se presenta como una alternativa interesante en la obtención de antioxidantes con un mecanismo de acción de captura de radicales libres y con un comportamiento proporcional a la concentración de tocoferoles y tocotrienoles en las muestras evaluadas.

Los foliolos de palma son fuente de  $\alpha$ -tocoferol, pero bajo las condiciones de extracción del estudio, la concentración resulta muy baja y la actividad antioxidante es del alrededor del 1.2% de la actividad de la vitamina E comercial.

## 7 BIBLIOGRAFIA

**Armstrong E, Morrow D, Sabatine M.** 2006 Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes. Part III. Biomarkers of oxidative stress and atherogenic growth factors. *Circulation*;113:289-92.13

**Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E.,** 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The royal society of chemistry* 127:183-198

**Bender DA.** 1992 Vitamin E: tocopherols and tocotrienols. En: *Nutritional Biochemistry of the vitamins*. Cambridge: Cambridge University Press, , Cap 4:87-105

**Bertuco, a. Y vetter, g.** 2001 "high pressure process technology: fundamentals and applications" elsevier. Amsterdam.

**Blanco Fuentes C.a., Gómez Pallares M.,, Ronda Balbás F. Y Caballero Calvo P.A.** 2006 "Técnicas Avanzadas de Procesado y Conservación de Alimentos" Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Valladolid. Valladolid.

**Brand-Williams W., Cuvelier M. Yberset C.** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel. Wissenschaft. Und Technologie* 28. 25-30.

**Brunner, G.** 1994 "Gas Extraction. An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes" Steinkopff Darmstadt. Springer, New York.

**Brunner, G., Birtigh, A., Johannsen, M.** 1995. Supercritical fluid extraction of oil-palm components, *J. Supercrit. Fluids*, 8, 46

**Burr MI.** 1994 Antioxidants and cancer. *Journal of Human Nutrition Dietetics*; 7:409-16.

**Cengel. Y.; Boles. M.** 1996. Termodinámica. Editorial McGraw Hill

**Choo, Y. M.; Ma, A.N.; Yap, S.C.** 1998. Caroteno, vitamina E y esteroides en aceites de *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera* y sus híbridos. *Palmas* V 19 No.2; 79-85

**Corredor C., Cortés L.Y. 1, Echeverri D., Guerra M., Delgado W.** 2003. Efecto de los tocotrienoles sobre el perfil lipídico y la formación de placa ateromatosa en conejos alimentados con una dieta aterogénica. *Lecturas Sobre Nutrición* ,10 (4): 35-50

**Correll CC, NG L, Edwards PA.**1994. Identification of farsenol as the non-sterol derivate of mevalonic acid required for the accelerated degradation of 3-hidroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem* 269: 17390-17393.

**De Lucas, A. Martinez De La Ossa, E. Rincon,J.Blanco,M.A.;Gracia,I.** 2002; Supercritica fluid extraction od tocopherol concentrates from olive tree leaves; *Journal of Supercritical Fluids*, Vol 22; number 3, pages 221-228

**Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M.,** 1986 Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. Institute of Biochemistry, University of Graz, Austria

**Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G.** 1992 The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radial Biol Med*;13:341-90.

**Gapor; A. B.; Fujimoto, K.; Shishikura, A.; Kaneda,T.; Arai, K.; Saito, S** 1990., 2, 16.

**Giacopini Mi, H Ortiz Y V Bosch,** 2002 Oxidación de las lipoproteínas de alta y baja densidad del plasma humano y su correlación con la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos. *Revista de la facultad de medicina Universidad Central de Venezuela*, vol.25 no.1

**Gómez M, Valle V., Arós F., Sanz G., Sala J. Fiol M., Bruguera J., Elosua R., Molina L., Martí H., M. Covas I.I, Rodríguez-Llorián A., Fitó M., Suárez-Pinilla M., Amezaga R., Marruga J.,** 2009, LDL oxidada, lipoproteína(a) y otros factores de riesgo emergentes en el infarto agudo de miocardio (estudio FORTIAM) *Revista Española de Cardiología*;62(4):373-82

**Gonzales, M. Y Muñis, P. Vall, V.** 2001.Actividad antioxidante de la cerveza, estudios *in vivo e in-vitro*. Centro de información Cerveza y Salud. 57 p.

**Gracia, I.** 2002. Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *J. Supercrit. Fluids*, 22, 221-228.

**Guthrie, N. Nesaretnam, K., Chambers, A.F. And Carroll, K.K.** 1993. Inhibition of breast cancer cell growth by tocotrienols. *FASEB J.* 7:A70

**Halliwell, B. Y Gutteridge, J.** 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford university press. New york, 3rd edition.

**Jialal I, Norkus EP, Cristol L, Grundy SM.** 1991 beta-Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*. Oct 15;1086(1):134-8.

**Khor H. T., Ng T. T.** 1999 Effects of administration of  $\alpha$ -tocopherol and tocotrienols on serum lipid and liver HMG-CoA reductase activity. Proceeding of the PORIM International Palm Oil Congress (Nutrition), February 1–6, pp. 177–186

**King, J. W., Favati, F., Taylor S. L.** 1996. Production of tocopherol concentrates by supercritical fluid extraction and chromatography, *Separation Sci. Technol.* 31, 1843.

**King, M.R. Y Bott.** 1993. Extraction of Natural Products using near critical Solvents. Blackie Academic.

**Kiran, E.** 2000 Supercritical Fluid. Fundamentals and applications. Nato ASI. Blackie Academic.

**Knez Z. Y Habulin M.** 2002 Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. *Journal of Supercritical Fluids* 23 29–42

**Koleva, I., Van Beek, T., Linsen, J., Groot, A., Y Evstatieva, L.** 2002. Screening of plants extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemistry Analysis* 13: 8-17.

**Kontush Un, T De Spranger, Reich Un, Djahansouzi S, Karten B, Braesen Jh, Finckh B, Kohlschutter Un, Beisiegel U.** 2002 How different constituents of low density lipoprotein determine its oxidizability by copper: a correlational approach. *Journal of Lipid Research*, Vol. 43, 453-462, March

**Kushi Lh, Folsom Ar, Prineas Rj, Mink Pj, Wu Y, Bostick R.** 1996 Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med*; 334;1 156-62.

**Lau, H., Choo, Y.M., Ma, A.N.** 2006. Quality of residual oil from palm-pressed mesocarp fiber (*Elaeis guineensis*) using supercritical CO<sub>2</sub> with and without ethanol., *J.A.O.C.S.* 83, 893-898

**Lee, H., Chung, B.H., Park, Y.H.** 1991. Concentration of tocopherols from soybean sludge by supercritical carbon dioxide, *J.A.O.C.S.* 68, 571

**Li, C., Yue, W. Y Cheng, C.** 2003. Antibacterial and DPPH free radical scavenging activities of ethanol extract of propolis collected in taiwan. *Journal of Food and Drugs Analysis* 11(4): 277-282.

**Lowry O, Rosebrough N, Farr A and Randall R.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.

**Maniam S. ; Mohamed N ; Ahmad N.S ; Ima NS** 2008, Palm Tocotrienol Exerted Better Antioxidant Activities in Bone than  $\alpha$ -Tocopherol Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, MALAISIE Basic & clinical pharmacology & toxicology ISSN 1742-7835 2008

**Mchugh M And V Krukonis.** 1994 "Supercritical Fluid Extraction. Principles and Practice". Butterworth-Heinemann.Stoneham. MA. 2<sup>a</sup> edición.

**Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, Loewel H, Koenig W.** 2005, Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation.*;112:651-7.12.

**Mendes, RL.; Reis AD, Pereira AP, Cardoso MT, Palavra AF and Coelho JP.** 2005. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) from the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) maxima*: experiments and modelling. *Chemical Engineering Journal.* 105: 147-151

**Miller, ER. ; Pastor-Barrinso R., Dalai, D,** 2005. "Meta analysis: High dosage vitamin E supplementation may increase all case mortality" *Ann Intern. Med.* 142: 37-46

**Molyneux, P.** 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrilhidrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of science and technology* 26(2):211-219.

**M Morris ; D Evans ; J Bienias ; C Tangney ; R Wilson** 2005 Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81:508-514.

**Ozilgen, S.; Ozilgen,M.** 1990. Kinetics model of lipid oxidation in foods. *Journal Food Science.*, 55, 498 –536

**Obregon, O, Lares, M Del C, Castro, J.** 2004 Potencial de oxidación de las Lipoproteínas de baja densidad en una población normal y en una población con diabetes mellitus tipo 2. *AVFT*, vol.23, no.1, p.25-29. ISSN 0798-0264.

- Parker R. A., Pearce B. C., Clark R. W., Gordon D. A., Wright J.J.K.** 1993 Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.*;268:11230-11238
- Qureshi A. A., Bradlow B. A., Salser W. A., Brace L. D.** 1997 Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk parameters of hypercholesterolemic human. *J. Nutr. Biochem.*;8:290-298
- Rice-Evans C.A. Y Miller N.J.** 1996. Structure- antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biology Medicine* 20: 933-956.
- Rojano, Benjamín A, Gaviria, Carlos A And Saez, Jairo A.** 2008, Antioxidant Activity Determination in a lipidic peroxidation model of butter inhibited by isoespintanol. *Vitae*, July/Dec. vol.15, no.2, p.212-218. ISSN 0121-4004.
- Rodríguez A, Lozada V, Larraín MA, Quitral V, Vinagre J, Aubourg, SP.** 2007, Development of lipid changes related to quality loss during the frozen storage of farmed coho salmon. *JAOCs*; 84: 727-734.
- Rozowski N, Jaime, Cuevas M, Ada, Castillo V, Oscar.** 2001 Diferencias en antioxidantes plasmáticos según nivel socioeconómico en mujeres chilenas. *Rev. méd. Chile*, ene., vol.129, no.1, p.43-50. ISSN 0034-9887
- Sayto, M., Yamamuchi, Y.** 1990. Isolation of tocopherols from wheat germ oil by recycle semi-preparative supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr.* 505,257
- Serbinova E., Kagan V., Han D., Packer L.** 1991 Free radical recycling and intermembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol, and alpha-tocotrienol. *Free Radic. Biol. Med.*;10:263-275
- Shishikura, A., Fujimoto, K., Kaneda, T., Arai,K., Satio, S.** 1988. Concentration of tocopherols from soybean sludge by supercritical fluid extraction, *J.Jpn. Oil Chem. Soc. (Yucagaku)* 37, 8
- Sotelo, J.L. Y Ovejero, G.** 2003 Procesos con fluidos supercríticos. *Anales de la RSEQ*. Diciembre, vol. 99. p 15-23.
- Stephens Ng, Parsons A, Schofield Pm, Kelly F, Cheesman K, Mitchison Mj,** et al. 1996 Randomised controlled trial of Vit. E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*;347:781-6.

**Sulaswatty, A.** 2002. preliminary study of concentrating carotenoid from red palm oil by supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction system. *International Oil Palm Conference, Nusa Dua Bali, July 8-12*

**Sundram, K. And Gapor Md. Top, A.** 1992. Vitamin E from palm oil: its extraction and nutritional properties. *Lipid Technology*, November/December, 137-141

**Sylvester. P.W., Russell, N., Lp, M.M. And Lp, C.** 1986. Comparative effects of different animal and vegetable fats fed before and during carcinogen administration on mammary tumorigenesis, sexual maturation and endocrine function in rats. *Cancer Res.* 46: 757-762

**Urrego F, Rodríguez L, Herrera L., Ramírez O., Delgado W.,** 2004 “La fibra prensada de palma de aceite, una valiosa fuente de carotenos”, *Ceniavances* No 110 Febrero ISSN 0123-8353

**Witztum JL.** 1993 Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart Journal*; 69:12-8.

**Witztum JL.** The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* 1994;344:793-5

**WC, Otvos, JD, et al.** 2007, Número de partículas LDL y el riesgo de futuras enfermedades cardiovasculares en el Framingham Offspring Study - Implicaciones para la Gestión de LDL. *Journal of clinical Lipidology* 1:583-592

**Yeo S.D. Y Kiran E.** 2005 Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. *J. of Supercritical Fluids* 34 287–308.

**York P., Shekunov B. Y., Kompella U. B.** 2004 *Supercritical Fluid Technology for Drug Product Development.* Marcel Dekker Inc.

#### **Recursos Web:**

[www.fedepalma.org](http://www.fedepalma.org) Información cultivo de palma en Colombia

<http://www.chematur.se/> Descripción de varias aplicaciones de los FSC y conexión a enlaces de interés

[http://www.ceic.unsw.edu.au/centers/scf/scf\\_fig1.htm](http://www.ceic.unsw.edu.au/centers/scf/scf_fig1.htm): resumen sobre fluidos supercríticos: propiedades y aplicaciones

## ANEXO 1 Contenido de Vitamina E. por región

### Contenido de vitamina E por región de muestreo

ZONA	β+γ Tocoferol	α-Tocoferol	δ-Tocoferol	Tocoferoles totales	β+γ Tocotrienol	α-Tocotrienol	δ-Tocotrienol	Tocotrienoles totales	VITA E TOTAL
NORTE	120	268	7	395	203	134	52	389	784
NORTE	124	249	9	382	202	125	51	378	760
NORTE	106	280	6	392	205	124	50	379	771
NORTE	126	270	4	400	206	126	56	388	788
NORTE	100	260	7	367	206	126	54	386	753
NORTE	120	269	9	398	200	130	56	386	784
NORTE	105	287	6	398	205	130	56	391	789
NORTE	100	276	4	380	201	125	43	369	749
NORTE	150	276	5	431	207	132	55	394	825
NORTE	139	278	7	424	200	130	45	375	799
NORTE	121	280	8	409	200	139	52	391	800
NORTE	123	258	4	385	204	131	57	392	777
NORTE	124	256	6	386	202	123	50	375	761
NORTE	135	262	7	404	203	129	55	387	791
NORTE	120	259	8	387	203	125	50	378	765
NORTE	101	265	9	375	206	132	54	392	767
CENTRAL	292	446	9	747	197	450	122	769	1516
CENTRAL	280	443	8	731	194	446	130	770	1501
CENTRAL	280	465	9	754	195	443	124	762	1516
CENTRAL	290	446	6	742	196	465	126	787	1529
CENTRAL	279	426	7	712	202	446	126	774	1486
CENTRAL	287	455	9	751	195	446	120	761	1512
CENTRAL	296	446	10	752	199	455	120	774	1526
CENTRAL	276	430	10	716	195	446	125	766	1482
CENTRAL	278	450	9	737	200	440	120	760	1497
CENTRAL	290	426	6	722	205	450	130	785	1507
CENTRAL	288	437	9	734	189	446	139	774	1508
CENTRAL	256	442	10	708	197	447	121	765	1473
CENTRAL	282	446	8	736	198	442	123	763	1499
CENTRAL	279	476	9	764	194	446	124	764	1528
CENTRAL	280	448	9	737	198	476	125	799	1536
CENTRAL	285	446	8	739	198	448	120	766	1505
ORIENTAL	242	242	2	486	272	258	62	592	1078
ORIENTAL	267	250	2	519	270	249	61	580	1099
ORIENTAL	216	243	2	461	280	250	66	596	1057
ORIENTAL	246	240	4	490	260	250	66	576	1066
ORIENTAL	240	239	5	484	259	260	64	583	1067
ORIENTAL	235	237	3	475	267	249	66	582	1057
ORIENTAL	276	234	5	515	296	257	67	620	1135
ORIENTAL	247	236	7	490	276	255	63	594	1084
ORIENTAL	248	238	5	491	278	250	68	596	1087
ORIENTAL	200	238	3	441	270	258	63	591	1032
ORIENTAL	234	238	2	474	268	250	61	579	1053
ORIENTAL	236	256	1	493	256	258	67	581	1074
ORIENTAL	239	262	1	502	263	256	62	581	1083
ORIENTAL	253	238	1	492	279	259	65	603	1095
ORIENTAL	246	250	2	498	260	249	61	570	1068
ORIENTAL	245	230	4	479	265	265	63	593	1072
OCCIDENTAL	122	528	5	655	113	450	129	692	1347
OCCIDENTAL	120	543	2	665	113	446	134	693	1358
OCCIDENTAL	124	523	1	648	115	443	125	683	1331
OCCIDENTAL	126	516	2	644	114	465	124	703	1347
OCCIDENTAL	126	517	1	644	116	446	126	688	1332
OCCIDENTAL	120	515	3	638	119	446	126	691	1329
OCCIDENTAL	120	516	1	637	110	455	130	695	1332
OCCIDENTAL	105	530	0	635	110	446	130	686	1321
OCCIDENTAL	100	532	1	633	115	440	125	680	1313
OCCIDENTAL	130	536	1	667	112	450	132	694	1361
OCCIDENTAL	139	580	0	719	110	446	130	686	1405
OCCIDENTAL	121	512	0	633	109	447	139	695	1328
OCCIDENTAL	123	517	0	640	111	442	131	684	1324
OCCIDENTAL	124	531	0	655	112	446	123	681	1336
OCCIDENTAL	125	527	1	653	112	476	129	717	1370
OCCIDENTAL	120	526	0	646	113	448	125	686	1332

### Resumen Estadístico para Tocoferoles totales

REGION DE ORIGEN	Frecuencia	Media	Varianza
1	16	394,563	285,729
2	16	736,375	249,317
3	16	486,875	361,85
4	16	650,75	442,2

Total	64	567,141	18568,1	136,265	
REGION DE ORIGEN	Mínimo	Máximo	Rango	Asimetría	tipi.
1	367,0	431,0	64,0	1,09563	
2	708,0	764,0	56,0	-0,443422	
3	441,0	519,0	78,0	-1,03856	
4	633,0	719,0	86,0	4,06101	
Total	367,0	764,0	397,0	-0,0697835	

Tabla ANOVA para Tocoferoles totales según REGION DE ORIGEN

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,14971E6	3	383235,0	1144,76	0,0000
Intra grupos	20086,4	60	334,774		
Total (Corr.)	1,16979E6	63			

Tabla de Medias para Tocoferoles totales según REGION DE ORIGEN con 95,0 intervalos LSD

REGION DE ORIGEN	Error Estándar				
	Frec.	Media	(s agrupada)	Límite inf.	Límite sup.
1	16	394,563	4,57421	388,093	401,032
2	16	736,375	4,57421	729,905	742,845
3	16	486,875	4,57421	480,405	493,345
4	16	650,75	4,57421	644,28	657,22
Total	64	567,141			

Contraste Múltiple de Rango para Tocoferoles totales según REGION DE ORIGEN

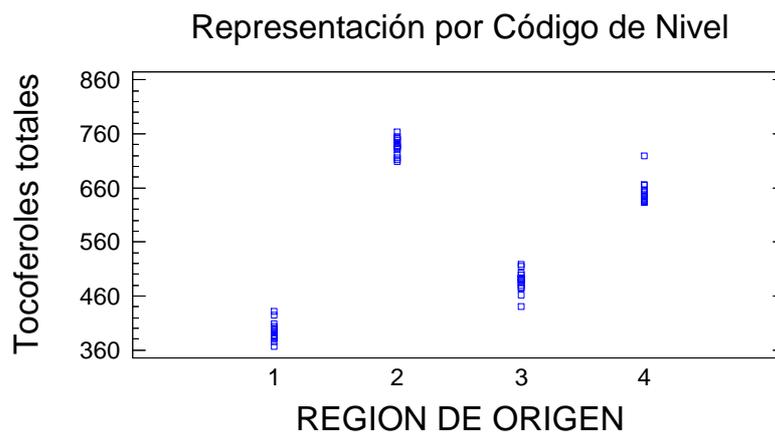
Método: 95,0 porcentaje LSD

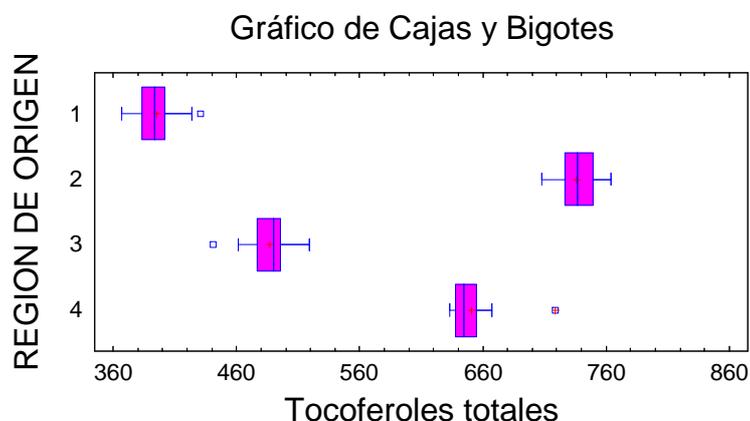
Nivel	Frec.	Media	Grupos homogéneos

1	16	394,563	X
3	16	486,875	X
4	16	650,75	X
2	16	736,375	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-341,813	12,9398
1 - 3	*-92,3125	12,9398
1 - 4	*-256,188	12,9398
2 - 3	*249,5	12,9398
2 - 4	*85,625	12,9398
3 - 4	*-163,875	12,9398

\* indica una diferencia significativa.





Resumen Estadístico para Tocotrienoles totales

REGION DE ORIGEN	Frecuencia	Media	Varianza		
Desviación típica					
1	16	384,375	57,7167	7,59715	
2	16	771,188	117,896	10,858	
3	16	588,563	148,662	12,1927	
4	16	690,875	85,5833	9,25113	
Total	64	608,75	21401,0	146,291	
REGION DE ORIGEN	Mínimo	Máximo	Rango	Asimetría	tipi.
1	369,0	394,0	25,0	-0,971217	
2	760,0	799,0	39,0	2,2829	
3	570,0	620,0	50,0	1,64773	
4	680,0	717,0	37,0	2,57112	
Total	369,0	799,0	430,0	-1,75896	

Tabla ANOVA para Tocotrienoles totales según REGION DE ORIGEN

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,34211E6	3	447371,0	4366,11	0,0000

Intra grupos            6147,88    60    102,465

-----  
 Total (Corr.)            1,34826E6    63

Tabla de Medias para Tocotrienoles totales según REGION DE ORIGEN  
 con 95,0 intervalos LSD

		Error Estándar			
REGION DE ORIGEN	Frec.	Media	(s agrupada)	Límite inf.	Límite sup.
1	16	384,375	2,53062	380,796	387,954
2	16	771,188	2,53062	767,608	774,767
3	16	588,563	2,53062	584,983	592,142
4	16	690,875	2,53062	687,296	694,454
-----					
Total	64	608,75			

Contraste Múltiple de Rango para Tocotrienoles totales según REGION DE ORIGEN

-----  
 Método: 95,0 porcentaje LSD

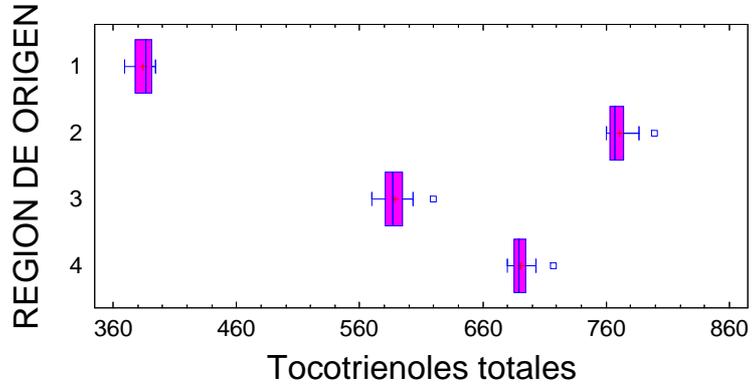
Nivel	Frec.	Media	Grupos homogéneos
1	16	384,375	X
3	16	588,563	X
4	16	690,875	X
2	16	771,188	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*-386,813	7,15875
1 - 3	*-204,188	7,15875
1 - 4	*-306,5	7,15875
2 - 3	*182,625	7,15875
2 - 4	*80,3125	7,15875
3 - 4	*-102,313	7,15875

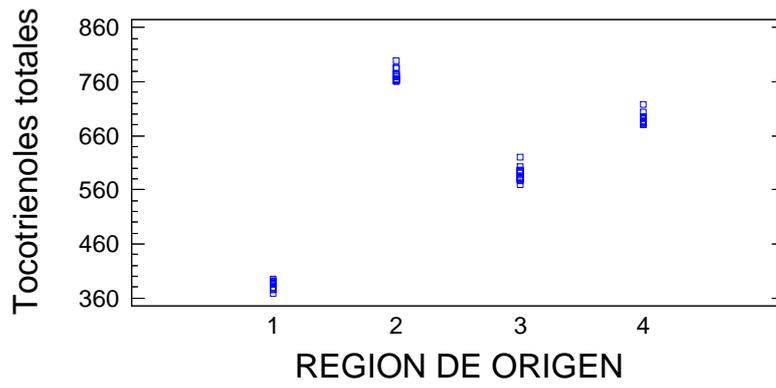
-----  
 \* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

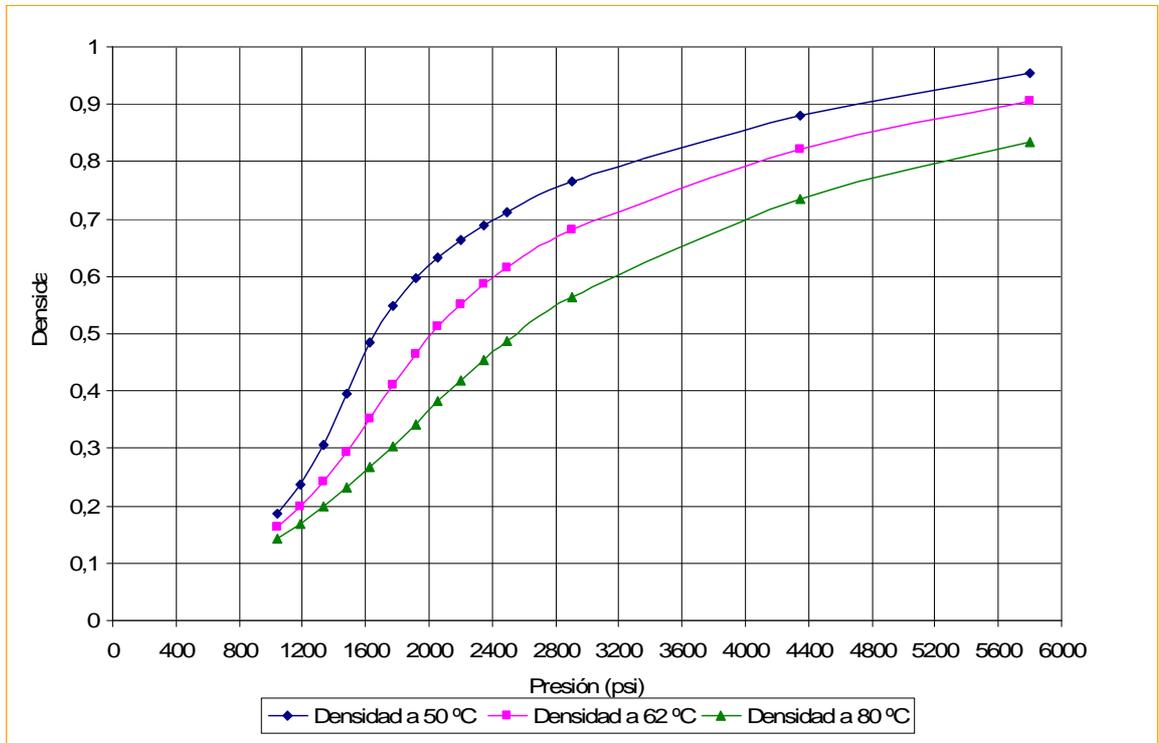
Gráfico de Cajas y Bigotes



Representación por Código de Nivel

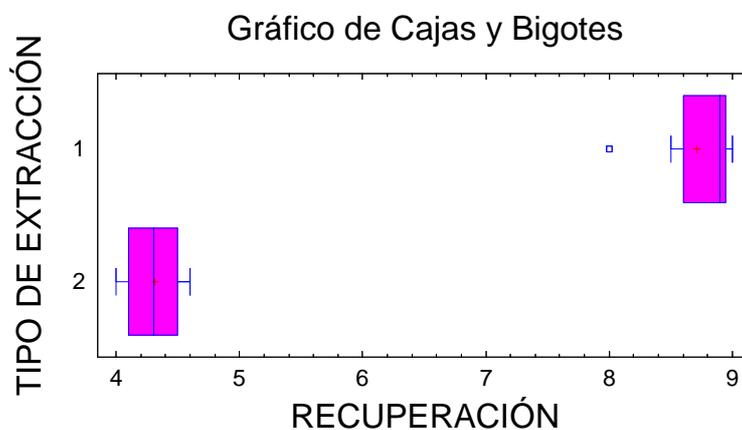
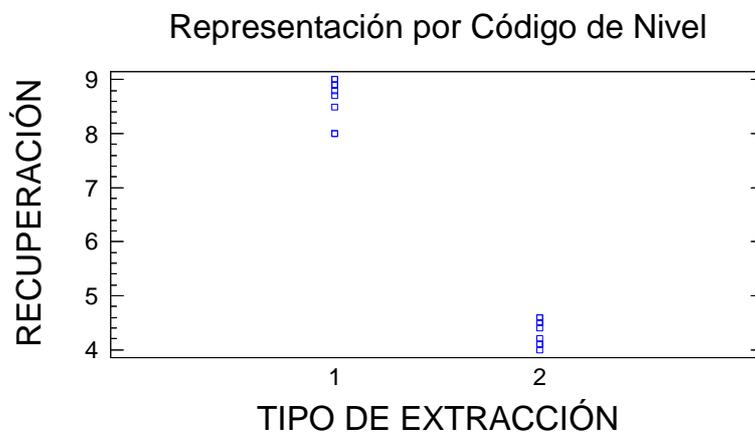


## ANEXO 2 Comportamiento de la densidad del CO2 con la temperatura.



**ANEXO 3 Recuperación de extracto con base en el peso seco de fibra y foliolos.**

Tipo de Extracción		Rendimiento
Soxhlet	1	9,0
Soxhlet	1	9,0
Soxhlet	1	8,7
Soxhlet	1	8,9
Soxhlet	1	8,5
Soxhlet	1	8,9
Soxhlet	1	8,9
Soxhlet	1	8,8
Soxhlet	1	8,9
Soxhlet	1	9,0
Soxhlet	1	8,0
Soxhlet	1	8,0
Supercritica	2	4,1
Supercritica	2	4,4
Supercritica	2	4,5
Supercritica	2	4,6
Supercritica	2	4,1
Supercritica	2	4,0
Supercritica	2	4,6
Supercritica	2	4,1
Supercritica	2	4,2
Supercritica	2	4,5
Supercritica	2	4,1
Supercritica	2	4,5



Resumen del Procedimiento  
 Variable dependiente: REUPERACIÓN  
 Factor: TIPO DE EXTRACCIÓN

Número de observaciones: 24  
 Número de niveles: 2

Tabla ANOVA para REUPERACIÓN según TIPO DE EXTRACCIÓN

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	116,6	1	116,6	1266,25	0,0000
Intra grupos	2,02583	22	0,0920833		
Total (Corr.)	118,626	23			

Tabla de Medias para RECUPERACIÓN según TIPO DE EXTRACCIÓN con 95,0 intervalos LSD

Nivel	Frec.	Error Estándar		Límite inf.	Límite sup.
		Media	(s agrupada)		
1	12	8,71667	0,0875992	8,58821	8,84513
2	12	4,30833	0,0875992	4,17987	4,43679
Total	24	6,5125			

Contraste Múltiple de Rango para RECUPERACIÓN según TIPO DE EXTRACCIÓN

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2	12	4,30833	X
1	12	8,71667	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*4,40833	0,25692

\* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de recuperación de extracto en base al peso seco de Foliolos

Tipo de Extracción	Rendimiento	
Soxhlet	1	1,5
Soxhlet	1	1,4
Soxhlet	1	1,4
Soxhlet	1	1,7
Soxhlet	1	1,8
Soxhlet	1	1,5
Soxhlet	1	1,3
Soxhlet	1	1,5
Soxhlet	1	1,5
Soxhlet	1	1,6
Soxhlet	1	1,5
Soxhlet	1	1,7
Supercritica	2	0,5
Supercritica	2	0,5
Supercritica	2	0,5
Supercritica	2	0,6
Supercritica	2	0,6
Supercritica	2	0,6
Supercritica	2	0,5
Supercritica	2	0,5
Supercritica	2	0,4

Resumen Estadístico para RECUPERACIÓN

TIPO DE EXTRACCIÓN	Frecuencia	Media	Varianza	
Desviación típica				
1	12	1,53333	0,0206061	0,143548
2	12	0,491667	0,00628788	0,0792961
Total	24	1,0125	0,295924	0,543989

TIPO DE EXTRACCIÓN	Mínimo	Máximo	Rango	
Asimetría tipi.				
1	1,3	1,8	0,5	0,56793
2	0,4	0,6	0,2	0,227767
Total	0,4	1,8	1,4	0,151868

TIPO DE EXTRACCIÓN	Curtosis típicada
-----	

1	-0,169559
2	-0,891515

---

Total -1,96517

Tabla ANOVA para RECUPERACIÓN según TIPO DE EXTRACCIÓN

Análisis de la Varianza

---

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	6,51042	1	6,51042	484,15	0,0000
Intra grupos	0,295833	22	0,013447		
Total (Corr.)	6,80625	23			

---

Método: 95,0 porcentaje LSD

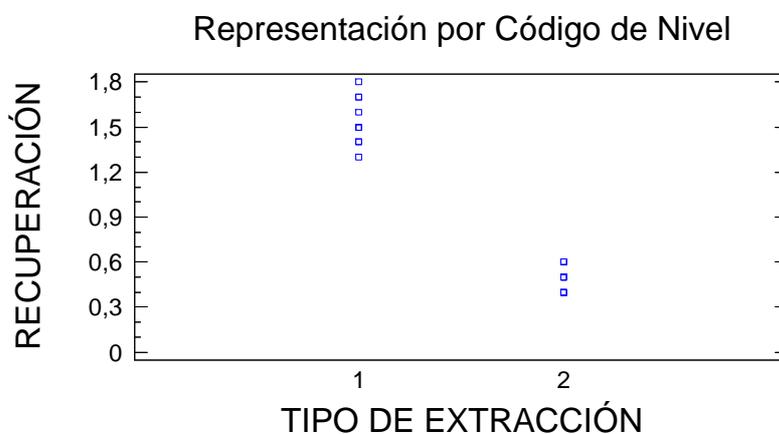
Nivel	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2	12	0,491667	X
1	12	1,53333	X

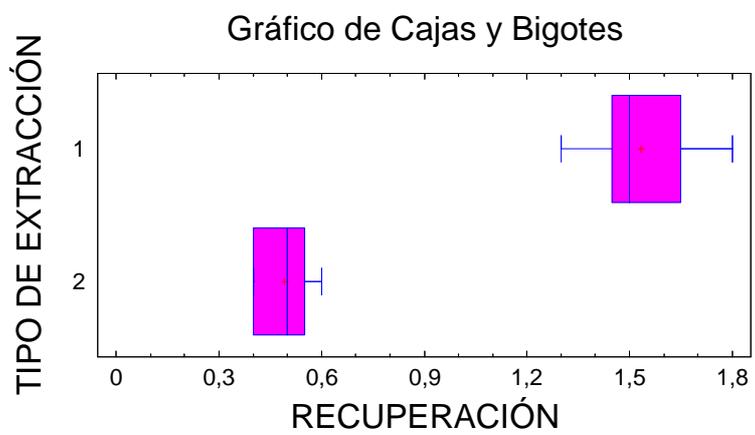
---

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*1,04167	0,0981792

---

\* indica una diferencia significativa.





**ANEXO 4 Concentración de tocoferoles y tocotrienoles en los extractos de fibra recuperados expresada en ppm**

	Presión	Vita E
1	1500	2630
1	1500	2640
1	1500	2780
1	1500	2790
1	1500	2550
1	1500	2560
1	1500	2567
1	1500	2678
1	1500	2689
1	1500	2554
1	1500	2573
1	1500	2551
2	3000	1393
2	3000	1465
2	3000	1456
2	3000	1342
2	3000	1334
2	3000	1345
2	3000	1387
2	3000	1421
2	3000	1432
2	3000	1345
2	3000	1435
2	3000	1355
3	4500	1092
3	4500	1098
3	4500	1102
3	4500	1008
3	4500	1123
3	4500	1102
3	4500	1100
3	4500	1097
3	4500	1078
3	4500	1099
3	4500	1029
3	4500	1171

Tabla ANOVA para VIT E TOTAL según PRESIÓN

### Análisis de la Varianza

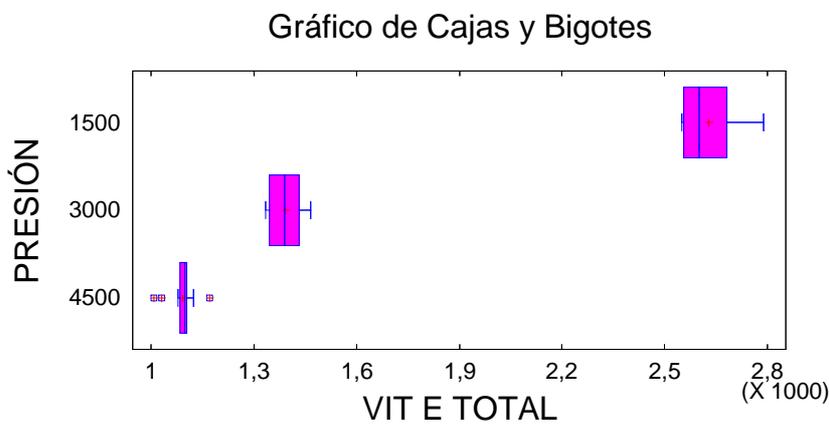
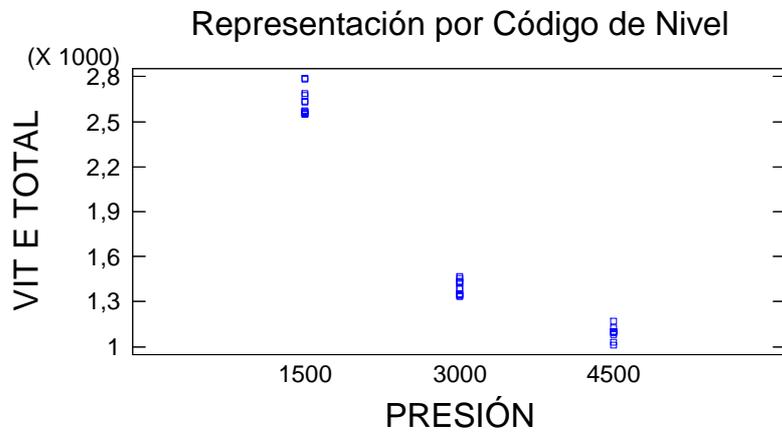
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,59584E7	2	7,97922E6	2045,90	0,0000
Intra grupos	128704,0	33	3900,11		
Total (Corr.)	1,60871E7	35			

### Resumen Estadístico para VIT E TOTAL

PRESIÓN	Frecuencia	Media	Varianza	Desviación típica
1500	12	2630,17	7683,61	87,6562
3000	12	1392,5	2308,09	48,0426
4500	12	1091,58	1708,63	41,3356
Total	36	1704,75	459632,0	677,962

PRESIÓN	Mínimo	Máximo	Rango	Asimetría tipi.
1500	2550,0	2790,0	240,0	1,26522
3000	1334,0	1465,0	131,0	0,281653
4500	1008,0	1171,0	163,0	-0,646526
Total	1008,0	2790,0	1782,0	1,56004

PRESIÓN	Curtosis típificada
1500	-0,324996
3000	-1,1658
4500	1,15422
Total	-1,82387



### ANEXO 5 Comparación extracción soxhlet y extracción supercrítica a 4500psi

Tipo de Extraccion		Rendimiento
Soxhlet	1	1,5
Soxhlet	1	1,4
Soxhlet	1	1,4
Soxhlet	1	1,7
Soxhlet	1	1,8
Soxhlet	1	1,5
Soxhlet	1	1,3
Soxhlet	1	1,5
Soxhlet	1	1,5
Soxhlet	1	1,6
Soxhlet	1	1,5
Soxhlet	1	1,7
Supercritica	2	0,5
Supercritica	2	0,5
Supercritica	2	0,5
Supercritica	2	0,6
Supercritica	2	0,6
Supercritica	2	0,6
Supercritica	2	0,5
Supercritica	2	0,5
Supercritica	2	0,4

Resumen Estadístico para RECUPERACIÓN

TIPO DE EXTRACCIÓN	Frecuencia	Media	Varianza
Desviación típica			
1	12	1,53333	0,0206061
2	12	0,491667	0,00628788
Total	24	1,0125	0,295924
Asimetría tipi.			
1	1,3	1,8	0,5
2	0,4	0,6	0,2
Total	0,4	1,8	1,4
Curtosis típicada			
1	-0,169559		
2	-0,891515		
Total	-1,96517		

Tabla ANOVA para RECUPERACIÓN según TIPO DE EXTRACCIÓN

Análisis de la Varianza

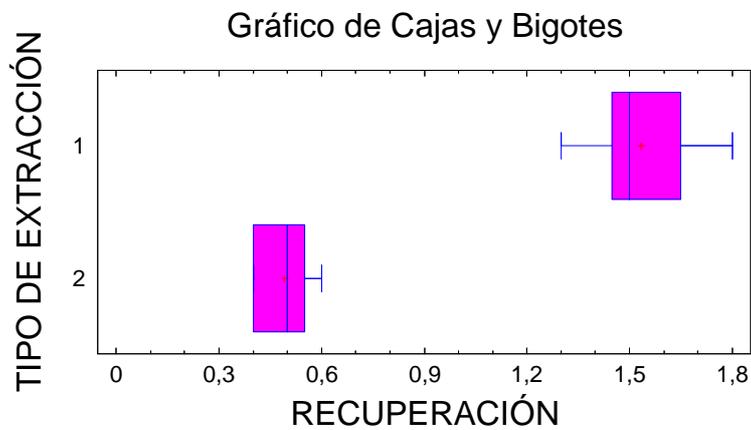
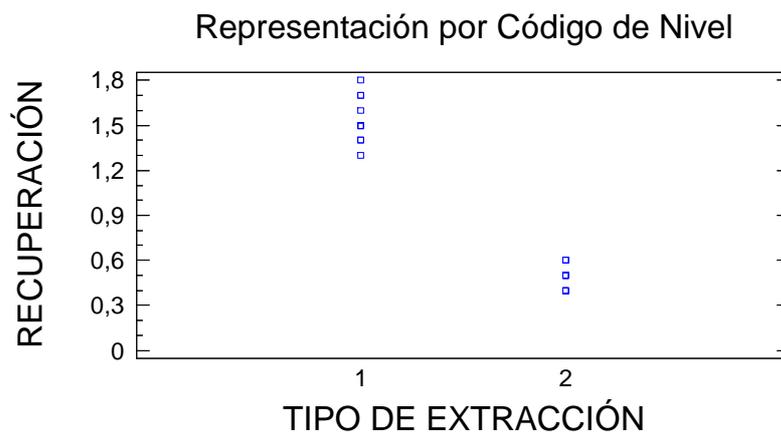
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	6,51042	1	6,51042	484,15	0,0000
Intra grupos	0,295833	22	0,013447		
Total (Corr.)	6,80625	23			

Método: 95,0 porcentaje LSD

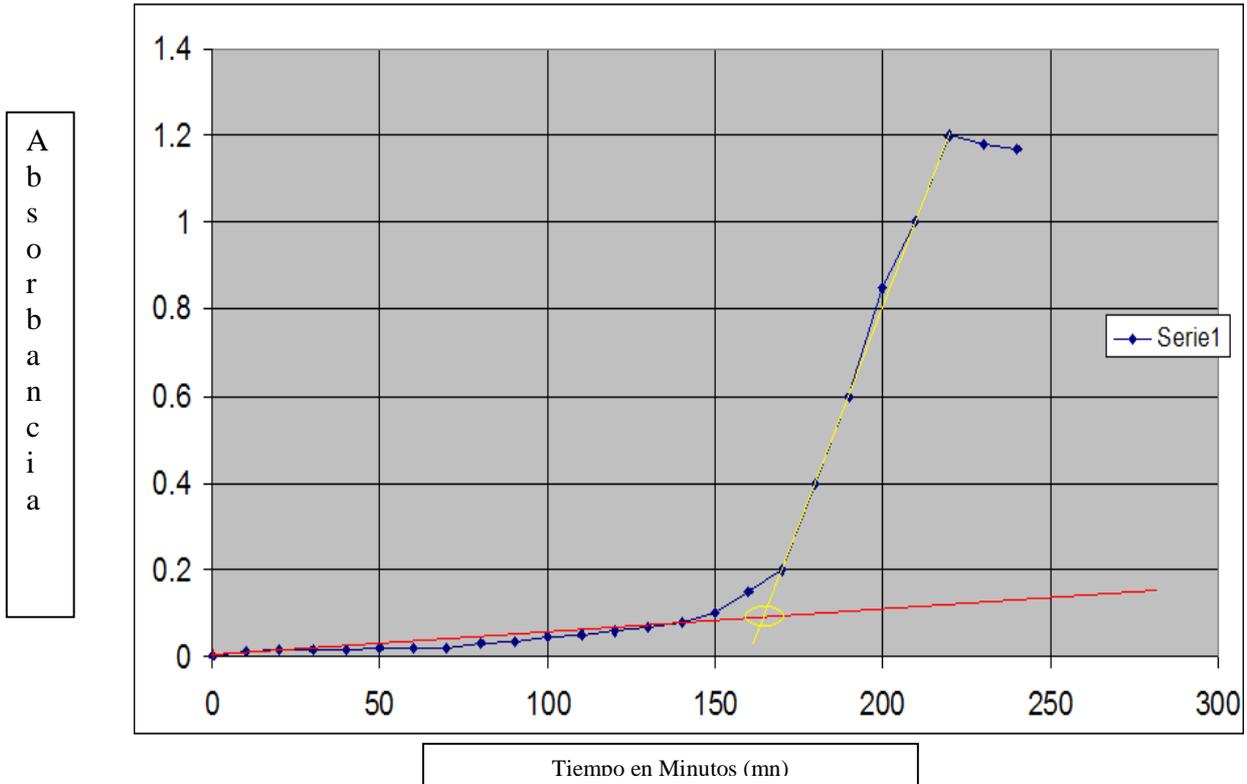
Nivel	Frec.	Media	Grupos homogéneos
2	12	0,491667	X
1	12	1,53333	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
1 - 2	*1,04167	0,0981792

\* indica una diferencia significativa.



## ANEXO 6 Calculo del tiempo de latencia



**Grafica 7** Determinación grafica del tiempo de latencia

Para la fase de latencia representada en la recta 1

- Tomamos dos puntos para definir la pendiente de la recta, los cuales son  $P_1(0, 0)$ ,  $P_2(140, 0.08)$
- La ecuación de la recta es:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} = \frac{0.08 - 0}{140 - 0} = 571.429 * 10^{-6}$$

$$R_1 = y_2 = 571.429 * 10^{-6} X_2 - 0.012$$

para la fase de propagación representada por la recta recta 2

- Tomamos dos puntos para definir la pendiente de la recta, los cuales son  $P_1 (170, 0.20)$ ,  $P_2 (220, 1.2)$
- La ecuación de la recta es:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} = \frac{1.2 - 0.20}{220 - 170} = 0.02$$

$$R_2 = y_2 = 0.02 X_2 - 3.2$$

La intersección que corresponde al final de la fase de latencia o tiempo de latencia corresponderá a la solución simultánea de las dos ecuaciones generadas así:

$$y_2 = 571.429 * 10^{-6} X_2 - 0.012 = 0.02 X_2 - 3.2$$

$$X_2 = 164 \quad y_2 = 0.08$$

Para esta cinética en particular el tiempo de latencia tiene un valor de 164 minutos.

**ANEXO 7 Estadística tiempo de latencia**

**DATOS DE TIEMPO DE LATENCIA DE CADA PACIENTE POR TRATAMIENTO**

<b>PACIENTE</b>	<b>LDL NATIVA</b>	<b>LDL+FIBRA</b>	<b>LDL+FOLIOLOS</b>	<b>LDL+VIT E</b>
1	75,93	85,91	79,82	77,06
1	77,80	86,20	79,89	79,25
1	70,20	86,10	79,23	78,55
2	91,20	150,29	100,41	105,25
2	90,30	159,13	100,29	105,13
2	91,20	159,75	100,74	105,60
3	75,90	117,10	79,80	77,06
3	76,00	116,40	78,20	79,25
3	76,40	116,75	78,40	78,55
4	80,40	114,97	88,81	106,72
4	80,30	114,81	88,70	106,60
4	80,20	114,66	88,59	106,25
5	79,80	116,25	88,94	77,06
5	78,20	118,50	86,38	79,25
5	78,40	119,10	87,60	78,55
6	91,20	160,25	102,90	108,60
6	90,30	160,31	102,85	109,72
6	91,20	160,45	102,74	109,60
7	83,50	120,10	98,13	98,43
7	82,60	119,40	98,24	98,55
7	82,80	118,75	98,46	98,78
8	91,90	171,49	101,41	110,60
8	91,80	171,73	101,29	110,72
8	92,20	171,50	101,74	110,60
9	80,40	114,97	88,81	106,72
9	80,30	114,81	88,70	106,60
9	80,20	114,66	88,59	106,25
10	90,90	156,29	100,41	116,25
10	90,80	156,13	100,29	116,13
10	91,20	156,75	100,74	116,60
<b>PROMEDIO</b>	83,8	131,5	92,7	98,8
<b>DESVIACIÓN</b>	6,6	26,7	8,8	14,3

## Análisis de los Componentes de la Varianza

Variable dependiente: TIEMPO LAG

Factores:

PACIENTE

TRATAMIENTO

Número de casos completos: 120

### Análisis de la Varianza para TIEMPO LAG

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Comp.	Var.	Porcentaje
TOTAL (CORREGIDO)	68946,8	119				
PACIENTE	20195,0	9	2243,88	51,8772	8,74	
TRATAMIENTO	48640,7	30	1621,36	539,989	91,02	
ERROR	111,165	80	1,38957	1,38957	0,23	

Gráfico de Componentes de la Varianza

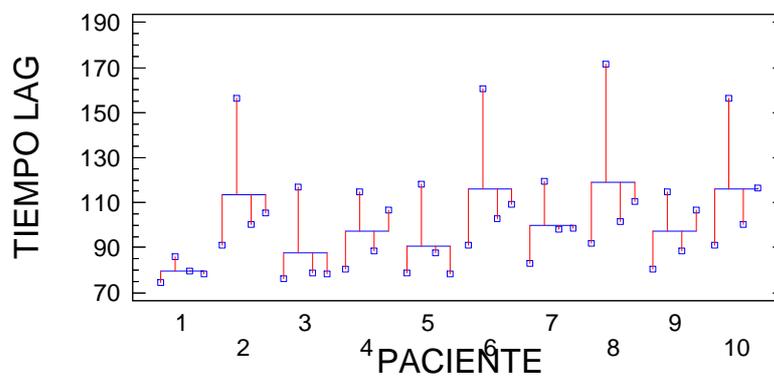


Gráfico de Resíduos para TIEMPO LAG

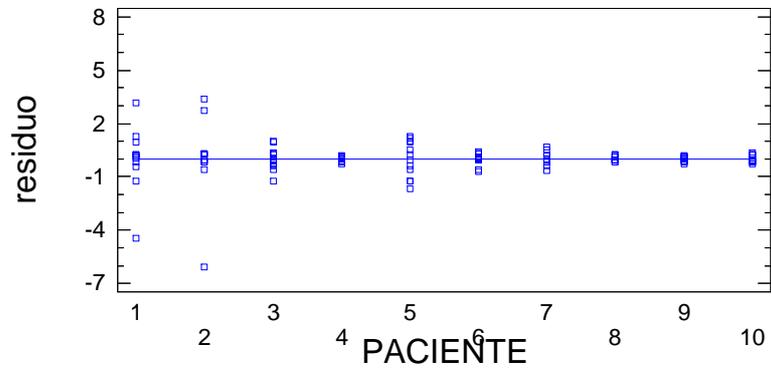


Gráfico de Resíduos para TIEMPO LAG

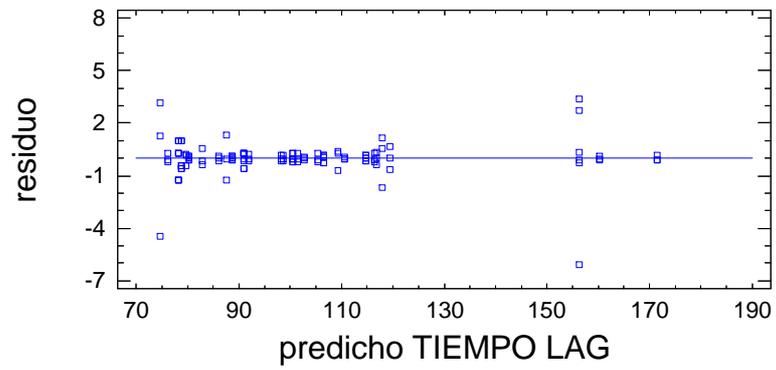
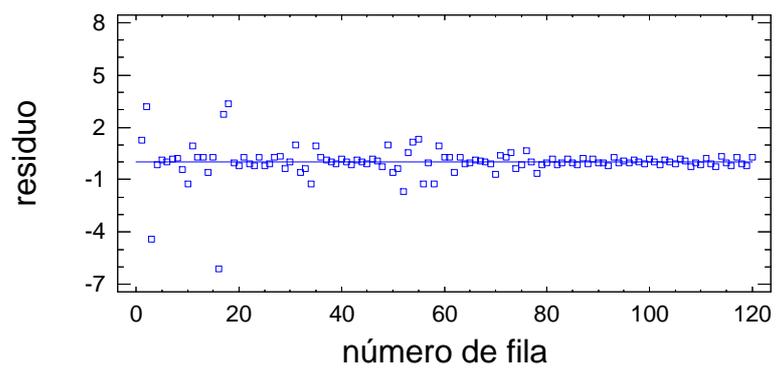
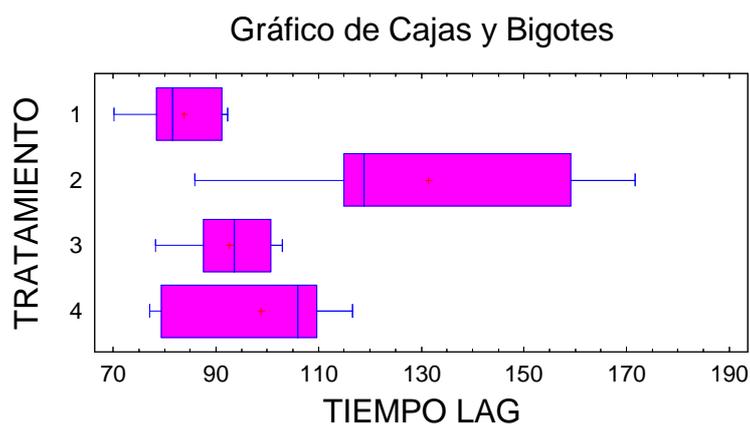


Gráfico de Resíduos para TIEMPO LAG



Desviación			
Nivel	Recuento	Media	Típica
-----			
MEDIA GLOBAL	120	101,687	24,0704
PACIENTE			
1	12	79,6617	4,6573
2	12	113,274	26,6562
3	12	87,4842	17,691
4	12	97,5842	14,3447
5	12	90,6692	16,9349
6	12	115,843	27,7047
7	12	99,8117	13,5425
8	12	118,915	32,4947
9	12	97,5842	14,3447
10	12	116,041	26,1073
TRATAMIENTO			
1	3	74,6433	3,96
2	3	86,07	0,147309
3	3	79,6467	0,362537
4	3	78,2867	1,1185
1	3	90,9	0,519615
2	3	156,39	5,29184
3	3	100,48	0,233024
4	3	105,327	0,244199
1	3	76,1	0,264575
2	3	116,75	0,35
3	3	78,8	0,87178
4	3	78,2867	1,1185
1	3	80,3	0,1
2	3	114,813	0,155027
3	3	88,7	0,11
4	3	106,523	0,244199
1	3	78,8	0,87178
2	3	117,95	1,5025
3	3	87,64	1,28047
4	3	78,2867	1,1185
1	3	90,9	0,519615
2	3	160,337	0,102632
3	3	102,83	0,0818535
4	3	109,307	0,614925
1	3	82,9667	0,472582
2	3	119,417	0,675154
3	3	98,2767	0,168028

4	3	98,5867	0,177858
1	3	91,9667	0,208167
2	3	171,573	0,135769
3	3	101,48	0,233024
4	3	110,64	0,069282
1	3	80,3	0,1
2	3	114,813	0,155027
3	3	88,7	0,11
4	3	106,523	0,244199
1	3	90,9667	0,208167
2	3	156,39	0,32187
3	3	100,48	0,233024
4	3	116,327	0,244199



Contraste Múltiple de Rangos para TIEMPO LAG según TRATAMIENTO

Método: 95,0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
-------------	----------	----------	----------	-------------------

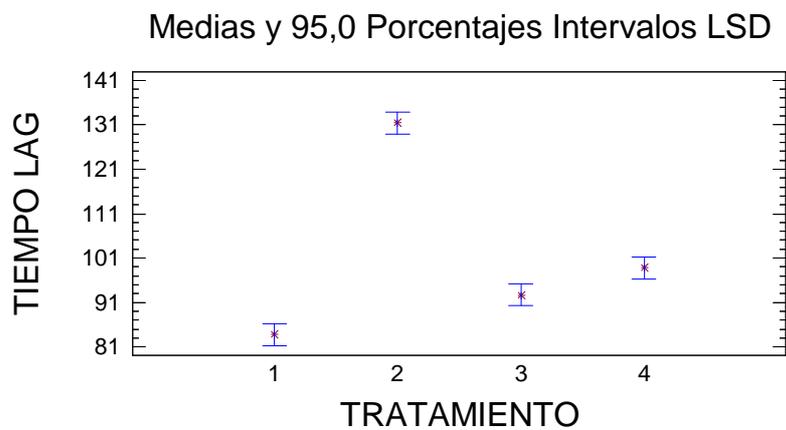
1	30	83,7843	1,7554	X
3	30	92,7033	1,7554	X
4	30	98,8093	1,7554	X
2	30	131,45	1,7554	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
-----------	-------------	-------------

1 - 2	*-47,666	4,9213
1 - 3	*-8,919	4,9213

1 - 4	*-15,025	4,9213
2 - 3	*38,747	4,9213
2 - 4	*32,641	4,9213
3 - 4	*-6,106	4,9213

-----  
 \* indica una diferencia significativa.



Tests para la Normalidad para TIEMPO LAG

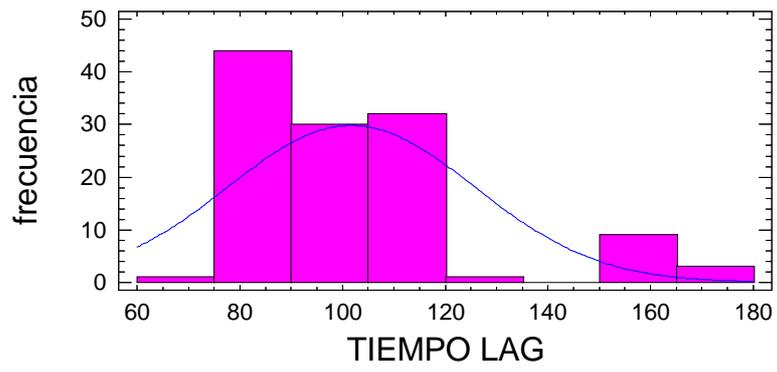
Estadístico chi-cuadrado de bondad de ajuste = 146,5  
 P-valor = 0,0

Estadístico W de Shapiro-Wilks = 0,834213  
 P-valor = 0,0

Puntuación Z para asimetría = 3,57577  
 P-valor = 0,000349276

Puntuación Z para curtosis = 2,43411  
 P-valor = 0,0149283

Histograma para TIEMPO LAG



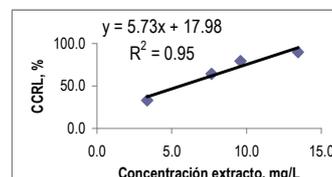
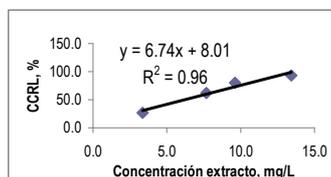
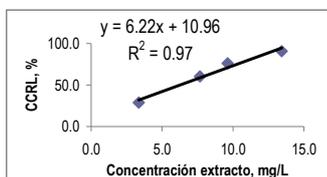
## ANEXO 8 Ensayos de Actividad Antioxidante frente a DPPH

Código del extracto: 1

Concentración mg/L	Extracto en solución, mg/L	A blanco	A 1	A 2	A 3	%CCRL1	%CCRL2	%CCRL3
10.1	3.4	0.003	0.242	0.249	0.227	28.9	26.8	33.3
23.0	7.7	0.004	0.137	0.133	0.123	60.4	61.6	64.6
28.8	9.6	0.006	0.087	0.073	0.076	75.9	80.1	79.2
40.3	13.4	0.006	0.038	0.029	0.04	90.5	93.2	89.9

Blanco DPPH	0.336
Absortividad específica L/mg cm	0.023
Concentración DPPH	14.6

EC <sub>50</sub> mg/L	5.6	5.5	5.0	Media	s	CV, %
EC <sub>50</sub> g/g DPPH	0.38	0.38	0.34	0.37	0.016	4.5%



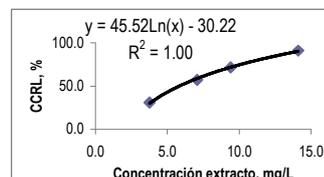
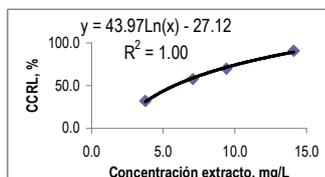
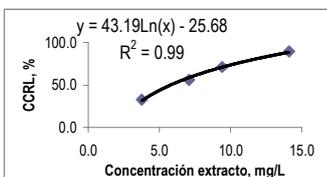
Código del extracto: 2

Bucarelia

Concentración mg/L	Extracto en solución, mg/L	A blanco	A 1	A 2	A 3	%CCRL1	%CCRL2	%CCRL3	Abs x	%CCRL	s
11.3	3.8	0.003	0.229	0.231	0.235	32.7	32.1	31.0	0.232	31.9	0.9
21.2	7.1	0.003	0.150	0.145	0.147	56.3	57.7	57.1	0.147	57.0	0.7
28.2	9.4	0.006	0.102	0.107	0.101	71.4	69.9	71.7	0.103	71.0	1.0
42.3	14.1	0.007	0.042	0.038	0.037	89.6	90.8	91.1	0.039	90.5	0.8

Blanco DPPH	0.336
Absortividad específica L/mg cm	0.023
Concentración DPPH	14.6

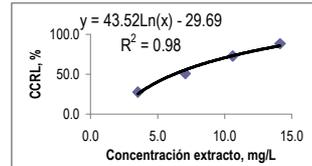
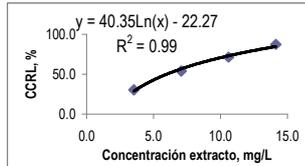
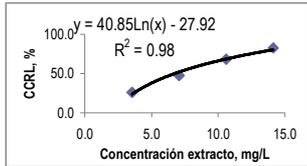
EC <sub>50</sub> mg/L	5.8	5.8	5.8	Media	s	CV, %
EC <sub>50</sub> g/g DPPH	0.39	0.40	0.40	0.40	0.002	0.4%



Código del extracto: 3  
Brisas

Concentración mg/L	Extracto en solución, mg/L	A blanco	A 1	A 2	A 3	%CCRL1	%CCRL2	%CCRL3	Abs x	%CCRL	s
10.6	3.5	0.003	0.252	0.237	0.246	25.9	30.4	27.7	0.245	28.0	2.2
21.2	7.1	0.004	0.180	0.159	0.170	47.6	53.9	50.6	0.170	50.7	3.1
31.8	10.6	0.006	0.113	0.102	0.097	68.2	71.4	72.9	0.104	70.8	2.4
42.4	14.1	0.007	0.065	0.05	0.047	82.7	87.2	88.1	0.054	86.0	2.9

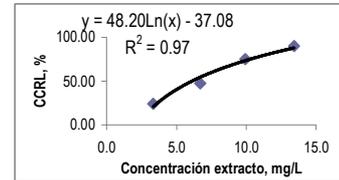
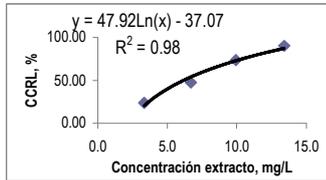
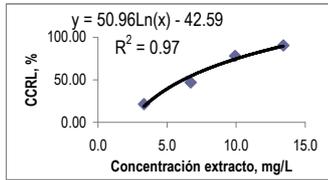
Blanco DPPH	0.336	EC <sub>50</sub> mg/L	6.7	6.0	6.2	Media	s	CV, %
Absortividad específica L/mg cm	0.023	EC <sub>50</sub> , g/g DPPH	0.46	0.41	0.43	0.43	0.021	4.9%
Concentración DPPH	14.6							
	6.3 mg/L							
	EC <sub>50</sub> 0.43 g extracto/g DPPH							



Código del extracto: 4  
Palmeiras de la costa

Concentración mg/L	Extracto en solución, mg/L	A blanco	A 1	A 2	A 3	%CCRL1	%CCRL2	%CCRL3	Abs x	%CCRL	s
10.0	3.3	0.003	0.26	0.253	0.252	21.65	23.78	24.09	0.255	23.2	1.3
20.1	6.7	0.004	0.178	0.176	0.176	46.95	47.56	47.56	0.177	47.4	0.4
29.8	9.9	0.005	0.077	0.092	0.086	78.05	73.48	75.30	0.085	75.6	2.3
40.3	13.4	0.006	0.037	0.038	0.038	90.55	90.24	90.24	0.038	90.3	0.2

Blanco DPPH	0.328	EC <sub>50</sub> mg/L	6.2	6.2	6.1	Media	s	CV, %
Absortividad específica L/mg cm	0.023	EC <sub>50</sub> , g/g DPPH	0.43	0.43	0.43	0.43	0.002	0.5%
Concentración DPPH	14.3							



## ANEXO 9 Ficha Técnica Vitamina E Comercial

### Vitamin E Acetate SD 50

Human Nutrition



The Chemical Company

**Chemical names**  
DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate,  
DL-alpha-tocopherol acetate, all-rac-alpha-tocopherol acetic acid ester, racemic 5,7,8-trimethyltocol acetate

<b>CAS No.</b>	52225-20-4
<b>EINECS No.</b>	231-710-0

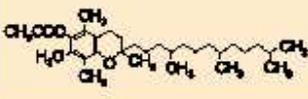
**Product number**  
10304064

**Units**  
1 mg of DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate = 0.67 D- $\alpha$ -TE  
= 1.00 former USP units

**Description**  
White to creamy white powder with a characteristic mild odor.

**Composition**  
The dry powder consists of DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate embedded in a matrix of lactose and caseinate. It contains glycerin monostearate (E 471) and sodium hydroxide as processing agent as well as tricalcium phosphate (E 341) as an anti-caking agent.

**Solubility**  
The product can be dissolved both in cold (10°C) and warm (35-40°C) water, to form a stable milky emulsion. It is virtually insoluble in organic solvents.



$C_{58}H_{100}O_2$       Molar mass 472.8 g/mol

**Specifications**

<b>Appearance:</b>	conforms
<b>Assay:</b>	min. 50% DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate (= 500 former IU of vitamin E or 336 $\alpha$ -TE per gram)
<b>Loss on drying:</b>	$\leq$ 3% (4 hours at 68°C)
<b>Acidity (USP):</b>	conforms

**Monographs**  
The active ingredient complies with the current "all-rac-alpha-tocopheryl acetate" Ph.Eur., "Vitamin E" USP, and "all-rac-alpha-tocopheryl acetate" FCC monographs.

**Particle-size distribution**  
max. 30% smaller than 63  $\mu$ m (230 mesh USP)  
min. 70% smaller than 250  $\mu$ m (60 mesh USP)

**Bulk density**  
0.4-0.55 g/ml

**Stabilization/Stability**  
Stored in the unopened original packaging at room temperature (max. 25°C), the product is stable for at least 36 months.

**Standard packaging**  
5 and 25 kg.  
Please see appendix I for further information.

## ANEXO 10 Galería fotográfica



Montaje para la extracción por lixiviación con hexano del aceite rojo de la fibra



Bomba de alta presión para la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico



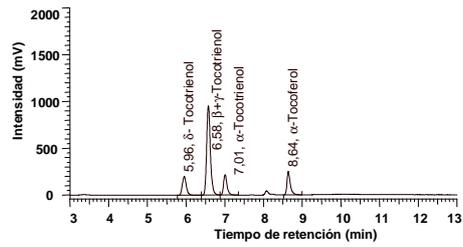
Equipo para extracción supercrítica a nivel de laboratorio



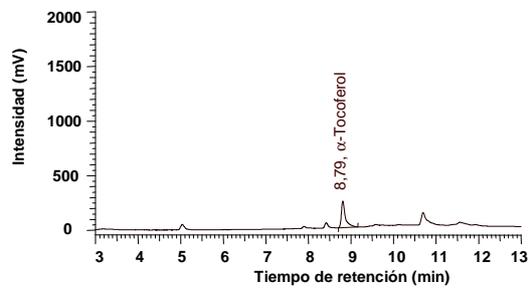
Espectrofotómetro y cromatógrafo líquido usados en el estudio

## ANEXO 11 Cromatogramas

Perfil vitamina E en extractos SFE de fibras



Perfil vitamina E en extractos SFE de folíolos



Extracto foliolo 1

## ANEXO 12 Protocolo de muestreo foliolos y fibra

### **MANEJO DE MUESTRAS**

#### ***RECEPCIÓN DE MUESTRAS***

Cada muestra que va a ser analizada en el laboratorio debe asignársele un número consecutivo que corresponde al número de laboratorio con el cual se identifica durante el proceso de análisis. Adicionalmente se registra toda la información pertinente a ella, en el formato establecido para ello.

#### ***ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS***

Cada muestra una vez codificada y analizada es almacenada según los requerimientos particulares en un nevera a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  a fin de mantener sus propiedades

#### ***DISPOSICIÓN FINAL DE LA MUESTRA***

Una vez cumplido el tiempo de almacenamiento de una muestra, se procede a eliminarla de acuerdo a su naturaleza y según el procedimiento para disposición de muestras.

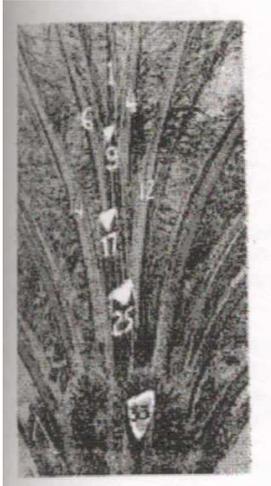
#### ***CADENA DE CUSTODIA***

En cada etapa la persona que tenga la muestra es responsable de su custodia y debe asegurar la integridad y seguridad de la muestra para evitar alteraciones, adulteraciones, pérdidas, contaminación y demás eventos que puedan poner en duda los resultados de cada análisis.

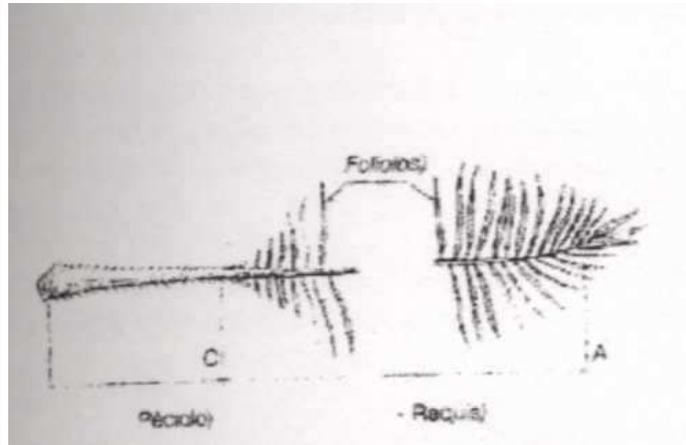
El laboratorio mantiene archivados en medio magnético los registros de recepción de muestras y resultados de los análisis de las mismas, de igual manera se archivan los formatos diligenciados de cada una de las determinaciones realizadas en el laboratorio.

#### **Muestreo de Foliolos**

En términos generales, se debe muestrear una hoja recién madura que haya finalizado su crecimiento, ya que usualmente este órgano refleja mejor el estado nutricional de la planta porque hay una relación directa entre acumulación de materia seca y de nutrientes. Se han establecido las normas o parámetros de muestreo foliar por lo tanto se escogerá la hoja 9, se troceara y eliminara la vena central dejando los foliolos individuales, de los cuales se tomara la porción central.



**Posición hojas**

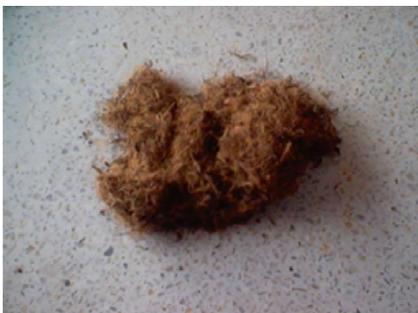


**Partes de la Hoja, identificación foliolos**

**Muestreo de Fibras**

Para garantizar la homogeneidad de las muestras, se adoptara el protocolo de muestreo previsto en el manual de laboratorio de CENIPALMA, recogiendo muestras en la salida de la prensa, tomando la primera muestra 1 hora después de iniciado el proceso en planta y por lo menos durante 6 horas consecutivas, recogiendo un puñado del material en un recipiente previsto para esto. Al final de la jornada se mezclara todo el material, tomando 1 kilogramo de muestra de la cual se retiraran manualmente las nueces y trozos de almendra.

El material libre de nueces se secura a 50°C para ser empacado al vacío y rotulado con el nombre la planta extractora, la fecha y los datos del analista. De cada plantación involucrada en el estudio se tomaran 16 muestras en días de proceso consecutivos.



**Fibra libre de nueces**



**Fibra salida del ciclón**

