

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias

APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DE LA GRANADA
(*Punica granatum*) VARIEDAD WONDERFUL PARA LA
OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS
MEDIANTE LA APLICACIÓN DE
TECNOLOGÍAS LIMPIAS

TESIS

Presentada por:

Bach. PAMELA RUTH TOLEDO MERMA

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TACNA – PERÚ

2020

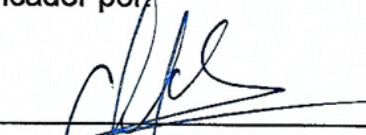
UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias

APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DE LA GRANADA
(*Punica granatum*) VARIEDAD WONDERFUL PARA LA
OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS
MEDIANTE LA APLICACIÓN DE
TECNOLOGÍAS LIMPIAS

Tesis sustentada y aprobada el miércoles 16 de diciembre del 2020,
estando conformado el jurado calificador por:

Presidente : 
Dra. LILIANA DEL CARMEN LANCHIPA BERGAMINI

Secretario : 
Dr. MARCIAL ALFREDO CASTILLO COHAILA

Vocal : 
Mgr. NICOLÁS GUILLERMO SEQUEIROS FLORES

Asesor : 
Dr. SAMUEL ROMÁN CERRO RUIZ

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a mis queridos padres, Benito Toledo y Emiliana Merma y asimismo a mis apreciados hermanos, Olga Toledo M. e Isaac Toledo M., quienes son mi más grande bendición y mi mayor motivación para cada día dar lo mejor de mí.

Además, dedicada a los estudiantes basadrinos de la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a Dios, a quien debo absolutamente todo.

A la Dra. Sylvia C. Alcázar Alay, responsable del proyecto de investigación donde participé como tesista de pregrado, financiado por el proyecto CONCYTEC-Banco Mundial a través de su unidad ejecutora FONDECYT (Contrato N°127-2018FONDECYT-BM-IADT-AV).

Asimismo, agradecer al FONDECYT por el financiamiento otorgado para realizar una movilización CTI en el Laboratorio de Tecnología Supercrítica (LASEFI) de la Facultad de Ingeniería de Alimentos (FEA) de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP), Brasil (Contrato N° 075-2019-FONDECYT).

A la Dra. Maria A. Meireles de Almeida, responsable del Laboratorio LASEFI.

A mi asesor, el Dr. Samuel R. Cerro Ruiz por su respaldo y consejos brindados.

A la Dra. Grazielle Náthia, Mgr. Monique Strieder, Mgr. Larry Chañi, parte del equipo de LASEFI, por su gran apoyo en la parte experimental.

Además, al Dr. Mauricio Rostagno, por su apoyo en el análisis HPLC.

Al Dr. Raúl Cartagena Cutipa, por brindarme las facilidades para realizar análisis de la materia prima en los laboratorios de la UPT.

A la Ing. Marianné Cornejo Figueroa, por ser una gran compañera de laboratorio.

Al Dr. Julio Isique Calderón, por facilitarme el equipo de secado.

Al Ing. Leonardo Espillico Cormilluni, por su apoyo en los análisis de la granada.

Al Dr. Roberto Castellanos Cabrera y Blgo. Heber Ramírez, por su apoyo en el análisis de proteínas de los residuos agroindustriales de granada.

Al Dr. Héctor Rodríguez Papuico, por su apoyo y soporte en la parte estadística.

ÍNDICE GENERAL

Página

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2. Formulación del problema	5
1.3. Delimitación de la investigación	6
1.4. Justificación	7
1.5. Limitaciones.....	7
1.6. Objetivos.....	7
CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	9
2.1. Hipótesis general y específicas	9
2.2. Diagrama de variables.....	10
2.3. Indicadores de las variables	11
2.4. Operacionalización de variables	12
CAPÍTULO III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	14
3.1. Conceptos generales y definiciones	14
3.2. Enfoques teóricos- técnico.....	16
3.2.1 El granado.....	16

3.2.2	Extracción mediante tecnologías limpias	21
3.2.3.	Compuestos bioactivos	31
3.3.	Marco referencial	36
CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		42
4.1.	Tipo de investigación	42
4.2.	Población y muestra	42
4.3.	Diseño estadístico	43
4.4.	Materiales y métodos.....	44
4.4.1.	Equipos y materiales	44
4.4.2.	Métodos	47
4.4.2.1.	Método procedimental.....	47
CAPÍTULO V. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS.....		62
5.1.	Técnicas aplicadas en la recolección de la información	62
5.1.1	Métodos analíticos	62
5.1.2	Métodos estadísticos.....	63
5.2.	Instrumentos de medición.....	64
5.3.	Resultados.....	66
5.3.1.	Análisis de la composición centesimal de la materia prima..	66
5.3.2.	Análisis del tamaño de partícula de la M.P.	66
5.3.3.	Rendimiento de extracción de la primera etapa	67
5.3.4.	Selección del solvente de dilución para análisis	68

5.3.5. Análisis preliminar de biocompuestos mediante TLC.....	70
5.3.6. Extracción con líquidos presurizados (II etapa).....	74
5.3.7. Rendimiento de extracción mediante PLE	75
5.3.8. Identificación de compuestos fenólicos mediante TLC.....	80
5.3.9. Identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC	81
5.4. Discusión de los resultados	82
CONCLUSIONES	99
RECOMENDACIONES.....	100
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	101
ANEXOS.....	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de variables en el proceso de extracción de compuestos fenólicos de la primera etapa del estudio.....	10
Figura 2. Diagrama de variables en el proceso de extracción de compuestos fenólicos de la segunda etapa del estudio.	10
Figura 3. Partes del granado, a) hojas, b) flores, c) fruto, d) corte longitudinal del fruto, e) arilo, f) cortes longitudinal y transversal del arilo.	17
Figura 4. Partes de la granada.....	17
Figura 5. Distribución de la producción nacional de la granada -2017.....	20
Figura 6. Distribución de la superficie cosechada de granada a nivel nacional-2017	20
Figura 7. Producción nacional de la granada, 2000-2018 (miles de t).	21
Figura 8. Diagrama de fases P vs. T.....	24
Figura 9. Esquema de una unidad de SFE a escala piloto.	26
Figura 10. Clasificación de compuestos bioactivos.....	32
Figura 11. Estructura básica de las antocianinas.....	33
Figura 12. Estructura de la punicalagina.....	34
Figura 13. Estructura del ácido elágico.....	35
Figura 14. Diagrama de flujo de la preparación de la materia prima (<i>P. granatum</i>).....	48

Figura 15. Diagrama de flujo de la extracción de biocompuestos a partir de la granada evaluando la proporción de solvente (I etapa) .	49
Figura 16. Diagrama de flujo de la extracción de biocompuestos a partir de residuos de granada mediante líquidos presurizados (II etapa).....	50
Figura 17. Cáscara de granada molida y tamizada.....	66
Figura 18. Análisis por TLC del extracto de residuo de granada obtenido del experimento 4 de la I etapa diluido en metanol y etanol a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm sin tratamiento químico.	69
Figura 19. Análisis por TLC del extracto de residuo de granada obtenido del experimento 4 de la I etapa comparado con patrón de cianidina-3-glucósido a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm sin tratamiento químico.	70
Figura 20. Análisis por TLC del extracto de residuo de granada obtenidos del experimento 3 y 4 de la I etapa a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm sin tratamiento químico...	71
Figura 21. Análisis por TLC del extracto de cáscara de granada obtenido del experimento 4 a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm sin tratamiento químico.	72

Figura 22. Análisis por TLC de extractos de residuo de granada del experimento 3 y 4 de la I etapa comparado con patrón de ácido elágico a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm.	73
Figura 23. Análisis por TLC de extractos de residuo de granada obtenido del experimento 3 y 4 de la I etapa comparado con patrón de ácido elágico y quercetina a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm.....	73
Figura 24. Frasco recolector conteniendo el extracto de cáscara y membranas carpelares de granada con solvente etanol.....	74
Figura 25. Proceso de evaporación del etanol contenido en el frasco recolector para obtener el extracto de la granada.....	74
Figura 26. Diagrama de Pareto de efectos de la temperatura, presión y su interacción sobre el rendimiento de extracción	76
Figura 27. Gráfica de interacción de los factores sobre el rendimiento de extracción.....	77
Figura 28. Gráfica de los efectos principales (temperatura y presión) sobre el rendimiento de extracción.	78
Figura 29. Análisis por TLC del extracto de cáscara de granada bajo a) luz visible sin revelador, b) luz visible con revelador, c) luz UV a 254 nm sin revelador, d) luz UV a 254 nm con	

revelador, e) luz UV a 366 nm sin revelador y f) luz UV a 366 nm con revelador (NP).....	80
Figura 30. Comparación de compuestos fenólicos presentes en el extracto 1 y extracto 2.....	81
Figura 31. Cromatograma de los compuestos fenólicos más representativos del extracto de cáscara y membranas carpelares de la granada.	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de las variables de la primera etapa	12
Tabla 2. Operacionalización de las variables de la segunda etapa	13
Tabla 3. Composición química de la cáscara de granada	18
Tabla 4. Composición química del fruto entero de la granada	18
Tabla 5. Condiciones críticas de solventes comunes, empleados en fluidos supercríticos.	25
Tabla 6. Grupos de compuestos bioactivos extraídos mediante PLE.	30
Tabla 7. Experimentos realizados en la primera etapa	43
Tabla 8. Arreglo factorial 2x5 para la optimización del proceso de extracción.....	44
Tabla 9. Composición centesimal de los residuos de la granada (<i>P.</i> <i>granatum</i>) variedad Wonderful.....	66
Tabla 10. Resultados de rendimiento de extracción de la I etapa.....	67
Tabla 11. Comparación de solventes de dilución para análisis de los extractos obtenidos	68
Tabla 12. Resultados promedio del rendimiento de extracción de la II etapa.....	75
Tabla 13. Tratamientos con mayores rendimientos de extracción	79

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia	119
Anexo 2. Fotografías de la preparación de la materia prima	119
Anexo 3. Fotografías de la extracción de biocompuestos a partir de la granada evaluando la proporción de solvente (I etapa).	121
Anexo 4. Fotografías de la extracción de biocompuestos a partir de la granada mediante líquidos presurizados (II etapa).	122
Anexo 5. Determinación del diámetro de partícula de la materia prima.	123
Anexo 6. Valor de polaridad de principales solventes de extracción	123
Anexo 7. Resultados del rendimiento de extracción con repeticiones ...	124
Anexo 8. Análisis estadístico	124
Anexo 9. Balance de masa para la preparación de la materia prima.....	126
Anexo 10. Concentración vs área del patrón ácido elágico	127
Anexo 11. Curva patrón del ácido elágico	127
Anexo 12. Contenido de compuestos fenólicos del extracto 1 y 2 de la granada en mg/ EAE.....	128
Anexo 13. Contenido de compuestos fenólicos del extracto 1 y 2 de la granada en mg/g de extracto y mg/100g m.s.....	129

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis fue extraer compuestos fenólicos presentes en los residuos agroindustriales de la granada (*Punica granatum*) básicamente su cáscara y membranas carpelares, aplicando tecnologías limpias como la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y líquidos presurizados (PLE). La cáscara y membranas carpelares de la granada presentaron una humedad de $71,95 \pm 0,8\%$, contenido de lípidos $1,61 \pm 0,13\%$, proteínas $1,41 \pm 0,03\%$, cenizas $1,21 \pm 0,01\%$ y carbohidratos totales de $23,81\%$ en b.s. El estudio se dividió en 2 etapas. En la I etapa, se evaluó la proporción de solvente CO_2 /etanol sobre el rendimiento de extracción aplicando SFE y PLE. A partir de estos resultados, se decide continuar con la II etapa, donde se aplicó solo la extracción PLE empleando etanol como solvente de extracción. En esta II etapa, la influencia de la temperatura (40 y $60\text{ }^\circ\text{C}$) y la presión ($20,40,60,80$ y 100 bar) fueron evaluadas sobre i) el rendimiento de extracción global (X_0) y ii) la composición cualitativa y cuantitativa de los compuestos fenólicos presentes aplicando un arreglo factorial 2×5 . Técnicas cromatográficas fueron usadas para evaluar los compuestos fenólicos presentes en los dos extractos de los tratamientos que presentaron el mayor rendimiento de extracción (X_0). En la I etapa el mayor X_0 obtenido fue $21,37\%$ empleando etanol puro mediante PLE. En la II etapa, las mejores condiciones de

extracción de compuestos fenólicos fueron a 60 °C y 40 (extracto 1, 37,28% b.s.) y 80 bar (extracto 2, 44,99% b.s.), es decir los tratamientos 7 y 9 respectivamente. Sin embargo, el extracto 1 presentó un contenido significativamente mayor de punicalagina α , β y ácido elágico ($48,22 \pm 2,05$, $146,58 \pm 11,20$ y $25,57 \pm 0,27$ mg/100 g b.s.) comparado con el extracto 2 ($40,41 \pm 1,56$, $125,72 \pm 3,65$ y $22,74 \pm 0,30$ mg/100 g de muestra b.s.).

Palabras clave: Residuo de granada, extracción con fluidos supercríticos, extracción con líquidos presurizados, compuestos fenólicos

ABSTRACT

This study aimed to extract phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum*) processing by-products specifically from its peel and carpelar membranes applying clean technologies such as Supercritical Fluid Extraction (SFE) and Pressurized Liquid Extraction (PLE). The pomegranate residue presented a humidity of $71,95\pm0,8\%$, lipids $1,61\pm0,13\%$, proteins $1,41\pm0,03\%$, ashes $1,21\pm0,01\%$ and total carbohydrates of $23,81\%$. The study was divided into 2 stages. In the I stage, the proportion of CO₂/ethanol solvent on extraction performance was evaluated by applying SFE and PLE. Based on these results, it was decided to continue with stage II, where only PLE extraction was applied using ethanol as the extraction solvent. In this II stage, the influence of the temperature (40 and 60°C) and pressure (20,40,60,80 and 100 bar) were evaluated on i) the global extraction yield and ii) qualitative and quantitative composition of the phenolic compounds applying a 2x5 factorial arrangement. Chromatographic techniques were used to evaluate the phenolic compounds of the two extracts of the treatments that presented the highest extraction yield (X_0). In the I stage, the highest X_0 obtained was 21,37% using pure ethanol by PLE. In the II stage, the best phenolic compounds extraction conditions were at 60 °C and 40 (Extract 1, 37.28% on d.w) and 80 bar (Extract 2, 44.99% on d.w), that means treatment 7 and

9 respectively. Nevertheless, E1 presented significantly higher content of α , β punicalagin and ellagic acid ($48,22 \pm 2,05$, $146,58 \pm 11,20$ and $25,57 \pm 0,27$ mg/100g of sample d.w, respectively) than E2 ($40,41 \pm 1,56$, $125,72 \pm 3,65$ and $22,74 \pm 0,30$ mg/100g of sample d.w).

Keywords: Pomegranate residue, supercritical fluid extraction, pressurized liquid extraction, phenolic compounds.

INTRODUCCION

Dentro de las frutas consideradas funcionales, la granada destaca por poseer numerosos compuestos químicos de alto valor biológico denominados “compuestos bioactivos”, los cuales se encuentran distribuidos en sus diferentes partes: corteza, membranas carpelares, arilos y semillas. Entre el 35- 50 % del peso total de la granada corresponde a la corteza y a las membranas carpelares, consideradas como residuo agroindustrial (Abid et al., 2017). Los compuestos fenólicos que se destacan son las punicalaginas, sustancias de naturaleza fenólica de gran capacidad antioxidante (García-Viguera y Pérez-Vicente, 2004), las cuales podrían proteger contra ciertas enfermedades crónicas (Arapitsas, 2012; Landete, 2011; Lu et al., 2008; Nuncio-Jáuregui et al., 2018), por todo ello muchas investigaciones se centran en la extracción de estos biocompuestos a partir de la granada (Robert et al., 2010; Santos et al., 2019).

Se han aplicado diferentes métodos de extracción para compuestos fenólicos entre los convencionales se encuentra la extracción con solventes (Fischer et al., 2011; Garcia-Villalba et al., 2015; Russo et al., 2018) y el método de Soxhlet (Azmir et al., 2013). Sin embargo, hasta la fecha son pocos los estudios aplicando métodos de extracción más modernos los

cuales tienen grandes ventajas (menor gasto de solvente y menor tiempo de operación) y son amigables con el medio ambiente como la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la extracción con líquidos presurizados (PLE) los cuales emplean solventes tipo GRAS (Generally Recognized As Safe) (Azmir et al., 2013; Richter et al., 1996).

Es por ello, que el objetivo de la presente investigación fue obtener extractos conteniendo compuestos fenólicos a partir de residuos agroindustriales de la granada (*P. granatum*) variedad Wonderful aplicando tecnologías limpias como SFE y PLE. Este estudio evaluó la influencia de la temperatura y la presión de operación sobre el rendimiento de extracción así como la composición química de los extractos mediante técnicas estadísticas y cromatográficas.

CAPÍTULO I.

EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

Las empresas dedicadas a la industria del procesamiento de frutas pueden llegar a generar una cantidad desmedida de residuos agroindustriales, la cual representa una pérdida para el sector frutícola y un problema de contaminación ambiental por su disposición. Sin embargo, dichos residuos agroindustriales son una fuente de compuestos fenólicos los cuales tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana y que podrían ser destinados a diversas industrias como la química, cosmética, farmacéutica y alimentaria. Dentro del sector frutícola, la granada (*P. granatum*) destaca por poseer numerosos compuestos químicos de alto valor biológico en sus diferentes partes: corteza, membranas carpelares, arilos y semillas.

Existen varios métodos para extraer los compuestos fenólicos presentes en una matriz vegetal. No obstante, la gran mayoría de métodos usados actualmente emplean solventes tóxicos debido a su disponibilidad y bajo costo para la industria. Sin embargo, desde los años setenta las investigaciones se han dirigido a desarrollar metodologías y tecnologías

que son amigables con el medio ambiente, conocidas como Tecnologías Limpias (CT) y que por lo tanto no constituyen riesgos para la salud. Una de ellas es la tecnología de Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE, *Supercritical Fluid Extraction* en inglés), mediante la cual se obtienen extractos inocuos ricos en compuestos bioactivos y/o fenólicos principalmente de naturaleza apolar empleando CO₂ en estado supercrítico. A su vez, para obtener compuestos de naturaleza polar, actualmente se emplea la Extracción con Líquidos Presurizados (PLE, *Pressurized Liquid Extraction* en inglés), la cual se basa en la utilización de un solvente de la misma naturaleza, siendo el alcohol etílico o etanol el más comúnmente empleado.

1.2. Formulación del problema

Problema general

¿Cuáles serán las condiciones de operación que favorezcan el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos a partir de la cáscara y membranas carpelares de la granada (*P. granatum*) variedad Wonderful de Ite - Tacna aplicando la tecnología de fluidos supercríticos y líquidos presurizados?

Problemas específicos

- ¿Cuál será la proporción de solvente CO₂ y/o etanol que favorezca el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada aplicando la extracción con fluidos supercríticos y líquidos presurizados?
- ¿Cuál será la temperatura y presión de proceso que favorezca el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada asistida por líquidos presurizados?
- ¿Cuál será la concentración de punicalaginas y ácido elágico presentes en los extractos del residuo sólido de la granada obtenidos mediante líquidos presurizados?

1.3. Delimitación de la investigación

- a) Delimitación temporal: La investigación se llevó a cabo en un periodo de 12 meses.

- b) Delimitación espacial: Para el estudio se emplearon frutos provenientes del campo experimental de la Municipalidad Distrital de Ite-Tacna. La Extracción aplicando Tecnologías Limpias y los análisis para la identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos fenólicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Tecnología Supercrítica: Extracción, Fraccionamiento e Identificación de Extractos Vegetales (LASEFI) de la Facultad de Ingeniería de Alimentos (FEA) de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP) en São Paulo-Brasil donde cuentan con extractores con fluidos supercríticos, líquidos presurizados y el equipo cromatógrafo HPLC.

- c) Delimitación teórica: El estudio se centró en evaluar el efecto de las condiciones de extracción (temperatura y presión) a través de tecnologías limpias empleando solventes no tóxicos, sobre el contenido de compuestos fenólicos presentes en la cáscara y membranas carpelares de la granada (*P. granatum*). Los ejes temáticos relacionados al presente estudio son la termodinámica y química analítica de alimentos.

1.4. Justificación

El presente proyecto se ha decidido llevar a cabo porque contribuirá a la generación de conocimiento y aplicación de tecnologías de extracción considerados limpias o verdes como SFE y PLE de compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales consideradas desecho (costo cero), fomentando así el aprovechamiento de los residuos orgánicos provenientes de la agroindustria haciendo uso de técnicas sostenibles y reincorporando estos productos a la cadena productiva.

1.5. Limitaciones

Dificultad en conseguir los patrones estándar de alta pureza de los compuestos fenólicos de interés a analizar.

1.6. Objetivos

Objetivo general

Obtener el mayor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de la cáscara y membranas carpelares de la granada (*P. granatum*) variedad Wonderful de Ite -Tacna aplicando la tecnología de fluidos supercríticos y líquidos presurizados.

Objetivos específicos

- Determinar la proporción de solvente CO₂ y/o etanol que favorezca el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada aplicando extracción con fluidos supercríticos y líquidos presurizados.
- Determinar la temperatura y presión de proceso que favorezca el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada asistida por líquidos presurizados.
- Identificar y cuantificar el contenido de punicalaginas y ácido elágico presentes en los extractos del residuo sólido de la granada obtenidos mediante líquidos presurizados.

CAPÍTULO II.

HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Hipótesis general y específicas

Hipótesis general

El rendimiento de extracción de compuestos fenólicos presentes en la cáscara y membranas carpelares de la granada (*Punica granatum*) es influenciado por las condiciones de operación de la tecnología con fluidos supercríticos y líquidos presurizados.

Hipótesis específicas

- La proporción de solvente CO₂ y/o etanol influye en el rendimiento de extracción global de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada aplicando la extracción con fluidos supercríticos y líquidos presurizados.
- La temperatura y presión de proceso a ciertas condiciones permite obtener los mejores rendimientos de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada asistida por líquidos presurizados.
- Es factible cuantificar el contenido de punicalaginas y ácido elágico presentes en los extractos del residuo sólido de la granada obtenidos mediante líquidos presurizados.

2.2. Diagrama de variables

El presente estudio se dividió en 2 etapas. La Figura 1 muestra la relación de la variable de entrada con la variable de salida de la primera etapa. Asimismo, en la Figura 2 se muestra la relación de las variables de entrada y salida de la segunda etapa.



Figura 1. Diagrama de variables en el proceso de extracción de compuestos fenólicos de la primera etapa del estudio.

Fuente: Elaboración propia (2019)

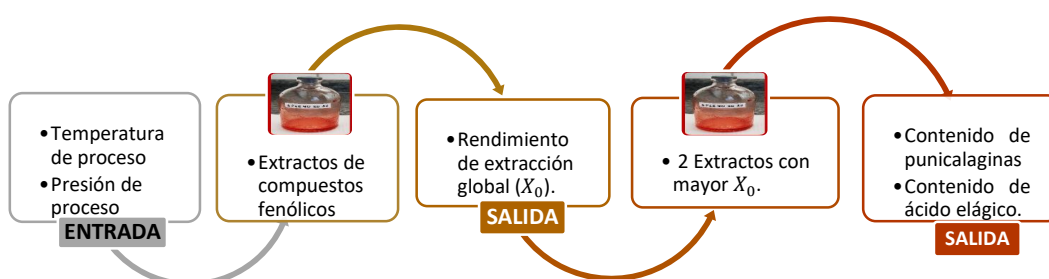


Figura 2. Diagrama de variables en el proceso de extracción de compuestos fenólicos de la segunda etapa del estudio.

Fuente: Elaboración propia (2019)

2.3. Indicadores de las variables

I Etapa:

a) Variables independientes

- Proporción de solventes CO₂ y/o Etanol

b) Variables dependientes

- Rendimiento de extracción global (X_0).

II Etapa:

a) Variables independientes

- Temperatura de proceso
- Presión de proceso

b) Variables dependientes

- Rendimiento de extracción global (X_0).
- Contenido de punicalaginas
- Contenido de ácido elágico

2.4. Operacionalización de variables

Tabla 1

Operacionalización de las variables de la primera etapa

VARIABLES	INDICADORES	UNIDAD	INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN	
INDEPENDIENTE	Proporción de solvente CO ₂ y/o Etanol	Volumen de solvente. Caudal de flujo	mL	Equipo extractor semi-automático (software ChromScope)
DEPENDIENTE	Rendimiento de extracción global (X_0)	Contenido de compuestos fenólicos	% p/p	Balanza analítica

Fuente: Elaboración propia (2019)

Tabla 2*Operacionalización de las variables de la segunda etapa*

	VARIABLES	INDICADORES	UNIDAD	INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN
I N D E P E N D I E N T E S	Temperatura de proceso	Temperatura	Grados centígrados (°C)	Termómetro del equipo extractor
	Presión de proceso	Presión	bar	Manómetro del equipo extractor
D E P E N D I E N T E S	Rendimiento de extracción global (X_0)	Contenido de compuestos fenólicos	% p/p	Balanza analítica
	Contenido de punicalaginas	Concentración de punicalaginas	mg/100 g	Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)
	Contenido de ácido elágico	Concentración de ácido elágico	mg/100 g	Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)

Fuente: Elaboración propia (2019)

CAPÍTULO III.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

3.1. Conceptos generales y definiciones

- a) Residuo sólido agroindustrial: según el artículo 6 del Reglamento de Residuos Sólidos N° 016-2012-AG, los residuos agroindustriales, son aquellos generados en procesos de transformación de productos agrícolas.
- b) Compuesto bioactivo: son aquellos componentes de los alimentos que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos y con efectos beneficiosos para la salud (Biesalski et al., 2009).
- c) Compuestos fenólicos: Engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenoles no son polifenoles, sino monofenoles. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas (Tuberoso y Orrù, 2008).
- d) Antocianinas: las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano. Las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas. Las

antocianinas se encuentran ampliamente en el reino vegetal y son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul (Aguilera et al., 2011).

- e) Punicalaginas: es el polifenol de mayor peso molecular conocido, que se hidroliza en ácido elágico y se metaboliza en el tracto intestinal generándose urolitinas (Gil et al., 2000; García-Viguera et al., 2004).
- f) Antioxidantes: sustancias que pueden retardar o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable. Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear los procesos oxidativos ya que estabilizan los radicales libres (Shahidi, 2000).
- g) Flavonoides: son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Martínez-Flórez et al., 2002).
- h) Fluido supercrítico: Un fluido supercrítico (FSC) es una sustancia que se encuentra en unas condiciones operativas de presión y temperatura superiores a las de su punto crítico (Jain et al., 2013).

- i) Líquido presurizado: Se considera a aquel solvente que ha sido sometido a altas presiones y temperaturas, siempre debajo de su punto crítico respectivo, por lo tanto, el solvente se mantiene en estado líquido durante todo el proceso de extracción.(Alvarez-Rivera et al., 2019).

3.2. Enfoques teórico- técnicos

3.2.1 El granado

El granado (*Punica granatum*) pertenece a la familia Punicaceae (Figura 3). Alrededor de 1000 cultivares de granada existen (Venkitasamy et al., 2019), originarias del Medio Este, extendiéndose a lo largo del Mediterráneo, hacia el Este China e India, y sobre el Suroeste Americano, California y México en el Nuevo Mundo. Mientras la planta de granado es considerada un pequeño árbol o un arbusto grande, su fruto es considerado ser una baya grande. El fruto es delimitado por un pericarpio duro, contenidos dentro hay numerosos arilos, cada semilla rodeada por un saco contenedor de jugo translúcido (Figura 4) (Calín-Sánchez y Carbonell Barrachina, 2012; Lansky y Newman, 2007).

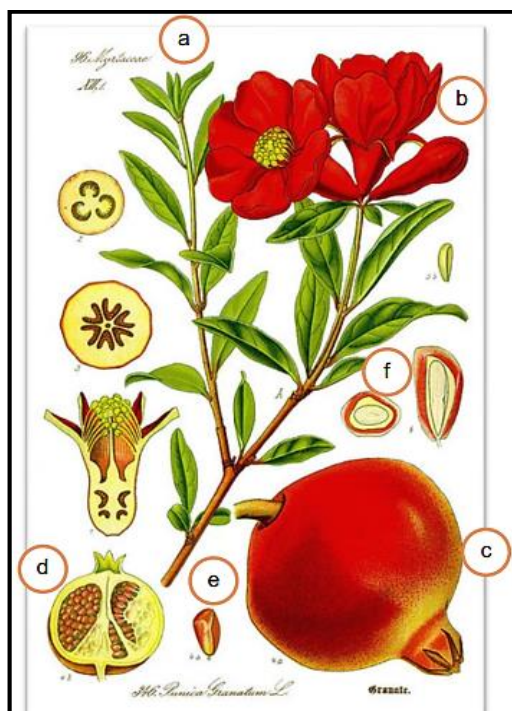


Figura 3. Partes del granado, a) hojas, b) flores, c) fruto, d) corte longitudinal del fruto, e) arilo, f) cortes longitudinal y transversal del arilo.
Fuente: Díaz (2014)

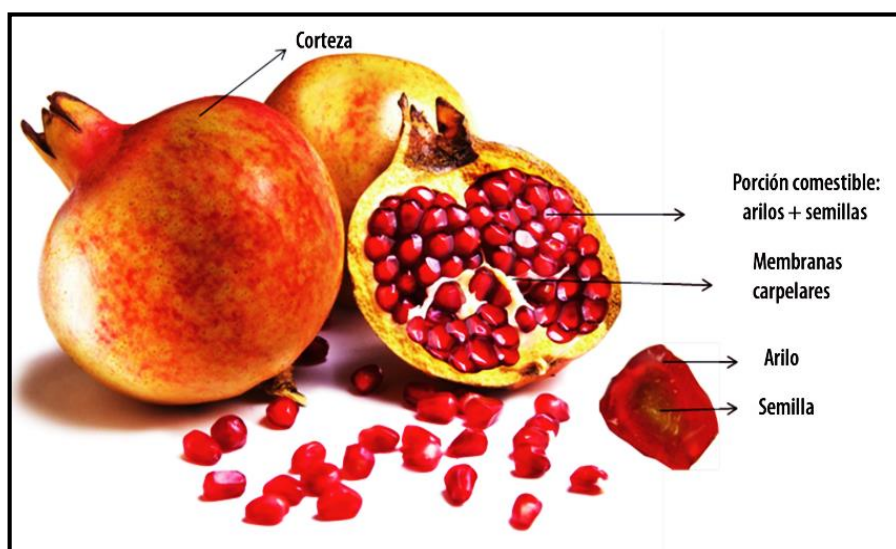


Figura 4. Partes de la granada
Fuente: Calín-Sánchez y Carbonell (2012).

La Tabla 3 muestra la composición química de la cáscara de granada (*P. granatum*) en base seca y la Tabla 4 del fruto entero.

Tabla 3

Composición química de la cáscara de granada

Análisis	Cantidad por 100 g de muestra
	Cáscara (g)
Materia seca	94,45±1,25
Humedad	5,5±1,25
Cenizas	3,59±0,08
Grasa cruda	3,57±0,38
Proteína total	1,26±0,17
Fibra cruda	17,75±1,61
Ácido elágico	0,26±0,08

Fuente: De la Cruz et al. (2011)

Tabla 4

Composición química del fruto entero de la granada

Análisis proximal	Cantidad por 275 g de muestra
Agua (%)	82,3
Proteína (g)	0,8
Grasa (g)	0,5
Carbohidratos (g)	25,3
Semillas y piel (%)	44,0
Energía (Kcal)	82,3
Calcio	5,0
Fósforo	12,0
Hierro	0,5
Sodio	5,0
Potasio	399,0
Ácido ascórbico	6,0
Tiamina	0,05
Riboflavina	0,05
Niacina	0,5
Vitamina A	Traza

Fuente: De la Cruz et al. (2011).

3.2.1.1 Producción del granado en el Perú

A partir del año 1997, el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI) del Perú recopiló información de la producción de la granada, donde dio a conocer que habían 55, 20 y 11 ha en Ica, La Libertad y Arequipa respectivamente. En 1998, hubo otros departamentos que también empezaron a cultivar y cosechar la granada en el sur del Perú como Moquegua con 4 ha y Tacna con 3 ha; igualmente, por el Norte Lambayeque con 2 ha (MINAGRI, 2019).

Después de dos años, en el 2000, se incorporó el departamento de Lima con 2 ha, y muchos años después, en el 2010 Apurímac y finalmente en el 2011 se incorpora Áncash, siendo 9 departamentos productores de granada hasta el día de hoy (MINAGRI, 2019). En la Figura 5 y 6 se muestran las regiones productoras de granada y las que cuentan con una importante área cosechada a nivel nacional respectivamente.

En cuanto a la evolución histórica de la producción de la granada desde el 2000 (928,2 t) al 2018 (46 382,9 t), ha sido positiva ya que ha habido una tasa promedio anual de crecimiento del 24.3 % en base a una superficie cosechada de aproximadamente 2800 ha, comparada a las 90 ha en el año 2000 (Figura 7) (MINAGRI, 2019).

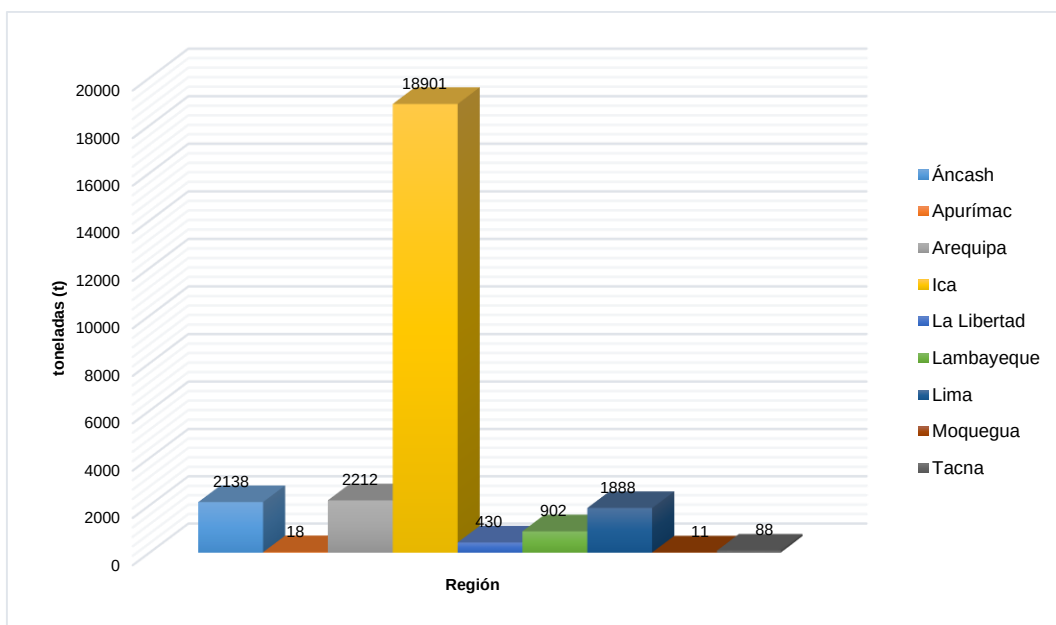


Figura 5. Distribución de la producción nacional de la granada -2017
Fuente: Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias-MINAGRI (2018)
Elaboración: Propia (2019)

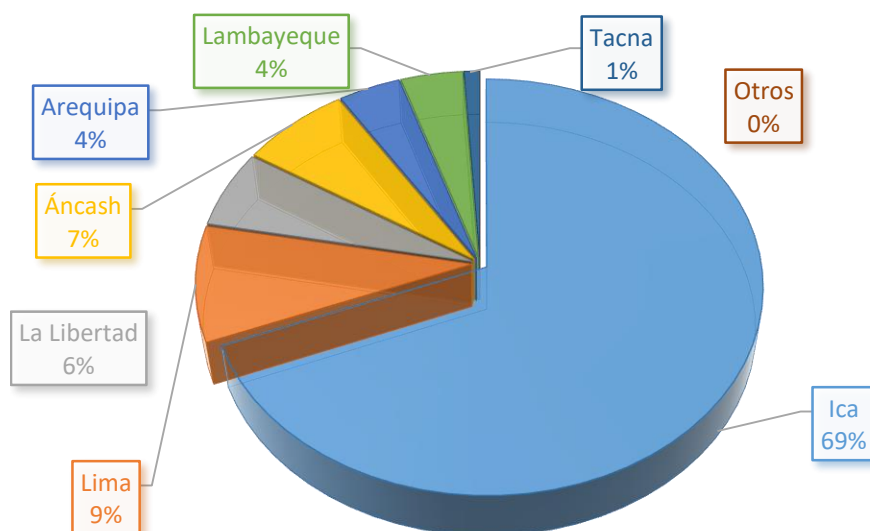


Figura 6. Distribución de la superficie cosechada de granada a nivel nacional-2017
Fuente: Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias-MINAGRI (2018)
Elaboración: Propia (2019)



Figura 7. Producción nacional de la granada, 2000-2018 (miles de t).
Fuente: Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias-MINAGRI (2018)
Elaboración: DEEEIA-DGPA-MINAGRI (2019)

3.2.2 Extracción mediante tecnologías limpias

A partir del siglo XXI, se han venido desarrollando tecnologías de extracción de compuestos fenólicos con el fin de obtener extractos inocuos. En la industria alimentaria, se han venido aplicando mayormente dos tecnologías consideradas limpias o verdes, una de ellas es la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la otra es la extracción con líquidos presurizados (PLE). Estos tipos de extracción se consideran extracciones de tipo sólido-fluido, la cual es una operación unitaria que consiste en la separación de un soluto o mezcla de solutos presentes en una matriz vegetal mediante el contacto con un solvente apropiado. Dicho solvente puede ser un líquido regular o un fluido supercrítico (Meireles, 2009).

El principal aspecto positivo de usar fluidos supercríticos y líquidos presurizados es que se producen extractos libres de solventes orgánicos, sin residuos y se da a bajas temperaturas en el proceso de separación (Knez et al., 2018).

3.2.2.1 Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

El proceso de extracción por fluidos supercríticos o “tecnología de los solventes verdes” es muy similar a la extracción convencional, una de las principales diferencias radica en usar como agente extractor un fluido supercrítico en lugar de un líquido (García, 1995).

Los fluidos supercríticos son conocidos desde mediados del siglo XIX, pero sus primeras aplicaciones aparecen en la década de los 70's, donde se reportan los primeros casos exitosos de extracción en el proceso de descafeinado del café (Maul et al., 1996).

El fluido más comúnmente usado es el dióxido de carbono, el cual tiene un punto crítico de 73,8 bar (7,38 MPa) y 31 °C (304,2 K). Es no tóxico, no inflamable, económico y está disponible en buen porcentaje de pureza (Meireles, 2009).

El CO_2 es un buen solvente para compuestos de naturaleza hidrofóbica (apolar) o ligeramente hidrofílica (polar). No obstante, cuando se incrementa la presión del sistema, el CO_2 modifica su tendencia fuertemente apolar pudiendo extraer compuestos hidrofílicos. Si el objetivo de la extracción es la de extraer compuestos hidrofílicos se puede adicionar solventes orgánicos de naturaleza hidrofílica logrando cambiar la polaridad del fluido. Estos solventes reciben el nombre de cosolventes o modificadores (Meireles, 2009).

A. Propiedades de los fluidos supercríticos

Todas las sustancias se caracterizan por poseer un diagrama de fases (Figura 8). El estado de equilibrio es aquel en el que una sustancia no cambia sus propiedades en el tiempo, a menos que sea afectada por una modificación de la temperatura o la presión, entre otras (García, 1995).

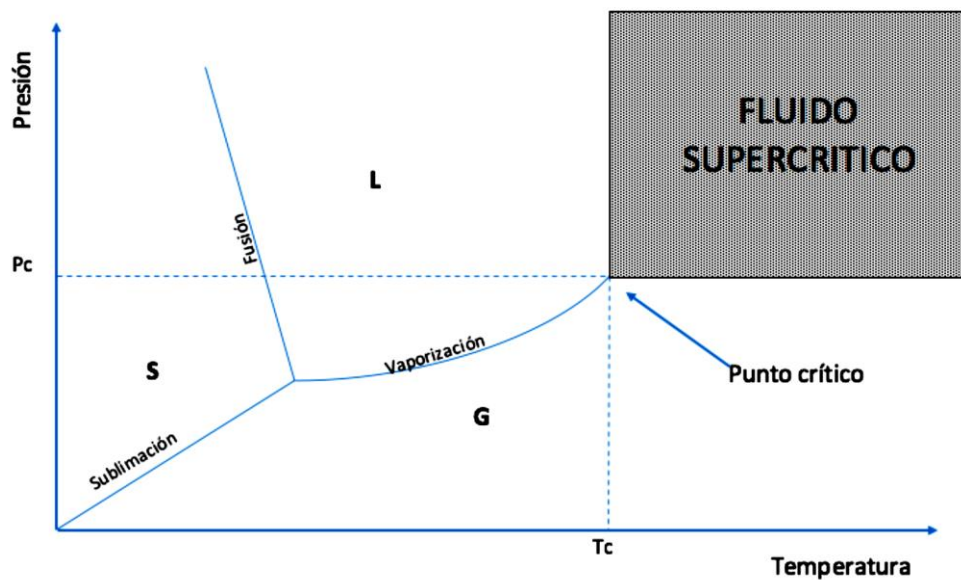


Figura 8. Diagrama de fases P vs. T
Fuente: García (1995).

Los diagramas se encuentran definidos por tres líneas, de sublimación, de fusión y de vaporización. Esta última se caracteriza por desaparecer en un punto denominado, punto crítico, en el cual la presión y la temperatura reciben el nombre de presión crítica y temperatura crítica (García, 1995; Román et al., 2016). Cuando una sustancia está por encima de sus valores críticos, dicha sustancia recibe el nombre de fluido supercrítico (Velásquez Á. M., 2008), condición en la cual la sustancia no se licua por más que se incremente la presión ni se vaporiza aunque se eleve la temperatura, lo que hace que la fase líquida sea indistinguible de la fase gaseosa (Brunner, 2013) debido a que no existe interacción entre

las fases. En este punto la sustancia no puede ser considerada ni como un gas, ni como un líquido (Román et al., 2016) ya que solo existe una fase.

Tabla 5

Condiciones críticas de solventes comunes, empleados en fluidos supercríticos

Solvente	Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (bar)
Dióxido de carbono	30,95	73,76
Agua	373,94	220,64
Metano	-82,75	46
Etano	32,15	48,73
Propano	96,65	42,45
Etileno	9,25	50,35
Propileno	91,75	46
Metanol	239,45	80,85
Etanol	240,75	61,40
Acetileno	36	62,47
Butano	152	70,6
Éter	193,6	63,8
Pentano	196	32,9
Amoníaco	132,5	109,9
Acetona	234,95	47,01

Fuente: Conde y Guerrero (2009); Reglero et al. (2005); Román et al. (2016); Velasco et al. (2007).

B. Etapas de Extracción

El proceso de extracción por fluidos supercríticos, consta básicamente de 4 etapas (Román et al., 2016; Brunner, 2013).

1. **Presurización:** Se eleva la presión, por encima de la presión crítica de la sustancia a emplear como solvente.
2. **Ajuste de temperatura:** Se eleva o disminuye la temperatura, por cualquier medio físico o mecánico, para llevar el solvente a la temperatura adecuada de extracción (por encima de su temperatura crítica).
3. **Extracción:** El fluido supercrítico entra en contacto con la matriz vegetal que contiene el soluto de interés en el extractor.
4. **Separación:** El solvente se descomprime a una presión inferior a la crítica, lo que provoca que se libere del soluto.

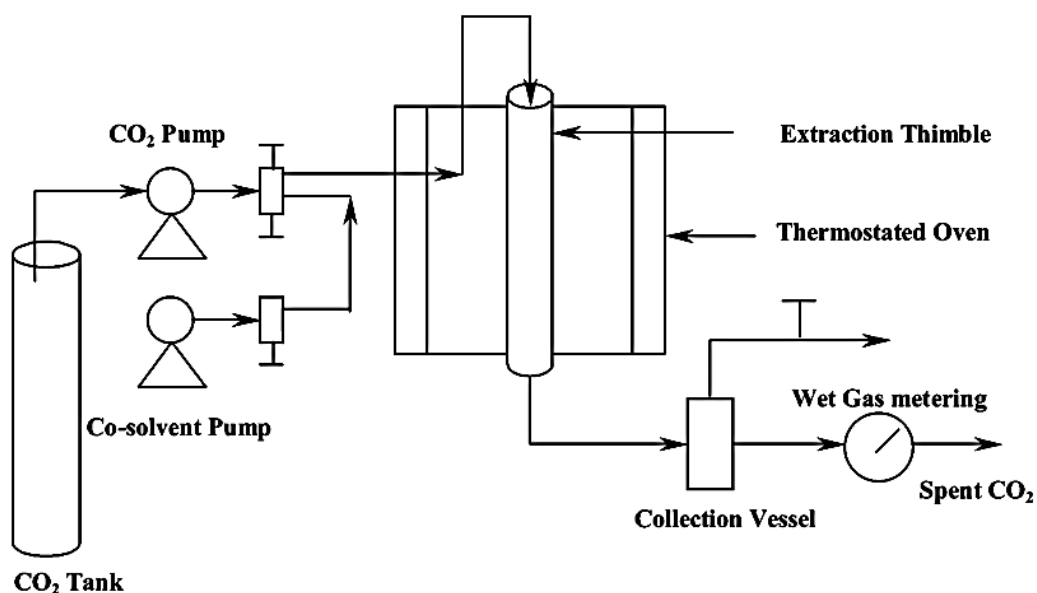


Figura 9. Esquema de una unidad de SFE a escala piloto.
Fuente: Yu et al. (2006).

3.2.2.2 Extracción con líquidos presurizados (PLE)

La extracción con líquidos presurizados (PLE – *Pressurized Liquid Extraction*) es también conocida como extracción con solventes presurizados (PSE – *Pressurized Solvent Extraction*), extracción con solventes acelerada (ASE – *Accelerated Solvent Extraction*), extracción con solventes mejorados (ESE-*Enhanced Solvent Extraction*) (Mustafa y Turner, 2011).

Gracias a la tendencia actual de extraer compuestos fenólicos presentes en alimentos naturales y a la necesidad de trabajar con tecnologías más eco amigables, es que el proceso de PLE está siendo bien vista para ser empleada por sus amplias ventajas. Proceso PLE emplea solventes que son considerados no tóxicos, como el agua y el etanol. Este tipo de extracción emplea altas temperaturas y presiones lo cual mejora el rendimiento de extracción, y además disminuye el tiempo y el consumo del solvente. Asimismo, los equipos de PLE proveen protección para los compuestos fenólicos contra el oxígeno y la luz por la columna cerrada donde se deposita la matriz vegetal (Mustafa y Turner, 2011).

A. Factores importantes

1. Efecto de la temperatura

La temperatura es uno de los factores a evaluar más importantes que influyen directamente en el rendimiento global de extracción, mejora la eficiencia y selectividad del solvente. Debido a que ayuda en la ruptura de las interacciones matriz vegetal-analito disminuyendo la energía de activación requerida para el proceso de desorción. Aparte de ello, las altas temperaturas provocan una disminución de la tensión superficial del solvente, soluto y muestra, así como un descenso en la viscosidad del solvente; como consecuencia de ello, permitirá que el solvente se difunda más fácilmente (se incrementa la tasa de difusión) en la matriz alcanzando las sustancias de interés y, por ende, mejorando la transferencia de masa (Mustafa y Turner, 2011).

2. Efecto de la presión

En el caso del factor presión, al ser incrementada, permite mantener el solvente en estado líquido. Trabajando junto a altas temperaturas y tensión superficial reducida, el efecto de la presión contribuye a forzar al solvente a ingresar dentro de la matriz y entrar en contacto con las sustancias de interés logrando retirarlas. Además, las altas presiones pueden facilitar la ruptura de los enlaces matriz vegetal-sustancia de

interés, mejorando la transferencia de masa de la sustancia de interés hacia el solvente (Mustafa y Turner, 2011).

B. Aplicaciones

En cuanto a la aplicación de esta tecnología verde en la extracción de compuestos bioactivos a partir de matrices vegetales se ha ido incrementando estos últimos años por sus múltiples ventajas como el corto tiempo de extracción comparado con otros métodos convencionales (Ejm.: Soxhlet), el menor uso del solvente, su forma de extracción en columna cerrada (protegiendo a la matriz del contacto con el oxígeno y la luz), la fácil preparación de la materia prima (seca y molida), fácil armado del lecho de extracción y la poca cantidad de muestra a utilizar.

En la Tabla 6 se muestran los principales compuestos bioactivos extraídos aplicando la extracción con líquidos presurizados.

Tabla 6*Grupos de compuestos bioactivos extraídos mediante PLE.*

Grupo de compuesto	Matriz vegetal	Solvente	Fuente
Polifenoles	Harina de colza	Agua	(Hassas-Roudsari et al., 2009)
	Orujo de uvas	Etanol, agua acidificada y mezcla de ambos	(Pereira et al., 2019)
	Propóleo de abeja	Mezcla de etanol, agua:HCl	(Erdogan et al., 2011)
	Cáscara y pulpa de manzana	Metanol y agua	(Alonso-Salces et al., 2001)
Taninos	Cáscara de granada	Agua	(Çam y Hisil, 2010)
Flavonoides	Cáscara de Jabuticaba	Etanol	(Santos et al., 2011)
		Etanol Isopropanol y Agua	(Cavalcanti, 2013)
	Residuo agroindustrial de mora	Agua, agua acidificada, etanol y etanol +agua	(Machado et al., 2015)
	Residuo de arándanos	Etanol, agua y acetona	(Paes et al., 2014)
	Cáscara de maracuyá	Etanol, agua y sus mezclas	(Viganó et al., 2016)
	Soja.	Agua, etanol y metanol diluidos	(Rostagno et al., 2004)
Ácidos fenólicos	Arroz	Acetato de etilo y ácido acético en metanol	(Setyaningsih et al., 2016)
Lignanós	Chancapiedra	Agua, etanol y mezcla de ambos	(Pereira et al., 2016)
Carotenoides	Alga Chlorella vulgaris	Etanol 90 %	(Cha et al., 2010)
	Residuos de zanahoria	Etanol	(Mustafa et al., 2012)
	Cáscara de aguaje	Mezclas de agua y etanol	(Rudke et al., 2019)
	Fibra de palma	Etanol	(Cardenas-Toro et al., 2015)
Tiosulfatos	Ajo	Etanol	(Farías-Campomanes et al., 2014)
Estilbenos	Bagazo de maracuyá	Etanol y agua	(Viganó, et al. 2016)

Fuente: Elaboración propia (2020)

3.2.3. Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son sustancias que pueden tener un efecto positivo en nuestro organismo y ser imprescindibles a largo plazo para nuestra salud. Estas sustancias bioactivas o metabolitos secundarios de origen vegetal se denominan también fitoquímicos o fitonutrientes. Gracias a sus importantes propiedades, efectos biológicos y a sus atributos sensoriales actualmente ocupan un área de investigación con mucho potencial dada la gran variedad de alimentos que los contienen (Martínez-Navarrete et al., 2008).

En el reino vegetal, se pueden distinguir 4 grandes grupos de compuestos bioactivos, los cuales se detallan en la siguiente Figura 10.

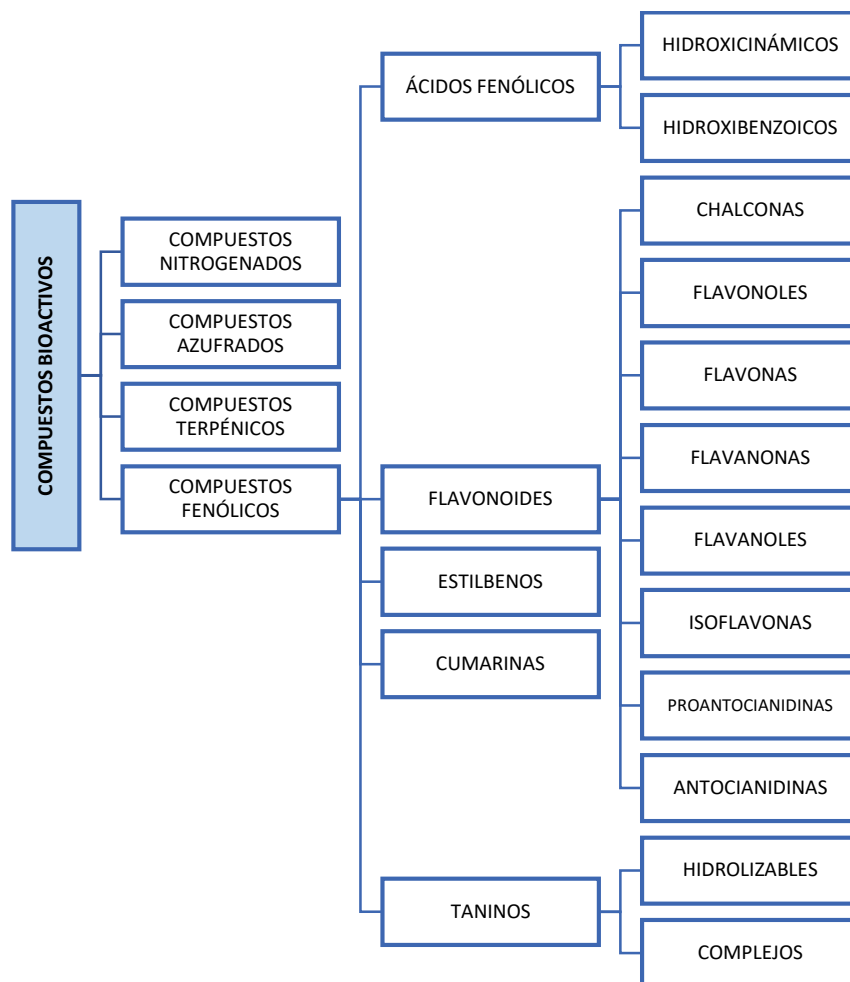


Figura 10. Clasificación de compuestos bioactivos

Fuente: Martínez-Navarrete et al. (2008); Lajolo y Mercadante (2018).

Elaboración: propia (2020)

3.2.3.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos abarcan un extenso grupo de sustancias orgánicas, y entre ellos los flavonoides son un importante subgrupo, dentro de los cuales se encuentran las antocianinas (Damodaran et al., 2010).

A. ANTOCIANINAS

Es uno de los grupos de pigmentos más conocidos presentes en las plantas. Son responsables por una amplia gama de colores, desde el azul, morado, violeta, magenta, rojo, hasta naranja. La palabra antocianina es derivada de dos palabras griegas: “anthos” y “kyanos”, que significan flor y azul respectivamente. Su interés en la investigación ha crecido enormemente sobre las últimas décadas por su potencial beneficio a la salud y su uso como colorante alimentario. La estructura básica de las antocianinas es el 2-fenilbenzopirona de la sal flavilium (Figura 11) (Damodaran et al., 2010).

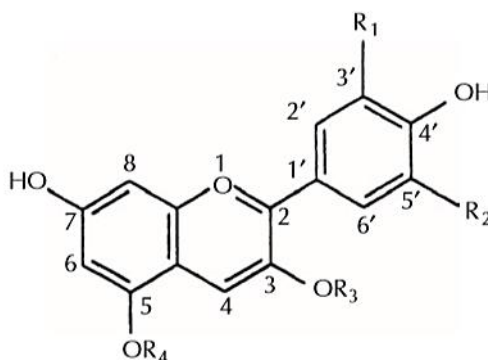


Figura 11. Estructura básica de las antocianinas
Fuente: Damodaran et al. (2010)

B. PUNICALAGINA

La punicalagina es un compuesto fenólico importante característico de las granadas con una estructura muy compleja (Figura 12) (Smith, 2014).

Las punicalaginas son los compuestos que presentan una mayor capacidad captadora de radicales libres, responsables del 50% de esta actividad en el zumo de granada (García-Viguera y Pérez-Vicente, 2004).

Las principales propiedades funcionales de las punicalaginas son (Calín-Sánchez y Carbonell-Barrachina, 2012):

- ❑ Poderoso efecto antioxidante.
- ❑ Actividad anticancerígena.
- ❑ Efecto protector del sistema cardiovascular.

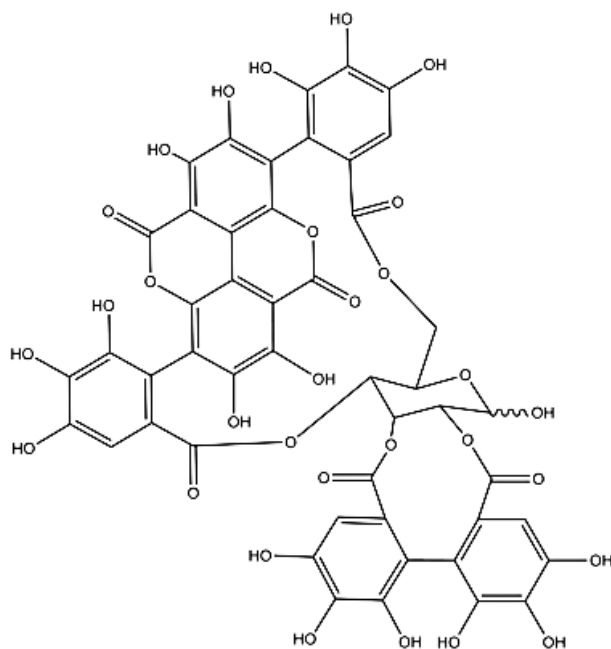


Figura 12. Estructura de la punicalagina
Fuente: Smith (2014)

C. ÁCIDO ELÁGICO (EA)

El ácido elágico es una molécula altamente estable, con 4 anillos (parte lipofílica), 4 grupos fenólicos y dos grupos lactona (parte hidrofílica) como se muestra en la Figura 13 (Bala et al., 2006).

El ácido elágico es un derivado dimérico del ácido gálico. Manifiesta propiedades antiinflamatorias, antitumorales y de apoptosis. Se encuentra presente en importante cantidad en varias frutas (granada, frambuesa, fresa, arándano) y nueces en su forma libre como glucósidos de ácido elágico o en su forma ligada como elagitaninos (Seeram et al., 2004).

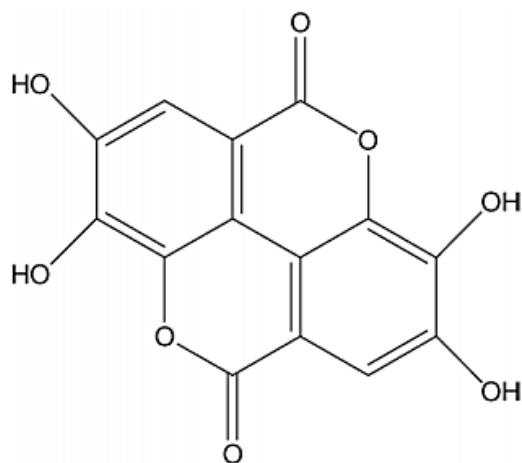


Figura 13. Estructura del ácido elágico
Fuente: Bala et al. (2006)

3.3. Marco referencial

Se realizó un estudio de extracción de biocompuestos presentes en los residuos industriales de la granada (cáscara de granada y semillas) mediante extracción con fluidos supercríticos (SFE) empleando el sc-CO₂ y cosolvente etanol. Los rendimientos de extracción estuvieron en el rango de 0,2 a 8,5 % bajo condiciones de extracción óptimas de 200 y 300 bar, 40-50 °C y una proporción de CO₂/ etanol de 80/20 (Bustamante et al., 2017).

Asimismo, se llevó a cabo otra investigación donde utilizaron como materia prima residuos industriales del Pisco (bagazo de uva) para la extracción de biocompuestos aplicando SFE (sc-CO₂) con cosolvente etanol en proporción 90/10 a una temperatura constante aproximada de 40 °C y trabajando a diferentes presiones (200-350 bar). El rendimiento de extracción obtenido fue de $5,5 \pm 0,1$ % a una presión de 200 bar, resultando extractos con altas concentraciones de compuestos fenólicos (Farías-Campomanes et al., 2013).

Se aplicó la tecnología con fluidos supercríticos para extraer flavonoides a partir de la cáscara de pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck). El diseño empleado fue el de Box-Behnken combinado con metodología de

superficie de respuesta para maximizar el rendimiento de extracción de flavonoides. Se logró obtener el mayor rendimiento de extracción de flavonoides (2,37 %) de la cáscara de pomelo trabajando a una temperatura de 80 °C, presión de 390 bar y un tiempo de extracción estático de 49 min con etanol diluido como co-solvente (He et al., 2012).

Se ejecutó una investigación aplicando SFE de compuestos fenólicos a partir de corteza de *Eucalyptus globulus* Labill. Se realizaron corridas preliminares con CO₂ puro y modificado usando el etanol, acetato de etila y agua como co-solvente, donde se observó que la mezcla de CO₂/Etanol proporcionó el mejor rendimiento de extracción, alto contenido de fenólicos totales y actividad antioxidante. Asimismo, este tipo de extracción empleando CO₂/Etanol indicó ser muy selectivo, ya que los extractos obtenidos contenían principalmente flavanonas como eriodictyol, naringenin y o-isoramentin flavonol metilado. Por otro lado, se analizó la influencia de la temperatura, contenido de etanol y caudal en este tipo de extracción, considerando una presión de 300 bar usando co-solvente etanol, llevándose a cabo un diseño 2³ completo de experimentos. Las condiciones más favorables fueron de 70 °C y una proporción CO₂/Etanol del 80/20, para lo cual el rendimiento de extracción fue de 0,48 %, el contenido de fenólicos totales=57,22 mg de equivalentes de ácido gálico

(GAE)/g de extracto y compuestos fenólicos totales mediante HPLC=119,46 mg/g de extracto (Santos et al., 2012).

Asimismo, se llevó a cabo una investigación empleando residuos sólidos de la producción industrial de jugos a partir de berries (frambuesa, cranberry y arándano) para la extracción de antioxidantes naturales empleando métodos de extracción convencional y con fluidos supercríticos (CO₂), siendo este último realizado por un tiempo de 2 horas a diferentes presiones entre 80-300 bar a una temperatura constante de 60 °C. Se obtuvo un rendimiento máximo de extracción de 5.20 % para los residuos de frambuesa a una presión de 200 bar, 3,89 % de residuos de cranberry a 250 bar y 1,4 % de residuos de arándano a 200 bar. Sin embargo, el contenido de compuestos fenólicos más alto fue encontrado en el orujo de la mora, 9 gr de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de extracto (Laroze et al., 2010).

Por otro lado, en cuanto a la extracción con líquidos presurizados, Alonso-Salces et al. (2001) llevaron a cabo una investigación donde evaluaron varios factores entre ellas la temperatura y presión para la obtención de compuestos fenólicos de la pulpa y cáscara de manzana Golden Delicious. Las temperaturas evaluadas fueron de 40, 60, 80 y 100

°C) y la presión de 69, 86 y 103 bar. Se estudió su efecto sobre la cantidad de compuestos fenólicos obtenidos mediante HPLC. Resultando las mejores condiciones de operación a una temperatura de 40°C y 69 bar de presión.

Otra investigación importante evaluó el efecto de la temperatura (100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 y 240 °C) y el tiempo de extracción (10, 20, 30, 60, 90, 120 min) sobre el contenido de compuestos fenólicos presentes en la cáscara de papa mediante la extracción con agua presurizada (60 bar). Donde se concluyó que las mejores condiciones para extraer los biocompuestos de interés se da a una temperatura de 180 °C y un tiempo de 60 min obteniendo un rendimiento de compuestos fenólicos de 0,08% (Singh y Saldaña, 2011).

Se estudió el efecto de la concentración del solvente etanol (70-100 %) y la temperatura (30-60 °C) sobre el rendimiento global, contenido de compuestos fenólicos totales, la composición de los fenoles de interés y la actividad antioxidante presentes en la cáscara de maracuyá. Como resultado de dicho estudio, se consideró que las mejores condiciones de extracción se dan trabajando con 70% de etanol a una temperatura de 60°C obteniendo un rendimiento de $35 \pm 0,2$ % (Viganó et al., 2016).

Además, se realizó un estudio con el objetivo de extraer compuestos antioxidantes a partir de los residuos agroindustriales de la mora (*Rubus fruticosus* L.) aplicando extracción con líquidos presurizados. Se estudió la influencia del tipo de solvente (agua, agua acidificada pH=2,5, etanol y etanol +agua 50% v:v) y la temperatura (60, 80 y 100 °C) sobre el rendimiento global, fenoles totales, antocianinas monoméricas y actividad antioxidante de los extractos. Los resultados mostraron influencia positiva de la temperatura sobre el rendimiento global, fenoles totales y antocianinas monoméricas. Las mejores condiciones de proceso de extracción se establecieron trabajando con una mezcla de etanol + agua 50 % v:v como solvente a una temperatura de 100 °C, resultando con un contenido de fenoles totales de 7,36 mGAE/g de residuo fresco, y un rendimiento global de 6,33 % (Machado et al., 2015).

Se realizó otro estudio aplicando extracción con agua presurizada con el fin de extraer polifenoles a partir de la cáscara de granada. Los factores que consideraron importantes para evaluar en el proceso de extracción fueron tamaño de partícula (0.065-1,400 mm), temperatura (40, 65 y 90 °C) y tiempo de extracción estática (5, 15 y 30 min). Donde las mejores condiciones de extracción se dieron experimentando con un

tamaño de partícula de 0,065 – 0,212 mm, a una temperatura de 40 °C y un tiempo estático de 5 min. El rendimiento de extracción fue de 43,3 ±2,7 %. Además, el contenido de punicalaginas fue de 11 660 mg/100 g en b.s. (Çam y Hisil, 2010).

Se realizó un estudio cuyo objetivo fue la extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de granada (*P. granatum L.*) aplicando la combinación de ultrasonido y líquidos presurizados. Evaluaron varios factores entre ellos la temperatura (50-100°C), el tipo de solvente (agua y etanol) entre otros, sobre el rendimiento de extracción. Los resultados mostraron que a temperaturas mayores a 60°C los compuestos fenólicos de interés (punicalaginas y ácido elágico) disminuyeron significativamente realizando la extracción con 70% etanol. La cantidad de punicalaginas α , β y ácido elágico reportada fue de 414±19, 812±28 y 128±9 mg/100 g, respectivamente (Sumere et al., 2018).

CAPÍTULO IV.

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. Tipo de investigación

El tipo de investigación es aplicada, cuantitativa y relacional (causa-efecto).

4.2. Población y muestra

A. Población

La población de granada variedad Wonderful proveniente del campo experimental de la Municipalidad del Distrito de Ite, provincia de Jorge Basadre de la región de Tacna fue de aproximadamente 7000 kg (7 t), la cual fue cosechada en el mes de marzo del año 2019.

B. Muestra

La muestra fue de 56,42 kg de granada entera variedad Wonderful considerada dicha cantidad por conveniencia, resultando en un rendimiento de 7,62% como matriz vegetal seca, molida y tamizada. En cuanto a la muestra empleada para realizar cada tratamiento mediante la extracción con fluidos supercríticos y líquidos presurizados fue entre 6-10 g para los experimentos y tratamientos de la I y II etapa.

4.3. Diseño estadístico

En la I etapa, no se realizó en base a ningún diseño estadístico. En la Tabla 7 se muestran los experimentos que se llevaron a cabo por duplicado de forma preliminar.

Tabla 7

Experimentos realizados en la primera etapa

Experimento	Tipo de extracción	Proporción de solvente		T (°C)	Presión (bar)
		CO ₂	etanol		
1	SFE	100	-	40	200
2		90	10		
3		50	50		
4	PLE	-	100		

Fuente: Elaboración propia (2019)

Para la II etapa, se llevó a cabo un arreglo factorial 2x5 teniendo dos factores: temperatura (Factor A) y Presión (Factor B). El estudio de las extracciones unitarias se realizó usando diferentes condiciones de temperatura (40 y 60 °C) y presión (20,40,60,80 y 100 bar).

Según el arreglo factorial planteado, se llevaron a cabo 20 tratamientos o corridas considerando 2 repeticiones para obtener una buena respuesta (Tabla 8).

Tabla 8

Arreglo factorial 2x5 evaluando temperatura y presión sobre el rendimiento de extracción

TRATAMIENTO	TEMPERATURA (°C)	PRESIÓN (bar)
1	40	20
2	40	40
3	40	60
4	40	80
5	40	100
6	60	20
7	60	40
8	60	60
9	60	80
10	60	100

Fuente: Elaboración propia (2019)

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Equipos y materiales

El estudio realizado se dio a escala de laboratorio donde se dispuso de los siguientes materiales:

4.4.1.1. Equipos

- Mufla (ThermConcept, Modelo KLE 03/11, Germany).
- Estufa (Raypa, Modelo DOD-50, España).
- Extractor soxhlet.

- Microcentrífuga (Eppendorf, Germany)
- Agitador vórtex.(Thermo Scientific, USA)
- Lector de microplacas (Biotek, USA)
- Secador de bandejas (ESIP/UNJBG).
- Molino manual.
- Extractor automático con fluidos supercríticos MV-10 ASFE
 - Marca y procedencia: WATERS, Milford (USA).
 - Rango de presión: 60-400 bar
 - Rango de temperatura: ambiente a 90°C
 - Software: ChromScope
- Extractor con líquidos presurizados (PLE)
 - Fabricado: Laboratorio LASEFI, São Paulo, Brasil (Santos, Veggi y Meireles, 2012).
- Rotavapor
 - Marca y procedencia: Marconi, Brasil
 - Modelo: MA 120
- Baño de ultrasonido
 - Marca y procedencia: Maxiclean 1400, Indaiatuba, SP, Brasil.
- Equipo con cámara UV (Multiband UV-254-366 nm, UVGL-58, Mineralight® Lamp, Upland, CA, EUA).

4.4.1.2. Insumos y materiales de laboratorio

- Mortero con mazo de porcelana.
- Espátulas delgadas y gruesas.
- Fiolas graduadas de 5, 10, 25 ml, 50 y 100 ml.
- Vasos de precipitado de 25, 50, 100 y 250 ml.
- Tubos de ensayo para centrífuga.
- Solución estándar de ácido elágico x 1 g (≥ 95 %, lote # BCBP8742V, United Kingdom).
- Soluciones estándar de antocianinas.
- Piseta plástica.
- Gradillas.
- Gas nitrógeno.
- Jeringa de plástico
- Jeringa de vidrio de 10 ml.
- Lápiz 2B.
- Filtros de plástico.
- Papel aluminio
- Fibra de vidrio.
- Cepillos delgados de plástico.
- Pinzas.
- Viales para HPLC.

- Dióxido de Carbono (CO₂)
- Cuba de vidrio.
- Placas de sílica gel (Alugram®, Xtra SIL G, Macherey-Nagel, Düren, Alemania, con y sin sensibilidad UV-254 nm).
- Tubos capilares.

4.4.1.3. Reactivos

- Acetato de etila (99,8 %) (Dinâmica, SP, Brasil).
- Ácido acético glacial (99,7 %) (Dinâmica, SP, Brasil).
- Metanol (99,8 %) (Dinâmica, SP, Brasil).
- Ácido fórmico (98 %) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ácido clorhídrico (36,5 %) (Synth, SP, Brasil)
- Alcohol etílico absoluto o etanol 99,5 % P.A (Anidrol, SP, Brasil)
- El agua MilliQ (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA)

4.4.2. Métodos

4.4.2.1. Método procedimental

En la Figura 14 se muestran las operaciones unitarias llevadas a cabo para la preparación de la materia prima (Anexo 2). Asimismo, en la Figura 15 y 16 se detalla el diagrama de flujo empleado en la primera y segunda etapa del presente estudio respectivamente.

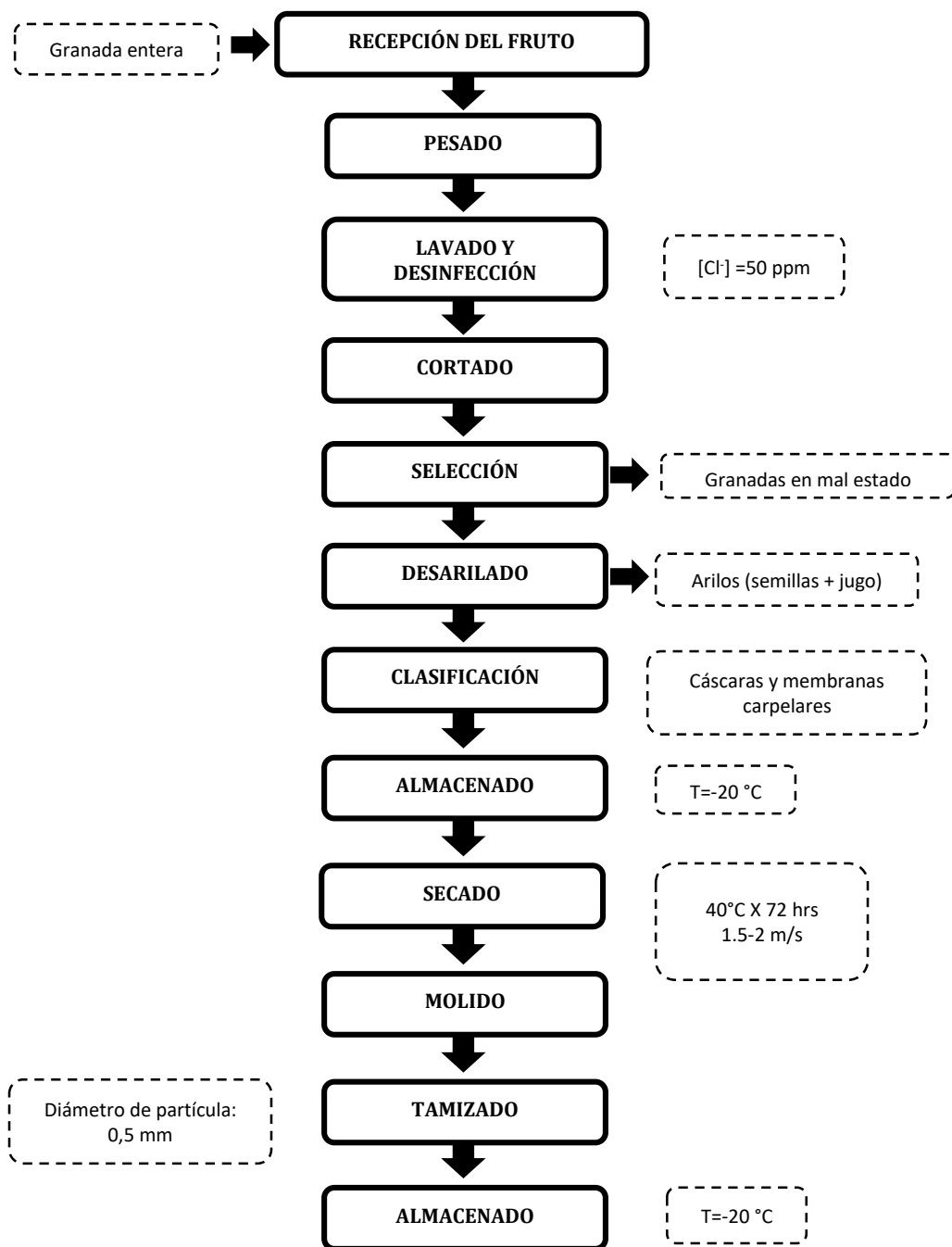


Figura 14. Diagrama de flujo de la preparación de la materia prima (*P. granatum*)

Fuente: Elaboración propia (2019)

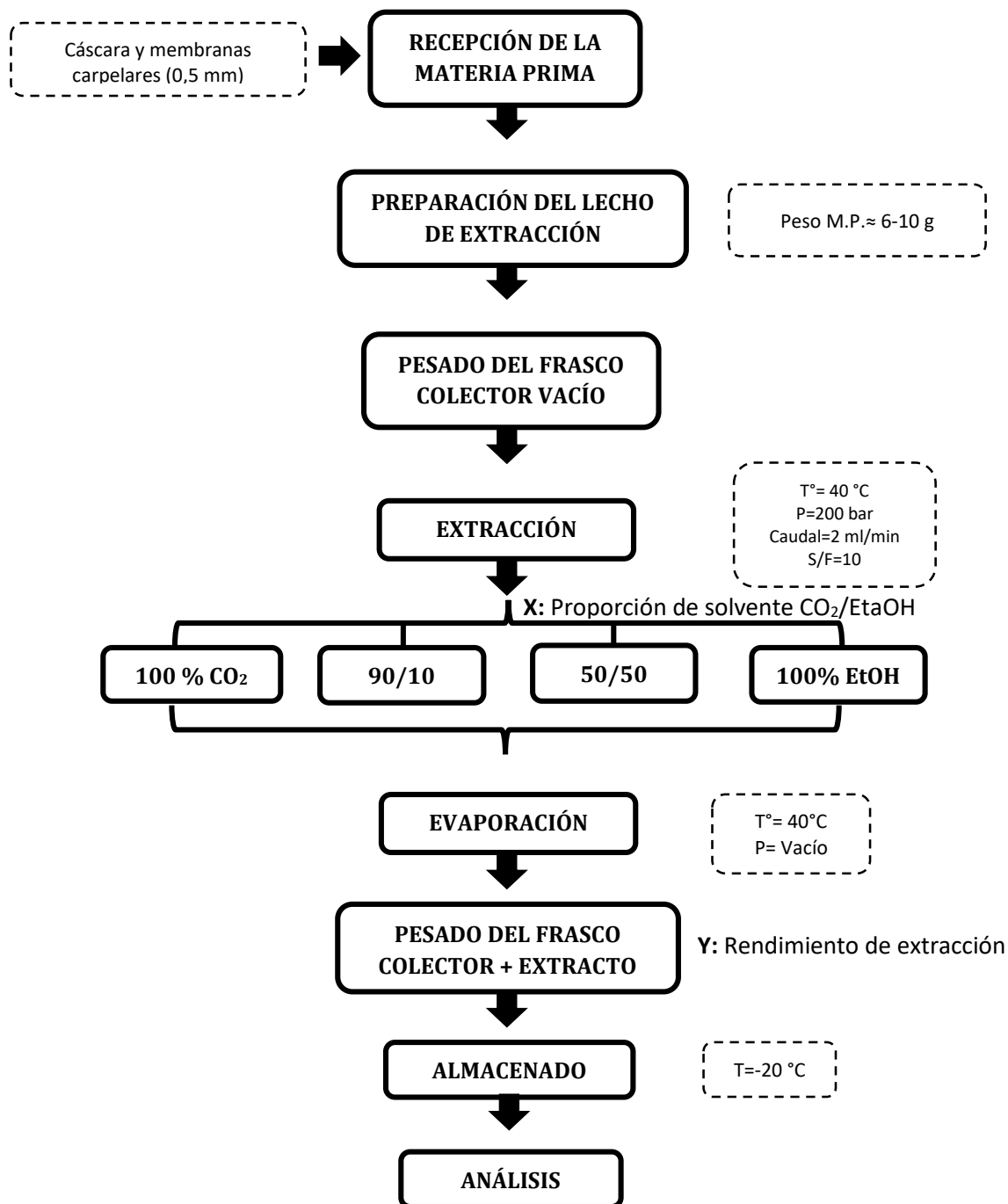


Figura 15. Diagrama de flujo de la extracción de biocompuestos a partir de los residuos de la granada evaluando la proporción de solvente (I etapa)

Fuente: Elaboración propia (2019)

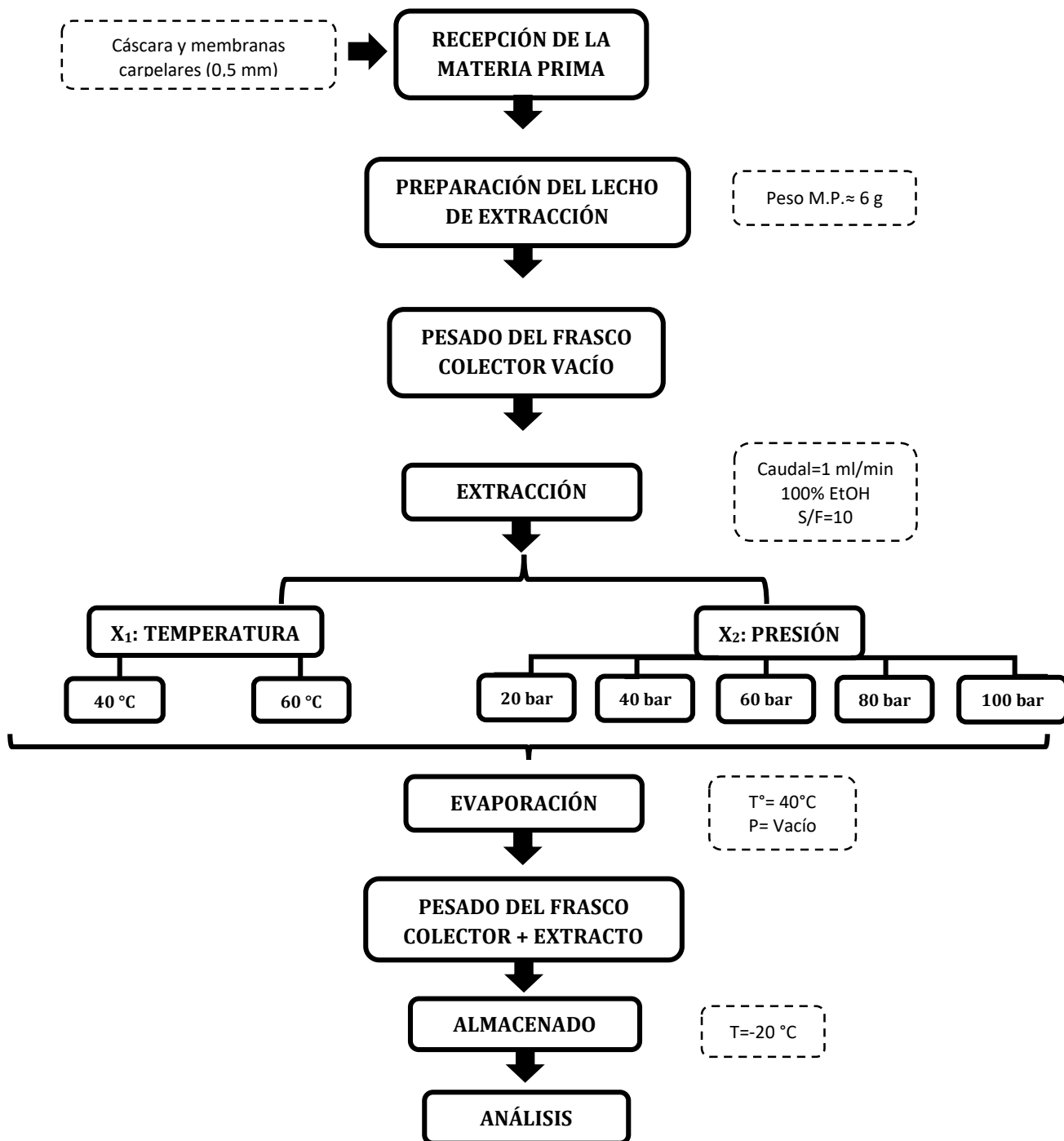


Figura 16. Diagrama de flujo de la extracción de biocompuestos a partir de residuos de granada mediante líquidos presurizados (II etapa).
Fuente: Elaboración propia (2019)

a) Recepción de la materia prima

La granada fue obtenida de la parcela experimental de la Municipalidad distrital de Ite, provincia de Jorge Basadre, Tacna.

b) Pesado

Se adquirió 56.42 kg de granada de la variedad Wonderful.

c) Lavado y desinfección

Con el fin de liberar la fruta de cualquier contaminante físico externo adherido a la cáscara, se precedió a lavar con agua potable y luego desinfectar con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 50 ppm.

d) Cortado

Luego de tener la fruta desinfectada se realizó el cortado de la granada en 4 partes con ayuda de cuchillos de acero inoxidable y tablas de picar.

e) Selección

Se separaron las granadas que se encontraban en mal estado (infestadas por hongos en el interior), las cuales se pesaron como desechos.

f) Desafilado

Consistió en desprender los arilos impregnados en la cáscara y membranas carpelares. Se realizó de forma manual con mucho cuidado.

g) Clasificación

Los arilos se separaron ya que no representan nuestra materia prima, considerando sólo la cáscara y membranas carpelares, las cuales se procedió a registrar su peso.

h) Almacenado

Las cáscaras y membranas carpelares se colocaron en bolsas plásticas blancas herméticas, de esa forma se almacenaron bajo condiciones de congelación (-20°C).

i) Secado

Posteriormente, los residuos fueron sometidos a un proceso de secado a 40 °C x 72 horas empleando un secador de bandejas con aire caliente.

j) Molido

Una vez secos, fueron molidos con ayuda de un molino manual y de cuchillos.

k) Tamizado

Los residuos molidos fueron tamizados a un tamaño de partícula promedio de 0,5 mm con ayuda de un juego de tamices y fueron almacenados en bolsas plásticas forradas con papel aluminio y mantenidas bajo condiciones de congelación (-20°C).

l) Almacenado

Se procedió a almacenar los residuos ya tamizados en bolsas plásticas inocuas con cierre ziplock, las cuales fueron rotuladas considerando su tamaño de partícula. Se sometieron bajo condiciones de congelación (-20°C).

m) Preparación del lecho de extracción

Previo al proceso de extracción, se realizó la preparación del lecho de extracción, la cual consistió en acondicionar la materia prima dentro de la celda o columna de extracción, para ello, primero se pesó una determinada cantidad (aprox. 6-10 g) de la materia prima tamizada. En seguida se colocó una capa fina de lana de vidrio dentro de la columna, luego la muestra y terminando con otra capa fina de lana de vidrio (Anexo 3).

n) Pesado del frasco colector vacío

Previamente a realizar el pesado del frasco colector, se verificó que éste se encuentre limpio y seco rotulándose a criterio. Luego de ello, con ayuda de una balanza analítica, se pesó el frasco, registrando dicho peso.

o) Extracción

En la etapa I, para la extracción se empleó un equipo extractor supercrítico automático MV10-ASFE (CO₂ y etanol) y un equipo PLE (LASEFI/FEA/UNICAMP) siendo este último empleado también en la etapa II (Anexo 3 y 4). Una vez alcanzadas las condiciones de trabajo, se inició con la extracción estática (5-10 min). Luego de dicho tiempo, se continuó con la extracción dinámica donde el extracto y el fluido fueron colectados en el frasco previamente pesado. El tiempo de extracción dinámico fue calculado teniendo en cuenta una proporción de solvente/materia prima (S/F) de 10 y el caudal de solvente de 2 ml/min en la etapa I y 1 ml/min en la etapa II.

p) Evaporación

Una vez finalizado el tiempo de extracción dinámico, se retiró el frasco colector, el cual fue colocado en un rotavapor para la evaporación del cosolvente etanol a una temperatura de 40°C y a presión de vacío a fin de obtener sólo el extracto de la materia prima dentro del frasco.

q) Pesado del frasco colector + extracto

Una vez que el frasco se encontró a temperatura ambiente fue pesado en una balanza analítica para determinar el rendimiento de extracción.

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{\text{masa de extracto}}{\text{masa de la materia prima}} \times 100 \dots\dots \text{ecuación 1}$$

r) Almacenado

Finalmente, se almacenó el frasco conteniendo el extracto a temperatura de congelación (-20 °C) envuelto en papel de aluminio. Previo a ello, se inyectó nitrógeno dentro del frasco para retirar el oxígeno presente y por ende evitar la oxidación de los compuestos.

s) Análisis

Se realizaron análisis cromatográficos de capa fina y líquida de alta resolución con el fin de poder identificar de forma cualitativa y cuantitativa los compuestos presentes en los extractos de residuos de granada.

4.4.2.2. Métodos analíticos

4.4.2.2.1. Dilución de los extractos

Para la dilución de los extractos se ensayó con dos solventes metanol P.A. al 99.8% y etanol al 99.5 % P.A. (Farías-Campomanes, 2012). Asimismo, se empleó sólo el extracto obtenido con mayor rendimiento por PLE de la I etapa (experimento 4). Para facilitar la dilución de los extractos,

todos ellos pasaron por baño de ultrasonido con diferentes tiempos dependiendo del grado de su disolución. Se empleó como fase estacionaria una placa de sílica gel de 10 x 10 cm, sin sensibilidad UV y como fase móvil, acetato de etila: cloroformo (91:9).

4.4.2.2.2. Análisis de cromatografía de capa fina (TLC)

A. Etapa I

Se realizaron análisis para identificación de antocianinas y compuestos fenólicos de los extractos obtenidos de los experimentos 3 y 4 de la primera etapa. Se emplearon como fase estacionaria placas de sílica gel 60 de 10 x 10 cm, pre-recubiertas con aluminio para CCD sin sensibilidad UV para todos los análisis de la primera etapa.

Para la identificación de antocianinas se emplearon 2 metodologías. La primera de ellas fue según Wagner y Bladt (2001) y Farías-Campomanes (2012), con algunas modificaciones. Se empleó como fase móvil acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua MilliQ (68:7:7:18, v/v/v/v). El extracto empleado fue del experimento 4, sólo con etanol. El cual fue diluido en metanol acidificado:0,01 % (v/v) HCl en fiola de 100 mL (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001). La concentración del extracto fue de 0,073 g/ml. Para la aplicación del extracto sobre la placa se

emplearon tubos capilares de 2 a 5 inyecciones. Se empleó el patrón de cianidina-3-glucósido, la cual estaba diluida en metanol en una concentración de 1 mg/ml. Para la detección de las bandas se visualizó en luz visible y en un equipo con cabina que emite luz UV (254-366 nm).

La segunda metodología para antocianinas que se empleó fue también de Wagner y Bladt (2001). Se empleó como fase móvil n-butanol: ácido acético glacial: agua MilliQ (50:10:20, v/v/v). Los extractos empleados fueron del tercer (con 50 % etanol) y cuarto experimento (sólo con etanol), los cuales fueron diluidos en metanol P.A. La concentración de los extractos fue de 0,05 g/ml. Se inyectó 10 µL de extracto diluido sobre placa. Se empleó el patrón de cianidina-3-glucósido, la cual estaba diluida en metanol en una concentración de 0,66 mg/ml. Para la detección de las bandas se visualizó en luz visible y en cámara UV a longitud de onda larga $\lambda=366$ nm.

Luego, se realizaron análisis para la identificación de compuestos fenólicos y flavonoides. Se emplearon dos métodos desarrollados por Farías-Campomanes (2012) y Albuquerque et al. (2015) con algunas modificaciones. El primer método consistió en emplear como fase móvil acetato de etila: cloroformo (91:9, v/v). Los extractos empleados fueron del experimento 3 y 4, los cuales fueron diluidos en metanol acidificado:0,01%

(v/v) HCl y metanol puro. La concentración de los extractos fue alrededor de 0,073 g/ml. Se inyectó 10-15 μ L de extracto diluido sobre la placa. Se comparó con patrón de ácido elágico diluido en metanol con tubo capilar. Para visualizar las bandas de los compuestos se sometieron bajo luz visible y UV con longitud de onda larga=366 nm.

El segundo método (Albuquerque et al., 2015) utilizado para flavonoides y compuestos fenólicos se basó en emplear como fase móvil n-hexano: acetato de etila: ácido fórmico (78:18:03, v/v/v). Los extractos utilizados fueron los de mayor rendimiento de extracción, del experimento 3 y 4, ya que la masa obtenida de los extractos del experimento 1 y 2 fue muy baja. Dichos extractos, así como los patrones empleados de ácido elágico y quercetina fueron diluidos en hidróxido de sodio 1 M. La concentración de los extractos fue de 0,05 g/ml y de los patrones ácido elágico y quercetina fueron 0,56 mg/ml y 0.26 mg/ml respectivamente. Se inyectaron 10 μ L de extracto y ácido elágico sobre la placa y de 10-12.5 μ L de quercetina. Para visualizar las bandas de los compuestos se sometieron bajo luz visible y UV, con longitud de onda larga=366 nm.

B. Etapa II

Se realizó el análisis TLC para la identificación de compuestos fenólicos. A diferencia de la I etapa, en esta II etapa se emplearon placas de sílica gel de 10 x 10 cm con sensibilidad UV-266 nm (Alugram®, Xtra SIL G, Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Se empleó como fase móvil acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua MilliQ (68:7:7:18, v/v/v/v) (Farías-Campomanes, 2012). Los extractos empleados fueron los 2 tratamientos con mayor rendimiento de extracción obtenidos mediante PLE, rotulados como E1 (extracto 1) y E2 (extracto 2). Para la aplicación del extracto sobre la placa se empleó una jeringa de 10 µL de capacidad (Hamilton, Nevada, EUA).

La visualización de las bandas generadas por los constituyentes que no fueron observadas en la región visible fue llevada a cabo por un equipo que emite luz UV. Luego, se empleó el revelador NP (2-aminoetil-difenilborinato), el cual fue preparado en matraz Erlenmeyer de 150 mL, donde se adicionó 50 g de 2-aminoetil-difenilborinato en 100 mL de metanol. Este revelador se aplicó con ayuda de un aspersor sobre la placa acomodada sobre una estructura vertical con el fin de observar las bandas de compuestos que no se visualizaban en luz UV a 254 nm, Luego, se sometió la placa a cámara UV visualizándose a 366 nm.

El factor de retención (R_f) se calculó de la división de la distancia recorrida por el compuesto sobre la distancia recorrida por el disolvente.

4.4.2.2.3. Análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para identificar y cuantificar los compuestos presentes en la cáscara y membranas carpelares de la granada se realizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se analizaron los 2 extractos obtenidos con mayor rendimiento de extracción mediante líquidos presurizados de la segunda etapa (E1 y E2). Primero, se preparó los solventes a utilizar, solvente A (Agua MilliQ acidificada al 1% de ácido fórmico) y Solvente B (Acetonitrilo al 1% de ácido fórmico). Para ello, se realizaron ensayos previos con el fin de obtener los mejores resultados cromatográficos de los compuestos presentes. Finalmente, se estableció el método de trabajo a un flujo de 1.6 ml/min, en un tiempo de 20 min. Se fijó la columna adecuada en este caso se utilizó la columna Kinetex Core Shell technology, 2,6 μ C18 100 A, dimensión 100 x 4,6 mm, de marca Phenomenex.

Por otro lado, se realizó la dilución del patrón ácido elágico con metanol a diferentes concentraciones de 1, 10, 25, 50 y 100 mg/L. Además, los dos extractos obtenidos con mayor rendimiento de extracción fueron diluidos en agua.

A partir del extracto diluido en fiola de 10 ml, se filtró con ayuda de una jeringa y filtro de plástico, trasvasándose 1,5 ml a un vial de vidrio para ser analizado en el equipo HPLC. Se utilizó el software Empower Pro, para el procesamiento de datos. El HPLC (model 2695D, Milford, USA) empleado estaba acoplado a un equipo detector de arreglo de diodos (PhotoDiodo Array Detector, 2898). Se trabajó a una longitud de onda de 340 nm. Los compuestos mostrados en los cromatogramas obtenidos se compararon con el tiempo de retención del patrón empleado ácido elágico y también con referencias bibliográficas para determinar cuantitativamente los compuestos de punicalaginas α y β .

CAPÍTULO V.

TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

5.1. Técnicas aplicadas en la recolección de la información

Los datos fueron recolectados de los análisis que se realizaron a las unidades de estudio y que a continuación se detallan:

5.1.1 Métodos analíticos

a. Análisis realizados a la materia prima

- ⇒ Humedad (método por pérdida de peso constante), A.O.A.C, 1997.
- ⇒ Cenizas (método por calcinación), A.O.A.C, 1975.
- ⇒ Grasa (método Soxhlet), A.O.A.C, 2003.
- ⇒ Proteína (método de Bradford, 1976).
- ⇒ Carbohidratos (por diferencia).
- ⇒ Diámetro de partícula (ASAE S424.1 MAR1992)

b. Análisis realizados a los extractos

- ⇒ Cromatografía de Capa Fina (TLC)
- ⇒ Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

5.1.2 Métodos estadísticos

Con los promedios de los 20 tratamientos; para conocer la influencia significativa de los factores temperatura y presión sobre el rendimiento de extracción se realizó un análisis de varianza (ANOVA) al 95 % de confianza. Luego de ello se realizó la prueba de Tukey, para ver la diferencia significativa entre las medias de los niveles de los factores y tratamientos. Después se aplicó un análisis de efectos simples ya que la interacción de los factores fue significativa ($p < 0,05$).

El modelo aditivo lineal para el arreglo factorial planteado es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} = Rendimiento de extracción de compuestos fenólicos obtenido a una temperatura i y presión j en la repetición k .
- μ = Rendimiento de extracción medio general.
- α_i = Efecto de la temperatura i .
- β_j = Efecto de la presión j .
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre la temperatura i y la presión j .
- ε_{ijk} = Efecto del error experimental obtenida obtenido a una temperatura i y presión j en la repetición k (Calzada, 1970).

Para el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey se utilizó el software estadístico Minitab 18. Para el análisis de efectos simples se empleó el software SAS 9.0.

5.2. Instrumentos de medición

Para el análisis de composición centesimal y medición de variables, se emplearon instrumentos de medición físicos de buena precisión (calibrados) y para la medición de la proporción de solvente CO₂/etanol en la I etapa del estudio empleando el equipo MV-10 ASFE, se dio de manera semi-automática ya que trabaja con un software computarizado, donde solo se indica la proporción de los solventes a utilizar.

a) Estufa. Para determinación de la humedad.

- Marca: Raypa. Modelo: DOD-50 (España)
- Rango de temperatura: hasta 250 ° C.
- V=230, 50/60 Hz y W= 1000

b) Balanza analítica. Para determinación del rendimiento de extracción.

- Marca: ADAM
- Capacidad: 0,0001 g-250 g
- Diámetro de plato: 80 mm.

c) Termómetro Láser Infrarrojo de mano. Para medición de la temperatura.

- Rango de medición de temperatura: -50 ~ 380 °C,
- Tiempo de respuesta: 500ms

d) Regla graduada. Para la medición del factor de retención en TLC.

- Marca: Artesco (plástico)
- Capacidad: 30 cm.

e) Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC) acoplado con detector de diodos (PDA). Para la determinación del contenido de los biocompuestos de interés.

- Marca: Waters e2695 separations module.
- Número de disolventes: uno a cuatro
- Tasa de rango de flujo: 0.000 a 10. 000 ml/min
- Presión máxima de operación: 5000 psi (345 bar)
- Número de viales de muestra: 120 viales.
- Capacidad del vial de muestra estándar: 2 ml
- Rango de volumen de inyección: 0,1 a 100 µl
- Muestra mínima requerida: 10 µl.
- Control de temperatura de la muestra (opcional): 4 a 40 °C.

5.3.Resultados

5.3.1. Análisis de la composición centesimal de la materia prima

En la Tabla 9 se reportan los resultados del análisis de composición centesimal de la cáscara y membranas carpelares de la granada de la variedad Wonderful analizada como materia prima.

Tabla 9

Composición centesimal de los residuos de la granada (P. granatum) variedad Wonderful

Análisis	% Base húmeda
Humedad	71,95±0,8
Lípidos	1,61±0,13
Proteínas	1,41±0,03
Cenizas	1,21±0,01
Carbohidratos totales*	23,81

(*) calculado por diferencia.

Fuente: Elaboración propia (2020).

5.3.2. Análisis del tamaño de partícula de la M.P.



Figura 17. Cáscara de granada molida y tamizada.

Fuente: Elaboración propia (2019).

En la Figura 17 se aprecia la matriz vegetal empleada, cáscara y membranas carpelares de granada molida y tamizada, a la cual se le calculó el tamaño de partícula promedio que fue de 0,5 mm (Anexo 5).

5.3.3. Rendimiento de extracción de la primera etapa

Luego de haber sometido la matriz vegetal a diferentes procesos de extracción (SFE y PLE) haciendo uso de diferentes proporciones de solvente CO₂/ etanol por duplicado, se obtuvieron los siguientes rendimientos de extracción, empleando la ecuación 1.

Tabla 10

Resultados de rendimiento de extracción de la I etapa.

Tipo de extracción	Experimento	Rendimiento de extracción (%)		X ₀ % (%)
		R1	R2	
SFE	1 (sólo CO ₂)	0,2189	0,0959	0,16
	2 (10 % etanol)	0,9116	0,7171	0,81
	3 (50 % etanol)	5,6707	5,0330	5,35
PLE	4 (sólo etanol)	22,4641	20,2727	21,37

Fuente: Elaboración propia (2020).

Por lo tanto, mediante SFE empleando CO₂ y etanol (realizado en el equipo SFE-MV10) se obtuvo un mayor rendimiento de extracción en el

experimento 3 (5,35%), la cual se realizó a una $T^{\circ}=40^{\circ}\text{C}$ y 200 Bar, con 50 % de etanol. Sin embargo, al comparar con el método de extracción con líquidos presurizados (en el equipo montado PLE) donde sólo se empleó el solvente etanol, el rendimiento de extracción fue casi cuatro veces mayor (21,37 %). Además, se puede apreciar que las extracciones sólo con CO_2 y 10 % de etanol son muy pequeñas (<1%) por lo tanto se decidió no llevar a cabo análisis posteriores de identificación de compuestos fenólicos.

5.3.4. Selección del solvente de dilución para análisis

Para seleccionar el solvente análisis más idóneo para diluir los extractos de la cáscara y membranas carpelares de la granada con el fin de analizarlos cromatográficamente, se realizaron pruebas con el solvente metanol y etanol. En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos al comparar el poder de dilución de ambos solventes.

Tabla 11

Comparación de solventes de dilución para análisis de los extractos obtenidos

Solvente	Dilución	Tiempo en baño de ultrasonido	Dilución final	Color
Metanol	Alta.	10 min	Completa	Naranja
Etanol	Baja.	30 min	Incompleta (60 %), quedó algo de extracto no disuelto.	Amarillo opaco

Fuente: Elaboración propia (2020)

Luego de ello, se realizó un análisis cromatográfico de capa fina (TLC) de los extractos diluidos en metanol y etanol para poder apreciar con cuál de los dos solventes empleados, los biocompuestos presentes en el extracto se separan mejor.

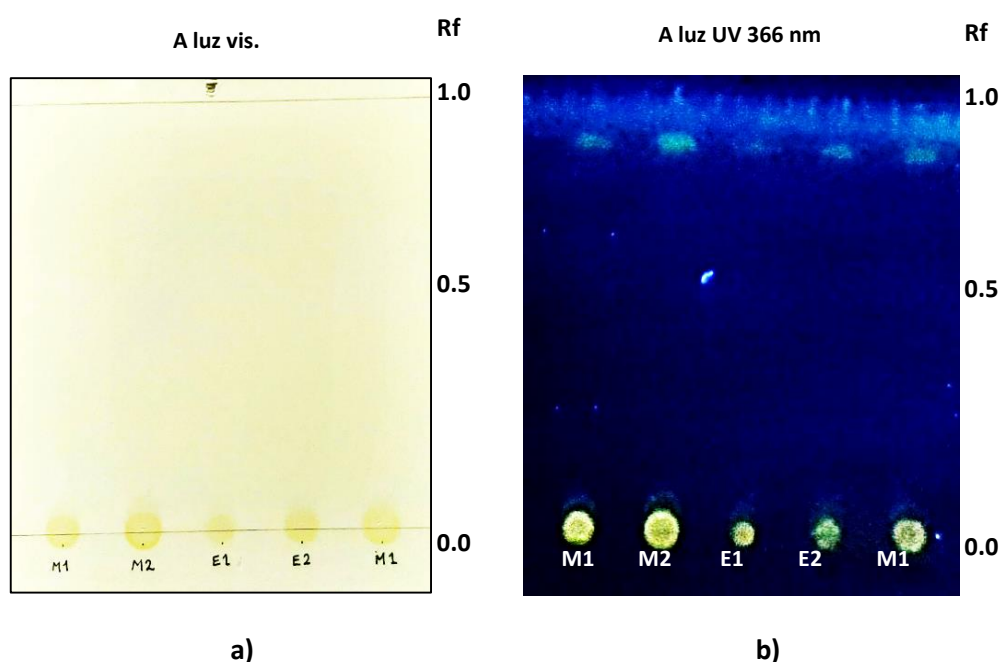


Figura 18. Análisis por TLC del extracto de residuo de granada obtenido del experimento 4 de la I etapa diluido en metanol y etanol a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm sin tratamiento químico.

De acuerdo al nivel de dilución del extracto con el solvente aplicado, se considera que es mejor la dilución con metanol que etanol, ya que la dilución es completa, no observándose ningún residuo del extracto en la solución preparada (Tabla 11), lo cual permitió que al realizar el análisis de

cromatografía de capa fina se muestren mejor las fases de los compuestos presentes de forma más intensa y marcada (Figura 18).

5.3.5. Análisis preliminar de biocompuestos mediante TLC

5.3.5.1. Antocianinas

A) Metodología 1: (Wagner y Bladt, 2001; Farías-Campomanes, 2012)

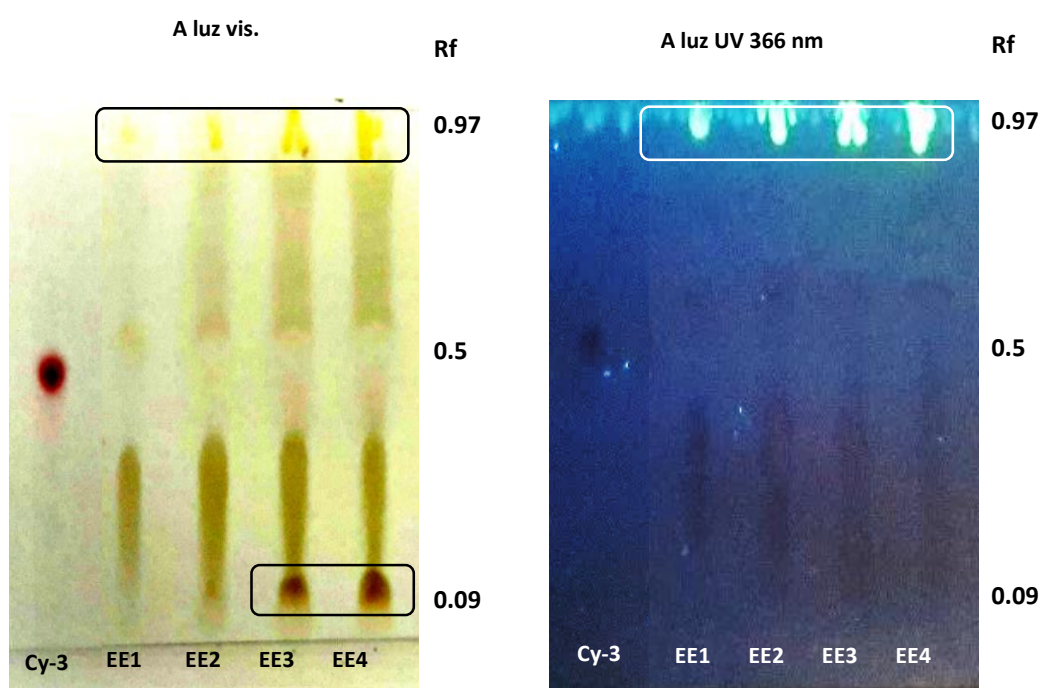


Figura 19. Análisis por TLC del extracto de residuo de granada obtenido del experimento 4 de la I etapa comparado con patrón de cianidina-3-glucósido a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm sin tratamiento químico.

B) Metodología 2 (Wagner y Bladt, 2001)

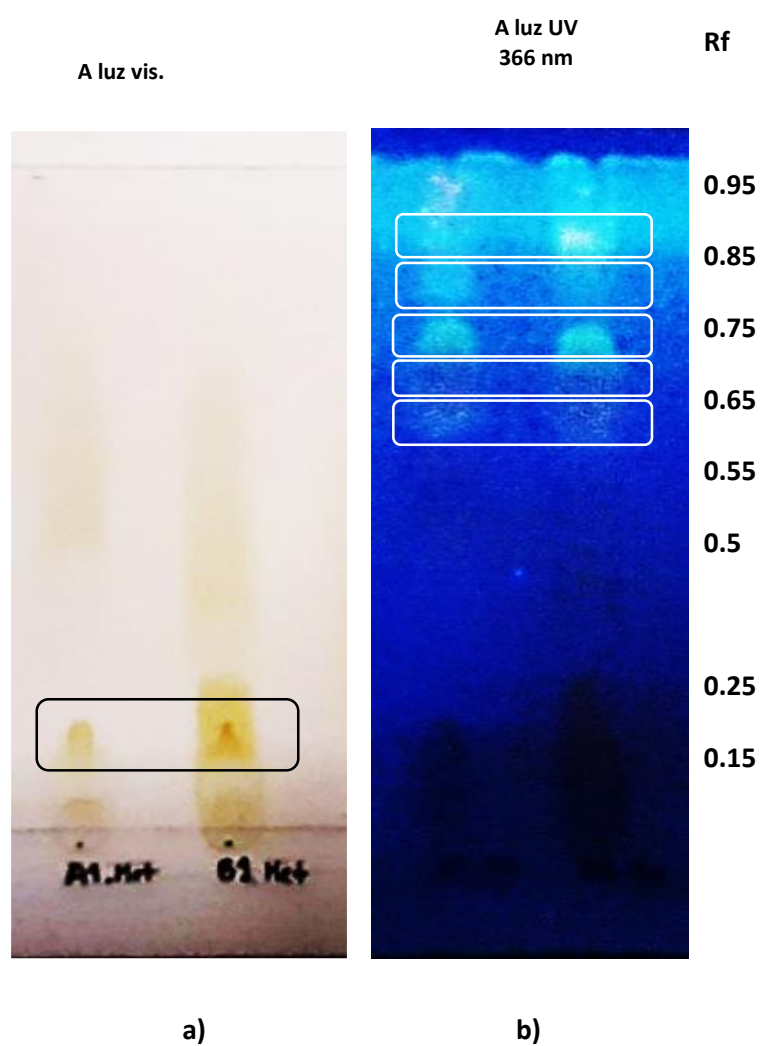


Figura 20. Análisis por TLC del extracto de residuo de granada obtenidos del experimento 3 y 4 de la I etapa a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm sin tratamiento químico.

5.3.5.2. Flavonoides y compuestos fenólicos

A) Metodología 1

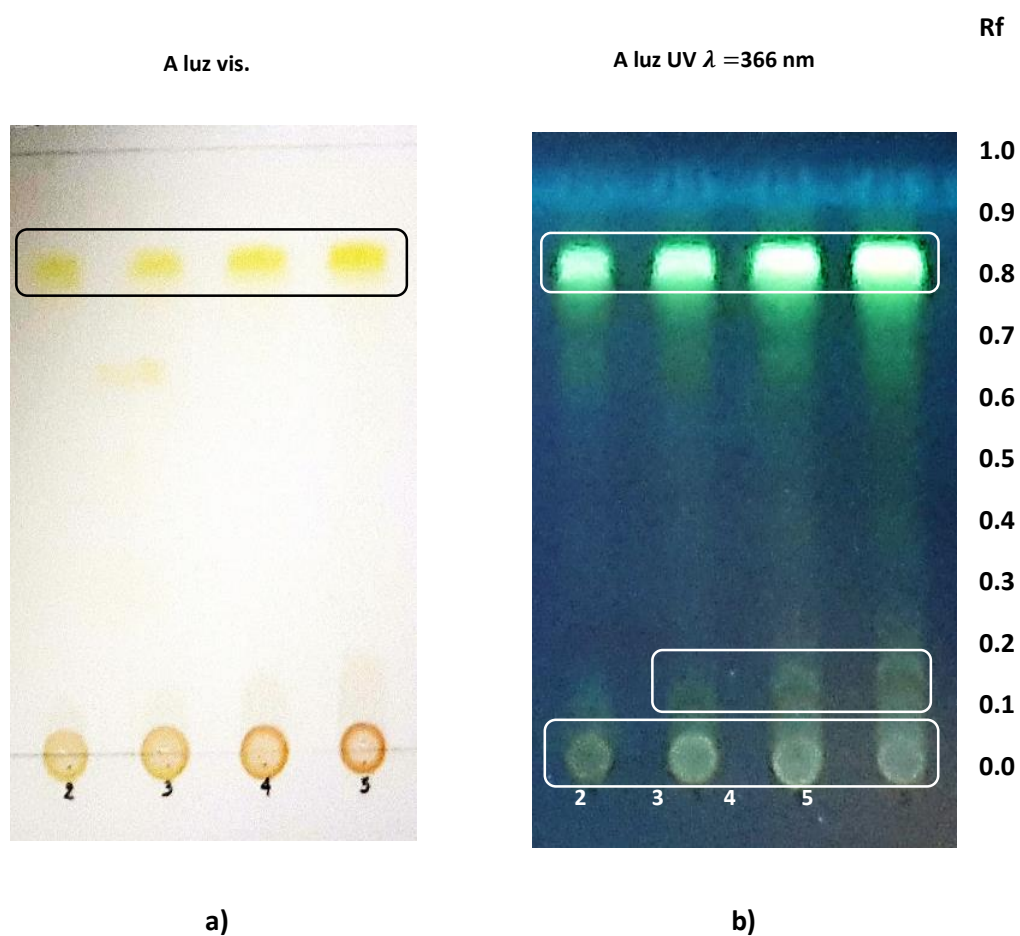


Figura 21. Análisis por TLC del extracto de cáscara de granada obtenido del experimento 4 a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm sin tratamiento químico.

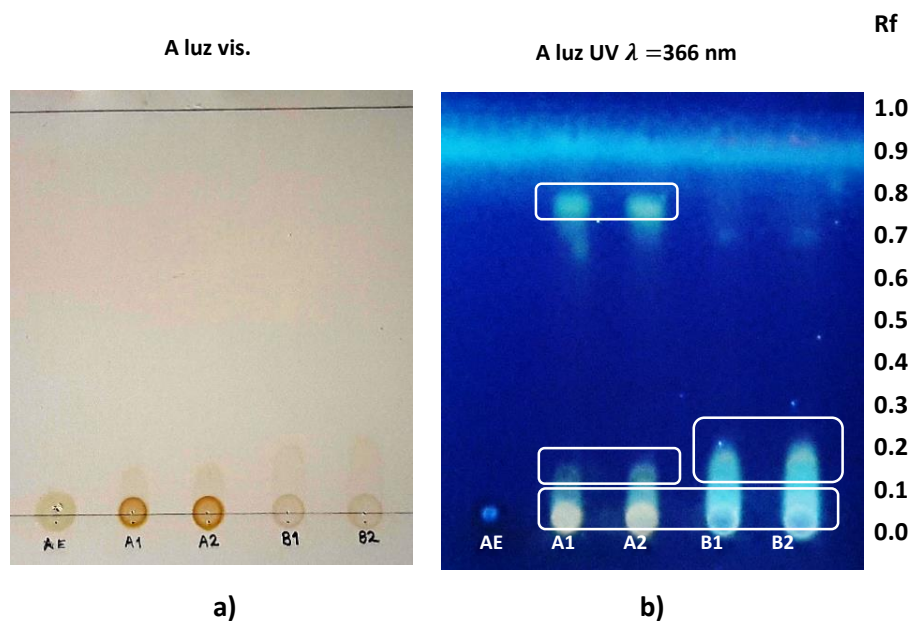


Figura 22. Análisis por TLC de extractos de residuo de granada del experimento 3 y 4 de la I etapa comparado con patrón de ácido elágico a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm.

B) Metodología 2

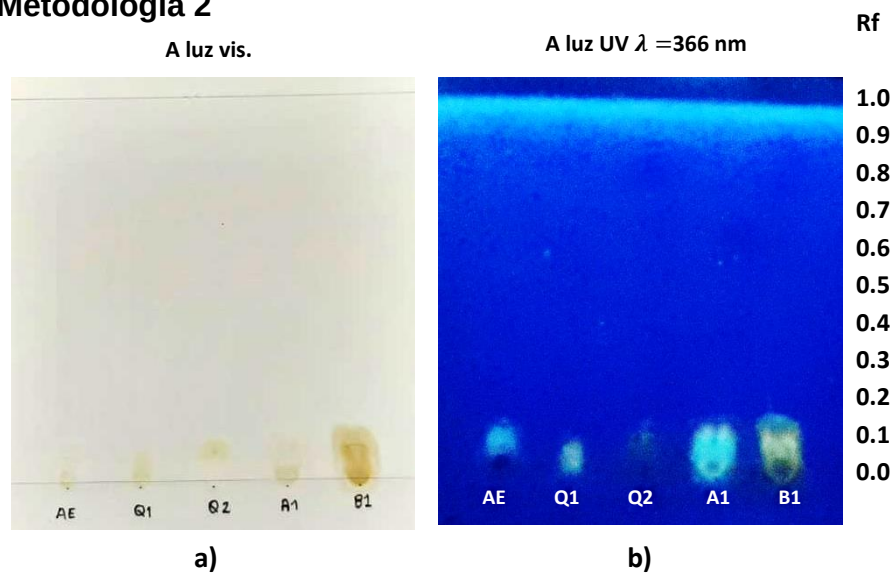


Figura 23. Análisis por TLC de extractos de residuo de granada obtenido del experimento 3 y 4 de la I etapa comparado con patrón de ácido elágico y quercetina a) bajo luz visible UV b) bajo luz UV a 366 nm.

5.3.6. Extracción con líquidos presurizados (II etapa)

En la II etapa, la extracción con líquidos presurizados empleando sólo etanol como solvente de extracción se llevó a cabo en un tiempo promedio de 86 minutos en cada tratamiento. La coloración del extracto obtenido fue naranja como se muestra en la Figura 24.

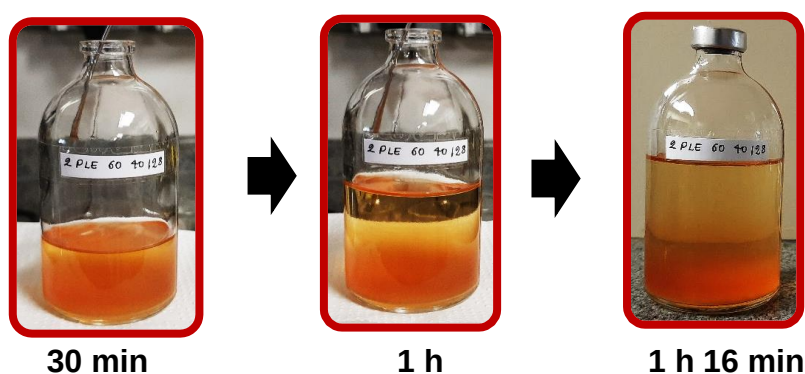


Figura 24. Frasco recolector conteniendo el extracto de cáscara y membranas carpelares de granada con solvente etanol.

Una vez concluido el proceso de extracción con líquidos presurizados, se realizó la evaporación del etanol en condiciones de vacío con ayuda de un rotavapor obteniendo un extracto con coloración rojiza, como se muestra en la Figura 25.

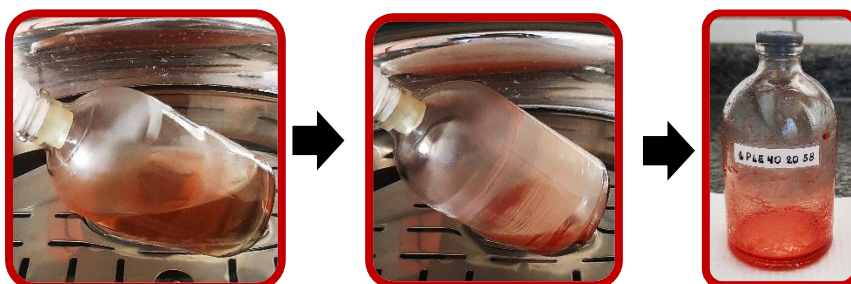


Figura 25. Proceso de evaporación del etanol contenido en el frasco recolector para obtener el extracto de la granada

5.3.7. Rendimiento de extracción mediante PLE

En la Tabla 12 se presentan los promedios de los resultados obtenidos de la determinación de los rendimientos de extracción global (%) para los 10 tratamientos, el cual se realizó con 2 repeticiones (Anexo 7).

Tabla 12

Resultados promedio del rendimiento de extracción de la II etapa

Tratamientos	X1: Temperatura (°C)	X2: Presión (bar)	Y: Rendimiento de extracción global (%)
1	40	20	27,41
2	40	40	31,01
3	40	60	30,59
4	40	80	31,39
5	40	100	31,12
6	60	20	30,00
7	60	40	37,28
8	60	60	35,36
9	60	80	44,99
10	60	100	36,06

Fuente: Elaboración propia (2020).

5.3.7.1. Análisis estadístico

El análisis de varianza (Anexo 8a) muestra que existen 3 efectos significativos con p -valor menores a 0,05 lo cual indica que los factores:

temperatura (A), presión (B) y su interacción (AB) tienen una influencia significativa sobre el rendimiento de extracción global.

La bondad del modelo se puede comprobar por el coeficiente de determinación (R^2). El valor de R^2 que resultó 0,90 indica que los factores temperatura, presión y su interacción explican el 90 % de la variabilidad de la variable respuesta (rendimiento de extracción global).

El efecto de los factores y su interacción sobre la variable respuesta se muestra gráficamente en el diagrama de Pareto (Figura 26) donde la línea vertical define el 95% de los intervalos de confianza. La interpretación del diagrama de Pareto demuestra que los factores temperatura y presión son altamente significativos, y en menor medida su interacción (AB). Un aumento en ellos aumenta el rendimiento de extracción global.

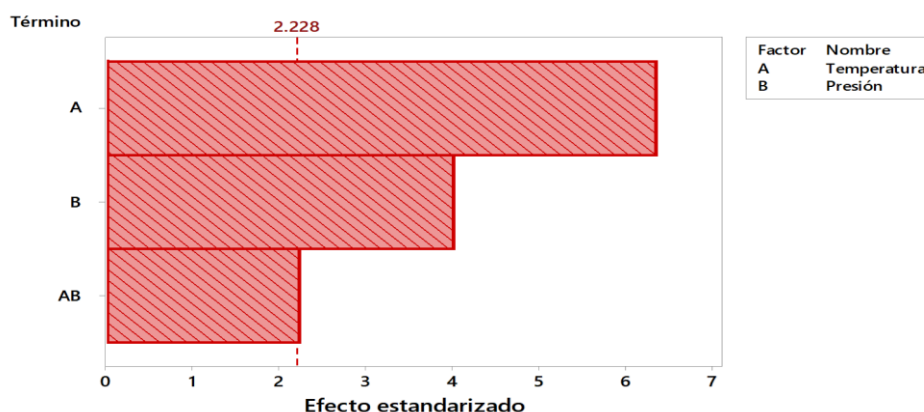


Figura 26. Diagrama de Pareto de efectos de la temperatura, presión y su interacción sobre el rendimiento de extracción
Fuente: Elaboración propia (2020), utilizando el software Minitab 18

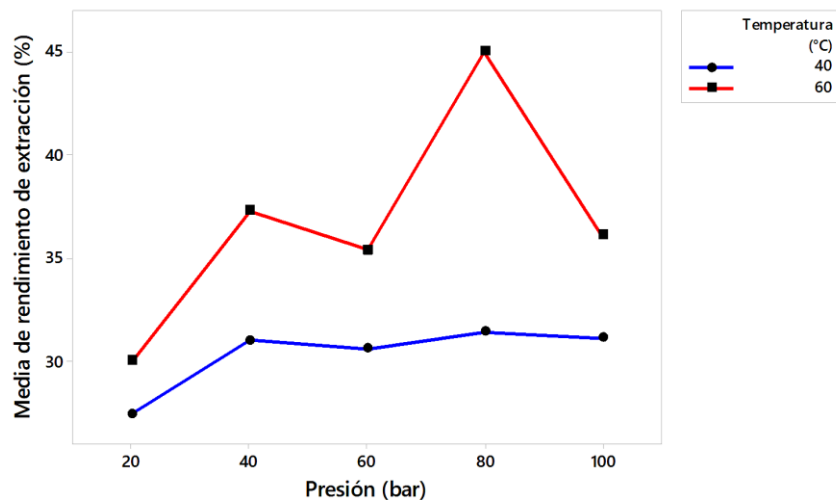


Figura 27. Gráfica de interacción de los factores sobre el rendimiento de extracción.

Fuente: Elaboración propia (2020), utilizando el software Minitab 18

En el presente trabajo de investigación se demuestra que la interacción doble (de 2 factores) si bien es significativa estadísticamente según el ANOVA, ya que el valor p es 0,049 (Anexo 8a), sin embargo, la interacción de ambos factores no tiene un efecto tan influyente sobre la respuesta como se muestra en la Figura 27 por ello no se aprecia a simple vista el cruce o intersección de las líneas y más bien los efectos principales (factores temperatura y presión) si tienen un efecto más significativo (Figura 28) por lo que los efectos principales terminan dominando el proceso (Gutiérrez y de la Vara, 2008).

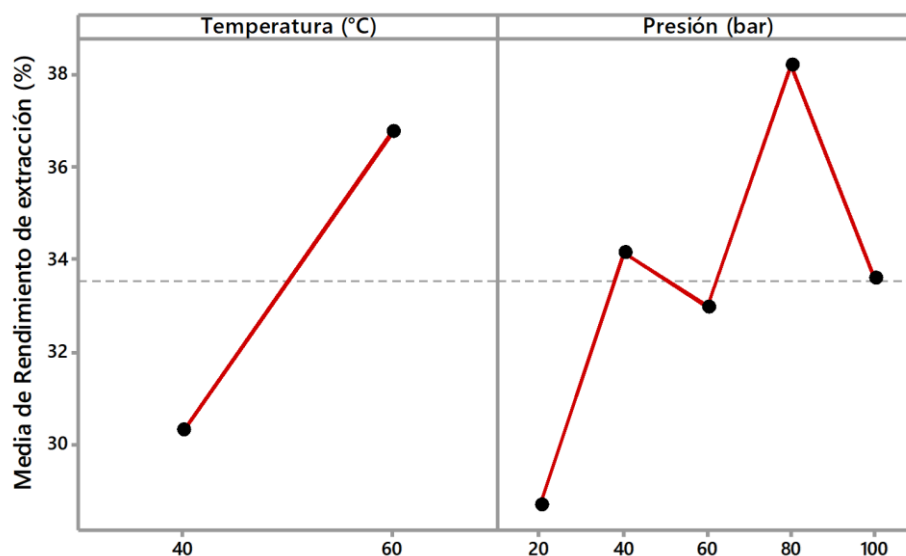


Figura 28. Gráfica de los efectos principales (temperatura y presión) sobre el rendimiento de extracción.

Fuente: Elaboración propia (2020), utilizando el software Minitab 18

Para comparar de forma más detallada las medias de los niveles de cada factor, se realizó la prueba de Tukey, donde se observa que existen diferencias significativas entre los dos niveles de temperatura (40 y 60 °C) obteniendo la media más alta del rendimiento de extracción a la temperatura de 60°C. En el caso de las medias de los 5 niveles del factor presión, se aprecia que hay dos grupos A y B, donde las medias de las presiones de 80 y 40 bar son significativamente diferentes a la media de la presión de 20 bar, siendo la media obtenida a 80 bar la más alta (Anexo 8b).

En cuanto a los tratamientos, según la prueba de Tukey, la media del rendimiento de extracción del tratamiento nueve, el cual fue sometido a una temperatura de 60 °C y 80 bar fue significativamente diferente a todos los demás tratamientos, obteniendo el mayor rendimiento de extracción (44,99%) (Anexo 8b).

Como el valor de probabilidad de la interacción de los factores temperatura y presión es menor a 0,05 se hallaron los efectos simples (Anexo 8c), donde se observa que, en cuanto a las temperaturas, a 60°C sí hay diferencias significativas entre las medias de los rendimientos de las cinco presiones evaluadas con un valor $p < 0,05$. En cuanto a las presiones, hubo diferencias significativas entre las medias de los rendimientos de las temperaturas solo a 80 y 40 bar ($p < 0,05$).

Luego se procedió a seleccionar los dos tratamientos con mayor rendimiento de extracción obtenido para analizar los compuestos fenólicos presentes a través de técnicas cromatográficas. En la Tabla 13 se muestran los tratamientos seleccionados.

Tabla 13
Tratamientos con mayores rendimientos de extracción

Tratamiento	Extracto	T (°C)	P (bar)	Rendimiento de extracción (%)
7	E1	60	40	37,28
9	E2		80	44,99

Fuente: Elaboración propia (2020)

5.3.8. Identificación de compuestos fenólicos mediante TLC

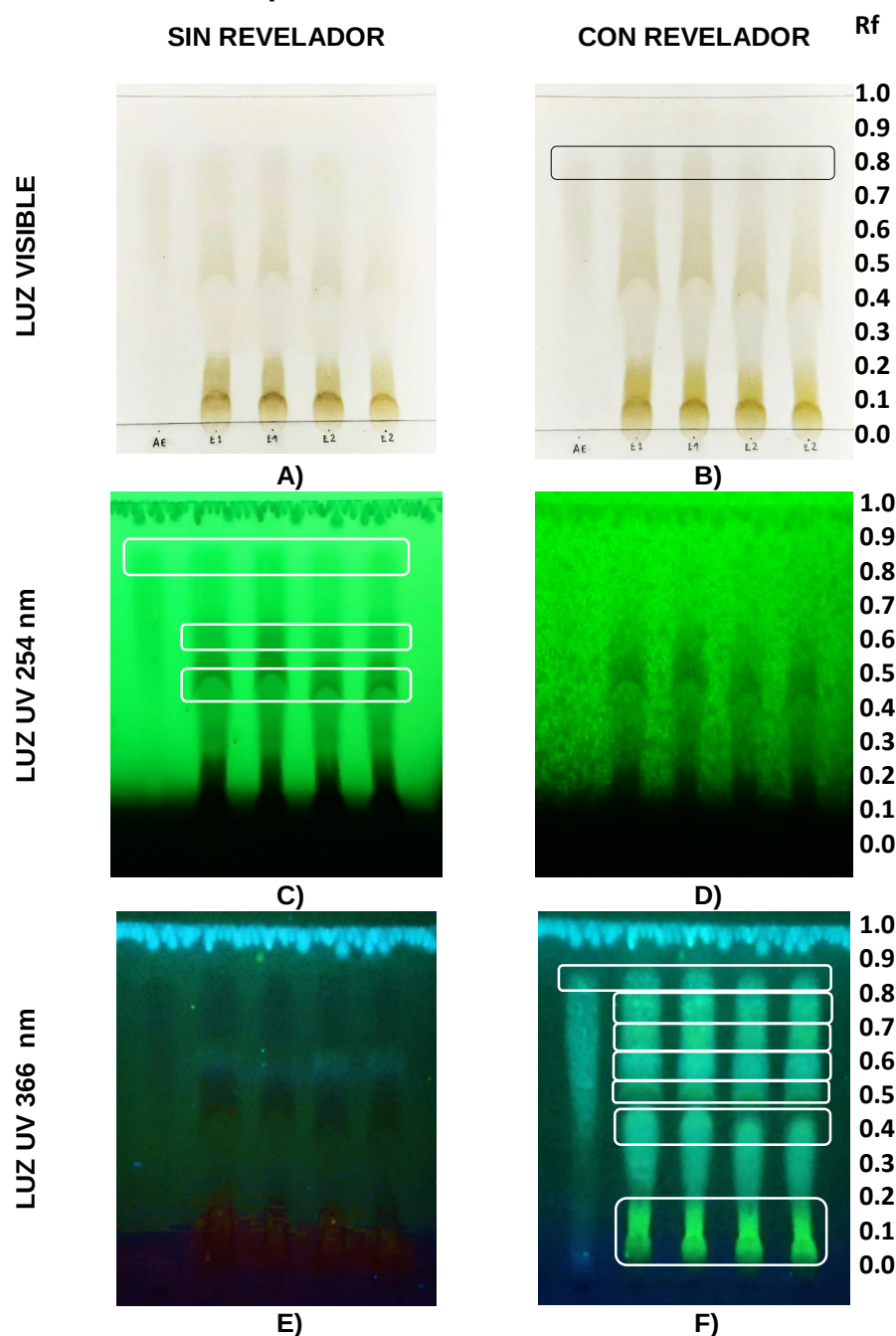


Figura 29. Análisis por TLC del extracto de cáscara de granada bajo a) luz visible sin revelador, b) luz visible con revelador, c) luz UV a 254 nm sin revelador, d) luz UV a 254 nm con revelador, e) luz UV a 366 nm sin revelador y f) luz UV a 366 nm con revelador (NP).

5.3.9. Identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC

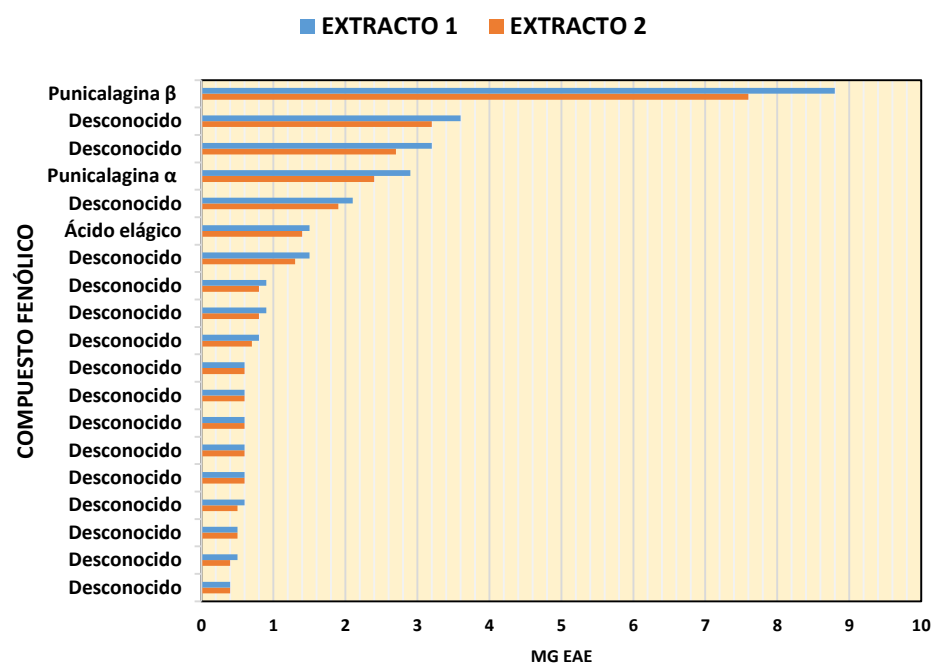


Figura 30. Comparación de compuestos fenólicos presentes en el extracto 1 y extracto 2.

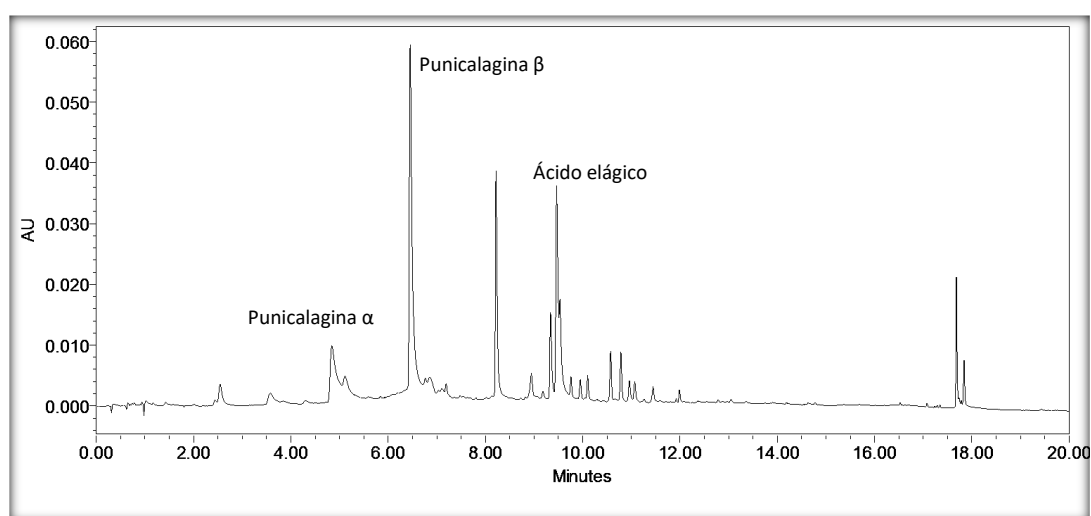


Figura 31. Cromatograma de los compuestos fenólicos más representativos del extracto de cáscara y membranas carpelares de la granada.

5.4. Discusión de los resultados

5.4.1 Extracciones de la Etapa I

La Etapa I se llevó a cabo con el fin de evaluar el rendimiento de extracción a través de diferentes proporciones de solvente CO₂/etanol, empleando tecnologías limpias (SFE y PLE), ya que en el caso de la extracción mediante SFE, la adición de pequeñas cantidades de cosolvente como el etanol mejora la polaridad del CO₂ en estado supercrítico, el cual es de naturaleza apolar (Mushtaq et al., 2015). Por ende, se pudo apreciar que el mayor rendimiento de extracción se obtuvo trabajando con 100% de solvente etanol mediante PLE, seguido de la proporción de 50/50, 90/10 y 100% CO₂. Esto confirma los estudios llevados a cabo por Paes et al. (2014), donde se hizo un estudio comparativo entre ambos procesos de extracción SFE y PLE, resultando éste último más conveniente para realizar la extracción de compuestos fenólicos de naturaleza polar. Por lo tanto, el uso del solvente etanol ayuda en el incremento del rendimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de los residuos de la granada por su afinidad química (Bustamante et al., 2017) y su uso es más conveniente por ser un solvente tipo GRAS.

Gracias a los experimentos realizados en la I etapa, donde se aplicaron dos de las tecnologías limpias, la tecnología con fluidos

supercríticos y la tecnología de extracción con líquidos presurizados considerando como variable de estudio independiente a la proporción de CO₂/Etanol (100% CO₂, 90/10, 50/50 y 100 % etanol) y como la variable respuesta el rendimiento de extracción trabajando a una temperatura y presión constante de 40°C y 200 bar, se pudo apreciar que la extracción con sólo etanol resultó en un mayor rendimiento, debido a su naturaleza polar que es más compatible con los biocompuestos que están en mayor proporción en los residuos de la granada (*P. granatum*), resultando en un rendimiento de 21,37% en base seca, el cual es cercano a los resultados de 23 % de rendimiento reportados por Yasoubi et al. (2007), quienes realizaron la extracción por maceración con etanol puro. Además, el rendimiento obtenido en el presente estudio empleando solo CO₂ y 10 % de cosolvente etanol mediante SFE (0,16-0,81%) fue algo menor a resultados reportados en un estudio anterior (0,4-1,3 %) (Bustamante et al., 2017) obtenidos a la misma presión (200 bar) y temperatura similar (40-50°C), lo cual puede deberse al diferente origen del fruto, procedimiento de preparación de la matriz vegetal y condiciones de trabajo (Huie, 2002).

5.4.2 Análisis de capa fina de los extractos obtenidos en la I etapa

5.4.2.1. Análisis de antocianinas

A. Metodología 1

Al observar la placa a detalle (Figura 19a.), se puede considerar que hay indicios de presencia de antocianinas en la muestra a la luz visible, que presenta el color característico en los extractos EE3 y EE4 comparado con el patrón de cianidina-3-glucósido, pero de mayor polaridad con un factor de retención (R_f) de 0,09. Aparte de ello, se puede apreciar la presencia de otro compuesto fenólico bien marcado siendo de color amarillo en luz visible y en luz UV a 366 nm de un color verde fosforescente (Figura 19b.) lo que según Wagner y Bladt (2001) serían flavonoides.

Además, con respecto a la fase móvil empleada que estuvo compuesta de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (68:7:7:18), cuyo índice de polaridad promedio es de 5,67 (Anexo 6) (Spangenberg et al., 2011) lo cual lo cataloga como una fase móvil de polaridad media alta, permitiendo una separación algo alongada de los compuestos los cuales fueron arrastrados por ser de naturaleza polar.

B. Metodología 2

Con respecto al análisis de los resultados obtenidos aplicando el método 2 para antocianinas (Wagner y Bladt, 2001), se puede notar en luz UV a longitud de onda larga de 366 nm (Figura 20b.), que ambos extractos de los experimentos 3 y 4 presentan una diversidad de compuestos sin identificar, sin embargo, no se observa claramente la presencia de antocianinas en luz visible (Figura 20a.), sólo se puede apreciar que en el extracto del experimento 4 hay algún compuesto de naturaleza polar que se aprecia de color marrón claro de Rf 0,15 aproximadamente.

En cuanto a la polaridad de la fase móvil preparada, la cual estuvo compuesta de butanol: ácido acético glacial: agua (50:10:20) se calculó tener un índice de polaridad de 4,59 (Anexo 6) (Spangenberg et al., 2011) considerándose ser un eluyente de polaridad intermedia lo cual fue positivo ya que en una visión panorámica se logró apreciar mejor la separación de los diversos compuestos presentes. Se recomendaría emplear puntos de comparación (patrones) porque el extracto presenta muchos componentes desconocidos. En adición, la desventaja que presentó este método fue el prolongado tiempo de elución que fue de aproximadamente 2,5 horas.

5.4.2.2. Análisis de flavonoides y compuestos fenólicos

A. Metodología 1

En el caso de los resultados obtenidos empleando el método 1 para flavonoides (Farías-Campomanes, 2012), se pudo observar que en el extracto obtenido solo con etanol (experimento 4) hubo presencia de flavonoides no identificados lográndose distinguir una franja bien marcada de color amarillo intenso a luz visible (Figura 21a.) y verde fosforescente en luz UV (366 nm) (Figura 21b.) de un compuesto “x” representativo en la muestra con un factor de retención de 0,83 que sería de polaridad medianamente baja. Al comparar con los resultados obtenidos por Farías-Campomanes (2012), se podría indicar que la franja de compuestos que permanecieron sobre la línea de inyección o partida serían flavonoides tales como quercetina y rutina. Asimismo, se logra apreciar, aunque no tan claramente en los puntos de inyección 3, 4 y 5 ciertos compuestos aglomerados los cuales serían de carácter polar, ya que el índice de polaridad calculado de la fase móvil empleada (acetato de etila: cloroformo; 91:9) sería de 4,37 (Anexo 6) (Spangenberg et al., 2011) denominándose de una polaridad media baja, la cual no permite una perceptible separación de los compuestos presentes en la cáscara y membranas carpelares de la granada que son de naturaleza mayoritariamente polar (Waksmundzka-Hajnos et al., 2008).

Al comparar el extracto obtenido sólo con etanol (experimento 4) con el extracto obtenido con 50 % de etanol (experimento 3), se pudo observar que ambos extractos presentan ciertos flavonoides en diferente concentración y de diferente polaridad, ya que en el extracto del experimento 4 (A1, A2) el eluyente de polaridad medianamente baja (4,37) (Anexo 6) arrastró un compuesto de semejante polaridad mostrándose de color verde amarillento fluorescente en luz UV a $\lambda = 366 \text{ nm}$ (Figura 22b) hasta un factor de retención de 0,8; sin embargo, en el extracto del experimento 3 (B1, B2) se apreció que sus componentes son más polares que del experimento 4, ya que los compuestos estuvieron más cerca de la línea de partida y se mostraron con mayor intensidad.

Al comparar ambos extractos con el patrón de ácido elágico diluido en metanol, se observó que no presentan dicho compuesto, no obstante, también puede deberse a que la concentración del ácido elágico inyectado fue un poco baja por lo cual no se pudo apreciar en la placa de sílica gel.

B. Metodología 2

Según los resultados obtenidos empleando la metodología 2 para compuestos fenólicos (Albuquerque et al., 2015), se pudo apreciar (Figura 23) que la fase móvil preparada no logró separar eficazmente los compuestos presentes en los extractos de ambos experimentos, eso debido posiblemente a que dicho eluyente de índice de polaridad calculado de 1,05 (Anexo 6) (Spangenberg et al., 2011) es de polaridad baja y no pudo transportar con facilidad los compuestos ya que son de naturaleza más polar debido a que permanecieron muy cerca al punto de inyección lo cual significa que fueron adsorbidos por el gel de sílica (fase estacionaria), la cual es de naturaleza polar.

Al comparar los extractos con los patrones de ácido elágico y quercetina, tampoco se podría considerar que hay presencia de ellos por la aglomeración de los compuestos cerca de la línea de partida (Figura 23). Se recomendaría emplear una fase móvil más polar dada la naturaleza de los compuestos presentes en dichos extractos.

5.4.3 Rendimiento de extracción de la II etapa

El tratamiento nueve ($T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $P=80\text{ bar}$) del arreglo factorial 2×5 presentó el más alto rendimiento de extracción ($X_0= 44,99\%$), el cual fue superior a los obtenidos en otros estudios que utilizaron tecnologías de extracción limpias y convencionales (Alexandre et al., 2017; Sharayei et al., 2019). Asimismo, este rendimiento de extracción obtenido en el presente estudio fue similar a los reportados por Çam y Hisil (2010) con $43,3\%$ quienes realizaron la extracción con agua presurizada como solvente de extracción y trabajaron a una temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y presión de $103,5\text{ bar}$. Sin embargo, algunas investigaciones mostraron rendimientos de extracción superiores a los determinados en el presente estudio (Machado et al., 2019). Estas diferencias podrían estar asociadas partiendo del diferente método de extracción aplicado, la variedad y el origen de la granada, el tipo de solvente de extracción y las condiciones de operación. En la Tabla 14 se muestra un cuadro comparativo de algunos estudios desarrollados sobre extracción de compuestos fenólicos a partir de los residuos de la granada (cáscaras principalmente) empleando diversas tecnologías de extracción limpias y convencionales.

Comparando con métodos convencionales de extracción empleando etanol (Wang et al., 2011), el promedio del rendimiento de extracción

mediante líquidos presurizados obtenido en el presente estudio resultó significativamente mayor (33,52 % >17,71 %) a partir de cáscara de granada variedad Wonderful. Además, comparando el tiempo de extracción empleado por cada tratamiento entre ambos métodos de extracción, mediante PLE se extrajo en menor tiempo (86 min < 240 min).

Tabla 14

Extracción de compuestos fenólicos a partir de los residuos de la granada empleando diversas tecnologías de extracción limpias y convencionales

Método de extracción	Variedad (Origen)	Solvente de extracción	Condiciones de operación	Rendimiento de extracción (%)	Referencia bibliográfica
Extracción a alta presión (HPE)	(Portugal)	36 % etanol	P= 3820 bar Θ=30 min.	24,9-31,3%	(Alexandre et al., 2017)
Extracción asistida con ultrasonido (UAE)	Malas (Isfahan, Irán)	70 % etanol	-	26,8-41,6%	(Kazemi et al., 2016)
	Sishekape-Ferdos	Agua	-	13,1 %	(Sharayei et al., 2019)
	Mollar (SP, Brasil)	70 % etanol	-	55,71-59,02%	(Machado et al., 2019)
Extracción con líquidos presurizados (PLE)	(Turquía)	Agua	T= 40°C P=103,5 bar	43,3± 2,7 %	(Çam y Hişil, 2010)
Extracción con fluidos supercríticos (SFE)	Wonderful (Elqui, Chile)	scCO ₂ :ethanol (80:20)	T=40-50°C P=200-300 bar	0,2-8,5 %	(Bustamante et al., 2017)
Extracción convencional	Wonderful (California, USA)	Etanol	T=40°C P=1,01 bar S/F=15 Θ=240 min	17,71 %	(Wang et al., 2011)

T=Temperatura, P=Presión, Θ=Tiempo, S/F=Solvente/materia prima

Fuente: Elaboración propia (2020)

5.4.3.1. Efecto de la presión

Según los resultados obtenidos y el análisis de varianza, el efecto de la presión fue significativa sobre el rendimiento de extracción global ($p < 0,05$). Sin embargo, los resultados muestran que no es directamente proporcional, ya que, a una presión de 100 bar, el rendimiento de extracción decrece trabajando a una temperatura de 60 °C. Con respecto a las presiones de 60 y 100 bar a una T° de 60 °C, resultaron con promedios de rendimientos de extracción relativamente cercanos (35,36 y 36,06 % respectivamente), siendo no significativamente diferentes, según prueba de Tukey. Mientras que las medias del rendimiento de extracción de las presiones de 80 y 40 bar, sí fueron significativamente diferentes que la media de la presión de 20 bar ($p < 0,05$), lo cual difirió de los resultados del estudio llevado a cabo por Alcázar-Alay et al. (2014). Esto se pudo deber a la diferente naturaleza química y estabilidad del compuesto bioactivo a extraer.

Según la literatura, altas presiones también son asociadas con altos rendimientos de extracción; sin embargo, no siempre este incremento es lineal, ya que el paso del solvente a través del lecho de extracción puede ser afectado por una compactación promovida debido al uso de elevada presión (Kronholm et al., 2007).

5.4.3.2. Efecto de la temperatura

Según los resultados obtenidos y el análisis de varianza, se determinó que la temperatura tiene una influencia significativa sobre el rendimiento de extracción global ($p < 0,05$). La temperatura fue directamente proporcional al rendimiento de extracción, eso quiere decir que mientras más alta sea la temperatura, habrá un mayor rendimiento de extracción (Machado et al., 2015).

Según la literatura, las altas temperaturas permiten que el poder de solvatación del solvente se incremente y provoquen la ruptura de las interacciones presentes entre la muestra matriz y el analito (causadas por fuerzas de Van Der Waals, puentes de hidrógeno, y atracciones dipolo-dipolo). Asimismo, el incremento de la temperatura ayuda a superar las interacciones cohesivas y adhesivas por la disminución de la energía de activación la cual es requerida para el proceso de desorción. En adición, las temperaturas elevadas decrecen la tensión superficial (solvente, soluto y matriz) lo cual mejora la humectación de la muestra y permite que los analitos se disuelvan más rápidamente en el solvente. Al mismo tiempo, el incremento de la temperatura disminuye la viscosidad del solvente, por lo tanto, mejora la penetración del solvente dentro de la matriz. Asimismo, mejora la tasa de difusión, en otras palabras, la transferencia de masa de

la molécula de interés en el solvente (Alvarez-Rivera et al., 2019; Mustafa y Turner, 2011).

5.4.4 Análisis de compuestos fenólicos de la etapa II

5.4.3.1. Cromatografía de capa fina (TLC)

Al observar la placa a detalle (Figura 29a, 29b), se pudo considerar que hay indicios de presencia de ácido elágico en la muestra a la luz visible, que presentó un color gris claro en los extractos E1 y E2 comparado con el patrón de ácido elágico ya que se presentaron al mismo nivel con un factor de retención (R_f) de 0,83, lo cual significó que dicho ácido fenólico fue de polaridad media baja ya que fue arrastrado por una fase móvil (acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua, 68:7:7:18, v/v/v/v) cuyo índice de polaridad promedio es de 5,67 (Spangenberg et al., 2011) la cual la cataloga como un eluyente de polaridad media. Asimismo, en luz visible, se pudo apreciar la presencia de otros compuestos obtenidos de diferentes grados de polaridad y color, los cuales fueron eluidos entre un factor de retención de 0,09 y 0,83.

Al observar la placa en luz UV de longitud de onda corta (254 nm) sin revelador (Figura 29c), se logró visualizar de mejor manera la presencia de otros compuestos por la separación de las bandas que no eran apreciadas

en luz visible. No obstante, aplicando el revelador, los compuestos mostrados se apreciaron borrosos.

En cuanto a la visualización de la placa en luz UV a una longitud de onda larga (366 nm) empleando el revelador NP (Figura 29f), se observó la presencia de 7 bandas, de diferente grado de polaridad y coloración, lo cual demuestra que existe una diversidad de compuestos fenólicos presentes en los residuos de la granada.

5.4.3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Luego de analizar cromatográficamente los dos extractos de cáscara y membranas carpelares de granada con mayor rendimiento de extracción global mediante HPLC-DAD (Figura 31), se identificó un total de 19 biocompuestos, de los cuales se hallaron 7 compuestos en cantidades importantes presentes en los residuos de la granada (*P. granatum*), logrando ser identificados y cuantificados 3 de ellos al ser comparados con la literatura (Calín-Sánchez et al., 2013; Çam y Hisil, 2010; Qu et al., 2012). Sin embargo, se llegaron a encontrar aproximadamente hasta 79 compuestos bioactivos presentes en la granada en un estudio anterior empleando otras técnicas espectroscópicas (Ambigaipalan et al., 2016).

Según el gráfico mostrado (Figura 30), el compuesto en mayor cantidad fue la punicalagina β (6,4 min), seguido de dos compuestos desconocidos. En seguida, el otro compuesto en cantidad importante fue la punicalagina α (4,8 min), seguido de otro compuesto desconocido, y luego se observó la presencia del ácido elágico (9,3 min) seguido de otro compuesto no identificado en similar cantidad. Los demás compuestos no identificados serían derivados de las punicalaginas y ácidos fenólicos presentes (Fischer et al., 2011).

Comparando el extracto 1 (E1) con el extracto 2 (E2), se observó que presentan los mismos compuestos fenólicos; sin embargo, el E1 presentó una cantidad significativamente mayor de punicalagina α , β y ácido elágico ($48,22 \pm 2,05$, $146,58 \pm 11,20$ y $25,57 \pm 0,27$ mg/100 g de muestra en b.s., respectivamente) en comparación con el E2 ($40,41 \pm 1,56$, $125,72 \pm 3,65$ y $22,74 \pm 0,30$ mg/100 g de muestra en b.s.). Por lo tanto, no necesariamente el extracto con mayor rendimiento de extracción en este caso el E2, puede contener la mayor cantidad de los compuestos de interés, ya que al haber sido sometido a una mayor presión posiblemente haya podido provocar la degradación en cierta proporción de los compuestos de interés o la ruptura de la estructura de estos compuestos (Farías-Campomanes et al., 2013). Por lo tanto, se recomendaría trabajar a una presión de 40 bar no solamente

porque se encontraron en mayor cantidad los compuestos fenólicos deseables, sino que también permite un ahorro de energía que se entrega al proceso, en consecuencia, ahorro de costos de producción, siendo el proceso de extracción más atractivo comercialmente, si se desearía aplicar como aditivo antioxidante o antimicrobiano a nivel o escala industrial en la industria alimentaria.

Asimismo, hay estudios realizados anteriormente sobre la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos de los residuos de la granada como el realizado por Qu et al. (2012) quienes encontraron 200, 216 y 491 mg/100 g de punicalagina α , punicalagina β y ácido elágico respectivamente, las cuales son cantidades superiores a las determinadas en el presente estudio. En adición, otro estudio de identificación el cual empleó análisis HPLC-DAD-ESI/MS, encontró en su cáscara 1054 mg/100 g de punicalaginas y 64 mg/100 g de ácido elágico (Fischer et al., 2011). El motivo por el cual la cantidad de compuestos de interés es mayor en estos estudios mencionados puede deberse a la diferencia en la variedad de granada estudiada, procedimientos de preparación de la materia prima y tipo de solvente de extracción empleado (Ambigaipalan et al., 2016).

El mayor contenido de las punicalaginas ($\alpha+\beta$) y ácido elágico obtenidos en el presente estudio resultaron 194,80 mg/100 g y $25,57\pm 0,27$ mg/100 g, respectivamente. Estos valores resultaron menores que los reportados por otros autores (Calín-Sánchez et al., 2013; Fischer et al., 2011). Esta diferencia podría deberse al proceso de secado que se llevó a cabo previo a la extracción, en la preparación de la matriz vegetal, ya que en el presente estudio se realizó un secado en bandejas mediante aire caliente, en cambio estos autores citados realizaron un secado de los residuos de la granada mediante el proceso de liofilización la cual preserva en mejor estado los compuestos bioactivos termolábiles, ya que causan mínimos daños a sus estructuras permitiendo el desarrollo de cristales de hielo dentro de la matriz, lo cuales pueden producir rupturas más grandes dentro de la estructura celular de la matriz, lo cual posiblemente mejore el acceso del solvente y la extracción en sí (Al-Rawahi et al., 2013).

Asimismo, el diferente método de extracción empleado ha podido influir en la cantidad de compuestos fenólicos de interés obtenida, ya que últimamente se vienen combinando métodos de extracción considerados tecnologías limpias para mejorar su eficacia (Santos et al., 2019; Sumere et al., 2018).

Las punicalaginas y el ácido elágico son biocompuestos que debido a sus propiedades ya comprobadas se hacen de gran interés para la industria de los alimentos pudiendo ser aplicados como ingredientes naturales con capacidad antioxidante, conservante y funcional.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un mayor rendimiento global de compuestos fenólicos a partir de la cáscara y membranas carpelares de la granada (*Punica granatum*) variedad Wonderful aplicando la extracción con líquidos presurizados (PLE), donde se empleó como solvente de extracción etanol puro.
2. Se determinó que la influencia de la temperatura, la presión de proceso y su interacción de ambos factores fue significativa sobre el rendimiento de extracción global de compuestos fenólicos ($p < 0,05$), donde el nivel más significativo del factor temperatura fue de 60 °C y los niveles de presión más significativos fueron de 80 y 40 bar ($p < 0,05$), dando como resultado un rendimiento de extracción global de 44,99% y 37,28%, respectivamente, que representan a los tratamientos 7 y 9.
3. Se logró identificar y cuantificar los compuestos de interés presentes en el residuo de la granada (cáscara y membranas carpelares) de los dos tratamientos que obtuvieron mayor rendimiento de extracción, donde el extracto 1 (tratamiento 7) presentó un mayor contenido de punicalaginas α , β y ácido elágico ($48,22 \pm 2,05$, $146,58 \pm 11,20$ y $25,57 \pm 0,27$ mg/100 g de muestra en b.s., respectivamente) en comparación con el extracto 2 (tratamiento 9) ($40,41 \pm 1,56$, $125,72 \pm 3,65$ y $22,74 \pm 0,30$ mg/100 g de muestra en b.s.).

RECOMENDACIONES

1. Se sugiere realizar el secado de los residuos de la granada mediante liofilización o microondas ya que estos métodos preservan mejor los compuestos bioactivos según el estado del arte.
2. Se recomienda realizar el proceso de extracción evaluando otras variables, como el caudal de flujo del solvente, el tipo de solvente pudiendo ser agua o una mezcla hidroalcohólica, así como el tiempo de contacto entre el solvente y la matriz vegetal.
3. Se recomienda extraer compuestos bioactivos de otros residuos agroindustriales de cultivos representativos de nuestra región como del orujo de las aceitunas, los residuos del orégano (palillos), de las cáscaras y semillas de frutas y hortalizas (zapallo de carga y ají) aplicando tecnologías limpias considerando los compuestos de interés a extraer.
4. Se sugiere realizar el análisis cromatográfico TLC empleando patrones estándar de los compuestos de interés para realizar su identificación.
5. Se sugiere determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abid, M., Yaich, H., Cheikhrouhou, S., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2017). Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC–MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *Journal of Food Science and Technology*, 2890-2901.
- Aguilera, M., Reza, M. d., Chew, R., & Meza, J. (2011). Propiedades Funcionales de las Antocianinas. *Biotecnia*, 16-22.
- Alcázar-Alay, S. C., Osorio-Tobón, J. F., Forster-Carneiro, T., & Meireles, M. A. (2017). Obtaining bixin from semi-defatted annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation. *Food Research International Journal*, 393-402.
- Albuquerque, C. L., Santana, Á. L., & Meireles, M. A. (2015). Thin Layer Chromatographic Analysis of Annatto Extracts Obtained Using Supercritical Fluid. *Food and Public Health*, 127-137.
- Alexandre, E. M. C., Araújo, P., Duarte, M. F., de Freitas, V., Pintado, M., & Saraiva, J. A. (2017). Experimental Design, Modeling, and Optimization of High-Pressure-Assisted Extraction of Bioactive

Compounds from Pomegranate Peel. Food and Bioprocess Technology. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1867-6>

Alonso-Salces, R., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L., Gallo, B., & Vicente, F. (2001). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of Chromatography A*, 37-43.

Al-Rawahi, A. S., Rahman, M. S., Guizani, N., & Essa, M. M. (2013). Chemical Composition, Water Sorption Isotherm, and Phenolic Contents in Fresh and Dried Pomegranate Peels. *Drying Technology: An International Journal*, 257-263.

Alvarez-Rivera, G., Bueno, M., Ballesteros-Vivas, D., Mendiola, J. A., & Ibañez, E. (2019). Pressurized liquid extraction. In *Liquid-Phase Extraction*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X>

Ambigaipalan, P., De Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2016). Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02950>

Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>

Azmir, J., Zaidul, I. S., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., & Omar, A. K. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 426-436.

Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., & Kumar, M. (2006). Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 206-210.

Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., ... Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>

Brunner, G. (2013). Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes (Vol. 4). Springer Science & Business Media.

Bustamante, A., Hinojosa, A., Robert, P., & Escalona, V. (2017). Extraction and microencapsulation of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* var. Wonderful) residues. *International Journal of Food Science and Technology*, 1-11.

Calín Sánchez, Á., & Carbonell Barrachina, Á. A. (2012). *La Granada y sus Productos Derivados*. Editorial Académica Española.

Calín-Sánchez, Á., Figiel, A., Hernández, F., Melgarejo, P., Lech, K., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2013). Chemical Composition, Antioxidant Capacity, and Sensory Quality of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Arils and Rind as Affected by Drying Method. *Food and Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0790-0>

Calzada, J. (1970). *Métodos estadísticos para la investigación*. Editorial Jurídica.

Çam, M., & Hisil, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peel. *Food chemistry*, 878-885.

Cardenas-Toro, F. P., Alcázar-Alay, S. C., Coutinho, J. P., Teixeira Godoy, H., Forster-Carneiro, T., & Meireles, M. A. (2015). Pressurized liquid extraction and low-pressure solvent extraction of carotenoids from pressed palm fiber: Experimental and economical evaluation. *Food and Bioproducts Processing*, 90-100.

Cavalcanti, R. (2013). *Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (Myrciaria cauliflora) utilizando líquido pressurizado e fluido*

supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática. Tesis de Doctorado. Campinas, Brasil.

Cha, K. H., Kang, S. W., Kim, C. Y., Um, B. H., Na, Y. R., & Pan, C. H. (2010). Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf100062m>

Conde L., Guerrero J. (2009) Extracción supercrítica de antioxidantes naturales a partir de hierbas y especias. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 3 – 1: 96 – 110.

Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2010). *Química de alimentos de Fennema*. Porto Alegre: Artmed.

Erdogan, S., Ates, B., Durmaz, G., Yilmaz, I., & Seckin, T. (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology*, 1592-1597.

Farías-Campomanes, A. (2012). Recuperação de compostos bioativos via extração supercrítica e convencional dos resíduos de uva provenientes de processamento do pisco. *Tesis de Maestría*. São Paulo, Brasil: UNICAMP.

- Farías-Campomanes, A., Rostagno, M., & Meireles, M. A. (2013). Production of polyphenol extracts of the grape bagasse using supercritical fluids: yield, extract composition and economic evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 70-78.
- Farías-Campomanes, A., Horita, C. N., Pollonio, M. A., & Meireles, M. A. (2014). Allicin-Rich Extract Obtained from Garlic by Pressurized Liquid Extraction: Quantitative Determination of Allicin in Garlic Samples. *Food and Public Health*, 272-278.
- Farías-Campomanes, A. (2016). Extração com fluidos pressurizados de compostos bioativos : polifenóis e tiosulfinaos. *Tesis de Doctorado*. São Paulo, Brasil: UNICAMP.
- Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification -henolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) mesocarp, arils, differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, 807-821.
- García, A. V. (1995). Extracción con fluidos supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas. En A. Valverde García, & A. R. Fernández-Alba, *Residuos de plaguicidas* (págs. 141-154). Instituto de Estudios Almerienses.

- García-Viguera, C., & Pérez, A. (2004). La granada: alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. *Alimentación, Nutrición y salud*, 113-120.
- García-Villalba, R., Espín, J. C., Kroon, P. A., Alasalvar, C., Aaby, K., Heinonen, M., . . . Tomas-Barberan, F. (2015). A validated method for the characterization and quantification of extractable and non-extractable ellagitannins after acid hydrolysis in pomegranate fruits, juices, and extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6555-6566.
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf000404a>
- Hassas-Roudsari, M., Chang, P., Pegg, R., & Tyler, R. (2009). Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. . *Food Chemistry*, 717–726.
- He, J.-Z., Shao, P., Liu, J.-H., & Ru, Q.-M. (2012). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Flavonoids from Pomelo (*Citrus grandis* (L.)

Osbeck) Peel and Their Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Science*, 13065-13078.

Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1265-3>

Kazemi, M., Karim, R., Mirhosseini, H., & Abdul Hamid, A. (2016). Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.017>

Knez, M., Cör*, D., Tancer, M., & Knez, Ž. (2018). Application of supercritical and subcritical fluids in food processing. *Food Quality and Safety*, 59-67.

Kronholm, J., Hartonen, K., & Riekkola, M.-L. (2007). Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. . *Trends in Analytical Chemistry*, 396-412.

Jain, A., Panchal, S., Sharma, S., & Ameta, R. (2013). Supercritical fluids. In *Green Chemistry: Fundamentals and Applications*.

<https://doi.org/10.1201/b15500>

Lajolo, F. M., & Mercadante, A. Z. (2018). *Química e Bioquímica dos Alimentos*. Rio de Janeiro: Atheneu.

Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>

Lansky, E. P., & Newman, R. A. (2007). Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.006>

Laroze, L., Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Zúñiga, M. E., & Domínguez, H. (2010). Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *European Food Research and Technology*, 669-677.

Lu, J., Ding, K., & Yuan, Q. (2008). Determination of Punicalagin Isomers in Pomegranate Husk. *Chromatographia*, 303-306.

Machado, A. P. D. F., Pasquel-Reátegui, J. L., Fernández Barbero, G., & Martínez, J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive

compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, 675-683.

Machado, A. P. D. F., Sumere, B. R., Mekaru, C., Martinez, J., Bezerra, R. M. N., & Rostagno, M. A. (2019). Extraction of polyphenols and antioxidants from pomegranate peel using ultrasound: influence of temperature, frequency and operation mode. *International Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14194>

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 271-278.

Martínez-Navarrete, N., Camacho Vidal, M. d., & Martínez Lahuerta, J. J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 64-68.

Maul, A. A., Wasicky, R., & Bacchi, E. M. (1996). Extração por fluido supercrítico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 185-200.

Meireles, M. (2009). *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: theory and applications*. Florida, USA: CRC Press Taylor & Francis group.

MINAGRI. (14 de Noviembre de 2012). Reglamento de Manejo de los Residuos Sólidos del Sector Agrario. Decreto Supremo N° 016-2012-AG. Lima, Perú: El Peruano.

MINAGRI. (Marzo de 2019). www.minagri.gob.pe. Obtenido de www.minagri.gob.pe/portal/analisis.../analisis-2019?...informe-tecnico-de-la-granada

Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Adnan, A., & Rizvi, S. S. H. (2015). Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.05.020>

Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized Liquid Extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analítica Chimica Acta*, 8-18.

Mustafa, A., Trevino, L. M., & Turner, C. (2012). Pressurized hot ethanol extraction of carotenoids from carrot by-products. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules17021809>

Nuncio-Jáuregui, N., Nowicka, P., Munera-Picazo, S., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á. A., & Wojdyło, A. (2018). Identification and quantification of major derivatives of ellagic acid and antioxidant

properties of thinning and ripe Spanish pomegranates. *Journal of Functional Foods*, 354-364.

Paes, J., Dotta, R., Barbero, G., & Martínez, J. (2014). Extraction of Phenolic Compounds and anthocyanins from Blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. *Journal of Supercritical Fluids*, 8-16.

Pereira, D. T., Tarone, A. G., Cazarin, C. B., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2019). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. *Journal of Food Engineering*, 105-113.

Pereira, R. G., Garcia, V. L., Nova Rodrigues, M. V., & Martínez, J. (2016). Extraction of lignans from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn using pressurized liquids and low pressure methods. *Separation and Purification Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.12.007>

Qu, W., Pan, Z., & Ma, H. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.020>

- Reglero, G., Senoráns, F. J., & Ibáñez, E. (2005). Supercritical fluid extraction: an alternative to isolating natural food preservatives. GV Barbosa-Canovas et al., 539-553.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., & Porter, N. L. (1996). Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 1033-1039.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x>
- Román, M. A., Rivera Narváez, C. M., Cardona Bermúdez, L. M., María Muñoz, L., David Gómez, D., Passaro Carvalho, C., & Quiceno Rico, J. M. (2016). Guía de Extracción por Fluidos Supercríticos: Fundamentos y Aplicaciones. Antioquía, España.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2004). Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta*, 169-177.
- Rudke, A. R., Mazzutti, S., Andrade, K. S., Vitali, L., & Ferreira, S. R. S.

- (2019). Optimization of green PLE method applied for the recovery of antioxidant compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.) shell. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125061>
- Russo, M., Fanali, C., Tripodo, G., Dugo, P., Muleo, R., Dugo, L., & De Gara, L. (2018). Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant activity: application to different Italian varieties. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 3507-3520.
- Santos, D. T., Albuquerque, C. L., & Meireles, M. A. (2011). Antioxidant dye and pigment extraction using a homemade pressurized solvent extraction system. *Procedia Food Science* , 1581-1588.
- Santos, D.T., Veggi, P. C., & Meireles, M. A (2012). Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. *Journal of Food Engineering*, 444-452.
- Santos, M. P., Souza, M. C., Sumere, B. R., Da Silva, L. C., Cunha, D. T., Bezerra, R. M., & Rostagno, M. A. (2019). Extraction of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.) with pressurized liquids assisted by ultrasound combined with an expansion gas. *Ultrasonics Sonochemistry*.

- Santos, S., Villaverde, J., Silva, C., Neto, C., & Silvestre, A. (2012). Supercritical Fluid Extraction of phenolic compounds of *Eucalyptus globulus* Labill bark. *The Journal of Supercritical Fluids*, 71-79.
- Seeram, N., Lee, R., & Heber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta*, 63-68.
- Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Palma, M., & Barroso, C. G. (2016). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from rice (*Oryza sativa*) grains. *Food Chemistry*, 452-459.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung - Food*. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20000501\)44:3<158::AID-FOOD158>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20000501)44:3<158::AID-FOOD158>3.0.CO;2-L)
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., & Ramaswamy, H. S. (2019). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT*, 101, 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.031>

- Singh, P. P., & Saldaña, M. D. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International*, 2452–2458.
- Smith, R. E. (2014). *Pomegranate: botany, postharvest treatment, biochemical composition and health effects*. New York: Nova Science Publishers.
- Spangenberg, B., Poole, C. F., & Weins. (2011). *Quantitative Thin Layer Chromatography: A practical survey*. Heidelberg: Springer.
- Sumere, B., Corrêa, M., Pacífico, M., Neves, R., Thimoteo, D., Martinez, J., & Rostagno, M. (2018). Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.). *Ultrasonics-Sonochemistry*, 151-162.
- Tuberoso, C. I. G., & Orrù, C. D. (2008). Phenolic compounds in food. In *Progress in Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/bk-1992-0507.ch001>
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-66.

Velásquez, Á. M. (2008). La tecnología de fluidos supercríticos, un proceso limpio para el sector industrial. *Producción Más Limpia. Producción + Limpia*, 3(2), 98-104.

Venkitasamy, C., Zhao, L., Zhang, R., & Pan, Z. (2019). Pomegranate. In *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814138-0.00008-3>

Viganó, J., Aguiar, A. C., Moraes, D. R., Jara, J. L., Eberlin, M. N., Cazarin, C. B., . . . Martínez, J. (2016). Sequential high pressure extractions applied to recover piceatannol and scirpusin B from passion fruit bagasse. *Food Research International*, 51-58.

Viganó, J., Brumer, I. Z., de Campos Braga, P. A., da Silva, J. K., Maróstica, M. R., Reyes Reyes, F. G., & Martínez, J. (2016). Pressurized liquids extraction as an alternative process to readily obtain bioactive compounds from passion fruit rinds. *Food and Bioproducts Processing*.

Wagner, H., & Bladt, S. (2001). *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. New York: Springer.

Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., & Kowalska, T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phitochemistry*. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group.

Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., & Atungulu, G. G. (2011). Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. *The Open Food Science Journal*.
<https://doi.org/10.2174/1874256401105010017>

Yasoubi, P., Barzegar, M., Sahari, M. A. & Azizi, M. H. (2007). Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel Extracts. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 35-42.

Yu, J., Dandekar, D. V., Toledo, R. T., Singh, R. K., & Patil, B. S. (2006). Supercritical Fluid Extraction of Limonoid Glucosides from Grapefruit Molasses . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6041–6045.

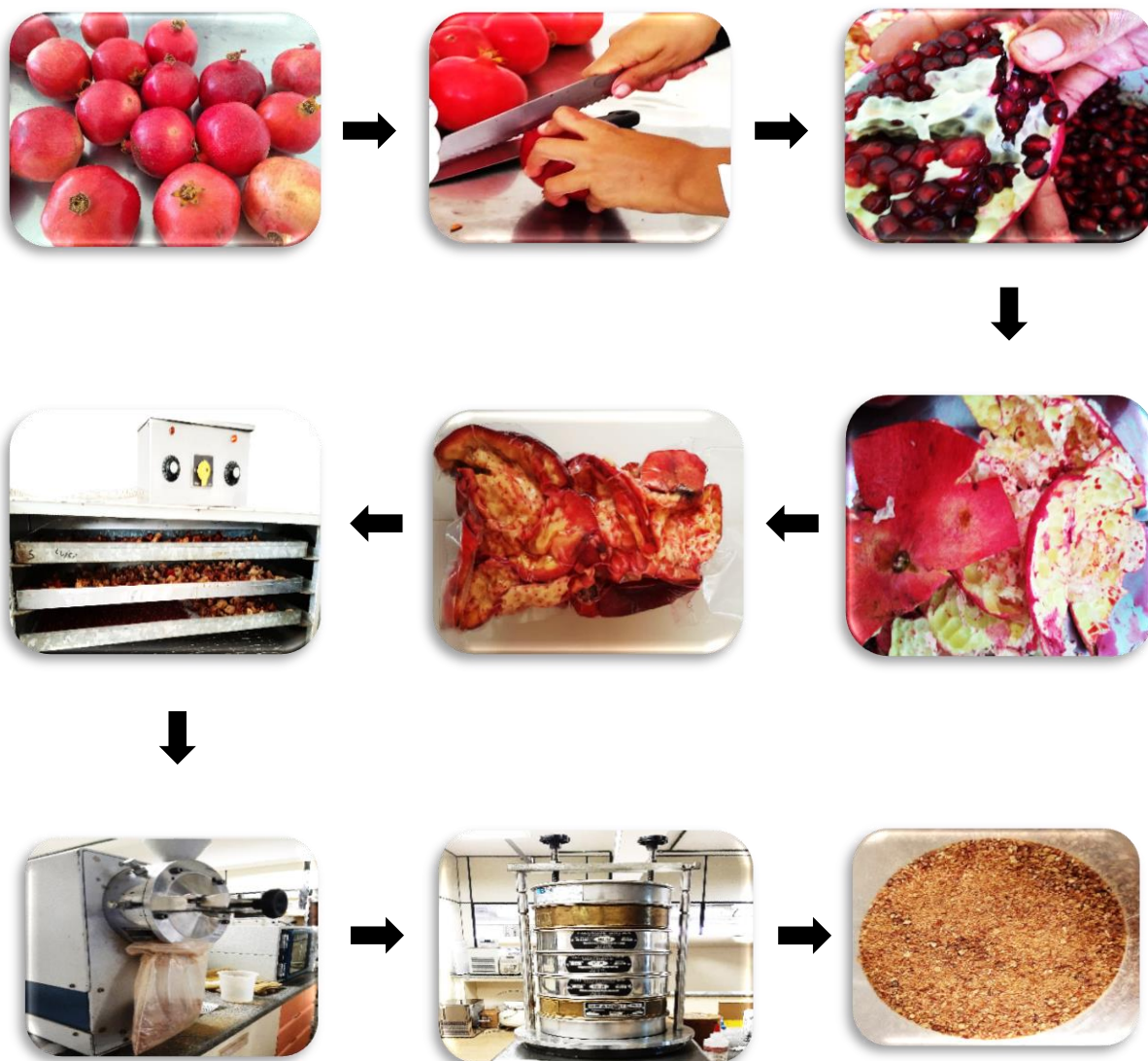
ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia

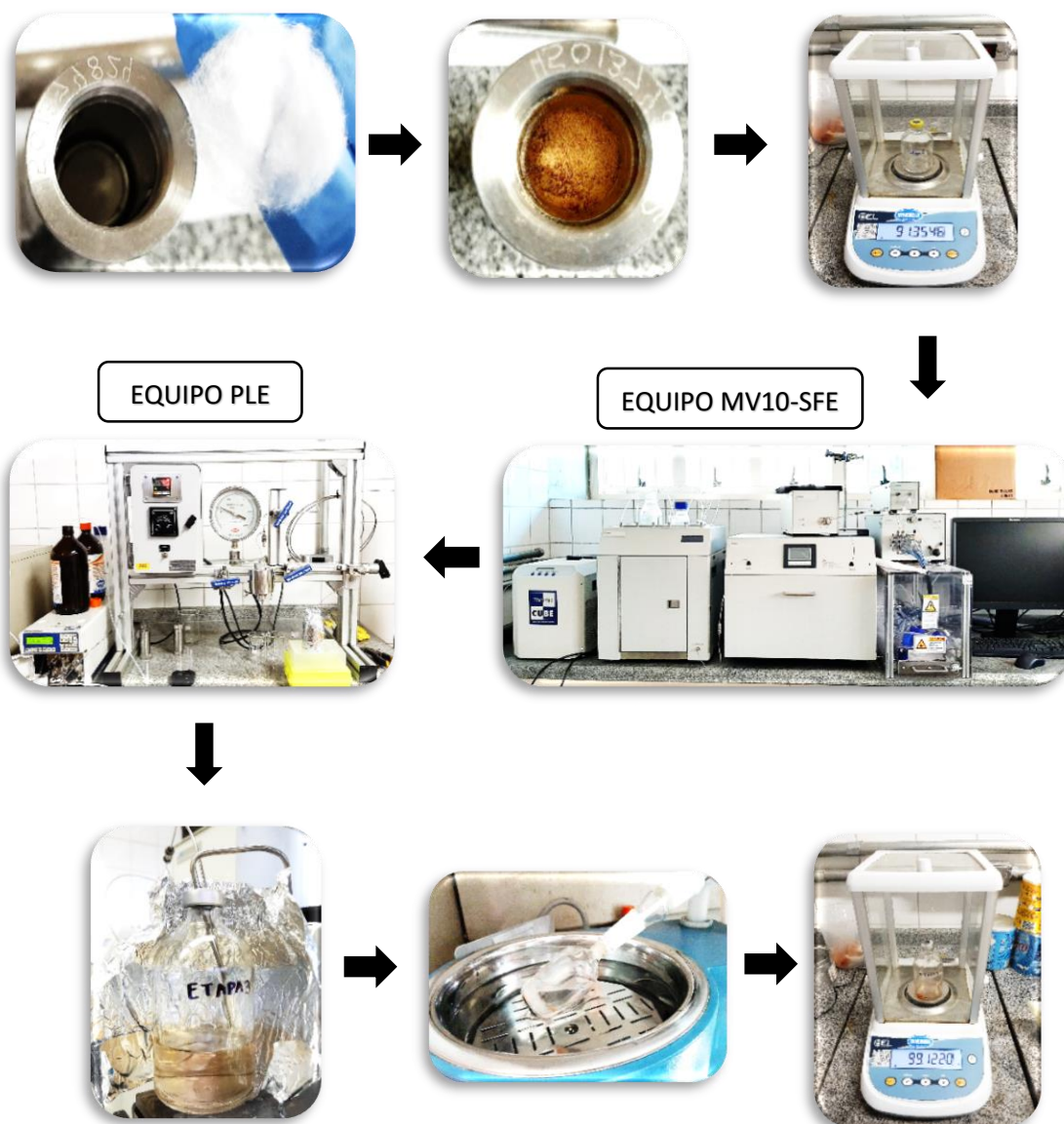
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLES
¿Cuáles serán las condiciones de operación que favorezcan el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos a partir de la cáscara y membranas carpelares de la granada (<i>P. granatum</i>) variedad Wonderful de Ite - Tacna aplicando la tecnología con fluidos supercríticos y líquidos presurizados?	Obtener el mayor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de la cáscara y membranas carpelares de la granada (<i>P. granatum</i>) variedad Wonderful de Ite - Tacna aplicando la tecnología con fluidos supercríticos y líquidos presurizados.	El rendimiento de extracción de compuestos fenólicos presentes en la cáscara y membranas carpelares de la granada (<i>P. granatum</i>) de Ite-Tacna es influenciado por las condiciones de operación de la tecnología con fluidos supercríticos y líquidos presurizados.	INDEPENDIENTES A. Proporción de solvente CO₂ y/o etanol (100% CO₂, 90/10, 50/50, 100% etanol). B. Temperatura de proceso (40 y 60 °C). C. Presión de proceso (20,40,60,80 y 100 bar). DEPENDIENTES A. Rendimiento de extracción global (X_0) (%). B. Contenido de punicalaginas (mg/100 g). C. Contenido de ácido elágico (mg/100 g).
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	
¿Cuál será la proporción de solvente CO ₂ y/o etanol que favorezca el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada aplicando la extracción con fluidos supercríticos y líquidos presurizados?	Determinar la proporción de solvente CO ₂ y/o etanol que favorezca el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada aplicando extracción con fluidos supercríticos y líquidos presurizados.	La proporción de solvente CO ₂ y/o etanol influye en el rendimiento de extracción global de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada aplicando la extracción con fluidos supercríticos y líquidos presurizados.	
¿Cuál será la temperatura y presión de proceso que favorezca el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada asistida por líquidos presurizados?	Determinar la temperatura y presión de proceso que favorezca el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada asistida por líquidos presurizados.	La temperatura y presión de proceso a ciertas condiciones permite obtener los mejores rendimientos de extracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo sólido de la granada asistida por líquidos presurizados.	
¿Cuál será la concentración de punicalaginas y ácido elágico presentes en los extractos del residuo sólido de la granada obtenidos mediante líquidos presurizados?	Identificar y cuantificar el contenido de punicalaginas y ácido elágico presentes en los extractos del residuo sólido de la granada obtenidos mediante líquidos presurizados.	Es factible cuantificar el contenido de punicalaginas y ácido elágico presentes en los extractos del residuo sólido de la granada obtenidos mediante líquidos presurizados.	

Fuente: Elaboración propia (2019)

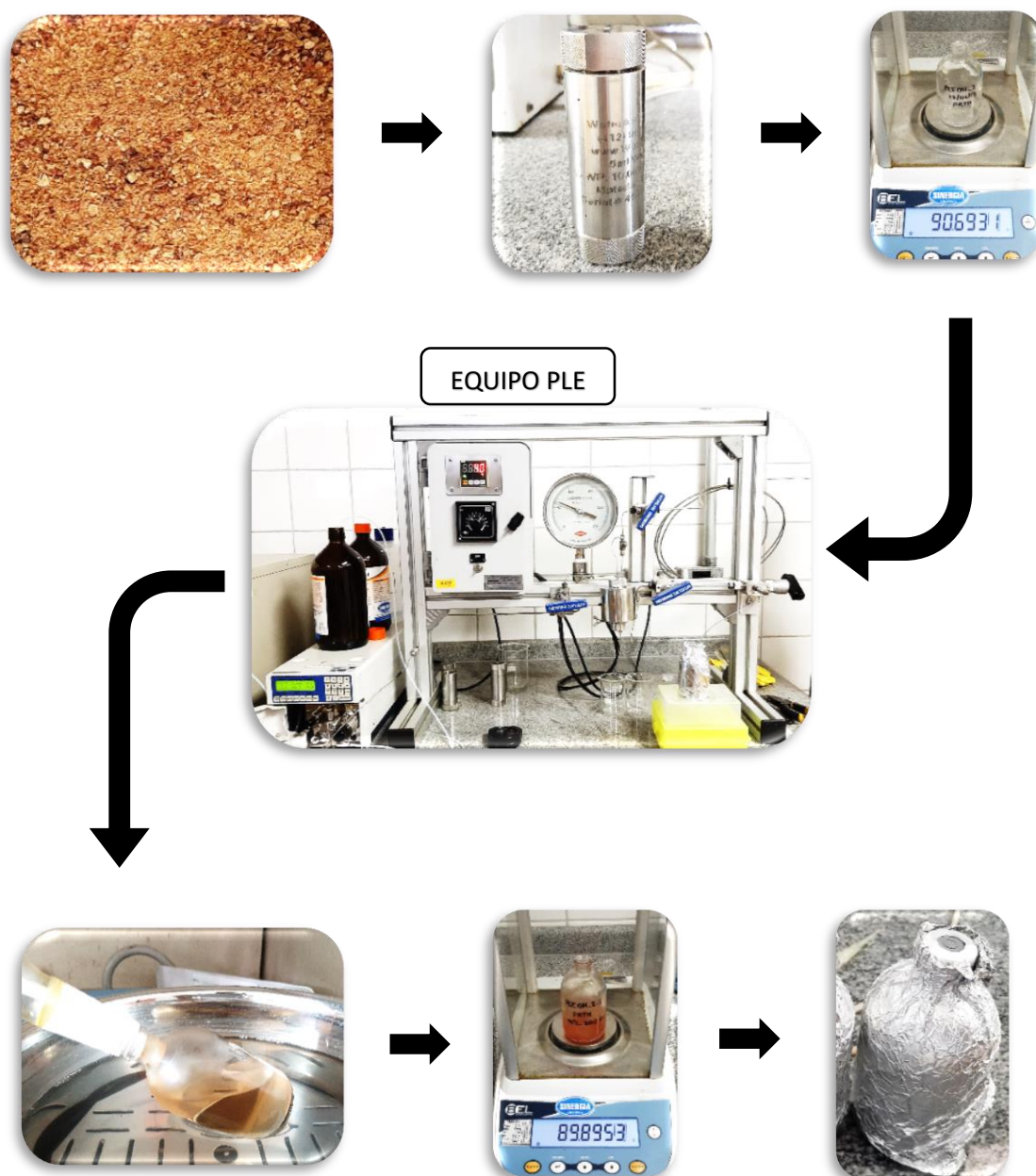
Anexo 2. Fotografías de la preparación de la materia prima



Anexo 3. Fotografías de la extracción de biocompuestos a partir de la granada evaluando la proporción de solvente (I etapa).



Anexo 4. Fotografías de la extracción de biocompuestos a partir de la granada mediante líquidos presurizados (II etapa).



Anexo 5. Determinación del diámetro de partícula de la materia prima

Repetición 1										
Número de Mesh	Abertura (A _n) (mm)	% masa retenida	Acumulativo del tamiz	Xi medio ($\sqrt{(A_1 + A_2)}$)	log Xi medio	*Mi (log Xi * %masa ret.)	Σ* Mi	Σ % masa retenida	$\frac{\Sigma * Mi}{\Sigma \% \text{ masa ret}}$	Diámetro de partícula
100										
9	2	0,006184458	99,99381554	2,2	0,338456494	0,00209317	-0,306435085	1	-0,306435085	0,494
12	1,41	0,059962355	99,93385319	1,7	0,225124554	0,013498999				
16	1	0,2199516	99,71390159	1,2	0,074609556	0,016410491				
24	0,71	0,158107018	99,55579457	0,8	-0,074370826	-0,011758549				
48	0,297	0,282199516	99,27359505	0,5	-0,337992601	-0,095381348				
80	0,18	0,133772519	99,13982253	0,2	-0,635985523	-0,085077386				
Fondo		0,139822533	99	0,1	-1,045757491	-0,146220461				
Repetición 2										
Número de Mesh	Abertura (A _n) (mm)	% masa retenida	Acumulativo del tamiz	Xi medio ($\sqrt{(A_1 + A_2)}$)	log Xi medio	*Mi (log Xi * %masa ret.)	Σ* Mi	Σ % masa retenida	$\frac{\Sigma * Mi}{\Sigma \% \text{ masa ret}}$	Diámetro de partícula
100										
9	2	0,008150722	99,99184928	2,2	0,338456494	0,002758665	-0,295316696	1	-0,295316696	0,507
12	1,41	0,069615179	99,9222341	1,7	0,225124554	0,015672086				
16	1	0,221672902	99,7005612	1,2	0,074609556	0,016538917				
24	0,71	0,163816141	99,53674506	0,8	-0,074370826	-0,012183142				
48	0,297	0,269508284	99,26723677	0,5	-0,337992601	-0,091091806				
80	0,18	0,128006414	99,13923036	0,2	-0,635985523	-0,081410226				
Fondo		0,139230358	99	0,1	-1,045757491	-0,14560119				

Fuente: Norma ASAE S424.1 MAR1992.

Anexo 6. Valor de polaridad de principales solventes de extracción

N°	Solvente	Polaridad	N°	Solvente	Polaridad
1	n-hexano	0,1	7	Acetona	5,1
2	Tolueno	2,4	8	Metanol	5,1
3	Éter diisopropil	2,4	9	Acetonitrilo	5,8
4	n-butanol	3,9	10	Ácido acético	6,0
5	cloroformo	4,1	11	Ácido fórmico	6,0
6	Acetato de etilo	4,4	12	Agua	10,2

Fuente: Spangenberg et al. (2011).

Anexo 7. Resultados del rendimiento de extracción con repeticiones

TEMPERATURA (°C)	PRESIÓN (Bar)	REP. 1 (%)	REP. 2 (%)	RENDIMIENTO PROMEDIO (%)
40	20	28,18	26,64	27,41
	40	29,03	32,98	31,01
	60	30,97	30,21	30,59
	80	31,03	31,75	31,39
	100	34,33	27,91	31,12
60	20	28,04	31,96	30,00
	40	36,87	37,68	37,28
	60	36,54	34,18	35,36
	80	46,80	43,18	44,99
	100	37,37	34,75	36,06

Anexo 8. Análisis estadístico

a) Análisis de varianza (ANOVA) mediante el software Minitab 18.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temperatura (°C)	1	206,98	206,982	40,65	0,000
Presión (bar)	4	182,72	45,679	8,97	0,002
Temperatura (°C)*Presión (bar)	4	71,16	17,789	3,49	0,049
Error	10	50,92	5,092		
Total	19	511,78			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2.25663	90,05%	81,09%	60,20%

b) Prueba de Tukey

Comparación por el método de Tukey: Temperatura (°C)

Temperatura (°C)	N	Media	Agrupación
60	10	36,737	A
40	10	30,303	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparación por el método de Tukey: Presión (bar)

Presión (bar)	N	Media	Agrupación
80	4	38,190	A
40	4	34,140	A
100	4	33,590	A B
60	4	32,975	A B
20	4	28,705	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparación de los tratamientos: Temperatura (°T)*Presión (bar)

Temperatura*Presión	N	Media	Agrupación
60 80	2	44.990	A
60 40	2	37.275	A B
60 100	2	36.060	A B C
60 60	2	35.360	B C
40 80	2	31.390	B C
40 100	2	31.120	B C
40 40	2	31.005	B C
40 60	2	30.590	B C
60 20	2	30.000	B C
40 20	2	27.410	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

c) Análisis de los efectos simples

Procedimiento GLM
Medias de cuadrados mínimos

A	B	Y LSMEAN
a1	b1	27.4100000
a1	b2	31.0050000
a1	b3	30.5900000
a1	b4	31.3900000
a1	b5	31.1200000
a2	b1	30.0000000
a2	b2	37.2750000
a2	b3	35.3600000
a2	b4	44.9900000
a2	b5	36.0600000

A*B Efecto dividido por A for Y

A	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
a1	4	21.587360	5.396840	1.06	0.4251
a2	4	232.286160	58.071540	11.40	0.0010

A*B Efecto dividido por B for Y

B	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
b1	1	6.708100	6.708100	1.32	0.2778
b2	1	39.312900	39.312900	7.72	0.0195
b3	1	22.752900	22.752900	4.47	0.0607
b4	1	184.960000	184.960000	36.32	0.0001
b5	1	24.403600	24.403600	4.79	0.0534

Anexo 9. Balance de masa para la preparación de la materia prima

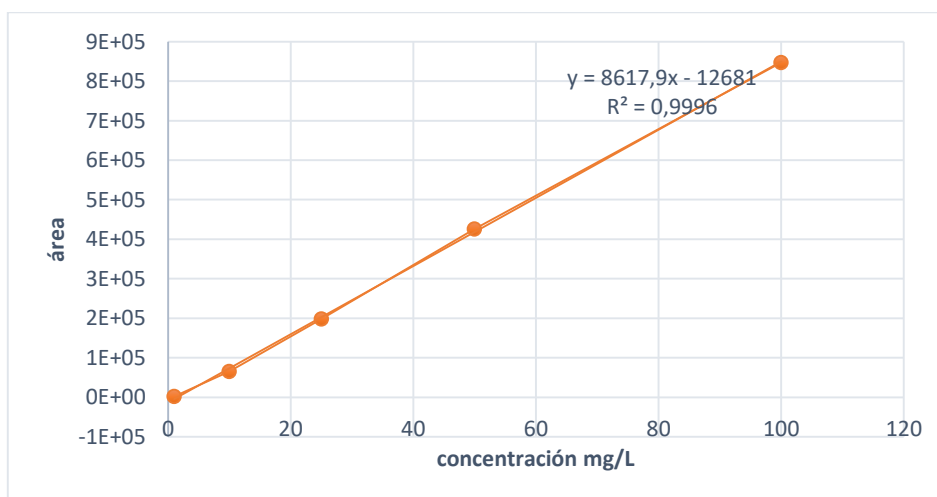
OPERACIONES UNITARIAS	Entra	Sale	Continua
RECEPCIÓN (kg)	56,42	0,00	56,42
PESADO (kg)	56,42	0,00	56,42
LAVADO/DESINFECCIÓN (kg)	56,42	0,00	56,42
CORTADO (kg)	56,42	0,00	56,42
SELECCIÓN (kg)	56,42	1,68	54,74
DESARILADO (kg)	54,74	35,84	18,90
CLASIFICACIÓN (kg)	18,90	0,00	18,90
ALMACENADO (kg)	18,90	0,00	18,90
SECADO (kg)	18,90	13,50	5,40
MOLIDO (kg)	5,40	0,40	5,00
TAMIZADO (kg)	5,00	0,70	4,30
ALMACENADO (kg)	4,30	0,00	4,30
MATRIZ VEGETAL (p/p %)			7,62%

Fuente: Elaboración propia (2020)

Anexo 10. Concentración vs área del patrón ácido elágico

CÓDIGO	CONCENTRACIÓN	ÁREA	PROMEDIO
PATRÓN EA_100 mg/L_R1	100 mg/L	846892	846892
PATRÓN EA_100 mg/L_R2		839316	
PATRÓN EA_50 mg/L_R1	50 mg/L	431247	426290,5
PATRÓN EA_50 mg/L_R2		421334	
PATRÓN EA_25 mg/L_R1	25 mg/L	197576	198379
PATRÓN EA_25 mg/L_R2		199182	
PATRÓN EA_10 mg/L_R1	10 mg/L	65538	65554
PATRÓN EA_10 mg/L_R2		65570	
PATRÓN EA_1 mg/L_R1	1 mg/L	2399	2400,5
PATRÓN EA_1 mg/L_R2		2402	

Anexo 11. Curva patrón del ácido elágico



Anexo 12. Contenido de compuestos fenólicos del extracto 1 y 2 de la granada en mg/ EAE (EAE=Equivalentes de Ácido elágico)

EXTRACTO 1: T°=60 °C/P=40 bar			
N°	NAME	MÉDIA (mg EAE)	DESVIO PADRÃO
1	Punicalagina α	2,9	0,1
2	Unknown	1,5	0,0
3	Punicalagina β	8,8	0,7
4	Unknown	3,2	0,0
5	Unknown	0,8	0,0
6	Unknown	0,5	0,0
7	Ácido elágico	1,5	0,0
8	Unknown	3,6	0,2
9	Unknown	2,1	0,1
10	Unknown	0,6	0,0
11	Unknown	0,6	0,0
12	Unknown	0,6	0,0
13	Unknown	0,9	0,0
14	Unknown	0,9	0,0
15	Unknown	0,6	0,0
16	Unknown	0,6	0,0
17	Unknown	0,6	0,0
18	Unknown	0,4	0,0
19	Unknown	0,5	0,0
TOTAL EXTRAÍDO		31,2	1,3

EXTRACTO 2: T°=60 °C/P=80 bar			
N°	NAME	MÉDIA (mg EAE)	DESVIO PADRÃO
1	Punicalagina α	2,4	0,1
2	Unknown	1,3	0,1
3	Punicalagina β	7,6	0,2
4	Unknown	2,7	0,0
5	Unknown	0,7	0,0
6	Unknown	0,4	0,0
7	Ácido elágico	1,4	0,0
8	Unknown	3,2	0,1
9	Unknown	1,9	0,1
10	Unknown	0,6	0,0
11	Unknown	0,6	0,0
12	Unknown	0,6	0,0
13	Unknown	0,8	0,0
14	Unknown	0,8	0,0
15	Unknown	0,6	0,0
16	Unknown	0,6	0,0
17	Unknown	0,5	0,0
18	Unknown	0,4	0,0
19	Unknown	0,5	0,0
TOTAL EXTRAÍDO		27.8	0,8

Anexo 13. Contenido de compuestos fenólicos del extracto 1 y 2 de la granada en mg/g de extracto y mg/100g m.s.

N° PICO	COMPUESTOS	CONDICIÓN	
		E1	E2
		60/40 (mg/g extracto)	60/80 (mg/g extracto)
1	α -Punicalagin	1,26 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,04
2	unidentified	0,65 $\pm$ 0,29	0,51 $\pm$ 0,03
3	β -Punicalagin	3,84 $\pm$ 0,01	2,92 $\pm$ 0,09
4	unidentified	1,39 $\pm$ 0,00	1,05 $\pm$ 0,01
5	unidentified	0,35 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,00
6	unidentified	0,20 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,00
7	Ellagic Acid	0,67 $\pm$ 0,08	0,53 $\pm$ 0,01
8	unidentified	1,58 $\pm$ 0,04	1,25 $\pm$ 0,06
9	unidentified	0,91 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,03
10	unidentified	0,27 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,01
11	unidentified	0,25 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,00
12	unidentified	0,26 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,00
13	unidentified	0,39 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,01
14	unidentified	0,39 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,00
15	unidentified	0,28 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,00
16	unidentified	0,27 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,00
17	unidentified	0,24 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01
18	unidentified	0,17 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00
19	unidentified	0,20 $\pm$ 0,00	0,18 $\pm$ 0,00
TOTAL		13,58$\pm$0,56	10,7$\pm$0,30

N° PICO	COMPUESTOS	CONDICIÓN	
		E1	E2
		60/40 (mg/100g m.s.)	60/80 (mg/100g m.s.)
1	α -Punicalagin	48,1515612	39,7229325
2	unidentified	24,9059799	21,5165885
3	β -Punicalagin	146,115082	125,789286
4	unidentified	53,1327572	44,6882991
5	unidentified	13,2831893	11,5858553
6	unidentified	8,30199331	6,62048876
7	Ellagic Acid	24,9059799	23,1717107
8	unidentified	59,7743518	52,9639101
9	unidentified	34,8683719	31,4473216
10	unidentified	9,96239197	9,93073314
11	unidentified	9,96239197	9,93073314
12	unidentified	9,96239197	9,93073314
13	unidentified	14,943588	13,2409775
14	unidentified	14,943588	13,2409775
15	unidentified	9,96239197	9,93073314
16	unidentified	9,96239197	9,93073314
17	unidentified	9,96239197	8,27561095
18	unidentified	6,64159465	6,62048876
19	unidentified	8,30199331	8,27561095
TOTAL		518,044382	456,813724