

## Extracción con CO<sub>2</sub> Supercrítico de Aceite de Semillas de Guanábana (*Annona muricata*): Cinética, Perfil de Ácidos Grasos y Esteroles

Daniela J. Dorado<sup>(1)</sup>, Andrés M. Hurtado-Benavides<sup>(1)\*</sup> y Hugo A. Martínez-Correa<sup>(2)</sup>

(1) Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA), Universidad de Nariño, Calle 18 Carrera 50 Ciudadela Universitaria Torobajo, Pasto-Colombia. (e-mail: ahurtadob@hotmail.com, dadojazzz@hotmail.com)

(2) Facultad de Ingeniería y Administración, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 32 No 12-00 Chapinero, Palmira-Colombia. (e-mail: hamartinezco@unal.edu.co)

\* Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia

*Recibido Mar. 22, 2016; Aceptado May. 6, 2016; Versión final Jul. 6, 2016, Publicado Oct. 2016*

### Resumen

Se estudió la extracción de aceite de semillas de guanábana utilizando dióxido de carbono supercrítico a presiones entre 20 y 35 MPa y temperaturas entre 313 y 333 K, con un flujo de dióxido de carbono constante de 30 g.min<sup>-1</sup> y un tiempo de extracción de 150 min. Se planteó un diseño experimental compuesto central para estudiar el efecto de la presión (P) y la temperatura (T) sobre el rendimiento, el perfil de ácidos grasos y esteroles. La composición en ácidos grasos y esteroles se analizó por cromatografía de gases. La presión tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el rendimiento alcanzando un rendimiento óptimo del 12.9%. El ácido oleico es el ácido graso mayoritario, seguido del ácido palmítico y linoleico. En menor proporción se encontraron el ácido esteárico, palmitoleico, linolénico y dodecanoico. Además, se encontró la presencia de campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol. Por lo tanto, el aceite obtenido libre de solventes muestra potencial para ser usado como ingrediente natural en diferentes industrias.

*Palabras clave: CO<sub>2</sub> supercrítico; aceite de semillas de guanábana; ácidos grasos; esteroles; ingredientes naturales*

## Extraction of Soursop (*Annona muricata*) Seed Oil by Supercritical CO<sub>2</sub>: Kinetic, Fatty Acid and Sterol Profiles

### Abstract

The extraction of soursop seed oil by supercritical carbon dioxide was performed, using pressures between 20 MPa and 35 MPa and temperatures from 313 K to 333 K, with a constant CO<sub>2</sub> flow of 30 g.min<sup>-1</sup> and an extraction time of 150 min. A central composite experimental design was used to study the effect of pressure (P) and temperature (T) on the yield, fatty acids profile and sterols. The fatty acids profile and sterols were analyzed by gas chromatography. The pressure had a significant effect ( $p < 0,05$ ) on the yield and an optimum yield of 12.9% was reached. Oleic acid is the major fatty acid, followed by palmitic and linoleic acid. Stearic, palmitoleic, linoleic and dodecanoic acids were found in smaller proportions. The presence of campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol was also found. Therefore, the solvent-free oil obtained shows potential to be used as a natural ingredient in different industries.

*Keywords: supercritical CO<sub>2</sub>; soursop seeds oil; fatty acids; sterols; natural ingredient*

## INTRODUCCIÓN

La guanábana (*Annona muricata*) es una fruta tropical ampliamente utilizada en Colombia para la preparación de jugos y pulpas de fruta. Las semillas representan aproximadamente entre el 20%- 25% en masa de la fruta madura (Okoro, 2013), las cuales constituyen parte del residuo del procesamiento de la guanábana y generalmente no tienen un destino que genere valor agregado y su disposición puede resultar en un problema de contaminación. En los últimos años, algunos estudios científicos han confirmado la presencia de alcaloides, acetogeninas (Ragasa et al., 2012) y ciclopéptidos en las semillas de guanábana, los cuales son compuestos que han atraído el interés farmacológico. Además, las semillas de guanábana, de acuerdo algunos estudios contienen una cantidad significativa de aceite (Solís et al., 2011; Cerón et al., 2012), por lo tanto su extracción podría ser una alternativa viable para el aprovechamiento de este tipo de recurso.

El aceite de semillas de guanábana presenta un contenido importante del 64 % en ácidos grasos insaturados (ácidos oleico y linoleico) (Cerón et al., 2012). La composición de ácidos grasos de un aceite es una característica química no solo útil para la verificación de la pureza del mismo, sino también desde el punto de vista nutricional (Liu, y otros, 2009). El consumo de ácido oleico reduce los niveles de colesterol y de lipoproteínas de baja densidad (Castro y Herrera, 2005). El consumo de ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico puede ayudar en la prevención del cáncer, de enfermedades al corazón, hipertensión y trastornos autoinmune (Sahena et al., 2009). Los ácidos grasos linoleico y oleico son ácidos grasos esenciales. Cuando hay insuficiencia de este tipo ácidos grasos se observan síntomas de dermatitis como escamas y deshidratación de la piel, en consecuencia, el suplemento de ellos en la piel puede curar dichos síntomas (Draeos, 2006). Por otra parte, compuestos minoritarios presentes en aceites vegetales como los esteroides tienen un mercado importante en Europa, Estados Unidos y Australia para la reducción del colesterol (Xu et al., 2009). Además, presentan una alta demanda en la industria farmacéutica para la elaboración de hormonas semi-sintéticas (Palou, y otros, 2005). Este tipo de compuestos se han encontrado en aceites de oliva, soya (Boskou, 2015) y semillas de durazno (Serhat y Gürü, 2014).

Los aceites vegetales de semillas oleaginosas generalmente se obtienen por el método convencional de extracción con solventes. Los solventes comúnmente usados son el hexano (Solís et al., 2010; Adepoju et al., 2014) y éter etílico (Cerón et al., 2012), los cuales presentan limitaciones para ser utilizados como solventes en productos para consumo humano (Lafont et al., 2011) y se tiene el problema relacionado con el tiempo prolongado de extracción y la eliminación incompleta del solvente después de la extracción (Velasco et al., 2007). En consecuencia, algunos autores han propuesto la extracción con dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC) como una tecnología alternativa para la extracción de aceites vegetales ya que permite una extracción selectiva y el fraccionamiento de extractos (Sahena et al., 2009). Además, esta tecnología posibilita la extracción de compuestos termolábiles, fácil eliminación del fluido utilizado y empleo mínimo o nulo de solventes orgánicos, respetando el medio ambiente (de Melo et al., 2014; Hurtado y otros, 2014). Se ha estudiado la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de aceites de semillas de maracuyá (Liu et al., 2009), de durazno (Serhat & Gürü, 2014), de granada (Liu et al., 2012), entre otros. Sin embargo, no hay estudios que reporten de forma detallada la extracción de aceite de semillas de guanábana utilizando fluidos supercríticos. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue la extracción de aceite de semillas de guanábana con CO<sub>2</sub>-SC, evaluando su rendimiento y composición química en función de las condiciones de presión y temperatura, con el fin de obtener aceites libres de solventes con posibles usos en la industria cosmética, alimentaria o farmacéutica, promoviendo de esta manera el aprovechamiento integral de las frutas.

## MATERIALES

Se describe la materia prima, luego se especifican los reactivos y solventes, se presenta el procedimiento experimental de la extracción supercrítica y se detallan los modelos cinéticos usados. Se describe el análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases (gc) y el análisis de esteroides

### *Materia prima*

Las semillas frescas de guanábana fueron suministradas por la empresa de pulpas de frutas INPADENA (Colombia). Las semillas fueron lavadas y secas a 313 K durante 8 horas, con lo cual se alcanzó una humedad de 4,28% b.s. Posteriormente las semillas fueron molidas con un molino de martillos (Metalurgica TRAPP, Brasil). Un equipo de tamizado modelo PS-35 serie 1182 y la serie de tamices (10-80, A.S.T.M.E.), se utilizó para determinar el diámetro medio de las partículas (0,861 mm). La densidad aparente ( $\rho_b$ ) del lecho de semillas molidas fue de  $0,496 \pm 0,003$  g/cm<sup>3</sup>, determinada por un método gravimétrico reportado por Sacilik et al. (2003). La densidad de partícula ( $\rho_p$ ) de las semillas de guanábana molidas fue de  $1,205 \pm 0,003$  g/cm<sup>3</sup>, determinado por el método por desplazamiento de tolueno (Sacilik et al., 2003). La porosidad del lecho fue de  $58,85 \pm 0,11$  % y se calculó a partir de la densidad real de la muestra y la densidad aparente mediante la ecuación propuesta por (Mohsenin, 1986).

### Reactivos y solventes

Se utilizó dióxido de carbono con una pureza del 99,8%, suministrado por Cryogas (Pasto, Colombia). Helio al 99,99% (Linde, Colombia). Los estándares internos para el análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME análisis) fueron adquiridos de RESTEK. ( $\geq 99\%$ ). Todos los disolventes utilizados fueron de grado HPLC (Honeywell, USA).

### Extracción supercrítica

La extracción de aceite de guanábana utilizando CO<sub>2</sub>-SC, se realizó en un equipo de extracción de 500 mL de capacidad TharSFE-500 (Waters, USA), el cual se muestra esquemáticamente en la Fig 1. El equipo consta de un sistema de regulación y control de presión, temperatura y flujo de CO<sub>2</sub> que opera través del software Process Suite (Versión 5.9). Se empleó un diseño experimental compuesto central rotacional para optimizar los parámetros del proceso de extracción supercrítica del aceite de semillas de guanábana. Se efectuaron 4 puntos factoriales, 4 puntos estrellas y 4 repeticiones en el punto central para un total de 12 experimentos (Ver Tabla 1). Se determinó el efecto de la presión y temperatura de extracción sobre las variables de respuesta: rendimiento y la composición en ácidos grasos y esteroides del aceite de semillas de guanábana. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y al azar. La extracción de aceite de semillas de guanábana se llevó a cabo en un rango de presión de 20 a 35 MPa y temperaturas entre 313 y 333 K utilizando un flujo de CO<sub>2</sub> constante de 30 g.min<sup>-1</sup> y un tiempo de extracción de 150 min. En cada experimento se utilizó una muestra de 200 g de semilla de guanábana molida. Los extractos se almacenaron en viales ámbar a 277 K hasta su posterior análisis. Se determinó el rendimiento basado en la cantidad de aceite de semillas de guanábana obtenido por unidad másica del material (semilla molida) en términos porcentuales. Se realizó el análisis estadístico con la ayuda del programa Statgraphics Centurion XV ® (StatPoint Technologies, Inc., War-renton, VA, USA).

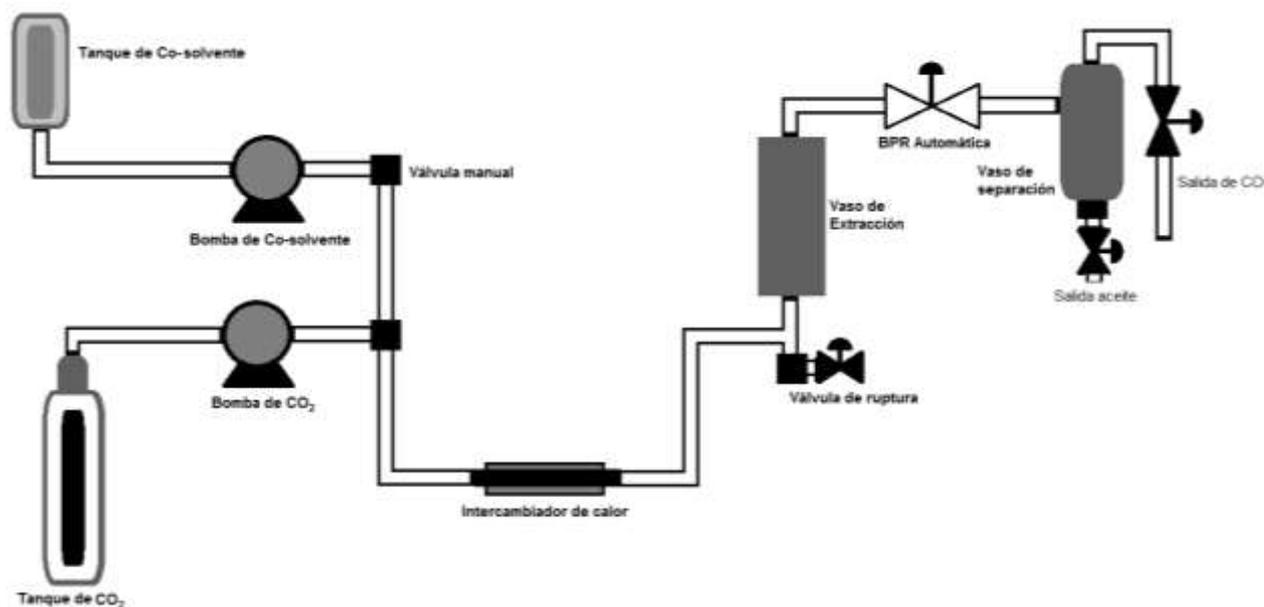


Fig. 1: Diagrama de proceso extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico.

### Cinética

Con el fin de efectuar el modelamiento cinético de la curva de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, se utilizaron tres modelos cinéticos: el modelo presentado por Sovová et al. (2006), el modelo de Nike et al. (1989) y el modelo de desorción propuesto por Tan y Liou (1989). El modelo de Sovová et al. (2006) omite el efecto de la resistencia de la transferencia de masa en el solvente. El modelo simula el proceso de extracción de grupos de sustancias a partir de la siguiente expresión (Ec.1):

$$e = e_1 [1 - \exp(-k_1 q)] + k_2 q \quad (1)$$

Donde "e" representa el rendimiento de extracción (p/p), y "q" la relación disolvente /materia prima (p/p), y e<sub>1</sub>, k<sub>1</sub> y k<sub>2</sub> son los parámetros ajustable.

El modelo de Naik et al. (1989), no toma en cuenta las interacciones entre el soluto y la matriz sólida y describe empíricamente la evolución del proceso de extracción usando la siguiente expresión (Ec. 2):

$$e = \frac{e_{\infty} t}{b+t} \quad (2)$$

Donde  $e$  corresponde al rendimiento en kg extracto/kg materia prima,  $t$  es el tiempo de extracción (min),  $e_{\infty}$  es el valor de "e" por un tiempo de extracción infinito y es un parámetro ajustable al igual que  $b$  (min).

El modelo de Tan and Liou (1989), por su parte asume que la transferencia de masa de la extracción se describe bien por una expresión de cinética de primer orden (Ec. 3).

$$m_{\text{ext}} = \frac{A}{k_d} [1 - \exp(-k_d B)] [\exp(-k_d t) - 1] \quad (3)$$

$$A = Q_{\text{CO}_2} \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} X_o \frac{\rho_s}{\rho} \quad (4)$$

$$B = \frac{\varepsilon H S \rho}{Q_{\text{CO}_2}} \quad (5)$$

Donde  $m_{\text{ext}}$  es la masa del extracto (kg),  $H$  es altura del lecho (m),  $S$  es la sección transversal (m<sup>2</sup>),  $\rho_s$  corresponde a la densidad del sólido (kg/m<sup>3</sup>),  $\rho$  es la densidad del solvente (kg/m<sup>3</sup>),  $Q_{\text{CO}_2}$  es el flujo de CO<sub>2</sub> (kg/s),  $\varepsilon$  es la porosidad del lecho,  $X_o$  es la relación de masa inicial del soluto extraíble en el sólido (p/p) y  $k_d$  es la constante de desorción (min<sup>-1</sup>) y es un parámetro ajustable del modelo. Los modelos fueron comprados por su grado de ajuste calculando el valor del error medio relativo (%EMR) según la ecuación (Ec. 6), donde  $X_{ei}$  corresponde la cantidad de aceite experimental (g),  $X_{ci}$  es la cantidad de aceite calculado y  $N$  es el número de datos.

$$\%EMR = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|X_{ei} - X_{ci}|}{X_{ei}} \quad (6)$$

#### *Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases (GC)*

El perfil de ácidos grasos se determinó mediante la preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Las muestras se derivatizaron de acuerdo a la metodología propuesta por Christie (1998), con algunas modificaciones. A una alícuota de aceite se le adicionó una solución de metanol y ácido clorhídrico y se sometió a un baño de agua a 323 K durante 8 horas; los ésteres metílicos de ácidos grasos se separaron con n-hexano grado HPLC. Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 17A versión 3 (Shimadzu Scientific Corporation, Kioto, Japón), equipado con un inyector de split/splitless a temperatura de 523 K, relación split 1:10 y un detector de ionización de llama (FID) (523 K). Los datos cromatográficos fueron obtenidos y procesados con el software Shimadzu VP Clase 4.3. Para la separación de mezclas se utilizó una columna capilar DB-WAX (J & W de Agilent Scientific. 30 m \* 0.25 μm ID \* 0,25 mm) con fase estacionaria de polietilenglicol. La temperatura del horno se programó de 313 K (5 min) hasta 523 K a 5 K/min. El gas portador y gas auxiliar empleado fue helio (99,99%, Linde) con un caudal de 1 mL/min. El volumen inyectado fue de extracto de 1,0 μL. Los ácidos grasos fueron identificados por comparación de tiempos de retención de una mezcla estándar de ácidos grasos (Restek, USA) analizados bajo las mismas condiciones operacionales. La cuantificación se realizó por porcentaje relativo de área.

#### *Análisis de esteroides*

Para la separación, identificación y cuantificación de esteroides, se realizó la preparación de las muestras de aceite de semillas de guanábana, utilizando el método reportado por Dhara et al. (2010). Los espectros de masas fueron obtenidos en un Cromatógrafo de Gases/Espectrómetro de Masas Shimadzu QP2010S (Shimadzu Scientific Corporation, EE.UU) equipado con detector selectivo de masas QP2010S, modo de operación full scan (40-500 umas). Temperatura de la interfase 583 K y del inyector a 573 K. Para la separación de las muestras se utilizó una columna capilar SHRXI-5MS (Shimadzu 30 m \* 0,25 mm \* 0,25 μm) con fase estacionaria de 5% fenil - 95% polidimetilsiloxano. La temperatura del horno fue programada de 423 K (2 min) hasta 573 K (25 min) a 10 K/min. El gas de arrastre y gas auxiliar empleado fue helio UAP (99,99%, Linde) a flujo de 1 mL/min. La identificación tentativa de los compuestos de las muestras de aceite de semillas de guanábana se realizó por comparación de los espectros de masas empleando la base de datos NIST 05. La cuantificación se llevó a cabo empleando el método del estándar interno utilizando como estándar una solución patrón de colesterol (Sigma, USA). Los resultados se expresaron en términos de concentración (mg/mL).

## RESULTADOS

Los resultados se presentan en tres sub-secciones: (i) extracción supercrítica; (ii) perfil en ácidos grasos; y (iii) composición en esteroides

### Extracción supercrítica

Las condiciones de extracción se establecieron teniendo en cuenta algunos estudios relacionados con la extracción de aceites de semillas de frutas (Cardoso et al., 2013; Liu et al., 2009). El tiempo de extracción se fijó en 150 min, ya que bajo este tiempo se alcanza una cantidad aceptable de aceite sin tener un gasto excesivo de CO<sub>2</sub> (0,0042 g aceite/gCO<sub>2</sub> a 27,5 MPa y 0,0081 g aceite/gCO<sub>2</sub> a 38,1 MPa). En la Fig. 2 se observa que a partir de los 60 min la cantidad de aceite obtenido por gramo de CO<sub>2</sub> consumido (g aceite/g CO<sub>2</sub>) comienza a disminuir de manera significativa y con el tiempo se estabiliza, por lo tanto no es conveniente prologar la extracción. El flujo se estimó en 30 g CO<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>, obteniendo una relación solvente/materia prima de 22,5 g CO<sub>2</sub>/g semilla, cuyo valor, se encuentra dentro del rango recomendado en literatura (Ibañez et al., 2002; de Melo et al., 2014).

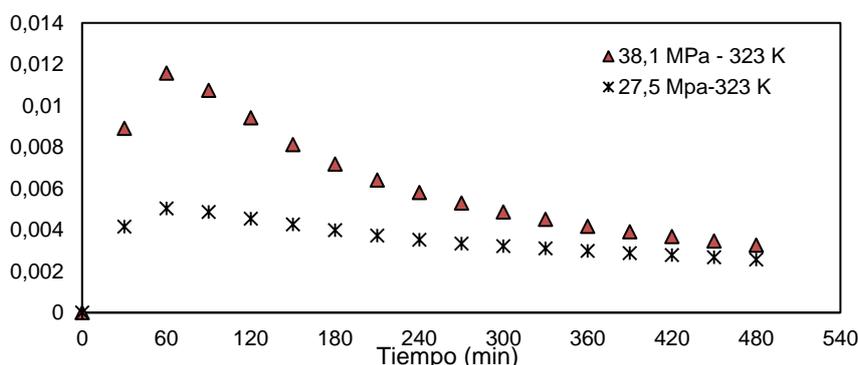


Fig. 2: Relación aceite extraído por unidad másica de CO<sub>2</sub> utilizado en función del tiempo

Los resultados de rendimiento de aceite de semillas de guanábana, con las variables codificadas entre paréntesis y la densidad del CO<sub>2</sub>, calculada a partir de la ecuación de estado modificada de Peng-Robinson (Stryjek y Vera, 1986), se muestran en la Tabla 1. El mayor rendimiento en aceite fue del 12,95% a 38,1 MPa y 323 K, el cual es superior al obtenido mediante extracción etanólica con un 6,15% en rendimiento (Moreno y Jorge, 2012). Un mayor rendimiento ha sido reportado por otros autores para aceite de semillas de guanábana obtenido por Soxhlet, con resultados del 30,59 % (Cerón, et al., 2012) y 34,61% (Adepoju et al., 2014). La diferencia en el rendimiento obtenido con los datos reportados en literatura, se deben a las discrepancias en los métodos de extracción y en los solventes empleados.

Tabla 1: Rendimiento en aceite de semillas de guanábana extraído con CO<sub>2</sub>-SC.

Exp.	Temperatura (K)	Presión (MPa)	Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	Rendimiento promedio % (p/p) ± Desviación estándar	
1	313 (-1,0)	20,0 (-1,0)	831	2,8829	± 0,0779
2	333 (+1,0)	20,0 (-1,0)	696	3,5118	± 0,1533
3	313 (-1,0)	35,0 (+1,0)	964	11,7039	± 0,0798
4	333 (+1,0)	35,0 (+1,0)	877	10,5617	± 0,7174
5	323 (0)	16,9 (-1,41)	707	1,4297	± 0,0190
6	323 (0)	38,1 (+1,41)	942	12,9505	± 0,0240
7	309 (-1,41)	27,5 (0)	929	6,5073	± 0,6036
8	337 (+1,41)	27,5 (0)	785	4,7272	± 0,3403
9	323 (0)	27,5 (0)	858	9,8886	± 0,3985
10	323 (0)	27,5 (0)	858	9,1371	± 0,3985
11	323 (0)	27,5 (0)	858	9,1904	± 0,3985
12	323 (0)	27,5 (0)	858	9,8133	± 0,3985

En este estudio la humedad de las semillas fue del 4,28%, lo cual puede justificar en parte el bajo rendimiento obtenido, ya que la humedad de las semillas es un parámetro que influye en el rendimiento; una humedad entre el 8,48% al 15,99% (base húmeda) es adecuada para una alta producción de aceite de semillas de guanábana (Okoro, 2013). Esto puede ser debido a que el agua presente en las semillas actúa como co-solvente y por un fenómeno de arrastre puede salir junto con el aceite incrementando el rendimiento.

Por otra parte, la significancia estadística del efecto de la presión y la temperatura sobre el rendimiento en aceite (% p/p), se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA). En la Tabla 2, se observa que solamente la presión tuvo un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el rendimiento en la extracción del aceite de semillas de guanábana utilizando CO<sub>2</sub>-SC.

Tabla 2: ANOVA para rendimiento en aceite de semillas de guanábana

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A:Presión	258,627	1	258,627	119,06	0,0083
B:Temperatura	2,29624	1	2,29624	1,06	0,4120
AA	3,21817	1	3,21817	1,48	0,3477
AB	1,5684	1	1,5684	0,72	0,4850
BB	17,4044	1	17,4044	8,01	0,1054
bloques	0,494929	1	0,494929	0,23	0,6802
Falta de ajuste	8,68817	11	0,789834	0,36	0,8925
Error puro	4,34436	2	2,17218		
Total (corr.)	293,423	19			

En el gráfico de superficie de respuesta (Fig. 3) se observa que la presión tuvo un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) y positivo sobre el rendimiento. Un comportamiento similar ha sido reportado en la extracción de aceite de semillas de granada (Liu et al., 2012) y semillas de maracuyá (Cardoso et al., 2013). Esto se debe principalmente, a que la variable más propensa a ser afectada por el aumento de la presión es la densidad del solvente (de Melo et al., 2014), dado que al incrementar la presión existe un aumento en la densidad del CO<sub>2</sub>-SC, resultando en una mayor capacidad de solvatación del aceite en el solvente. De esta manera, el rendimiento se incrementó en un 8% al pasar del nivel más bajo al nivel más alto de presión evaluado. Además, al aumentar la presión se facilita la penetración del disolvente en los poros de las semillas, proporcionando un contacto eficiente entre el solvente y el soluto (Castro et al., 2013). Por su parte, la variación en la temperatura no afectó de manera significativa ( $p > 0,05$ ) el rendimiento en aceite. Resultados similares fueron obtenidos en la extracción de aceite de semillas de *Moringa oleifera* (Ruttarattanamongkol et al., 2014) y de semillas de *Phaleria macrocarpa* (Azmir et al., 2014). De acuerdo al análisis estadístico, al combinar los niveles de los factores que maximizan el rendimiento, se puede alcanzar un 12,86 % a 38,1 MPa y 323 K, tendencia que se puede observar en la Fig. 3. La Ecuación 6 (donde P corresponde a la presión en MPa) representa el modelo matemático lineal disponible en el software para estimar el rendimiento en función de los factores significativos ( $p < 0,05$ ), que explica el 88,31 % de la variabilidad de los datos de rendimiento en aceite de semillas de guanábana. Las condiciones óptimas a nivel estadístico coincidieron con los resultados experimentales (38,1 MPa-323 K) con un rendimiento del 12,95%.

$$R = -7,56277 + 0,0536062 P \quad (6)$$

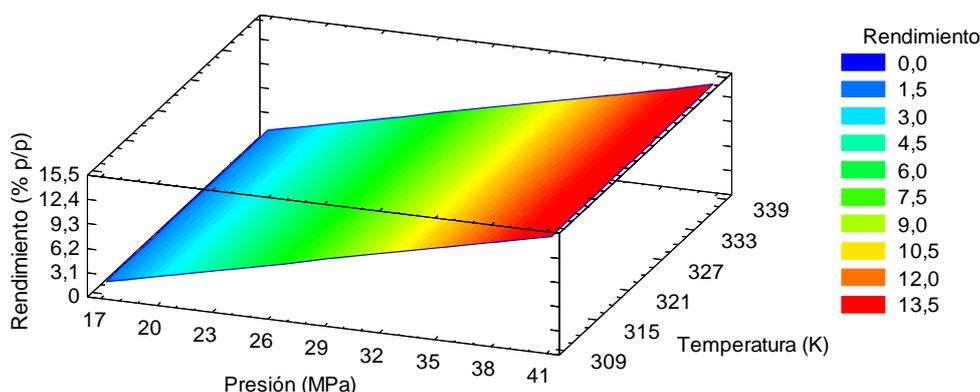


Fig. 3: Superficie de respuesta para rendimiento en aceite de semillas de guanábana

En la Fig. 4 se muestra la curva de extracción de aceite de semillas de guanábana a 381 MPa y 323 K, en términos de masa del aceite en función del tiempo, junto con las curvas que se obtienen con los modelos cinéticos de Sovová et al. (2006), Tan y Liou (1989) y Naik et al. (1989). Los parámetros ajustados de dichos modelos se pueden ver en la Tabla 3.

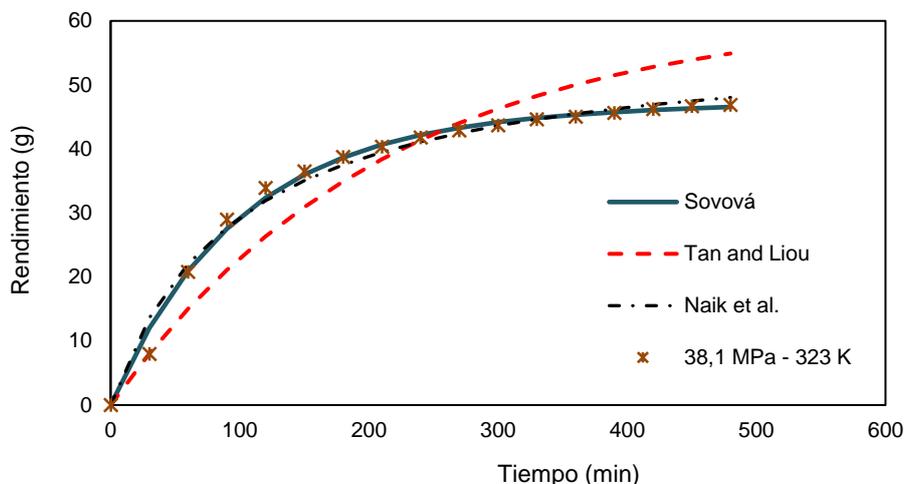


Fig. 4: Cinética de extracción supercrítica de aceite de semillas de guanábana

De acuerdo a la curva experimental, se observó (Fig. 4) que desde el tiempo inicial hasta alrededor de los 120 min se da una alta tasa de extracción, alcanzando la recuperación del 72,3% del total del aceite después de 480 min. Después de esta primera etapa, la cantidad de aceite que se va extrayendo en el tiempo es menor y por ello se observa la tendencia a estabilizarse. Esto indica que el aceite de las semillas de guanábana soluble en el CO<sub>2</sub>-SC, se va agotando. A partir de los 360 min se alcanzó una extracción del 96,1% del aceite logrado al final de la extracción, lo cual indica que en esa etapa el soluto presenta una mayor interacción con la matriz (Sovová et al., 2006) y la extracción del aceite se ve limitada.

Comparando los valores de la masa extraída de aceite que se obtiene experimentalmente con los valores calculados por los modelos utilizando los parámetros presentados en la Tabla 3, se observó que el modelo de desorción (Tan y Liou, 1989), no describió el comportamiento apropiadamente, existiendo una subestimación de los datos experimentales hasta los 250 min aproximadamente. Sin embargo, más allá de este punto, el modelo sobrestima los datos, lo cual indica que el fenómeno que describe el proceso es más importante que el fenómeno de desorción del soluto que se produce durante la extracción supercrítica como lo expresa Martínez et al. (2011). Los modelos de Sovová et al. (2006) y Nike et al. (1989) describieron bien el comportamiento cinético experimental con un porcentaje de error medio relativo (% EMR) menor al 10 %. El modelo de Sovová et al (2006) describió en un 98,9% el comportamiento de los datos experimentales y por lo tanto es el modelo más adecuado para representar la cinética de la extracción de aceite de semillas de guanábana a 38,1 MPa y 323 K.

Tabla 3: Parámetros ajustados y error medio relativo de los modelos cinéticos

Modelo	Sovová et al. (2006)		Tan y Liou (1989)		Naik et al. (1989)	
Parámetros	e1	0,181	A (kg/min)	0,0058	e <sup>∞</sup> (g/g)	0,231
	k1	0,0851	B (min)	10,3	b (min)	97,34
	k2	0,0001	kd (min <sup>-1</sup> )	0,0019		
EMR (%)		1,1009		11,3654		2,1336

#### Perfil en ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos del aceite de semillas de guanábana obtenido con CO<sub>2</sub>-SC, se muestra en la Tabla 4. El ácido graso mayoritario es el ácido oleico (C18:1, 24,84%-46,48%), seguido del ácido palmítico (C16:0, 19,22%-42,69%) y el ácido linoleico (C18:2, 17,19%-36,17%). En menor proporción se encontraron los ácidos grasos esteárico (C18:0, 3,77%-8,46%), palmítoleico (C16:1, 1,13%-2,90%), linolénico (C18:3, 0,86%-1,47%) y dodecanoico (12:0, 0,30%-0,50%). Una composición cercana fue reportada por otros autores para aceite de semillas de guanábana obtenido mediante extracción Soxhlet (Cerón et al., 2012) y extracción etanólica (Moreno et al., 2012). Los aceites de semillas de guanábana obtenidos, contienen en

promedio el 35,68% de ácidos grasos saturados (ácido palmítico, esteárico y dodecanoico) y un 64,89% de insaturados (oleico, linoleico, palmítico y linoléico). Otros autores también reportaron valores superiores al 60% de ácidos grasos insaturados y valores entre el 20% y 35% de ácidos grasos saturados en aceite de semillas de guanábana obtenidos mediante extracción con solventes (Moreno y Jorge, 2012; Cerón et al., 2012; Adepoju et al., 2014). Por lo tanto, es posible afirmar que el aceite de semillas de guanábana se constituye como una fuente importante de ácidos grasos insaturados, independientemente del método de extracción, por lo que el aceite debe ser almacenado a una temperatura baja, evitando la exposición al aire, para evitar un deterioro acelerado (Liu et al., 2009). La relación promedio de insaturados/saturados obtenida fue del 1,82, dada por el alto porcentaje de ácido oleico y linoleico presentes en todos los aceites, los cuales son ácidos grasos esenciales útiles en el mantenimiento de la integridad y la nutrición de la piel, el fortalecimiento de la barrera lipídica de la piel y de mejorar su hidratación (Rabasco y González, 2000).

Tabla 4: Ácidos grasos presentes en aceite de semillas de guanábana extraído con CO<sub>2</sub>-SC

T (K)	P (MPa)	C12:00	C16:00	C16:01	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	NI	Insaturados/ saturados
		% Área Relativo								
313	20	-	37,78	1,55	4,33	24,84	30,55	1,03	1,87	1,29
333	20	-	42,69	2,9	8,46	27,13	17,19	0,99	1,25	0,84
313	35	-	30,18	1,37	-	29,97	36,17	0,86	1,47	2,12
333	35	-	19,22	1,35	-	46,48	29,06	0,90	1,58	3,72
323	16,9	0,50	28,59	2,44	3,98	35,1	28,13	1,28	-	1,82
323	38,1	0,30	25,63	2,16	4,39	36,25	30,07	1,21	-	2,08
309	27,5	0,39	26,91	2,35	3,77	34,26	30,36	1,23	-	1,97
337	27,5	0,33	28,75	1,13	3,85	35,57	29,31	1,12	-	1,94
323	27,5	-	30,29	2,06	5,54	34,51	22,12	1,12	2,40	1,52

En la Tabla 5 se muestra la significancia estadística del efecto de la presión y la temperatura sobre el perfil en ácidos grasos del aceite de semillas de guanábana. La presión (A), temperatura (B) y su interacción (AB), tuvieron un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el contenido de ácido oleico. Por otra parte, la presión y la interacción presión-temperatura tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de ácido palmítico y la relación de ácidos grasos insaturados/saturados. Solamente la presión tuvo un efecto significativo en el contenido de ácido palmítico. Finalmente, los factores y sus interacciones no tuvieron un efecto estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ) sobre el contenido ácido dodecanoico, esteárico y linoléico en los niveles de presión y temperatura evaluados.

Tabla 5: Significancia estadística de los factores sobre la composición ácidos grasos

Fuente	C16:00	C16:01	C18:1	Insaturados/Saturados
	p-valor			
A:Presión	0,0322	0,0389	0,0203	0,0223
B:Temperatura	0,6480	0,4566	0,0319	0,1675
AA	0,7804	0,4814	0,7630	0,2576
AB	0,0743	0,0456	0,0335	0,0346
BB	0,9893	0,0921	0,4403	0,2455
Bloques	0,2522	0,5595	0,4259	0,2429
Falta de ajuste	0,1561	0,0678	0,0926	0,1436

La Fig. 5, muestra el efecto de la temperatura y la presión sobre el porcentaje relativo de los ácidos grasos (oleico, palmítico y palmítico) y sobre la relación de insaturados/saturados a un tiempo fijo de 150 min. Se observa que la presión, la temperatura y la interacción presión-temperatura tuvieron un efecto positivo sobre el porcentaje relativo de ácido oleico (Fig. 5a) y en la relación de ácidos grasos insaturados/saturados (Fig. 5d). De esta manera, a altas presiones, el incremento de la temperatura aumenta de manera significativa el porcentaje de ácido oleico y con ello la relación de ácidos grasos insaturados/saturados, ya que se incrementa la densidad del CO<sub>2</sub>-SC y la presión de vapor de los solutos, aumentando su solubilidad y en consecuencia su contenido en el aceite. Otros autores reportaron un efecto similar en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en desechos de camarón (Sánchez-Camargo et al., 2011) y en el contenido de ácido oleico de aceite de semillas de palma (Nik Norulaini et al., 2004). Las condiciones con las cuales se

obtienen valores máximos de ácido oleico (49,23%) y de la relación de ácidos grasos insaturados/saturados (3,9) se encuentran alrededor de los 38,1 MPa y 337 K, lo cual corresponde a los niveles más elevados de presión y temperatura estudiados. Una elevada relación insaturados/saturados es favorable en términos de nutrición y salud, ya que una dieta rica en ácidos grasos insaturados está relacionada con la prevención del cáncer, enfermedades al corazón y trastornos autoinmunes (Sahena et al., 2009). El ácido oleico específicamente, reduce los niveles de colesterol y de lipoproteínas de baja densidad (Castro y Herrera, 2005). No obstante, se debe tener en cuenta que un alto nivel de ácidos grasos insaturados puede llegar a tener un impacto negativo en la estabilidad oxidativa de los aceites, ya que son susceptibles a la ruptura de sus dobles enlaces y a la formación de compuestos con malos olores, lo cual puede causar un efecto negativo en la calidad de un producto final (Dangarembizi et al., 2015).

Por otra parte, la presión tuvo un efecto lineal negativo sobre el porcentaje relativo de ácido palmítico (Fig. 5b), es decir, el aumento de la presión redujo el contenido de este ácido graso. Por otro lado, la presión y su interacción con la temperatura tuvieron un efecto negativo sobre el ácido palmítico (Fig. 5c). De esta manera, se observa que a alta presión el aumento de la temperatura disminuye el contenido de este ácido graso, ya que el efecto de la temperatura fue más importante, disminuyendo la densidad del solvente y en consecuencia el poder de solvatación de esta sustancia. Sin embargo, a una baja presión, el incremento de la temperatura produce un aumento en el contenido de ácido palmítico, elevando la presión de vapor del soluto y con ello su solubilidad. Por lo tanto, utilizar una presión baja de 16,9 MPa y temperaturas de 323 K y 337 K, favorecen el contenido de ácido palmítico (36,26%) y palmítico (3,00%), respectivamente. El ácido palmítico es un ácido graso saturado, no esencial, sin embargo es útil en la formulación de diversos productos cosméticos, jabones y cremas de afeitar (Dangarembizi et al., 2015). Por su parte, el ácido palmítico es un ácido graso omega-7, monoinsaturado, el cual tiene propiedades desinflamatorias y protege el sistema cardiovascular (Rezanka et al., 2013).

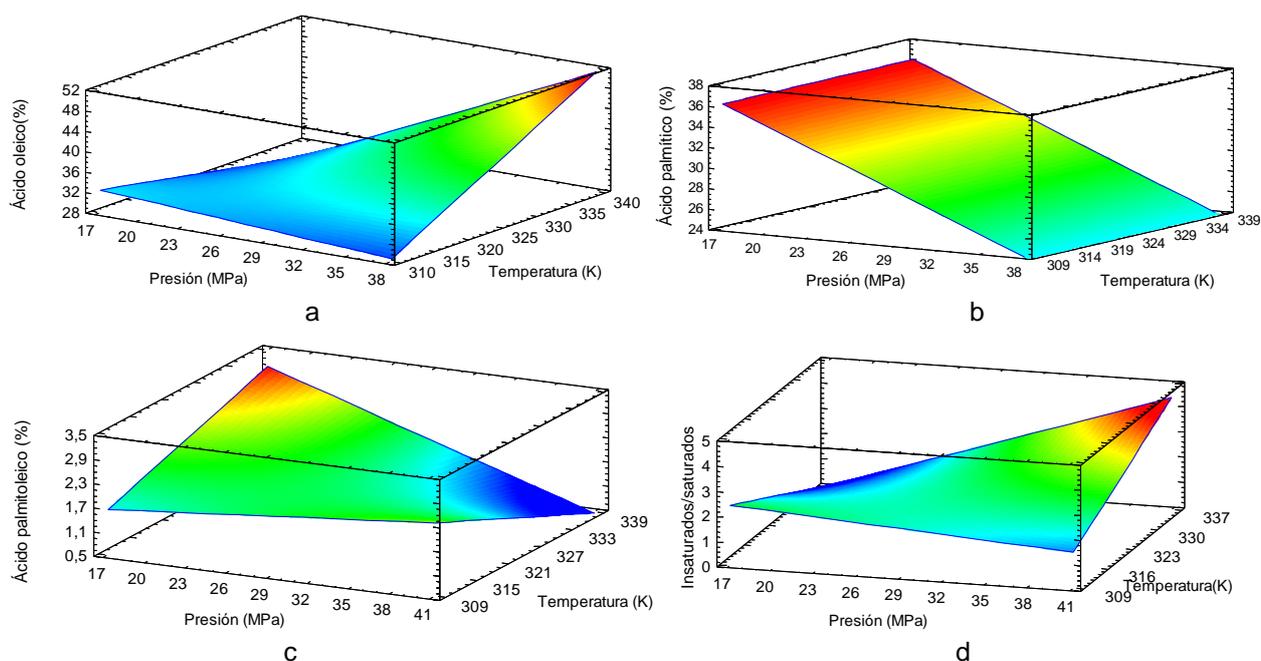


Fig. 5: Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y presión sobre el porcentaje relativo de ácido oleico (a), palmítico (b), palmítico (c) y relación insaturados/saturados (d)

### Composición en esteroides

La composición de esteroides del aceite de semillas de guanábana, se muestra en la Tabla 6. El  $\beta$ -sitosterol fue el esteroide presente en mayor concentración con un contenido promedio de 1,02 mg/mL (1073 mg/kg), seguido del estigmasterol con 0,73 mg/mL (768 mg/kg) y campesterol con una concentración de 0,36 mg/mL (379 mg/kg), para un contenido de esteroides totales entre 1,40 y 2,81 mg/mL (1475-2958 mg/kg). Todos los aceites vegetales contienen cantidades variables de esteroides, sin embargo, el campesterol, estigmasterol y el  $\beta$ -sitosterol son los que se encuentran en mayor proporción. Estos esteroides han sido identificados en el aceite de girasol y soya (Pramparo et al., 2005). En aceite de oliva el  $\beta$ -sitosterol puede llegar a un contenido  $\geq 95\%$ , campesterol  $\leq 4\%$  y estigmasterol  $\leq 0,5\%$  y un contenido de esteroides totales  $\geq 1000$  mg/kg (Boskou, 2015). Por otra parte, en el aceite de semillas de durazno el  $\beta$ -sitosterol es considerado el esteroide mayoritario con 1220 mg/kg (Serhat y Gürü, 2014). El  $\beta$ -sitosterol se caracteriza por tener un gran potencial farmacológico. Pequeñas dosis de este compuesto pueden aumentar la actividad *In vitro* de

proliferación de linfocitos, así como actuar de agente quimiopreventivo de cáncer de colon y de mama (Oliveira et al., 2012). De las distintas formas de los fitosteroles, en particular el estigmasterol se emplea en forma directa para la elaboración de drogas con corticoides. El campesterol se usa en cosmética (Pramparo et al., 2005). Por lo tanto el aceite de semillas de guanábana contiene compuestos de interés para la industria cosmética y farmacéutica. El análisis de varianza, mostró que la presión, la temperatura y sus interacciones, no tuvieron un efecto estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ) sobre el contenido de campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol en el aceite de semillas de guanábana. Por lo tanto, no es posible estimar condiciones de extracción con las cuales se maximice el contenido de estos compuestos en el aceite en los niveles de presión y temperatura evaluados.

Tabla 6: Composición de esteroides en aceite de semillas de guanábana extraído con CO<sub>2</sub>-SC

T (K)	Presión (MPa)	Campesterol	Estigmasterol	$\beta$ -Sitosterol
		Concentración mg/mL de aceite		
313	200	0,19	0,52	0,70
333	200	0,45	1,00	1,36
313	350	0,30	0,64	0,95
333	350	0,26	0,57	0,83
323	169	0,40	0,88	1,18
323	381	0,40	0,68	0,95
309	275	0,50	0,88	1,30
337	275	0,42	0,70	0,95
323	275	0,30	0,75	1,00

## CONCLUSIONES

Se obtuvo un aceite a partir de un residuo agroindustrial como las semillas de guanábana, utilizando CO<sub>2</sub>-SC como solvente. Los resultados mostraron que un modelo lineal de primer orden, describe de forma adecuada la extracción del aceite. Solamente la presión tuvo un efecto positivo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el rendimiento en aceite. Se predijo que los parámetros de extracción óptimos dentro de los intervalos experimentales son 38,1 MPa y 323 K, alcanzando un rendimiento del 12,86 %. Los resultados del modelamiento cinético mostraron que el modelo de Sovová describió en un 98,9% el comportamiento de la cinética experimental de la extracción. El aceite de semillas de guanábana presentó como ácido graso mayoritario el ácido oleico, seguido del palmítico, linoleico y en menor proporción el ácido esteárico, palmítoleico, linolénico y dodecanoico. La presión y temperatura supercríticas tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de ácido oleico, palmítico, palmítoleico y sobre la relación de insaturados/saturados. De esta manera, la composición en algunos ácidos grasos del aceite puede modificarse por variaciones en la presión y la temperatura. Además se encontró la presencia de  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y campesterol en el aceite. Por lo tanto, el aceite de semillas de guanábana obtenido con CO<sub>2</sub>-SC, es un aceite vegetal libre de solventes con una composición rica en ácidos grasos insaturados y en esteroides, lo cual permite inferir que tiene potencial para ser usado como ingrediente natural en industrias como la alimentaria, farmacéutica o cosmética.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías de Colombia y a la Universidad de Nariño por el apoyo financiero para la ejecución del presente proyecto de investigación código 2013000100001.

## REFERENCIAS

- Adepoju, T. F., Olawale, O., Okunola, A. A. y E. M. Olatunji, Solvent extraction of oil from soursop oilseeds & its quality characterization, *International Journal of Sustainable Energy and Environmental Research*: 3(2), 80-89 (2014)
- Azmir, J., Zaidul, I., Sharif, K. M., Uddina, M. S., Jahurul, M. H., Jinap, S. y A. Mohamed, Supercritical carbon dioxide extraction of highly unsaturated oil from *Phaleria macrocarpa* seed, *Food Research International*: 65, 394–400 (2014)

- Boskou, D., Olive oil: Properties and processing, Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition, G. Talbot (Ed.), Vol. 290, Woodhead Publishing Limited is an imprint of Elsevier, Thessaloniki, Hellas (2015)
- Cardoso, R., Rossi, M., Gimenez, L., Jagadevan, S., Machado Giufrida, W. y S. Davantel, Extraction of passion fruit seed oil using supercritical CO<sub>2</sub>: a study of mass transfer and rheological property by Bayesian inference, *Grasas y Aceites*: 64(4), 400-406 (2013)
- Castro, H., Benelli, P., Ferreira, S. y F. Parada, Supercritical fluid extracts from tamarillo (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp and its application as protectors against lipid oxidation of cooked beef meat, *The Journal of Supercritical Fluids*: 76, 17– 23 (2013)
- Castro, M. y C. Herrera, Composición, caracterización y potencial aterogénico de aceites, grasas y otros derivados producidos o comercializados en Costa Rica, *Acta Médica Costa Rica*: 47, 36-42 (2005)
- Cerón, A., Osorio, O. y A. Hurtado, Identificación de ácidos grasos presentes en el aceite extraído a partir de semillas de guanábana (*Annona muricata*), *Revista de Ciencias Agrícolas*: 21(1), 81-87 (2012).
- Christie, W. W, Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids, *Lipids*: 33, 343-353 (1998)
- Dangarembizi, R., Chivandi, E.; Dawood, S.; Erlwanger, K.; Mazuru, G.; Michael, M. y A. Samie, The fatty acid composition and physicochemical properties of the underutilised *Cassia abbreviata* seed oil, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*: 28(3), 1005-1008 (2015)
- de Melo, A., Silvestre, A. y C.Silva, Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology, *The Journal of Supercritical Fluids*: 92, 115–176 (2014)
- Dhara, R., Bhattacharyya, D. y M. Ghosh, Analysis of Sterol and Other Components Present in Unsaponifiable Matters of Mahua, Sal and Mango Kernel Oil, *Journal of Oleo Science*: 59(4), 169-176 (2010)
- Draelos, Z., *Cosmeceuticos: Serie dermatología estética*. España: Esvier (2006)
- Hurtado-Benavides, A; Martín-Álvarez, P.; Vázquez, L.; Reglero, G.; Señoráns, F. y E. Ibañez. Optimization of Countercurrent Supercritical Fluid Extraction of Minor Components from Olive Oil. *Current Analytical Chemistry*: 10, 78-85 (2014)
- Ibañez, E., Hurtado Benavides, A.; Señoráns, F. y G.Reglero, Concentration of Sterols and Tocopherols from Olive Oil with Supercritical Carbon Dioxide, *JAOCS*: 79(12), 1255-1260 (2002)
- Liu, G., Xu, X., Gong, Y., He, L. y Y. Gao, Effects of supercritical CO<sub>2</sub> extraction parameters on chemical composition and free radical-scavenging activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil, *Food and Bioproducts Processing*: 90, 573–578 (2012)
- Liu, S., Yang, F., Zhang, C., Ji, H., Hong, P. y C. Deng, Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil by response surface methodology, *The Journal of Supercritical Fluids*: 48, 9–14 (2009)
- Lafont, J. J., Páez, M. S. y A. A. Portacio, Extracción y Caracterización Físicoquímica del Aceite de la Semilla (Almendra) del Marañón (*Anacardium occidentale* L). *Información Tecnológica*: 22(1), 51-58 (2011)
- Martínez, H. A., Magalhães, P., Queiroga, C., Peixoto, C., Oliveira, A. y F.Cabrala, Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds, *The Journal of Supercritical Fluids*: 55, 998–1006 (2011)
- Mohsenin, N. N., *Physical Properties of Plant and Animal Materials: structure, physical characteristics and mechanical properties*, Gordon and Breach Science Publishers, New York, EE.UU (1986)
- Moreno, D. M. y N. Jorge, Soursop (*Annona muricata* L.) and sugar apple (*Annona squamosa* L.) Antioxidant activity, fatty acids profile, *Nutrition & Food Science*: 42(6), 434 - 441 (2012)
- Nik Norulaini, N. A., Md Zaidul, I. S., Anuar, O. y A. K. Mohd Omara, Supercritical enhancement for separation of lauric acid and oleic acid in palm kernel oil (PKO). *Separation and Purification Technology*: 39, 133–138 (2004)

- Naik, S. N., Lentz, H. y R. C. Maheshawari, Extraction of perfumes and flavors from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid–vapor equilibrium conditions, *Fluid Phase Equilibria*:49, 115–126 (1989)
- Okoro, C. K., Influence of Moisture Content Variation on the Percentage Oil Yield of Soursop (*Annona muricata*) Seeds, *International Journal of Scientific & Engineering Research*: 4(7), 1288-1292 (2013)
- Oliveira, E. M., Freitas, S. L., Martins, F. S., Couto, R. O. y J. R. Paula, Isolation and quantitative HPLC-PDA analysis of  $\beta$ -sitosterol in phytopharmaceutical intermediate products from *Vernonanthura*. *Química Nova*: 35(5), 1041-1045 (2012)
- Palou, A., Picó, C., Bonet, M., Oliver, P., Serra, F., Rodríguez, A., y J. Ribot, *El libro blanco de los esteroides vegetales*, 2a edición (Sana El Hid.), España (2005)
- Pramparo, M., Prizzon, S., y M. Martinello, Estudio de la purificación de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides a partir del destilado de desodorización, *Grasas y Aceites*: 56(3), 228-234 (2005)
- Rabasco, A. y M. L. González, Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations, *Grasas y Aceites*: 51(1), 74-96 (2000)
- Ragasa, C., Soriano, G., Torres, O., Don, M. J. y C. C. Shen, Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacognosy Journal*: 4(32) (2012)
- Rezanka, T., Matoulkova, D., Kolouchova, I., Masák, J. y K. Sigler, Brewer's Yeast as a New Source of Palmitoleic Acid—Analysis of Triacylglycerols by LC–MS, *Journal of the American Oil Chemists' Society*: 90, 1327–1342 (2013)
- Ruttarattanamongkol, K., Siebenhandl-Ehn, S., Schreiner, M. y A. M. Petrasch, Pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction, physico-chemical properties and profile characterization of *Moringa oleifera* seed oil in comparison with conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*: 58, 68–77 (2014)
- Sacilik, K., Ozturk, R. y R. Keskin, Some Physical Properties of Hemp Seed, *Biosystems Engineering*, 86(2), 191-198 (2003)
- Sánchez-Camargo, A. P., Martínez-Correa, H. A., Paviani, L. C. y F. A. Cabral. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *The Journal of Supercritical Fluids*: 56, 164–173 (2011)
- Sahena, F., Zaidul, I., Jinap, S., Karim, A., Abbas, K., Norulaini, N. y A. Omar, Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*: 95, 240–253 (2009)
- Serhat, M. y M. Gürü, Extraction of oil and  $\beta$ -sitosterol from peach (*Prunus persica*) seeds using supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*: 92, 319–323 (2014)
- Solís, J. A., Amador, C., Hernández, M. R. y M. R. Hernández, Caracterización físicoquímica y comportamiento térmico del aceite de “almendra” de guanábana (*Annona muricata*, L), *Grasas y Aceites*: 61(1), 58-66 (2010)
- Solís, J., Hernández, M. y M. Durán, Chapter 124 - Soursop (*Annona muricata* L.) Seeds, Therapeutic and Possible Food Potential. En *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (págs. 1045-1052) (2011)
- Sovová, H., Aleksovski, S. A., Bocevska, M. y R. P. Stateva, Supercritical fluid extraction research, *Chemical Industry & Chemical, Engineering Quarterly*: 12, 168–174 (2006)
- Stryjek, R., y Vera, J. H. PRSV: An Improved Peng–Robinson Equation of State for Pure Compounds and Mixtures. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*: 64 (1986)
- Tan, C. S. y D. C. Liou, Modeling of desorption at supercritical conditions. *American Institute of Chemical Engineers Journal*: 35, 1029–1031 (1989)
- Velasco, R. J., Villada, H. S. y J. E. Carrera, Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*: 18(1), 53-66 (2007)
- Xu, G., Lei Guan, L., Sun, J. y Z. Y. Chen, Oxidation of Cholesterol and  $\beta$ -Sitosterol and Prevention by Natural Antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 57, 9284–9292 (2009)