

Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de extractos (CO₂ supercrítico y convencional) de harina de *Brosimum alicastrum*

Bioactive compounds and antioxidant activity from flour extracts (supercritical CO₂ and conventional) of *Brosimum alicastrum*

MOO-HUCHIN, Mariela Irene†*, COHUO-HUCHIN, María del Rosario y MOO-HUCHIN, Victor Manuel

Universidad Tecnológica del Poniente, Calle 29 Las Tres Cruces, C. P. 97800, Maxcanú, Mérida, Yucatán, México.

Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Mérida, km 5 Mérida-Progreso, C.P. 97118, Mérida, Yucatán, México.

ID 1^{er} Autor: *Mariela Irene, Moo-Huchin* / **ORC ID:** 0000-0003-1805-7948

ID 1^{er} Coautor: *María del Rosario, Cohuo-Huchin*

ID 2^{do} Coautor: *Victor Manuel, Moo-Huchin* / **ORC ID:** 0000-0002-9365-8922

M. Moo, M. Cohuo y V. Moo

mariel_15204@hotmail.com

J. Olives (Dr.). Ciencias biológicas y químicas. Proceedings-©ECORFAN-Mexico, 2019.

Abstract

The ramon (*Brosimum alicastrum*), is a predominant tree in the Yucatan Peninsula and the fruit seed was used as a food source for the Mayan native population. Currently, the ramon seed has aroused the interest of many researchers for its antioxidants content; however, there isn't enough available information about it. The information on the characterization of the ramon flour would provide information on its functional value for the development of functional foods. To generate such information it is important to use an extraction method for the quantitative analysis of its interest compounds. Therefore, the objective of this work was to characterize the ramon flour extracts (CO₂ supercritical and conventional, E-SL) through its antioxidants compounds content and antioxidant activity. In this work, a two stages supercritical CO₂ sequential extraction method was used; a first extraction (E-CO₂) without co-solvent, followed by an extraction with co-solvent (E-CO₂-CO); prior the second extraction, the dynamic time of extraction and the effect of various proportions of aqueous ethanol (25%, 50%, 75%) and absolute ethanol on the total fenolic content was evaluated (CFT). The analyzed response variables for the E-CO₂-CO extract characterization were compared with the results obtained from the E-SL extract. In the first stage, a 30 minutes dynamic time was established to obtain an antioxidant extract that was characterized by HPLC (tocopherols, carotenoids, squalene, phytosterols). Fucosterol was identified as the major compound with 5,997.27 mg/100 g dry extract, followed by the stigmasterol with 561.45 mg/100 g dry extract. In the second stage, the use of absolute EtOH as a co-solvent improved the extraction yield of CFT (from 2 to 12 mg EAG/100 g of EAG flour/100 g flour, 25 % and absolute ethanol, respectively). The E-CO₂-CO crude extract showed a high content of total flavonoids (2.97± 0.12 g quercetin/100 g dry extract) and hydrolyzables tannins with 1.72 ± 0.17 g tannic acid/100 g dry extract. The supercritic CO₂ extract (E-CO₂-CO) showed high antioxidant activity measured with the ABTS⁺ assay (649.29±20.50 mM trolox/100 g dry extract). The obtained results are important to consider the ramon flour as an ingredient for the development of functional foods and aperitives.

Ramon flour, Bioactive compounds, Antioxidant activity

Introducción

En la actualidad existe un interés en la búsqueda de nuevas materias primas de origen vegetal o subproductos agroindustriales (cáscaras, semillas, granos y frutos) como fuente de compuestos o ingredientes bioactivos para ser usadas en el desarrollo de alimentos funcionales o como nutraceuticos tales como barritas, panes, aperitivos funcionales y extractos estandarizados en tabletas, cuyo consumo ha logrado demostrar una mejora de la salud humana (Montemurro, Pontonio, y Rizzello, 2019).

Las investigaciones actuales demuestran que la mejora y conservación de la salud, está asociado a la ingesta de nutrientes y sustancias no esenciales como los compuestos bioactivos, que son capaces de modular ciertas funciones en el organismo, reduciendo el riesgo de padecer enfermedades degenerativas conservando en buen estado la salud humana (El-akabawy y El-sherif, 2019). Entre los compuestos más estudiados se encuentran los compuestos fenólicos; los cuales han demostrado ser potentes antioxidante naturales, capaces de eliminar o estabilizar radicales libres (principal causa para la generación de enfermedades crónico-degenerativas) (Zaidi et al., 2019). Estudios confirman que la función antioxidante de los compuestos fenólicos se lleva a cabo por diferentes mecanismos de acción como secuestradores de radicales libres, capacidad para la modulación de enzimas, quelación metálica, así como sus efectos sobre las vías de señalización celular y en la expresión de genes (Belščak-Cvitanović., et al 2018; Rodrigo, Miranda, y Vergara, 2011).

El *Brosimum alicastrum* o Ramón es un árbol predominante en la península de Yucatán, que desde tiempos ancestrales sus semillas fueron usadas como una alternativa al maíz para el consumo humano. En la actualidad son muy pocas las poblaciones nativas de Yucatán que lo utilizan como fuente de alimento; sin embargo, sólo existe información respecto al valor nutrimental de su harina, pero escasa información respecto al contenido de compuestos con propiedades útiles a la salud. Se ha informado que la semilla de ramón contienen vitaminas, minerales, proteínas, etc. (Carter, 2015). En un estudio se ha informado que las semillas tostadas de Ramón adquiridos al Maya Nut Institute contienen ácidos fenólicos que en alimentos funcionales ha demostrado tener efectos deseables, reduciendo el riesgo de padecer enfermedades degenerativas (Ozer, 2016).

Por su parte, Moo-Huchin et al. (2019) también reportaron que las semillas de Ramón muestran mayor contenido de ácido clorogénico y que fue capaz de retardar la oxidación de lípidos de carne de cerdo. Sin embargo, la información disponible no es suficiente para dar por hecho el conocimiento de su composición bioactiva.

Disponer de un método de extracción es importante para el aislamiento e identificación de compuestos fenólicos. Aunque las técnicas convencionales han sido muy utilizadas por su eficiencia, facilidad de preparación de extractos y una amplia aplicación; dichas técnicas implican el uso de disolventes como alcoholes, acetona, éter di-etílico y acetato de etilo que resultan ser tóxicos para el consumo; además de que los tiempos de extracción suelen ser muy prolongados con la posibilidad de perder compuestos de interés, durante la extracción (Prado et al., 2015). Por otra parte, cuando se utilizan técnicas no convencionales es posible obtener otros metabolitos de interés con posibles aplicaciones en varias áreas, tal es el caso del uso de la extracción con CO₂ supercrítico. La extracción con fluido CO₂ supercrítico proporciona características atractivas que superan muchas de las limitaciones de las extracciones convencionales (Azmir et al., 2013), siendo un método que permite recuperar extractos de mayor pureza, es selectivo a ciertos compuestos, permite el uso de solventes generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) y bajo costo relativo a la producción de metabolitos (Cadena-carrera et al., 2019). Por estas razones, la presente investigación tiene como objetivo caracterizar los extractos de la harina de ramón obtenidos por extracción con CO₂ supercrítico y extracción sólido-líquido mediante el contenido de compuestos fenólicos, fitoesteroles, escualeno, carotenoides y tocoferoles.

Metodología a desarrollar

Obtención de la harina

Las semillas del árbol de Ramón (*Brosimum alicastrum*) se recolectaron en la región de Calkiní, Campeche en septiembre de 2018. Las semillas fueron seleccionadas considerando que fueran libres de daño mecánico y con un tamaño homogéneo; las cuales fueron acondicionadas, retirando la testa y secadas a 70 °C durante 72 h hasta obtener el 10% de humedad. Al finalizar el tiempo de secado, las semillas fueron trituradas y molidas hasta obtener el polvo. El polvo que se obtuvo se pasó por un tamiz de malla No. 100 (0.149 mm), hasta obtener la harina que fue almacenada a 4°C en bolsas de polietileno.

Preparación y obtención de los extractos de harina

Los extractos de harina fueron obtenidos a partir de dos métodos de extracción: CO₂ supercrítico y extracción sólido-líquido. En este trabajo se realizó una extracción CO₂ supercrítico secuencial de dos etapas a modo estática-dinámica para extraer selectivamente los principales compuestos bioactivos de la harina de ramón. Se realizó una primera extracción con solo CO₂ supercrítico sin co-solvente; mientras que la segunda extracción consistió en exponer la harina resultante de la primera extracción a una nueva extracción con CO₂ supercrítico usando etanol absoluto como co-solvente.

Procedimientos de extracción

Extracción sólido-líquido

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Camaal-Chuc et al. (2018), utilizando etanol acuoso y agitación mecánica. Todas las extracciones fueron realizadas por triplicado.

El rendimiento de extracción (%) para extractos obtenidos por ambos métodos, fue determinado por la ecuación presentada a continuación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{masa del extracto seco (g)}}{\text{masa de la muestra (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Extracción secuencial con CO₂ supercrítico

La extracción con CO₂ supercrítico se realizó usando un equipo de extracción modelo SFT-150 SFE/SFR System, con una celda de extracción de 0.1 l, separador de CO₂ y colector de extracto, tanque de aire y CO₂, bombas, medidor de flujo. Los principales procedimientos de extracción fueron: cargar la cámara de extracción con la harina de ramón, cambiar las condiciones de CO₂ en el tanque a condiciones supercríticas (esto se logra por un enfriamiento, aumentando la presión y finalmente aumentando la temperatura). Se permitió que el CO₂ en las condiciones supercríticas elegidas entre a la cámara de extracción para la extracción estática o remojo, luego se deja el paso del CO₂ supercrítico a través de la muestra para la extracción dinámica. El CO₂ que contiene el extracto se dirige a la primera cámara de separación, en donde el gas se expande a presión atmosférica y se obtiene el extracto.

El procedimiento de extracción se llevó a cabo en dos etapas, la primera etapa se realizó con el propósito de recuperar y caracterizar el extracto crudo lipofílico de la harina dejando expuestas los solutos de mayor polaridad a una segunda extracción usando CO₂ supercrítico con co-solvente en el sistema. En base a esta extracción, se realizó un estudio cinético, con la finalidad de determinar el tiempo de extracción dinámica para realizar la segunda etapa. Las condiciones utilizadas en la extracción CO₂ supercrítico (E-CO₂) son las descritas por Martínez-Correa et al., (2012a y 2017b) y Uribe et al., (2011), con algunas modificaciones. 50 g de harina fina se sometió a una extracción estática a 60 °C, 40 MPa por 30 min. Posteriormente, se hizo pasar el flujo de CO₂ (1.8 g/min) a través de la muestra durante 60 min (extracción dinámica). Los extractos fueron recuperados en un vial ámbar por despresurización del sistema y fueron pesados para calcular el rendimiento de extracción. Los extractos secos obtenidos se reconstituyeron en EtOH/agua (1:1 v/v) y almacenados en congelación -20°C, hasta su uso.

En un trabajo realizado por Monroy et al. (2016), mencionan que el uso de co-solvente en el sistema de extracción supercrítica es capaz de modificar la polaridad del CO₂, mejorando el poder de solvatación e incrementando el rendimiento de extracción de compuestos. Por lo que convierte al método, una alternativa para la extracción de compuestos de polaridad media a alta como los compuestos fenólicos y flavonoides. Por lo tanto, en este trabajo se sugirió una segunda extracción con CO₂ supercrítico usando co-solvente (E-CO₂-Co).

En la segunda etapa de extracción (E-CO₂-Co), se realizó un experimento preliminar usando varias concentraciones de etanol/agua y etanol absoluto, para evaluar su efecto, con la finalidad de determinar la concentración de etanol que permita obtener mayor rendimiento de compuestos fenólicos. La extracción se llevó a cabo con la harina resultante (20 g) de la primera extracción, lo cual se mezcló con 20 ml de solvente (EtOH al 25, 50, 75 y 100 %), seguido de la extracción CO₂ supercrítica previamente descrita en esta sección, utilizando una temperatura de 40°C, presión 20MPa, extracción estática de 30 min y la extracción dinámica por 30 min. Cada extracción se realizó por triplicado.

El extracto seco obtenido se reconstituyó con 4 ml etanol/agua (1:1, v/v) y fue analizado por su contenido de compuestos fenólicos totales utilizando una reacción colorimétrica con Folin-Ciocalteu descrita por Moo-Huchin et al., (2014). Con base a los resultados, en este trabajo se determinó la concentración de co-solvente que obtuvo mayor contenido de compuestos fenólicos totales. Tras la determinación de la concentración del co-solvente, se realizaron otras extracciones (CO₂ supercrítico + co-solvente) y se prepararon los extractos para su caracterización.

Caracterización del extracto por métodos analíticos y bioactividad.

Los extractos E-CO₂ obtenidos en la primera etapa fueron caracterizados a través del contenido de carotenoides (α -carotenos, luteína), tocoferoles (α -tocóferoles, γ -tocóferol), fitosteroles (estigmasterol, fúcoesterol) y escualeno siguiendo las metodologías descritas por Can-Cauich et al. (2019).

Mientras que los extractos obtenidos en la extracción sólido-líquido (E-SL) y en la segunda etapa de extracción supercrítica (E-CO₂-Co) se caracterizaron y compararon por su contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, taninos condensados, taninos hidrolizables y la actividad antioxidante de acuerdo a la metodología reportado por Moo-Huchin et al. (2014).

Análisis estadístico

Se realizaron tres extracciones por tratamiento y las mediciones fueron realizadas por triplicado para cada repetición. Los resultados se reportaron como promedio \pm desviación estándar (DE). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) mediante el software estadístico Statgraphics Plus versión 2.1 (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA) y se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, en donde las diferencias con $p < 0.05$ se consideraron significativas.

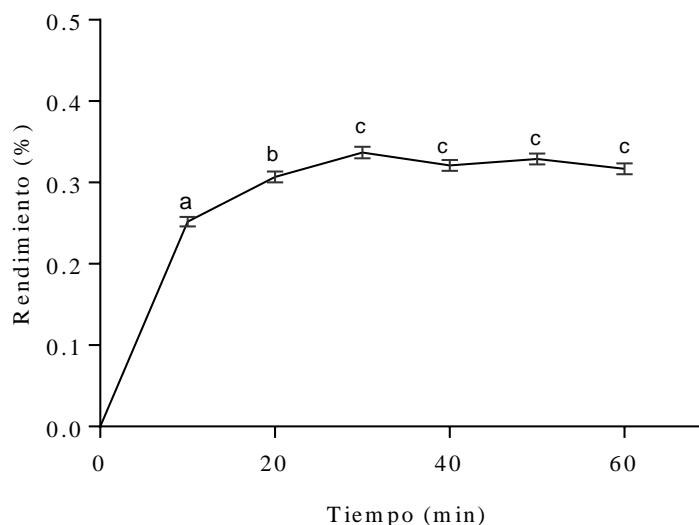
Resultados

Primera etapa: cinética de extracción supercrítica (E-CO₂)

Para la obtención de extractos ricos en compuestos activos a tiempos cortos en un sistema de extracción CO₂ supercrítico sin tener un gasto excesivo de CO₂ que comprometa la viabilidad económica, se ha sugerido realizar un estudio cinético, como una primera etapa para determinar el tiempo de extracción dinámico, lo cual corresponde a un tiempo en la que se permite el paso de flujo constante del CO₂ supercrítico a través de la muestra expuesta en una celda de extracción hasta la extracción completa (Uribe et al., 2011). Entonces, en este trabajo se justifica la necesidad de determinar el tiempo de extracción dinámica con CO₂ supercrítico, considerando como criterio el rendimiento de extracción máxima acumulado.

La figura 3.1 muestra el comportamiento de los valores de rendimiento de extracto crudo acumulado de harina en un intervalo de tiempo de extracción con CO₂ supercrítico de 0 a 60 min.

Figura 3.1 Comportamiento de los valores de rendimiento de extracción acumulado de harina en función del tiempo de extracción dinámica CO₂ supercrítico a 60° C y 40 MPa. Letras diferentes en cada intervalo de tiempo indican valores significativamente diferentes ($P \leq 0.05$)



Por otra parte, se ha mencionado por algunos autores que la curva general de extracción CO₂ supercrítico es caracterizada por tres períodos basados en la transferencia de masa: a) extracción de solutos que se encuentran en la superficie de la matriz vegetal (extracción lineal o constante, EL); b) agotamiento parcial de los solutos en la superficie (extracción descendente, ED) y finalmente, c) extracción completa de algún metabolito extraíble (controlada por difusión, EC) ó por que el sistema ha llegado a la capacidad máxima de extracción (CME) (López-Padilla, Ruiz-Rodriguez, Reglero, y Fornari, 2017; Rocha-Uribe et al., 2019; Sovová, Nobre, y Palavra, 2016). Considerando lo anterior y de acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, se observó que durante los primeros 10 min, el rendimiento acumulado de extracción incrementa de forma lineal respecto al tiempo (EL); mientras que la región ED se mostró entre 10 y 30 min de extracción. Tras 30 min de extracción, el rendimiento acumulado se mantuvo sin cambios significativos hasta 60 min (EC ó CME). Acorde a los valores de rendimiento acumulado, la mayor recuperación de extraíbles (0.35%) resultó a 30 min; lo cual fue definido como el tiempo de extracción dinámica.

El valor de rendimiento alcanzado en este trabajo es comparable a lo reportado por Santos et al. (2017) en extractos de raíz de *Rumex Acetosa L.* (de 0.2 a 8.3%) y Lúcia et al. (2019) quienes obtuvieron un rendimiento que varió de 0.73% (15 MPa, 60°C con 2 ml/ min) a 1.73% (20 MPa, 40°C, 4 ml/ min) en extracto de hojas de *Eugenia involucrata*. Este trabajo confirma la idea de la necesidad de determinar el tiempo de extracción dinámico con CO₂ supercrítico previo a utilizar un método estandarizado para la obtención y caracterización de extractos de matrices vegetales.

Caracterización del extracto por su contenido de carotenoides, tocoferoles, fitosteroles y escualeno por HPLC

Las semillas y nueces son bien conocidas por sus propiedades farmacológicas para la conservación de la salud humana debido a la presencia de compuestos bioactivos minoritarios con características liposolubles, como fitosteroles, tocoferoles y carotenoides. Conjuntamente, estos compuestos han demostrado ser potentes antioxidantes, que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades causadas por el estrés oxidativo y/o como aditivos en los alimentos retrasando la oxidación lipídica (Can-Cauich et al., 2019). Por ello, dentro de la primera etapa de este estudio de investigación se llevó a cabo la recuperación y caracterización del extracto crudo lipofílico de harina de ramón obtenido con CO₂ supercrítico sin co-solvente, con el propósito de separar esta fracción y dejar expuestas a los más polares para una segunda extracción usando un modificador en el sistema de extracción. El extracto de la harina obtenido se caracterizó por su contenido de carotenoides, tocoferoles, fitosteroles y escualeno (Tabla 3.1).

Los compuestos predominantes en el extracto crudo de Ramón fueron esteroides, principalmente el fucosterol con 5,997.27 mg/100 g extracto seco y estigmasterol con 561.45 mg/100 g extracto seco, seguido por los carotenoides y escualeno. De acuerdo a algunos trabajos publicados para extractos de nueces y semillas, la presencia de fucosterol es muy poco o escasamente reportado, debido a que los principales esteroides que se han reportado en variedades de nueces, pistachos, girasol, almendra y semillas de calabaza son β -sitosterol y estigmasterol, incluso a concentraciones más bajas a los reportados en este trabajo (Vu et al., 2019; Wang et al., 2019). Mientras que Can-Cauich et al. (2019) lo reporta en aceites de semillas de calabaza y Wong et al. (2018) en algas marinas, haciendo énfasis como fuente principal de fucosterol. Las organizaciones reguladoras como la Autoridad Europea para la Seguridad de los alimentos (EFSA) y Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), recomiendan incorporar a la dieta la ingesta de fitosteroles, debido a algunos estudios que se han dado a conocer sobre los efectos favorables en la disminución de la absorción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el intestino, causando un descenso en la concentración de colesterol en la sangre; previniendo riesgo de enfermedades cardiovasculares (Bot et al., 2018). Por lo tanto, los resultados mostrados son importantes para considerar la harina de ramón como ingrediente bioactivo para el desarrollo de alimentos funcionales o en su caso incorporarlos a alimentos específicos.

Tabla 3.1 Contenido de carotenoides, tocoferoles, fitosteroles y escualeno de extractos de harina *Brosimum alicastrum* obtenido por E-CO₂

Composición	Contenido (mg/100 g extracto seco)
Compuestos Fenólicos Totales	1.30±0.05
Luteína	45.34 ± 0.33
β -caroteno	68.24 ± 0.93
α -tocoferol	34.64 ± 2.34
γ -tocoferol	29.12 ± 0.47
Estigmasterol	561.45 ± 60.08
Fucosterol	5,997.27 ± 120.49
Escualeno	53.32 ± 0.92

Los valores presentados son medias \pm desviación estándar (n=3)

Segunda etapa: Estudio preliminar del efecto del etanol como co-solvente en la extracción con CO₂ supercrítico (E-CO₂-Co)

Una de las limitaciones que presenta el sistema CO₂ supercrítico es la poca selectividad ante los compuestos orgánicos de mediana o alta polaridad. Por ello, se han buscado estrategias usando modificadores o co-solventes dentro del proceso para mejorar la eficiencia de extracción y la selectividad para compuestos bioactivos de matrices vegetales (Jiao y Kermanshahi, 2018).

En este trabajo, se realizaron pruebas de extracción preliminares con el objetivo de determinar la concentración de co-solvente para la recuperación máxima de compuestos fenólicos totales presentes en la harina.

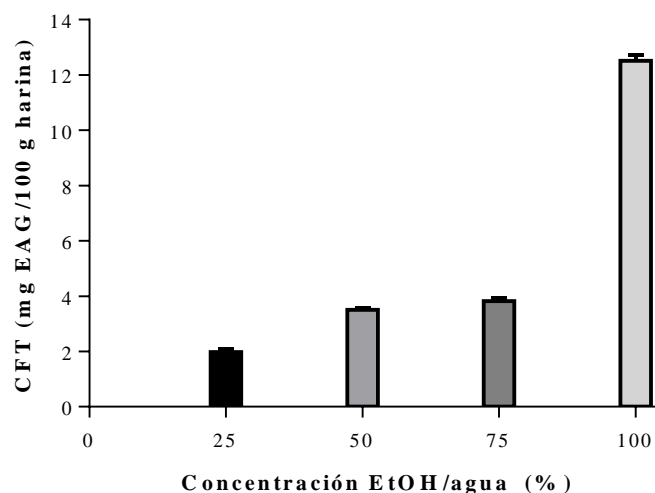
La figura 3.2 muestra el efecto de varias concentraciones de EtOH-agua y etanol absoluto en la extracción de polifenoles de la muestra de harina de *B. alicastrum*. A diferencia de las mezclas etanol en agua, el etanol absoluto exhibió la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales de la harina de ramón que varió de 2 hasta 12 mg EAG/100 g de harina. De acuerdo a algunos autores los grupos -OH del etanol en estado supercrítico son capaces de formar enlaces de hidrógeno con los solutos, aumentando la solubilidad y la recuperación de los compuestos fenólicos del medio extractor (Lu, Boughner, Liotta, y Eckert, 2002; Valle, Robert, y Fuente, 2018).

Estos resultados concuerdan con los reportados por Alves (2018), quién demostró que el uso de diferentes modificadores en el sistema supercrítico, el etanol fue capaz de mejorar el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos en semillas de chía (*Salvia Hispanica L.*). Cadena-Carrera et al. (2019) también reporta un efecto favorable y significativo del EtOH en la extracción de compuestos fenólicos en hojas de guayusa (*Ilex guayusa Loes*).

Por otra parte, Reder et al. (2018) en su trabajo describe que el etanol puede causar un hinchamiento de las partículas mejorando la solubilidad y difusión de los compuestos fenólicos. Estos resultados concuerdan con los trabajos reportados por Pimentel-Moral et al.(2018) y Reder et al. (2018), donde obtuvieron mayor contenido de compuestos fenólicos cuando se usó etanol como co-solvente.

El uso de EtOH, como co-solvente no solo se ha limitado a la extracción de compuestos polares (Bitencourt et al., 2018), también se ha usado para la recuperación de compuestos lipofílicos y otros compuestos bioactivos, como reportan (Valle et al., 2018; Xie, Cahoon, Zhang, y Ciftci, 2019). En el presente trabajo de investigación se demuestra que el uso de co-solvente (EtOH) en un sistema de CO₂ supercrítico como un factor importante que favorece el incremento de la polaridad del CO₂, mejorando significativamente el rendimiento y la selectividad de compuestos fenólicos de los extractos de la harina de *B. alicastrum*.

Figura 3.2 Efecto del etanol en el Contenido de Compuestos Fenólicos Totales (CFT) en la extracción con CO₂ supercrítico (E-CO₂-Co), a 40°C y 20MPa



Caracterización del extracto por su contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y su actividad antioxidante

En la tabla 3.2 se muestra la comparación del contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos de Ramón obtenidos por (E-CO₂-Co) y extracción sólido-líquido (E-SL). El rendimiento de extracción obtenido por E-CO₂-Co fue de 0.69 % (p/p, respecto a la muestra seca); mientras que la E-SL resultó en un rendimiento de extracción promedio de 18 % (p/p, respecto a la muestra seca).

El valor del rendimiento alcanzado en la extracción E-CO₂-Co fue mayor al reportado por Radojkovi et al., (2016); cuyos valores van de 0.30 % (20 MPa, 60 min) hasta 0.65 % (40MPa, 90 min) para extractos de hojas de *Morus*. Este valor de rendimiento también fue superior a lo alcanzado en la extracción CO₂ supercrítico sin co-solvente (primera etapa). Estos resultados indican que la mayoría de los compuestos bioactivos presentes en la harina de ramón son compuestos que tienen carácter de mediana hasta alta polaridad, demostrando que el uso de etanol en un sistema supercrítico mejora la recuperación de estos compuestos.

De acuerdo con los resultados, el contenido de compuestos fenólicos totales del extracto alcohólico obtenido por extracción sólido-líquido fue superior al extraído por CO₂ supercrítico (7.19 ± 0.06 y 2.45 ± 0.15 g EAG/ 100 g extracto seco, respectivamente). Los valores del contenido de compuestos fenólicos totales del extracto E-CO₂-Co reportados en este trabajo resultaron ser más altos a lo encontrado por Goyeneche et al., (2018) y Reder et al., (2018) para extractos de hojas de rábano y hojas de *Arctium Lappa* (conocida como bardana en Brasil) obtenidas por CO₂ supercrítico.

En otro resultado, el contenido de taninos condensados de los extractos fue similar entre ambos métodos de extracción. Cuando se utilizó la extracción E-CO₂-Co, el extracto recuperado resultó con mayor contenido de flavonoides totales y taninos hidrolizables con valores de 2.97 ± 0.12 g QE/100 g extracto seco y 1.72 ± 0.17 g ácido tánico/100 g extracto seco, respectivamente. El valor del contenido de flavonoides totales reportado en este trabajo resultó superior a lo encontrado por Goyeneche et al., (2018) para hojas de rábano.

El efecto positivo en la extracción CO₂ supercrítica con EtOH, se debió a la capacidad en conjunto que presenta el co-solvente y las condiciones del sistema de extracción. Es probable que bajo las condiciones del sistema de extracción CO₂ supercrítica con co-solvente utilizado, existe una interrupción de las interacciones electrostáticas y de van der Waals entre los compuestos no extraíbles (flavonoides) y las cadenas de los polisacáridos (fibra dietética) o proteínas (Palafox-Carlos et al., 2011); lo que permite una mayor recuperación de taninos y flavonoides.

Generalmente, el contenido de compuestos fenólicos está relacionado con la actividad antioxidante de los extractos, en este trabajo la actividad de los compuestos se evaluó utilizando tres ensayos (ABTS, DPPH y poder reductor) que se consideran simples y con alta reproducibilidad. Respecto al ensayo ABTS⁺, la actividad antioxidante del extracto de harina obtenido por E-CO₂-Co presentó el valor más alto de 649.29 ± 20.50 mM Trolox/100 g extracto seco, respecto al E-SL (471.83 ± 3.20 mM ETrolox/100 g extracto seco).

El valor reportado para E-CO₂-Co es mayor a lo reportado por Mazzutti et al., (2019) para extracto de hojas de *Sida Rhombifolia* (360 ± 0.01 mM MET/100g extracto). Como se puede observar en la tabla 2, el extracto E-CO₂-Co obtuvo menor contenido de CFT, pero mayor contenido de flavonoides totales y taninos hidrolizables; lo cual probablemente éstos últimos contribuyen en la mayor actividad antioxidante para E-CO₂-Co.

Además, es posible que la mayor actividad antioxidante se deba a que los extractos E-CO₂-Co presentan un grado de pureza mayor al extracto E-SL y la existencia de un posible sinergismo entre los compuestos.

En cuanto al ensayo DPPH y poder reductor, la actividad antioxidante más alta se obtuvo en los extractos E-SL con 83.28 ± 3.63 mM Trolox/100 g extracto seco y 86.82 ± 1.95 mg ácido ascórbico/100 g ES, respectivamente cuando se compara con E-CO₂-Co. La mayor actividad antioxidante DPPH para E-SL puede atribuirse al contenido de compuestos fenólicos y posiblemente a otros compuestos que fueron extraídos (proteínas, péptidos, ácidos orgánicos, etc), como reportan (Mazzutti et al., 2019; Sanjaya et al., 2014).

Tabla 3.2 Contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, taninos condensados e hidrolizables y actividad antioxidante de extractos *Brosimum alicastrum* obtenidos por E-CO₂-Co y E-SL

Compuestos fenólicos	Métodos de extracción	
	E-CO ₂ -Co	E-SL
Compuestos fenólicos totales (g ácido gálico/100g ES)	2.45± 0.15a	7.19± 0.06b
Flavonoides totales (g Quercetina/100 g ES)	2.97± 0.12b	2.01 ± 0.04a
Taninos condensados (g Catequina/100 g ES)	0.45 ± 0.04a	0.49 ± 0.00a
Taninos hidrolizables (g Ácido tánico/100g ES)	1.72 ± 0.17b	0.82 ± 0.08a
Actividad antioxidante		
ABTS ⁺ (mM Trolox/100g ES)	649.29±20.50b	471.83±3.20a
DPPH (mM Trolox/100g ES)	58.31±0.34a	83.28±3.63b
Poder reductor (mg ácido ascórbico/100 g ES)	11.68±0.68a	86.82±1.95b

ES: extracto seco. Los valores presentados son medias ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes presentaron diferencias estadísticamente significativas (p > 0.05)

Conclusiones

El tiempo dinámico de 30 min permitió obtener la mayor cantidad de extraíbles en el sistema de extracción CO₂ supercrítico de la harina de Ramón.

El extracto de harina obtenido mediante la extracción con CO₂ supercrítico se caracterizó por su contenido de β-caroteno, luteína, α y γ-tocoferol, fucosterol, estigmasterol y escualeno. La mayoría de estos compuestos cuantificados no han sido reportados en la harina de *Brosimum alicastrum*.

A medida que aumenta el contenido de etanol como co-solvente en la extracción CO₂ supercrítico también incrementó el contenido de compuestos fenólicos totales de la harina. Por tanto, en este trabajo se sugiere el uso de etanol absoluto como co-solvente.

Cuando se comparan ambos extractos (E-CO₂-CO y E-SL), el extracto de harina obtenido con CO₂ supercrítico con co-solvente resultó con mayor contenido de flavonoides totales, taninos hidrolizables y actividad antioxidante ABTS.

En este trabajo se confirma que la cuantificación de compuestos antioxidantes de la harina es dependiente del método de extracción a utilizar. Además, el utilizar métodos distintos favorece un análisis más detallado de la composición de la harina de ramón, un producto vegetal poco caracterizado. Este hallazgo, ha permitido tener un mayor conocimiento de la composición bioactiva de la harina de semilla de *Brosimum alicastrum*, útil para promover su uso como ingrediente bioactivo para la formulación y desarrollo de alimentos y aperitivos funcionales.

Referencia

- Alves, P. B. (2018). PT Graphical abstract SC. *The Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.11.006>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813572-3.00001-4>
- Bot, A., Unilever, R., & Vlaardingen, D. (2018). Phytosterols, 17–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21626-0>
- Caamal-Chuc, N. S. (2018). Evaluación del contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de semillas de *Brosimum alicastrum* usando la metodología de superficie de respuesta. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yucatán.

- Cadena-carrera, S., Parolo, D., Bella, A., Cé, R., Cruz, B., Miguel, J., & Hense, H. (2019). The Journal of Supercritical Fluids Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes .) obtained by supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent, 152. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104543>
- Can-cauich, C. A., Sauri-duch, E., Moo-huchin, V. M., & Cuevas-glory, L. F. (2019). Effect of extraction method and specie on the content of bioactive compounds and antioxidant activity of pumpkin oil from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.153>
- Carter, C. T. (2015). Chemical and Functional Properties of Brosimum Alicastrum Seed Powder (Maya Nut , Ramón Nut), 165.
- El-akabawy, G., & El-sherif, N. M. (2019). Biomedicine & Pharmacotherapy Zeaxanthin exerts protective effects on acetic acid-induced colitis in rats via modulation of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111(January), 841–851. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.001>
- Goyeneche, R., Fanovich, A., Rodriguez Rodrigues, C., Nicolao, M. C., & Di Scala, K. (2018). Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from radish leaves: Yield, antioxidant capacity and cytotoxicity. *Journal of Supercritical Fluids*, 135, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.004>
- Jiao, G., & Kermanshahi, A. (2018). SC. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.042>
- López-Padilla, A., Ruiz-Rodriguez, A., Reglero, G., & Fornari, T. (2017). Supercritical carbon dioxide extraction of *Calendula officinalis*: Kinetic modeling and scaling up study. *Journal of Supercritical Fluids*, 130(March), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.033>
- Lu, J., Boughner, E. C., Liotta, C. L., & Eckert, C. A. (2002). Nearcritical and supercritical ethanol as a benign solvent: Polarity and hydrogen-bonding. *Fluid Phase Equilibria*, 198(1), 37–49. [https://doi.org/10.1016/S0378-3812\(01\)00754-3](https://doi.org/10.1016/S0378-3812(01)00754-3)
- Lúcia, I., Barzotto, M., Andressa, K., Antônio, E., Sene, A. C., Newton, S., & Vieira, L. (2019). The Journal of Supercritical Fluids Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and α -tocopherol content. *The Journal of Supercritical Fluids*, 143(June 2018), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.08.003>
- Martinez-Correa, H. A., Cabral, F. A., Magalhães, P. M., Queiroga, C. L., Godoy, A. T., Sánchez-Camargo, A. P., & Paviani, L. C. (2012). Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. *Journal of Supercritical Fluids*, 63, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.12.016>
- Martinez-Correa, H. A., Paula, J. T., Kayano, A. C. A. V., Queiroga, C. L., Magalhães, P. M., Costa, F. T. M., & Cabral, F. A. (2017). Composition and antimalarial activity of extracts of *Curcuma longa* L. obtained by a combination of extraction processes using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, 119, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.017>
- Mazzutti, S., Maria, C., Oliveira, M., Regina, S., & Ferreira, S. (2019). PT SC. *The Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.03.013>
- Monroy, Y. M., Rodrigues, R. A. F., Sartoratto, A., & Cabral, F. A. (2016). the supercritical carbon dioxide in the extraction of phenolics. *The Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.07.019>
- Montemurro, M., Pontonio, E., & Rizzello, C. G. (2019). *Quinoa Flour as an Ingredient to Enhance the Nutritional and Functional Features of Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814639-2.00036-8>

- Moo-Huchin, Víctor M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., De Lourdes Vargas Y Vargas, M., Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152, 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.013>
- Ozer, H. K. (2016). ce pt us cr t, 2912(November). <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1252389>
- Palafox-Carlos H., J.F. Ayala-Zavala y G.A. González-Aguilar. 2011. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*. 76(1):R6-R15.
- Pimentel-moral, S., Borrás-linares, I., & Lozano-sánchez, J. (2018). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Microwave-assisted extraction for Hibiscus sabdariffa bioactive compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 156, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.050>
- Prado, J. M., Vardanega, R., Debien, I. C. N., Angela, M., Meireles, D. A., Gerschenson, L. N., Chemat, S. (2015). *Conventional extraction. Food Waste Recovery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800351-0/00006-7>
- Radojkovi, M., Zekovi, Z., Vidovi, S., Mandi, A., Mi, A., Radojkovi, M., & Zekovi, Z. (2016). *Accepted Manuscript*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.004>
- Reder, A., Souza, C. De, Guedes, A. R., Manoel, J., Rodriguez, F., Bombardelli, M. C. M., & Corazza, M. L. (2018). The Journal of Supercritical Fluids Extraction of Arctium Lappa leaves using supercritical CO₂ + ethanol: Kinetics, chemical composition, and bioactivity assessments. *The Journal of Supercritical Fluids*, 140(April), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.06.011>
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412(5–6), 410–424. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.11.034>
- Sanjaya, R. E., Tedjo, Y. Y., Kurniawan, A., Ju, Y., Ayucitra, A., & Ismadji, S. (2014). Investigation on supercritical CO₂ extraction of phenolic- phytochemicals from an epiphytic plant tuber (*Myrmecodia pendans*). *Biochemical Pharmacology*, 6, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2014.03.001>
- Santos, Ê. R. M., Oliveira, H. N. M., Oliveira, E. J., Azevedo, S. H. G., Jesus, A. A., Medeiros, A. M., ... Sousa, E. M. B. D. (2017). The Journal of Supercritical Fluids Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. *The Journal of Supercritical Fluids*, 122, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.11.019>
- Soto-Armenta, L. C., Sacramento-Rivero, J. C., Ruiz-Mercado, C. A., Lope-Navarrete, M. C., & Rocha-Urbe, J. A. (2019). Extraction yield and kinetic study of *Lippia graveolens* with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.12.018>
- Sovová, H., Nobre, B. P., & Palavra, A. (2016). Modeling of the kinetics of supercritical fluid extraction of lipids from microalgae with emphasis on extract desorption. *Materials*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/ma9060423>
- Uribe, J. A. R., Perez, J. I. N., Kauil, H. C., Rubio, G. R., & Alcocer, C. G. (2011). Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 56(2), 174–178. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.12.007>
- Valle, M., Robert, P. S., & Fuente, J. C. De. (2018). Cosolvent effect of ethanol on the solubility of lutein in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.08.012>

Vu, D. C., Lei, Z., Sumner, L. W., Coggeshall, M. V., & Lin, C. (2019). Journal of Food Composition and Analysis Identification and quantification of phytosterols in black walnut kernels, *75*(April 2018), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.016>

Wang, Mengmeng, Zhang, L., Wu, X., Zhao, Y., Wu, L., & Lu, B. (2019). LWT - Food Science and Technology Quantitative determination of free and esterified phytosterol profile in nuts and seeds commonly consumed in China by SPE / GC – MS. *LWT - Food Science and Technology*, *100*(August 2018), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.077>

Wong, C. H., Gan, S. Y., Tan, S. C., Gany, S. A., Ying, T., Gray, A. I., Phang, S. M. (2018). Fucosterol inhibits the cholinesterase activities and reduces the release of pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide and amyloid-induced microglial cells.

Xie, L., Cahoon, E., Zhang, Y., & Ciftci, O. N. (2019). The Journal of Supercritical Fluids Extraction of astaxanthin from engineered *Camelina sativa* seed using ethanol-modified supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, *143*(August 2018), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.08.013>

Zaidi, H., Ouchemoukh, S., Amessis-Ouchemoukh, N., Debbache, N., Pacheco, R., Serralheiro, M. L., & Araujo, M. E. (2019). Biological properties of phenolic compound extracts in selected Algerian honeys—The inhibition of acetylcholinesterase and α -glucosidase activities. *European Journal of Integrative Medicine*, *25*(November 2018), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2018.11.008>