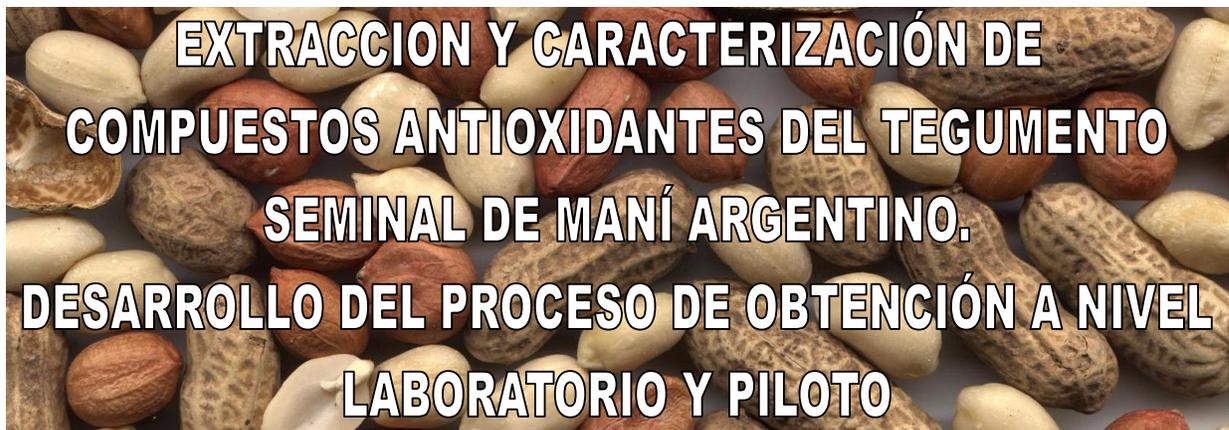


Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba



Tesis Doctoral



Ing. Qca. Valeria Nepote

Director: Dr. Nelson Rubén Grosso

Año 2003

*A la memoria de mis abuelos María Juana y Vito
y a mi esposo Elias*

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que de alguna forma colaboraron en la realización de este trabajo. Especialmente al director de este proyecto, Dr. Nelson Rubén Grosso, por su inagotable paciencia y comprensión durante estos cinco años.

Además, quisiera agradecer al Director del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), Dr. Carlos A. Guzmán y al Dr. Oscar Orio, por su importante colaboración y participación en la Comisión Asesora; a CONICET, SECYT-FCEfyN-UNC y CONICOR, por el aporte financiero para la realización del trabajo.

Por último y de todo corazón, a mis padres Cristina y Alberto, a mis hermanas Adriana y Daniela, y a los compañeros (y amigos) del ICTA que en todo momento me brindaron su ayuda incondicional.

A todos ustedes ¡MUCHAS GRACIAS!

INDICE DE CONTENIDOS

	<i>Página</i>
❖ RESUMEN	1
❖ ABSTRACT	2
❖ ESTRATTO	3
❖ ABREVIATURAS	4
❖ ANTECEDENTES GENERALES	5
❖ HIPÓTESIS	9
❖ OBJETIVOS	9
❖ CAPÍTULO 1: Extracción de componentes antioxidantes del tegumento del maní, con diferentes tipos de solventes.	10
❖ CAPÍTULO 2: Identificación de algunos compuestos antioxidantes del tegumento de maní.	32
❖ CAPÍTULO 3: Aplicación y determinación de la actividad antioxidante de los extractos de tegumento de maní sobre productos alimenticios.	55
❖ CAPÍTULO 4: Determinación del proceso adecuado a nivel laboratorio para la obtención de las sustancias antioxidantes del tegumento de maní.	99
❖ CAPÍTULO 5: Desarrollo del proceso a nivel piloto.	125
❖ ANEXO. Evaluación de la factibilidad y rentabilidad del proceso desarrollado, para su posterior transferencia a nivel industrial.	173
❖ CONCLUSIONES GENERALES	231
❖ BIBLIOGRAFÍA	235



RESUMEN

El principal objetivo de este trabajo fue extraer y caracterizar compuestos antioxidantes del tegumento de maní, desarrollando el proceso de obtención a escala laboratorio, piloto y la evaluación de una posible transferencia a escala industrial. El trabajo se dividió en 5 capítulos, uno por cada objetivo particular del proyecto. El capítulo 1 trató sobre la extracción con diferentes solventes de los compuestos antioxidantes del tegumento de maní. En el capítulo 2 se caracterizaron algunos de estos compuestos. En el capítulo 3 se detallaron las pruebas de aplicación de estos antioxidantes sobre productos alimenticios. En el capítulo 4 se desarrolló el proceso de obtención del extracto antioxidante a escala laboratorio. En el capítulo 5 se describió la extracción a escala piloto. Por último, se realizó un estudio técnico y evaluación económica del proceso de extracción de los antioxidantes para escala industrial presentada como Anexo en este trabajo. Los resultados del estudio experimental mostraron que el tegumento de maní contuvo alrededor del 12-14% de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, los cuales pudieron extraerse con solventes polares como el etanol o mezclas etanol-agua. Uno de los compuestos identificado y cuantificado fue el resveratrol ($9.07 \pm 0.72 \mu\text{g}$ resveratrol /g tegumento de maní seco). De la aplicación del extracto sobre productos alimenticios se encontró que estos compuestos poseen actividad antioxidante, protegiendo el alimento de la oxidación lipídica, aunque en menor grado que los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT. De acuerdo a los resultados de la extracción en laboratorio el método más eficiente de obtención, utilizando la mezcla etanol-agua 70-30, fue por agitación continua durante 10 minutos del tegumento sin desengrasar, a temperatura ambiente y en tres etapas, con rendimientos de 11.84 ± 0.02 g fenoles totales/100g tegumento seco. A escala piloto se describieron algunas características y parámetros de la lixiviación continua y en contracorriente utilizando un equipo rotativo, para la extracción del 95% de los fenoles del tegumento. De la evaluación económica se obtuvieron estimaciones de los costos de producción a escala industrial, resultando con valores positivos en cuanto a rentabilidad. En base a los resultados de este proyecto se concluyó que los compuestos antioxidantes naturales provenientes del tegumento de maní pueden ser extraídos industrialmente y utilizados para elevar la vida útil de productos alimenticios.



ABSTRACT

The objective of this work was to extract, to characterize antioxidant compounds from Argentinean peanut skins and to develop the obtention process at laboratory and pilot levels, to evaluate a possible industrial extraction process. This work was divided into 5 chapters, each one correspond to a particular objective of the project. The chapter 1 was related to the antioxidant compounds extraction from peanut skins with different solvents. In the chapter 2 some of these compounds were characterized. In the chapter 3 the application tests of these antioxidants were detailed. In the chapter 4 an obtention process at lab level was developed. In the chapter 5 a pilot scale extraction process was described. And finally, a technical study and an economic evaluation of the antioxidant compounds industrial extraction process was developed as an Annex. The experimental results showed that the peanut skins contained about 12-14% of phenolic compounds with antioxidant activity, which were extracted with polar solvents like ethanol or ethanol-water mixtures. One of the identified and quantified compounds was resveratrol ($9.07 \pm 0.72\mu\text{g}$ resveratrol /g dry peanut skins). These natural antioxidants showed protective activity against lipid oxidation of food like sunflower oil and peanut products. This protection was lower than synthetic antioxidants like BHA and BHT. The more efficient lab extraction method was using ethanol-water mixture 70-30, by agitation during 10 minutes of the skins with fat, at room temperature and in three stages. It was obtained 11.84 ± 0.02 g of total phenolic compounds each 100g dry peanut skins. Some parameters were described in the countercurrent and continuous extraction process at pilot level, with a rotatory equip, to obtain 95% of the phenolic compounds form the skins. Through the economic evaluation there were estimated the production costs at industrial level, and it resulted with positive profit values. On the basis of these results, the conclusion of this work was the antioxidant compounds form peanut skins can be industrially extracted and applied to extend the shelf-life of food products.



ESTRATTO

L'obiettivo di questo lavoro era di estrarre, caratterizzare i residui dell'antiossidante dalle pelli dell'arachide e sviluppare il processo di conseguimento ai livelli del pilota e del laboratorio, per valutare un processo industriale possibile dell'estrazione. Questo lavoro è stato diviso in 5 capitoli, ogni che corrisponde ad un obiettivo particolare del progetto. Il capitolo 1 è stato collegato con l'estrazione antiossidante dei residui dalle pelli dell'arachide con differenti solventi. Nel capitolo 2 alcuni di questi residui sono stato caratterizzati. Nel capitolo 3 le prove di applicazione di questi antiossidanti erano dettagliate. nel capitolo 4 un processo di conseguimento al livello del laboratorio è stato sviluppato. Nel capitolo 5 un processo dell'estrazione della scala pilota è stato descritto. E per concludere, uno studio di tecnica e una valutazione economica del processo industriale dell'estrazione dei residui antiossidanti sono stati sviluppati nel Annesso. I risultati sperimentali hanno indicato che le pelli dell'arachide hanno contenuto circa 12-14% dei residui fenolici con attività antiossidante, che erano estratti in solventi polari come le miscele del etanolo-acqua o dell'etanolo. Uno dei residui identificati e misurati era resveratrolo ($9,07 \pm 0,72 \mu\text{g}$ di resveratrolo/g di pelli asciutte dell'arachide). Questi antiossidanti naturali hanno mostrato l'attività protettiva contro ossidazione del lipido di alimento come i prodotti dell'olio e dell'arachide. Questa protezione era più bassa degli antiossidanti sintetici come la BHA ed il BHT. Il metodo dell'estrazione del laboratorio che ha risultato più efficiente stava usando la miscela 70-30 dell'etanolo-acqua, da agitazione durante i 10 minuti delle pelli con grasso, alla temperatura ambiente ed in tre fasi. Con questo metodo a stato ottenuto $11,84 \pm 0,02 \text{ g}$ dei residui fenolici totali/ 100 g di pelli asciutte dell'arachide. A stato descritto alcuni parametri dell'a controcorrente ed il processo continuo dell'estrazione al livello pilota, con un rotatorio dota, ottenendo 95% della forma dei residui fenolici dalle pelli. Con la valutazione economica sono stati valutati i costi di produzione al livello industriale ed ha risultato con i valori positivi di profitto. Nella base di questi risultati abbiamo concluso che i residui antiossidanti dalle pelli dell'arachide possono essere estratte su scala industriale ed applicate per prolungare la durata d'immagazzinamento dei prodotti alimentari.

**ABREVIATURAS**

BHA	Butil-hidroxi anisol (antioxidante)
BHT	Butil-hidroxi tolueno (antioxidante)
CAA	Código Alimentario Argentino
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CP	Cromatografía en papel
DCM	Diclorometano
DPPH	Radical difenil-picril-hidrazil
ETOAC	Acetato de etilo
FCEFYN	Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
FDA	Food and Drug Administration - USA
HCl	Acido Clorhídrico
H ₂ O	Agua
IA	Indice de Acidez
IAN	Indice de Anisidina
ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (FCEFYN, UNC)
IP	Indice de Peróxido (expresado en meq O ₂ /Kg de materia grasa)
MDA	Malondialdehido
meq O ₂ /Kg	Miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de grasa
MT	Maní Tostado
MTM	Maní Tostado con Miel
MTM-AN	Maní Tostado con Miel y Antioxidantes Naturales
MTM-BHT	Maní Tostado con Miel y BHT
Na ₂ S ₂ O ₃	Tiosulfato de sodio
-OH	Grupo Hidroxilo
OPC	Proantocianidinas oligoméricas
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
TBA	Acido Tiobarbitúrico
TBHQ	tert-butil-hidroquinona (antioxidante)
UNC	Universidad Nacional de Córdoba.



ANTECEDENTES GENERALES

Argentina es uno de los países productores y exportadores de maní más importantes del mundo, así como China, India y Estados Unidos. Córdoba es la principal provincia productora de maní del país, produce entre el 98 y 99% del total. El área sembrada ha sido, en promedio en los últimos 10 años, de 242.000 Hectáreas, con una producción récord para la campaña 1997/98 de 627.700 Toneladas. La producción argentina de maní para la campaña 2001/2002 fue de 360.000 toneladas métricas, de las cuales 354.000 toneladas fueron producidas en Córdoba (Cámara Argentina de Maní, 2001; Cámara manisera de Córdoba, 2001; CIARA, 2002).

En nuestro país se cultiva fundamentalmente el maní tipo “Runner”, siendo “Florman” el principal cultivar utilizado (80% de la producción). El otro cultivar empleado, es el “Colorado Irradiado” que corresponde a un maní denominado tipo “Valencia” (Krapovickas and Gregory, 1994).

El maní producido tiene distintos destinos; luego de la cosecha se lo traslada a las plantas seleccionadoras, donde se obtienen principalmente dos categorías de maní: el “confitería” y el “industria”. Del total producido, alrededor del 35-45% se destina a la molienda y extracción de aceite, el cual es exportado en casi su totalidad. El maní tipo “confitería” en su mayoría se exporta como tal, y otra parte se utiliza para producir maní partido, maní pelado, pasta de maní, maní “blancheado”, etc. (Woodroof, 1983; CIARA, 2002; Bolsa de Comercio de Rosario, 2001).

El maní blancheado es un producto que deriva de la eliminación del tegumento de la semilla, de esta manera se obtiene un grano pelado que se utiliza con diversos fines industriales, como por ejemplo para maní frito salado, maní saborizado, etc. Como residuo de este procesamiento queda el tegumento, siendo aprovechado solamente para la alimentación de ganado (Woodroof, 1983), aunque posee un interesante potencial para su explotación como



fuelle de antioxidantes naturales de grado alimentario (Masquelier, 1987; Sanders *et al.*, 2000).

El maní es una semilla oleaginosa cuya composición aproximada es: 45-50% aceite, 25-30% proteínas, 15-20% hidratos de carbono, 3% cenizas, y el resto estaría constituido por otros componentes menores (Grosso and Guzmán, 1995).

En el maní se han encontrado compuestos con actividad antioxidante en diferentes parte del fruto. En el aceite de maní se encuentran sustancias antioxidantes como los tocoferoles, fosfolípidos y glicolípidos, siendo éstos dos últimos principales constituyentes de la goma del aceite (Gopala Krishna and Prabhakar, 1994). Por otra parte, también se han encontrado compuestos fenólicos con actividad antioxidante en la semilla, la caja y en tegumento del maní.

En la cáscara o caja del maní se han realizado numerosos estudios de actividad y eficacia antioxidante de extractos metanólicos de compuestos fenólicos (Duh *et al.*, 1992; Yen *et al.*, 1993; Yen and Duh, 1994-1995; Duh and Yen, 1997).

Se sabe que el tegumento de maní contiene una alta proporción de sustancias fenólicas antioxidantes, del tipo proantocianidinas o también llamadas OPC (proantocianidinas oligoméricas), un compuesto complejo del tipo flavan-3-ol (Masquelier, 1987; Louis, 1999).

Uno de los compuestos encontrados más recientemente en el maní es el resveratrol (*trans*-resveratrol, *trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) y otros estilbenos, con propiedades de fitoalexina (Sobolev *et al.*, 1995, Sanders and McMichael, 1997; Sobolev and Cole, 1999; Sanders *et al.*, 2000). El resveratrol y los compuestos relacionados han sido ampliamente estudiados en uva y vino tinto (Langcake and Pryce, 1976; Kanner *et al.*, 1994; Korhammer *et al.*, 1994; Waffo Teguo *et al.*, 1996; Mattivi and Reniero, 1992), comprobándose que poseen actividad antioxidante y antifúngica, y propiedades beneficiosas para la salud como por ejemplo el hecho de que disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares, baja el nivel



de colesterol, y reduce el riesgo de cáncer (Arichi *et al.*, 1982; Kimura *et al.*, 1985, 1995; Jang *et al.*, 1997).

Los antioxidantes en general son compuestos que, en bajas concentraciones, retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales autooxidables interfiriendo en el mecanismo fundamental de formación de radicales libres (St. Angelo, 1996; Carelli *et al.*, 2000). Estos compuestos se encuentran presentes en los tejidos vivos evitando los procesos oxidativos. Cuando los tejidos se rompen o degradan debido a los tratamientos de procesamiento en los alimentos se comienzan a formar compuestos prooxidantes, peróxidos y otros radicales oxigenados, además la mayoría de los antioxidantes naturales se destruyen, por ello se hace necesario agregarlos para conservar el alimento hasta su consumo. Como característica importante de los antioxidantes es su gran eficiencia en concentraciones muy bajas, del orden de unas centésimas o milésimas de porcentaje (Fennema, 1993; St. Angelo, 1996).

Los antioxidantes sintéticos son los más utilizados en la industria (alimentaria, farmacéutica, de plásticos, pinturas, etc.). Cuentan con numerosas ventajas como los bajos costos de obtención, alta efectividad, con muy baja concentración, facilidad de aplicación y control, diferentes propiedades de solubilidad, según donde se lo aplique, están disponibles comercialmente en grandes cantidades y en forma estandarizada. Sin embargo, la desventaja fundamental es su toxicidad, por ello se encuentran regulados por normas nacionales e internacionales, y no todos los compuestos son permitidos en todos los países por igual (Valenzuela *et al.*, 2000). Se ha encontrado que muchos de los antioxidantes sintéticos más comunes (como el BHA y BHT) poseen propiedades cancerígenas, probadas en ratones (Ito *et al.*, 1982; Imida *et al.*, 1983), y no se conocen con exactitud si existen otros mecanismos de toxicidad crónica en el organismo debido a que su aplicación es relativamente reciente (Valenzuela *et al.*, 2000).

Los antioxidantes naturales se encuentran mayoritariamente en el reino vegetal formando parte de una amplia variedad de plantas (Six, 1994; Lambelet *et al.*, 2000). Casi



todos corresponden a estructuras fenólicas o polifenólicas con diferente grado de insaturación y con sustituyentes (grupos hidroxilos -OH) a la estructura cíclica (Valenzuela *et al.*, 2000).

Si bien existe una creciente presión para aumentar el uso de antioxidantes de origen natural y sustituir a los sintéticos, son varios los problemas en relación a este reemplazo: menor efectividad y mayores costos. Pero cuentan con la ventaja de su condición natural, habitualmente asociada a sustancias inocuas o de muy baja toxicidad cuando se les compara con sus símiles sintéticos (Valenzuela *et al.*, 2000). A pesar de sus desventajas, los antioxidantes naturales son cada vez más variados y más estudiados, fundamentalmente debido a la existencia de numerosos trabajos de investigación relacionados a la disminución de enfermedades cardiovasculares, cáncer y envejecimiento por el consumo de alimentos con antioxidantes naturales (Arichi *et al.*, 1982; Kimura *et al.*, 1985, 1995; Masquelier, 1987; Klatsky *et al.*, 1992; Jacob, 1994; Fitch Haumann, 1994; Jang *et al.*, 1997; Louis, 1999).



HIPOTESIS

En el tegumento seminal del maní argentino se encuentran sustancias fenólicas con actividad antioxidante, las cuales pueden ser purificadas, caracterizadas y producidas industrialmente para beneficio del hombre.

OBJETIVOS

Objetivo General

Extraer y caracterizar sustancias antioxidantes del tegumento del maní argentino y desarrollar un proceso para la obtención de dichos compuestos a nivel laboratorio y piloto.

Objetivos Específicos

1. Extraer componentes antioxidantes del tegumento del maní, con diferentes tipos de solventes.
2. Identificar algunos compuestos antioxidantes del tegumento.
3. Aplicar y determinar la actividad antioxidante de los extractos de tegumento de maní sobre productos alimenticios.
4. Determinar el proceso adecuado a nivel laboratorio para la obtención de las sustancias antioxidantes del tegumento del maní.
5. Desarrollar el proceso a nivel piloto.

Capítulo 1

Extracción de Componentes Antioxidantes del
Tegumento de Maní con Diferentes Solventes



INTRODUCCION

Los antioxidantes son sustancias naturales o sintéticas que, en pequeñas cantidades, retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales autooxidables. Se sabe que los antioxidantes alimenticios actúan como inhibidores de radicales libres, interfiriendo en el mecanismo fundamental de la autooxidación (Fennema, 1993; St. Angelo, 1996; Carelli *et al.*, 2000).

Los antioxidantes naturales están ampliamente presentes en la naturaleza. Se les encuentra mayoritariamente en el reino vegetal, formando parte de las semillas, frutos, hojas, raíces; de una amplia variedad de plantas, árboles, arbustos, hongos, etc. Las principales fuentes de antioxidantes naturales son las especias, hierbas, té, cacao, aceites, semillas, cereales, granos, frutas, vegetales, enzimas, proteínas e hidrolizados de proteínas. Casi todos corresponden a estructuras fenólicas o polifenólicas con diferente grado de insaturación y con sustituyentes (grupos hidroxilos -OH) a la estructura cíclica (Six, 1994; Lambelet *et al.*, 2000; Valenzuela *et al.*, 2000).

La mayoría de estos compuestos fenólicos, por su estructura química polar, pueden ser extraídos mediante solvente polares como el metanol, etanol, acetona, acetato de etilo o agua (Waterman and Mole, 1994). En gran parte de los trabajos sobre extracción y estudio de actividad antioxidante de compuestos fenólicos obtenidos a partir de material vegetal se utilizaron estos solventes (Agbor-Egbe and Rickard, 1990; Scalbert *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 2002). En trabajos sobre extracción de compuestos antioxidantes de la caja de maní se han probado solventes polares como el metanol, etanol, acetona, con buenos resultados en cuanto a actividad antioxidante de los extractos (Duh *et al.*, 1992; Yen *et al.*, 1993; Yen and Duh, 1994-1995; Duh and Yen, 1997).

El objetivo de este capítulo fue utilizar solventes de diferente polaridad como el metanol, etanol, acetona, agua y mezclas etanol-agua para la extracción de los compuestos antioxidantes del tegumento de maní, a fin de encontrar el o los solventes con mayores rendimientos en cuanto a extracto seco, fenoles totales y actividad antioxidante.



MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó tegumento seminal de maní tipo runner obtenido por blanchado industrial de la empresa Lorenzati y Ruetsch S.A., Ticino, Córdoba. Se utilizaron tegumentos correspondientes a la cosecha 1998 para los primeros ensayos del objetivo 1, y cosecha 2001 para ensayos finales de este objetivo.

Metodologías

1. Determinación de la composición porcentual del tegumento

Para tegumento fresco y tegumento deslipidizado se determinaron los siguientes porcentajes:

- **Humedad:** se secaron 5g de cada muestra molida en estufa a 60°C hasta peso constante (Grosso y Guzmán, 1995), y se determinó el porcentaje de humedad por diferencia de peso, según la siguiente fórmula: $\% \text{ humedad} = (\text{peso muestra húmeda} - \text{peso muestra seca}) \times 100 / \text{peso muestra húmeda}$.
- **Materia grasa:** se realizó la extracción de los lípidos de las muestras utilizando equipos Soxhlet, con n-hexano, por un período de 12 horas.
La materia grasa se calculó por diferencia de peso de las muestras antes y después de la extracción (Grosso y Guzmán, 1995), según la fórmula: $\% \text{ de aceite} = \text{peso aceite} \times 100 / \text{peso muestra}$.
- **Proteínas:** a partir de cada muestra, se determinó el porcentaje de nitrógeno por el método de Kjeldhal. Para convertir el porcentaje de nitrógeno en porcentaje de proteínas se utilizó el factor 5,46 (AOAC, 1980).
- **Cenizas:** se incineró una muestra en horno mufla a 550°C durante 6 hs. El porcentaje se determinó con el peso después de la incineración en relación con el peso antes de la misma, utilizando la siguiente fórmula: $\% \text{ de cenizas} = \text{peso después de la incineración} \times 100 / \text{peso antes de la incineración}$ (AOAC, 1980).



➤ **Fenoles Totales:** se realizó una extracción total de los fenoles del tegumento mediante soxhlet con metanol durante 16 horas. El extracto metanólico se secó completamente en evaporador rotatorio (vacío, 40°C), luego se realizaron diluciones conocidas del extracto seco, y sobre estas se determinaron los fenoles totales. La curva de calibración se obtuvo con soluciones de fenol patrón (Merck, Darmstadt, Germany) en metanol. La determinación de fenoles totales se realizó por medio de una reacción con el reactivo Folin-Ciocalteu (Anedra, San Fernando, Buenos Aires, Argentina), siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación (Método adaptado para 10mL, según Waterman and Mole, 1994):

- 1°. Se colocó en un tubo de ensayo 8,4 mL de agua destilada y 0,1mL de la solución preparada del extracto en metanol.
- 2°. Se agregaron 0,5mL del reactivo Folin-Ciocalteu, y se dejó reposar durante 3 a 6 minutos.
- 3°. Se agregó 1ml de solución saturada de carbonato de sodio, y se dejó reposar durante 1 hora.
- 4°. Se midió la absorción de la solución (azul-celeste) en espectrofotómetro UV-visible a 760nm. Paralelamente se realizó un blanco, con 0,1mL de metanol.

Por extrapolación a la curva de calibración con fenol patrón se determinó el contenido de fenoles totales de la muestra, en mg/mL de solución del extracto, y luego por cálculos de conversión (según la dilución del extracto metanólico) se obtuvo el valor en porcentaje de fenoles totales del tegumento (1mg/ml de fenol en las diluciones de las muestras equivale a 1mg/ml de fenol patrón).

➤ **Otros componentes:** se determinó en forma teórica utilizando la siguiente fórmula, para las muestras secas: % de otros componentes = 100% - % humedad - % materia grasa - % proteínas - % cenizas - % fenoles totales (Grosso y Guzmán, 1995).

El tegumento deslipidizado se obtuvo por dos extracciones con 50mL de hexano cada 5g de tegumento, a temperatura ambiente, oscuridad, reposo, durante 24hs cada extracción.

Todos los porcentajes se expresaron en porcentaje en peso de materia fresca.



2. Extracción de los compuestos fenólicos con diferentes solventes

Se realizaron extracciones del tegumento con los siguientes solventes polares:

a. *Solventes puros*: Metanol, Etanol, Acetona y Agua.

Se extrajeron 10 gramos de tegumento (maní cosecha 1998) sin deslipidizar y deslipidizado, mediante 2 extracciones en reposo con 150ml de solvente, a temperatura ambiente y oscuridad, durante 24 horas cada extracción.

El tegumento deslipidizado se obtuvo por dos extracciones con 50mL de hexano cada 5g de tegumento, a temperatura ambiente, oscuridad, reposo, durante 24hs cada extracción.

b. *Mezclas etanol:agua*: 0, 30, 50, 70 y 100% de etanol.

Teniendo en cuenta los rendimientos obtenidos en la etapa anterior, se decidieron realizar extracciones con mezclas etanol:agua. En este caso se extrajeron 2,5 gramos de tegumento (maní cosecha 2001), con 50 mL de solvente, durante 24 horas, en reposo, temperatura ambiente y oscuridad. También se compararon tegumentos sin deslipidizar y deslipidizado, este último fue deslipidizado totalmente, por soxhlet con hexano, durante 16hs.

A fin de comparar los rendimientos de extracción con estos solventes se analizaron los porcentajes obtenidos de:

- Extracto seco: por evaporación total del solvente (evaporador rotatorio, vacío, 40-45°C) y peso del extracto seco resultante, expresado en g extracto seco cada 100g de tegumento seco.
- Fenoles totales: sobre diluciones de los extractos secos obtenidos se determinaron los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole 1994). La curva de calibración se obtuvo con soluciones de fenol patrón en metanol (Merck, Darmstadt, Germany). Los resultados se expresaron en contenido de fenoles del extracto seco: g fenol / 100g extracto seco, y en rendimientos de fenoles extraídos: g fenol / 100g tegumento seco, para estimar este valor se utilizó la siguiente fórmula: $\text{g fenol}/100\text{g tegumento seco} = (\text{g fenol}/100\text{g extracto seco}) \times (\text{g extracto seco}/100\text{g tegumento seco}) \times 100$.



- Actividad secuestrante de radicales libres (con DPPH): se evaluó la actividad secuestrante de radicales libres de los extractos obtenidos utilizando DPPH (radical difenil-picril-hidrazil, Milwaukee, WI, USA). El efecto atrapador de radicales libres de los extractos crudos se determinó por decoloración de una solución metanólica de DPPH según Joeux *et al.* (1995) y Viturro *et al.* (1999) (Schmeda-Hirschmann, 1999). El grado de decoloración indicó la eficiencia como atrapador de radicales libres de las sustancias analizadas. Se utilizó una solución metanólica de DPPH como control.

Procedimiento: Se realizó una solución madre de DPPH en metanol 20µg/mL y soluciones de los extractos de 300µg/mL. Se prepararon las soluciones de DPPH control (0.750mL metanol + 1.500mL solución madre DPPH, concentración final DPPH: 13,33µg/mL), y las soluciones de muestras con DPPH (concentración final DPPH: 13,33µg/mL) con el agregado de diferentes concentraciones de los extractos (concentraciones finales extractos: 10, 5 y 1µg/mL). Se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y luego se midió la absorción en espectrofotómetro a 517nm, frente a un blanco de metanol.

Los resultados se expresan en % de Actividad Secuestrante de Radicales Libres = (absorción control – absorción muestra) x 100 / absorción control.

Análisis estadístico de datos

Las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron analizadas estadísticamente con el programa Infostat (versión 1.1, 2002, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC), mediante Anova y test Duncan ($\alpha = 0.05$).

Se realizó un análisis de correlación (coeficientes de Pearson, $\alpha < 0.05$, programa estadístico Infostat) entre el contenido de fenoles (mg fenoles totales/ g extracto seco) y el porcentaje de actividad secuestrante de radicales libres para 1µg/mL de los extractos y la regresión lineal entre dichas variables.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Composición porcentual del tegumento de maní blandeado

En la **Figura 1** se muestra una fotografía del tegumento de maní runner blandeado, utilizado para la extracción de los compuestos fenólicos.

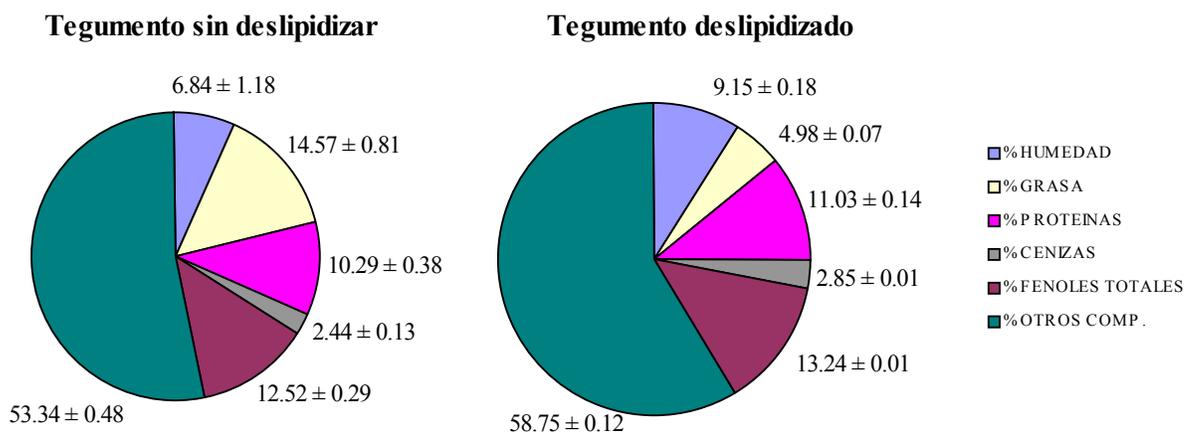
En la **Figura 2** se graficó la composición porcentual del tegumento de maní runner blandeado industrialmente sin desengrasar y desengrasado, aunque estos porcentajes pueden variar de acuerdo a la época del año, y condiciones de blandeado.

Figura 1. Tegumento de maní runner blandeado.





Figura 2. Composición porcentual tegumento de maní runner blanqueado, sin deslipidizar y deslipidizado.



Según datos encontrados en bibliografía (Woodroof, 1983), el tegumento de maní en general presentó la siguiente composición: humedad 9.01%, albuminoides 12.68%, lípidos 11.76%, extracto libre de nitrógeno 34.9% y cenizas 11.19%.

Comparando estos valores con los de la **Figura 2** se observó que los porcentajes de grasas fueron mayores para nuestro tegumento, ya que el proceso de blanqueado industrial implica un arrastre de partículas de maní (que poseen altos porcentajes de grasas). Por otro lado la humedad fue levemente inferior ya que el proceso de blanqueado también incluye un suave calentamiento, lo que favorece a eliminar un poco de humedad. También se observó que el proceso de deslipidizado eliminó casi el 10% de grasa del tegumento.



2. Extracción de los compuestos fenólicos con diferentes solventes

a. *Extracción con solventes puros*

➤ Rendimientos de extracto seco:

En la **Figura 3** se observan fotografías de las extracciones con hexano y etanol, y el extracto etanólico filtrado.

En la **Figura 4** se observa el gráfico de barras con los rendimientos obtenidos para los diferentes solventes puros. De esta figura se concluyó que los solventes que dieron mayores porcentajes de extracción fueron el metanol, etanol y acetona para tegumento con grasa, mientras que para tegumento desengrasado los mejores solventes resultaron ser el metanol y el etanol.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas para las extracciones con metanol y etanol cuando se utilizó tegumento deslipidizado y sin deslipidizar, debido a que se trata de solventes muy polares, y que por lo tanto extraerían menores cantidades de lípidos. Para el agua tampoco se encontraron diferencias en el tegumento con y sin deslipidizar, pero los porcentajes de extracción resultaron significativamente inferiores al resto.

A pesar de los altos valores de rendimientos de extracción de fenoles del metanol, se decidió descartar este solvente debido a la toxicidad, sobre todo porque estos extractos serían utilizados como aditivos antioxidantes en alimentos.

Por los bajos rendimientos se descartaron la acetona y el agua, el primero también por la alta extracción de compuestos lipídicos, sin actividad antioxidante.



Figura 3. Extracciones de tegumento de maní con hexano, etanol y extracto etanólico filtrado.

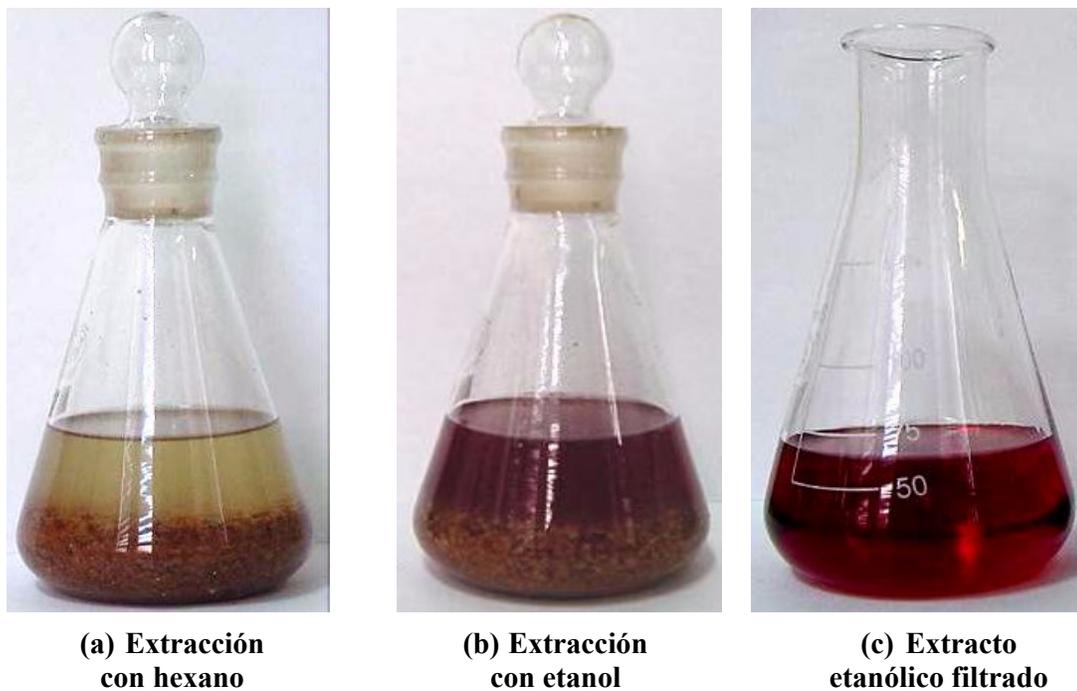
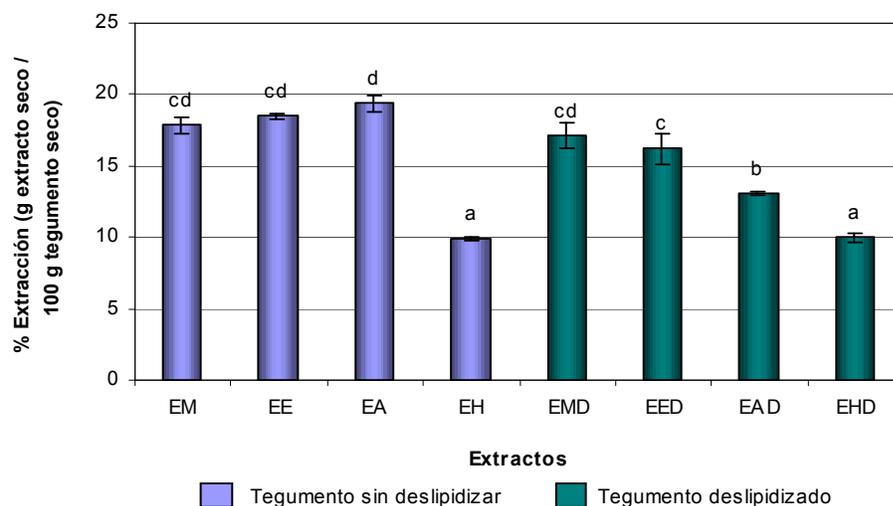


Figura 4. Rendimientos de extracción (porcentajes) para diferentes solventes polares puros (EM: metanol, EE: etanol, EA: acetona y EH: agua), de tegumento sin deslipidizar y deslipidizado (D). Letras diferentes indican diferencias significativas (Anova y test Duncan, $\alpha = 0.05$).





➤ Rendimiento de Fenoles Totales:

Los resultados de contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos, etanólicos, de acetona y agua de tegumento deslipidizado y sin deslipidizar se resumen en la **Figura 5**.

En la **Figura 6** se resumen los rendimientos de extracción de fenoles totales sobre los tegumentos deslipidizado y sin deslipidizar.

Según el análisis estadístico (ANOVA y test Duncan para $\alpha = 0,05$) de la **Figura 5**, se encontraron diferencias significativas entre los solventes. Para el tegumento sin deslipidizar el extracto que contuvo mayor cantidad de fenoles fue el de metanol, seguido por el etanol y agua (sin diferencias entre sí), y por último la acetona. Para el tegumento deslipidizado, los extractos con mayores contenidos de fenoles fueron los de metanol, etanol y agua, mientras que el extracto de acetona dio valores significativamente menores.

En general, los contenidos de fenoles de todos los solvente resultaron mayores significativamente para el tegumento deslipidizado.

Según la **Figura 6**, los mayores rendimientos de fenoles sobre el tegumento sin deslipidizar se obtuvo con metanol, seguido por el etanol (con diferencias significativas), y por último el agua y acetona. Para el tegumento deslipidizado los mayores rendimientos se obtuvieron con el metanol y etanol, seguido por el agua y por último la acetona.

En general el tegumento deslipidizado dio mayores rendimientos que el sin deslipidizar, excepto para la acetona en donde no se encontraron diferencias significativas entre los dos tegumentos.



Figura 5. Contenido de fenoles totales de los extractos de metanol (EM), etanol (EE), acetona (EA) y agua (EH), de los tegumentos deslipidizados (D) y sin deslipidizar. Letras distintas indican diferencias significativas (Anova y Test Duncan $\alpha = 0.05$).

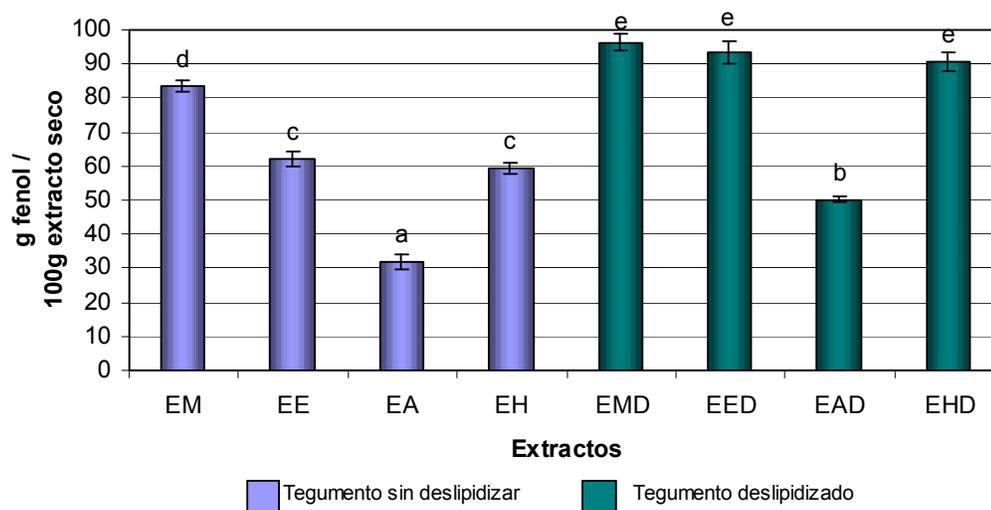
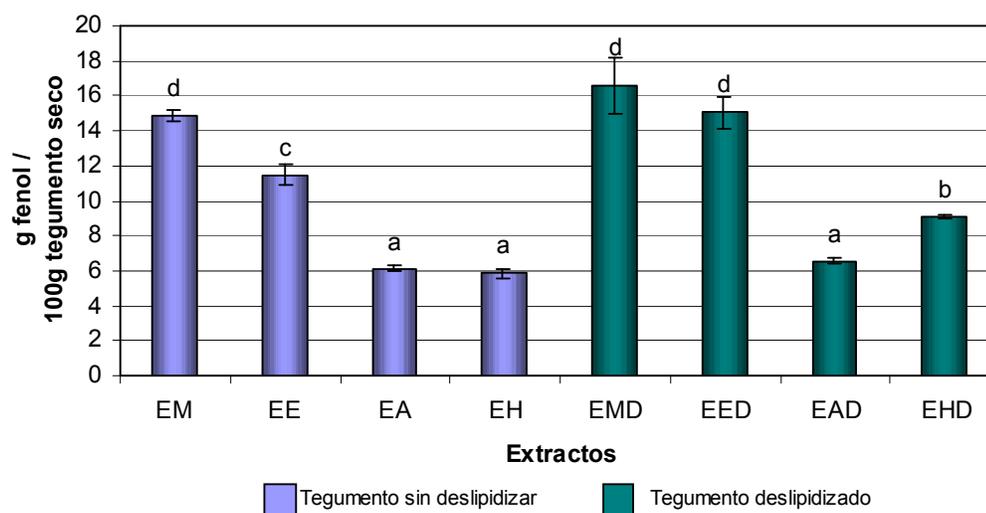


Figura 6. Rendimiento de extracción de fenoles totales, del tegumento deslipidizado y sin deslipidizar, utilizando metanol (EM), etanol (EE), acetona (EA) y agua (EH). Letras distintas indican diferencias significativas (Anova y Test Duncan $\alpha = 0.05$).





➤ Actividad secuestrante de radicales libres:

Los resultados de actividad secuestrante de radicales libres de los extractos metanólicos, etanólicos, de acetona y agua, de tegumento deslipidizado y sin deslipidizar se resumen en la **Figura 7**.

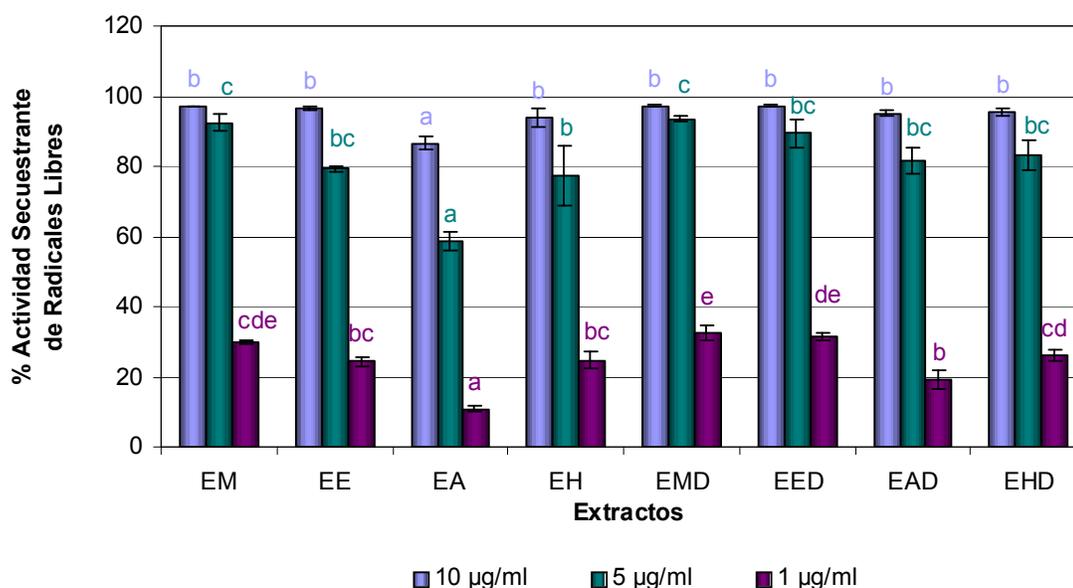
Según el análisis estadístico (ANOVA y test Duncan para $\alpha = 0,05$) de la **Figura 7**, se encontraron diferencias significativas entre las tres concentraciones de extractos, obteniéndose los mayores valores de actividad para los 10 μ g/mL de extracto, pero en esta concentración no se encontraron diferencias significativas entre los extractos, excepto para la acetona que dio valores significativamente menores de actividad.

Para las concentraciones de 5 y 1 μ g/mL se encontraron diferencias significativas entre los extractos, siendo estas más marcadas para la concentración de 1 μ g/mL. Se encontró que para el tegumento sin deslipidizar los extractos con mayores porcentajes de actividad fueron los de metanol, etanol y agua (sin diferencias significativas entre ellos), mientras que para el tegumento deslipidizado los mayores porcentajes fueron los de los extractos metanol y etanol.

Con estas observaciones, además de los resultados de porcentajes de extracción de materia seca y fenoles totales se puede concluir que los solventes más adecuados en cuanto a rendimientos y actividad fueron el metanol y etanol, pero al descartarse el metanol, se continuó trabajando con etanol y se lo utilizó para hacer mezclas etanol:agua.



Figura 7. Porcentajes de Actividad Secuestrante de Radicales Libres de los extractos de metanol (EM), etanol (EE), acetona (EA) y agua (EH), para concentraciones de extracto de 10, 5 y 1 µg/mL. Letras distintas para cada concentración de extracto indican diferencias significativas (Anova y Test Duncan $\alpha = 0.05$).



b. *Extracción con mezclas etanol:agua*

➤ Rendimientos de extracto seco:

En la **Figura 8** se graficó el porcentaje de extracto seco obtenido en función del porcentaje de etanol del solvente (mezclas etanol:agua) utilizado para extraer el tegumento.

Según el análisis estadístico (ANOVA, Test Duncan, $\alpha = 0.05$) se obtuvieron diferencias significativas en los porcentajes de extracción. Se puede observar que a medida que se incrementa el contenido de etanol del solvente se eleva el porcentaje de extracción para el tegumento con o sin deslipidizar, pero cuando se alcanza el 100% de etanol el porcentaje



de extracción disminuye para el tegumento sin deslipidizar, mientras que para el tegumento deslipidizado se mantiene constante.

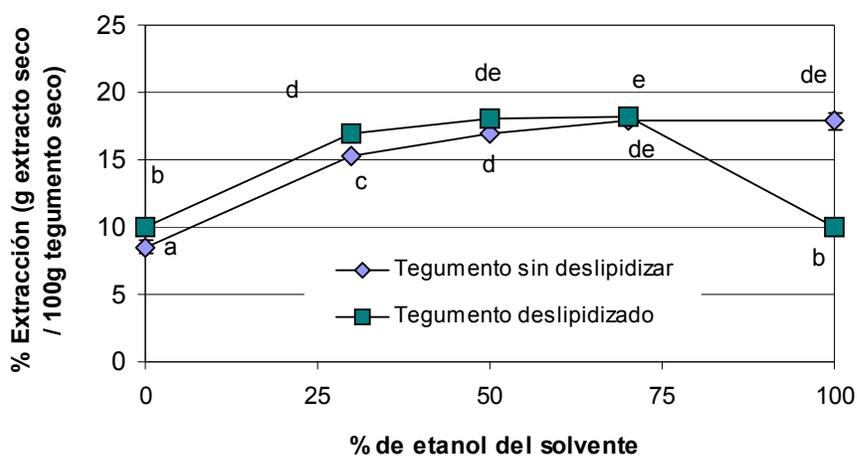
Teniendo en cuenta las diferencias significativas entre el tegumento deslipidizado y sin deslipidizar, en general se encontró que los valores de rendimientos, entre 0 y 30% de etanol, son menores en el caso del tegumento sin deslipidizar, entre 50 y 70% de etanol, no se encontraron diferencias significativas, y a partir de 70 a 100% de etanol, el tegumento sin deslipidizar superó al deslipidizado. Esto se podría explicar debido a que a medida que se incrementa el porcentaje de etanol en el solvente, este se hace menos polar, y extrae mayores cantidades de compuestos lipídicos, casi ausentes en el tegumento deslipidizado.

Para el caso del tegumento sin deslipidizar, se encontró que los mejores rendimientos se obtuvieron con mezclas entre 50 y 100% de etanol (sin diferencias significativas), mientras que para el tegumento deslipidizado los mayores valores fueron para mezclas entre 30 y 70% de etanol. De todas formas para decidir el solvente o mezcla hay que considerar otros factores como la actividad antioxidante, los costos del solvente y de la evaporación del mismo.

Teniendo en cuenta los rendimientos, se pueden utilizar las mezclas entre 50 y 70% de etanol, debido a que dieron los valores más altos, y no sería necesario deslipidizar previamente el tegumento, ya que estos solventes extraerían bajas cantidades de lípidos. Las diferencias que se observan en los rendimientos de etanol y agua puros, entre la **Figura 8** y la **Figura 4** se debieron a que se trabajó con tegumentos de diferente cosecha y diferentes formas de deslipidizado, una por maceración y otra por soxhlet tal como se describe en Materiales y Métodos, lo cual indudablemente influyó sobre los resultados finales. El deslipidizado con maceración no es total por lo que la maceración con etanol también extrae parte de los lípidos.



Figura 8. Rendimiento de extracción en función de la cantidad de etanol de la mezcla del solvente etanol:agua. Letras distintas indican diferencias significativas (Anova y test Duncan, $\alpha = 0.05$).



➤ Rendimientos de fenoles totales:

Para los extractos obtenidos con mezclas de etanol:agua, se obtuvieron los gráficos de las **Figuras 9 y 10**, con los contenidos de fenoles totales de los extractos y el rendimiento de obtención de fenoles respectivamente, de los tegumentos con y sin grasa.

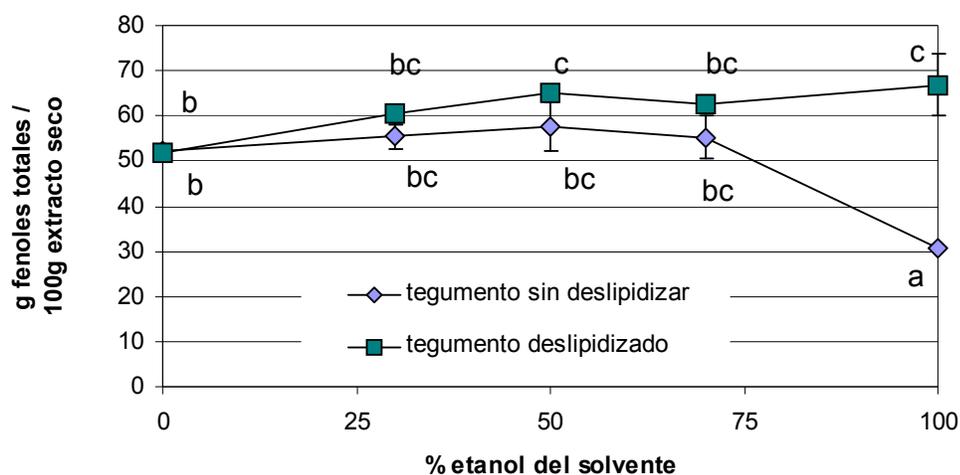
De acuerdo al análisis estadístico de la **Figura 9** (Anova y Test Duncan $\alpha = 0.05$) no se encontraron diferencias significativas entre los tegumentos sin deslipidizar y deslipidizado para mezclas entre 0% y 70% de etanol, mientras que para el 100% de etanol el tegumento deslipidizado mostró contenidos de fenoles significativamente mayores al tegumento sin deslipidizar.

Para el tegumento sin deslipidizar no se encontraron diferencias entre los contenidos de fenoles para las mezclas de entre 0 y 70% de etanol, mientras que para el 100% de etanol los contenidos resultaron significativamente menores.



Para el tegumento deslipidizado no se encontraron diferencias significativas entre las mezclas 0, 30 y 70% de etanol, ni entre las mezclas de 30 a 100% de etanol, resultando levemente inferior el contenido de fenoles del extracto de 0% de etanol (diferente significativamente de la mezclas 50% y 100%). Las diferencias que se observan en los contenido de fenoles totales/100g de extracto seco de los extractos, entre esta **Figura 9** y la **Figura 5** pudieron deberse a que se trabajó con tegumentos de diferente cosecha y diferentes formas de deslipidizar, una por maceración (Figura 5) y otra por soxhlet (Figura 9) tal como se describe en Materiales y Métodos. El deslipidizado con soxhlet pudo extraer algunos compuestos que dan lectura en la técnica de fenoles totales.

Figura 9. Contenido de fenoles totales de los extractos de tegumentos sin deslipidizar y deslipidizado con mezclas etanol:agua. Letras distintas indican diferencias significativas (Anova y test Duncan, $\alpha = 0.05$).

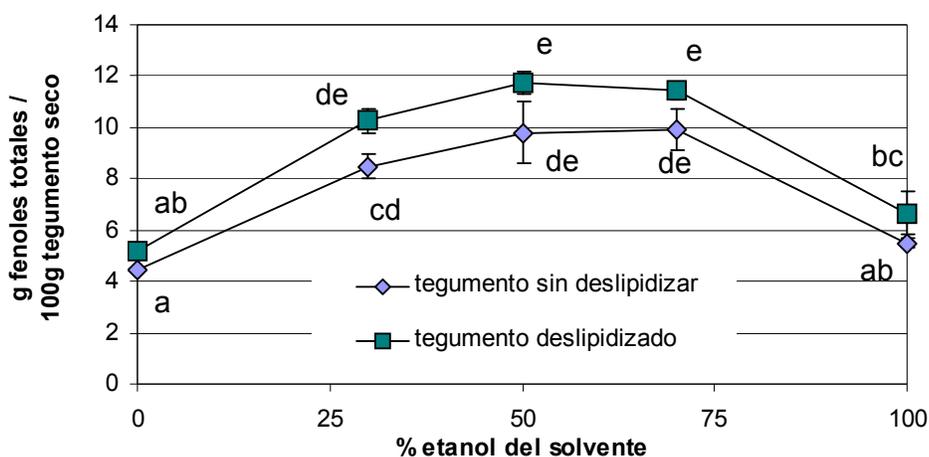


Según el análisis estadístico de la **Figura 10** (Anova y Test Duncan $\alpha = 0.05$), en ambos tegumentos se observa una tendencia de aumento del rendimiento de extracción de fenoles con el aumento de etanol de la mezcla solvente desde 0% hasta 70% de etanol, y una disminución para el 100% de etanol, sin existir diferencias significativas en los



rendimientos al comparar igual solvente entre los tegumentos deslipidizado y sin deslipidizar. Los mayores valores se obtuvieron con las mezclas entre 30 y 70% de etanol, para ambos tegumentos. Las diferencias que se observan en los contenido de fenoles totales/100g de tegumento seco de los extractos, entre esta **Figura 10** y la **Figura 6** pudieron deberse a las mismas causas explicadas para las figuras anteriores (**Figuras 8 y 9**).

Figura 10. Rendimientos de extracción de Fenoles Totales de los tegumentos sin deslipidizar y deslipidizado con mezclas etanol:agua. Letras distintas indican diferencias significativas (Anova y test Duncan, $\alpha = 0.05$).



➤ Actividad secuestrante de radicales libres:

Para los extractos obtenidos con mezclas de etanol:agua, se obtuvo el gráfico de la **Figura 11**, con los porcentajes de actividad secuestrante de radicales libres para una concentración de 1µg/mL de los extractos de los tegumentos deslipidizado y sin deslipidizar.

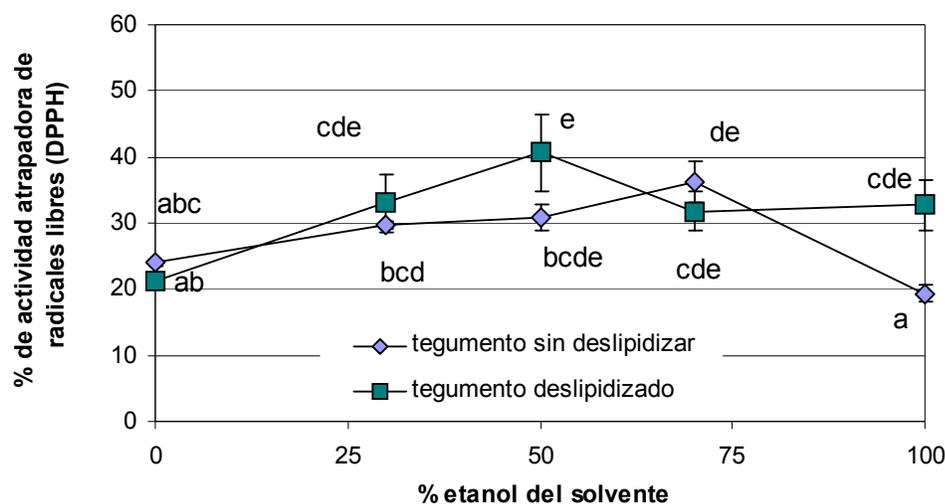


Se encontraron diferencias significativas entre ambos extractos (**Figura 11**). Para el tegumento sin deslipidizar solo se encontraron diferencias significativas importantes para el extracto con 100% etanol, resultando en menor porcentaje de actividad con respecto al resto. Para el tegumento deslipidizado el único extracto que mostró diferencias significativas fue el de 0% etanol, con porcentaje de extracción menor al resto.

De acuerdo a los resultados en cuanto a rendimientos de extracto seco, fenoles totales y actividad antioxidante se preferirían las mezclas etanol-agua entre 50 y 70% de etanol. Por una parte, debido a la polaridad del solvente por el agregado de agua, este permite extraer mayor cantidad de compuestos polares que de lípidos, no siendo necesario el deslipidizado previo del tegumento.

Por otro lado se prefiere que el contenido de etanol de la mezcla sea alta ya que facilita el proceso de evaporación del solvente del extracto, disminuyéndose los costos de evaporación que serían los más importantes en el proceso, pudiéndose además recuperar el solvente para ser utilizado nuevamente. Por todo esto es que se continuó trabajando con mezcla etanol:agua 70:30.

Figura 11. Porcentajes de Actividad Secuestrante de Radicales Libres de los extractos de tegumentos sin deslipidizar y deslipidizado con mezclas etanol:agua. Letras distintas indican diferencias significativas (Anova y test Duncan, $\alpha = 0.05$).





Correlación entre Contenido de Fenoles Totales y Actividad Secuestrante de Radicales Libres

Con los datos obtenidos de contenido de fenoles totales y actividad secuestrante de radicales libres para $1\mu\text{g/mL}$ de los extractos obtenidos mediante diferentes solventes y mezclas, se realizó un análisis de correlación, y se obtuvo un coeficiente de Pearson ($\alpha < 0.05$) de 0.89, lo cual indica la existencia de una buena correlación entre los fenoles y la actividad secuestrante de radicales libres, es decir que con el aumento de contenido de fenoles aumenta proporcionalmente la actividad secuestrante de radicales libres.

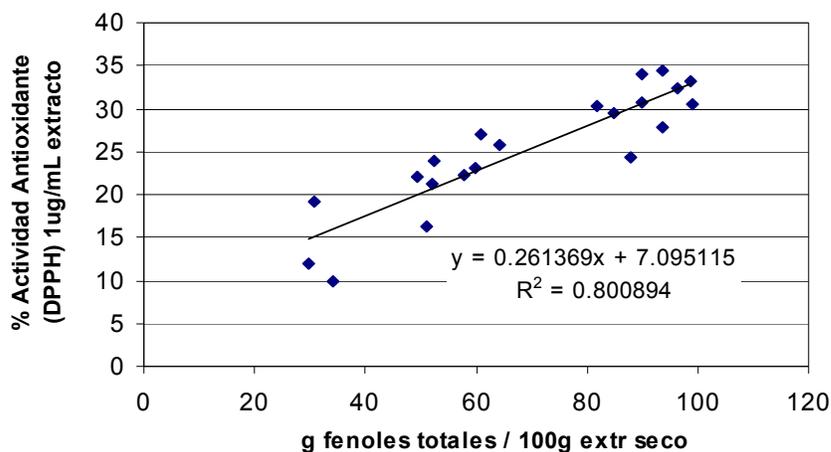
Por otro lado se realizó una regresión lineal de primer grado, y se obtuvo la siguiente ecuación de regresión (**Figura 12**):

$$\% \text{ de Actividad Secuestrante de Radicales Libres (} 1\mu\text{g/mL extracto)} = 7.095115 + 0.261369 [\text{g fenol/ } 100\text{g extracto seco}]$$

$$R^2 = 0.800894, R^2 \text{ ajustado} = 0.7904151$$

Con estos resultados se podría predecir el % de Actividad Secuestrante de Radicales Libres conociendo el contenido de fenoles de los extractos.

Figura 12. Gráfico de % de actividad secuestrante de radicales libres (DPPH) en función del contenido de fenoles totales de los extractos.





CONCLUSIONES

- **Composición porcentual:** Los componentes mayoritarios (65%) del tegumento lo constituyeron otros componentes diferentes a grasas, proteínas, y cenizas, dentro de los cuales se encuentran los compuestos fenólicos con contenidos entre 12-13%.
- **Extracción con diferentes solventes puros:** Los solventes con mayores porcentajes de extracción de materia seca y fenoles fueron el etanol y metanol, para tegumento con y sin lípidos, mientras que la acetona y el agua extrajeron bajas cantidades de compuestos fenólicos. La acetona extrajo altas cantidades de compuestos lipídicos. El tegumento deslipidizado mostró mayores rendimientos de fenoles totales que el sin deslipidizar para todos los solventes.

En cuanto a actividad secuestrante de radicales libres, los extractos que mejores actividades dieron fueron los de metanol, etanol y agua, lo cual corresponde a los contenidos de fenoles totales.

Por estos resultados se descartaron, para próximas extracciones, los solventes metanol por su toxicidad, acetona y agua por los bajos rendimientos en obtención de fenoles, y se continuaron los ensayos con mezclas etanol-agua.

- **Extracción con mezclas de etanol-agua:** para el tegumento sin deslipidizar, a medida que se incrementa el contenido de etanol de la mezcla aumentan los porcentajes de extracción de materia seca y fenoles totales, mientras que para el tegumento deslipidizado se alcanza un máximo de extracción para 50-70% de etanol, disminuyendo para etanol al 100%. Para los porcentajes 50 y 70% de etanol no se encontraron diferencias significativas entre tegumento deslipidizado y sin deslipidizar. En cuanto a contenido de fenoles de los extractos, en general no se encontraron diferencias entre los extractos, salvo para el solvente etanol 100% y tegumento sin deslipidizar que dio el menor contenido de fenoles.



En cuanto a actividad secuestrante de radicales libres, no se encontraron diferencias significativas entre los extractos, salvo para el etanol 100% del tegumento sin deslipidizar que dio el menor porcentaje de actividad.

Por todo esto se decidió que para las extracciones a nivel laboratorio y piloto se utilizarán mezclas etanol-agua 70:30, ya que se extraen las mayores cantidades de compuestos fenólicos, y al contener mayor cantidad de etanol la evaporación del solvente sería más rápida y económica.

- **Actividad secuestrante de radicales libres vs contenido de fenoles totales de los extractos:** Comparando diferentes concentraciones de extractos, se encontró que para $1\mu\text{g/mL}$ las diferencias significativas fueron más marcadas que para 5 y $10\mu\text{g/mL}$.

Además se encontró que los valores de contenido de fenoles de los extractos y su actividad secuestrante de radicales libres se correlacionan positivamente, con un coeficiente de 0.89, es decir que a medida que se incrementa el contenido de fenoles se incrementa proporcionalmente la actividad secuestrante de radicales libres del extracto.

Capítulo 2

Identificación de Algunos Compuestos Antioxidantes
del Tegumento de Maní



INTRODUCCION

En las distintas partes del fruto del maní se han encontrado e identificado compuestos con actividad antioxidante. En el aceite de maní se encuentran sustancias antioxidantes como los tocoferoles, y algunos fosfolípidos como la lecitina (Gopala Krishna and Prabhakar, 1994).

Además de los antioxidantes del aceite, en el maní aparecen otros componentes antioxidantes del tipo de sustancias polifenólicas. En la caja del maní se han realizado numerosos estudios de actividad y eficacia antioxidante de extractos metanólicos de compuestos fenólicos, principalmente de tipo flavonoides, de los cuales el principal es la luteolina, el cual ha demostrado poseer actividad similar al BHA y superior al α -tocoferol (Duh *et al.*, 1992; Yen *et al.*, 1993; Yen and Duh, 1994-1995; Duh and Yen, 1997).

En relación a las propiedades antioxidantes del tegumento de maní existen trabajos demostrando que contiene una alta proporción de sustancias fenólicas antioxidantes, del tipo proantocianidinas o también llamadas OPC (proantocianidinas oligoméricas), un compuesto complejo del tipo flavan-3-ol, descrito por Masquelier en 1947. Su trabajo consistió en buscar toxicidad en el tegumento de maní, descubriendo que no sólo no era tóxico, sino que además encontró una sustancia antioxidante, potencialmente vasoprotectora. En 1950 esta sustancia se utilizó a nivel medicinal. En 1987, Masquelier patentó (US patent nº 4,698,360) la utilización de estos compuestos como antioxidantes terapéuticos (Louis, 1999).

Más recientemente, se ha descubierto que en el maní existen otros compuestos fenólicos con actividad antioxidante como el resveratrol (*trans*-resveratrol, *trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (**Figura 13**) y sus derivados. Esta unidad generalmente se encuentra formando dímeros, trímeros y tetrámeros, que constituyen los denominados oligostilbenos, compuestos que han sido ampliamente estudiados en uva y vino tinto (Langcake and Pryce, 1976; Kanner *et al.*, 1994; Korhammer *et al.*, 1994; Waffo Teguo *et al.*, 1996; Mattivi and Reniero, 1992).



El resveratrol es uno de los principales estilbenos, con propiedades de fitoalexina producida por diferentes partes de la planta de maní (*Arachis hypogaea L.*), incluyendo la semilla. Los estilbenos son producidos por la planta de maní como defensa ante estímulos externos, particularmente ataque por hongos (Ingham, 1976; Sobolev *et al.*, 1995). Ellos se producen naturalmente en altas concentraciones en las semillas inmaduras. Con la maduración disminuye la producción de resveratrol y los metabolitos relacionados (Dorner *et al.*, 1989).

Este compuesto demostró poseer actividad protectora en ratones actuando como antioxidante y antimutagénico (Jang *et al.*, 1997). También está relacionado con la reducción de riesgo de enfermedades cardiovasculares inhibiendo o alterando la agregación y coagulación de plaquetas o modulando el metabolismo de lipoproteínas, regulando la formación de colesterol (Arichi *et al.*, 1982; Kimura *et al.*, 1985, 1995). Se ha demostrado que el consumo de vino de manera moderada está asociado con una disminución del riesgo de muerte por enfermedades cardiovasculares, lo cual estaría asociado al contenido de resveratrol del vino (Klatsky *et al.*, 1992).

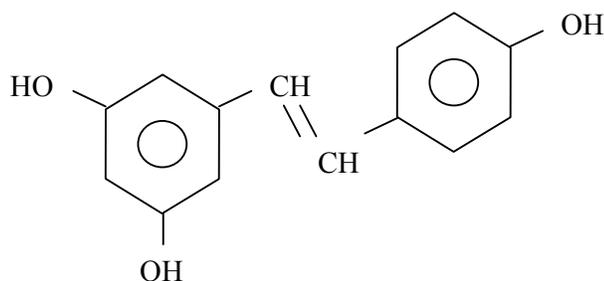
El resveratrol fue encontrado en la piel de la uva y en productos a base de uva, como el vino, en niveles de 0.031-7.17ppm (Mattivi, 1993; Celotti *et al.*, 1996). La mayoría de los estudios realizados hasta el momento relacionados al resveratrol en maní han sido llevados a cabo por Sanders y McMichael (1997); Sanders *et al.* (2000), en maní tipo “Runner”, “Virginia” y “Spanish”, de diferentes localidades de producción de los Estados Unidos, y por Sobolev *et al.* (1995) y Sobolev y Cole (1999), en maní comestible y productos de maní. En un principio se pensaba que el resveratrol sólo se producía en maní debido a ataque de hongos, y en consecuencia el maní resultaba no apto para su consumo. Pero en recientes estudios se encontró resveratrol en maní comestible sin ataque fúngico.

En los trabajos de Sanders *et al.* (2000) la semilla de maní crudo de diferentes cultivares contuvo 0.02-1.79 μ g de resveratrol por gramo y el tegumento 0.37-0.67 μ g/g. En productos de maní, como maní tostado, hervido y pasta, este compuesto fue encontrado en niveles entre 0.018 - 7.873 μ g/g (Sobolev and Cole 1999). De estos productos el maní tostado fue el que dio menores contenidos, en promedio 0.055 \pm 0.023 μ g/g, en la manteca de maní el



contenido fue significativamente superior, $0.324 \pm 0.129 \mu\text{g/g}$, y en maní hervido dio los mayores niveles $5.138 \pm 2.849 \mu\text{g/g}$.

Figura 13. Estructura química del *trans*-resveratrol: *trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno



El objetivo de este capítulo fue purificar extractos crudos del tegumento mediante particiones y diferentes técnicas cromatográficas, identificar algunos grupos de flavonoides, proantocianidinas y cuantificar el contenido de resveratrol del tegumento de maní runner blanqueado.



MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se trabajó con tegumento de maní runner blanqueado (cosecha 2000, Lorenzati, Ruetsch y Cia. S.A., Ticino, Córdoba, Argentina).

Metodologías

1. Extracción de los compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó a partir de 20g de tegumento de maní molido y deslipidizado, en dos etapas de 24 hs con 300mL de etanol 96% cada etapa, a temperatura ambiente, oscuridad y reposo. Los extractos se filtraron, juntaron y evaporaron hasta sequedad en evaporador rotatorio por vacío a 35-40°C (Buchi R 110, Frawil, Switzerland). El rendimiento del extracto se expresó en g extracto seco/ 100g tegumento seco.

El deslipidizado del tegumento se realizó en dos extracciones con 50ml de hexano cada 10g de tegumento durante 12h cada extracción, a temperatura ambiente.

Se determinó el contenido de fenoles del extracto (g fenoles totales/100g extracto seco) y del tegumento (g fenoles totales/100g tegumento seco), mediante el método de Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994), y el porcentaje de actividad secuestrante de radicales libres mediante DPPH (para 1µg/mL de extracto, según Joeux *et al.*, 1995 y Schmeda-Hirschmann, 1999).

2. Purificación del extracto crudo

- **Partición con solventes:** El extracto crudo y seco de tegumento fue re-disuelto en 55mL de agua desionizada, y se particionó con 90mL de diclorometano (DCM) y 300mL de acetato de etilo (ETOAC), separándose de la fase acuosa (H₂O). Al igual que en el extracto crudo, sobre cada partición con solventes se determinaron los rendimientos de partición del extracto (g extracto seco de cada partición/ 100g extracto crudo total),



contenido de fenoles de los extractos (g fenoles totales/100g extracto seco, según Waterman and Mole, 1994) y actividad secuestrante de radicales libres (1µg/mL de extracto, según Joeux *et al*, 1995 y Schmeda-Hirschmann, 1999).

- **Cromatografía en columna (CC):** Las fracciones obtenidas por partición con solventes que mostraron mayor rendimiento en fenoles y actividad antioxidante (ETOAC y H₂O) fueron evaporadas hasta sequedad (evaporador rotatorio, vacío y 35-40°C). 400mg de dichos extractos secos se disolvieron en 2 mL de metanol y se separaron con metanol en columna de vidrio empacada con Sephadex LH-20 (Sigma) (Tapia *et al*. 1999) por duplicado, con las siguientes dimensiones: diámetro 1 cm, largo total 60.5cm, largo del empaque de sephadex 33.5 cm. Flujo de elusión de 0.5 ± 0.05 mL/min.

Durante la elusión de los extractos en la columna se obtuvieron fracciones de diferentes colores al UV, mediante observación directa de la columna con lámpara UV (365nm). Sobre estas fracciones se determinaron los rendimientos de extracto seco (g extracto seco de cada fracción de la columna /100g extracto seco total), contenido de fenoles (g fenoles totales/ 100g extracto seco de cada fracción de la columna, según Waterman and Mole (1994), y actividad secuestrante de radicales libres, 1µg/mL de extracto, según Joeux *et al*. (1995) y Schmeda-Hirschmann (1999).

3. Identificación de algunos componentes fenólicos

- **Cromatografía en capa delgada (CCD):** Para controlar las fracciones obtenidas de la columna e identificar grupos de flavonoides y resveratrol se realizaron CCD en una dimensión en placas con silica gel de 20x20 cm y 0.2 mm espesor de silica gel 60G (Merck, Damstadt, Germany), con solvente EtOAc : Ac. Acético : Agua (17:1:2). Las fracciones de la columna y extractos etanólicos, ETOAC y H₂O se compararon con un estándar de resveratrol (*trans*-resveratrol, Sigma Co, St Louis, MO, USA) (Wagner, *et al*. 1984; Harborne, 1973; Mabry, *et al*. 1970).

Como reveladores se utilizaron, luz UV 365nm, amoníaco, ácido difenil bórico (Ester de ácido difenilbórico-etanolamina, Aldrich, Milwaukee, WI, USA).



- **Cromatografía en Papel (CP):** de forma descendente, en papel Whatman 3MM (20x20cm) (Wagner, *et al.* 1984; Harborne, 1973; Mabry, *et al.* 1970), solvente MeOH:Agua 2:1, comparando los extractos con un patrón de resveratrol (Sigma Co).

Como reveladores se utilizaron, luz UV 365nm, amoníaco y vainillina. Esta última se utilizó disuelta en HCl (3mL vainillina al 4% en metanol + 1.5ml HCl concentrado + 5.5ml H₂O) como reactivo para identificar proantocianidinas (Porter, 1989).

- **Resonancia Magnética Nuclear (RMN):** Las fracciones obtenidas de la columna (CC) que al ser separadas por cromatografía en capa delgada (CCD) y en papel (CP), frente a una muestra de resveratrol patrón (99%, Sigma, USA), contuvieron una mancha similar, fueron juntadas y evaporadas en atmósfera de nitrógeno. Estas muestras fueron analizadas por RMN¹H para comprobar la presencia del resveratrol. Los espectros de RMN¹H fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker AC-200, perteneciente a la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas (U.N.C.), equipado con una sonda dual (¹H, ¹³C) y operando a una frecuencia de 200.13 MHz para ¹H y 50.3 MHz para ¹³C. Para la adquisición de los datos se utilizó el software estándar de Bruker y fueron procesados con el software WINNMR. La muestra y el *resveratrol* (99%, Sigma) fueron disueltos en 0.5mL de MeOD, utilizando TMS como estándar interno. Los corrimientos químicos se informan en partes por millón (f).

4. Cuantificación de resveratrol por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

Las fracciones sobre las que se identificó la presencia de resveratrol por CCD, CP y RMN, fueron disueltas en la fase móvil de HPLC y 10µL fueron inyectados en un equipo HPLC (LKB Bromma, Sweeden) equipado con una columna de silica gel (Macherey-Nagel Nucleosil 120-5-C18, Düren, Germany). El resveratrol fue separado con metanol:agua (1:1 v:v, flujo 1,5ml/min) como fase móvil e identificado y cuantificado utilizando un detector UV a 320nm. Como estándar externo se utilizó un patrón de resveratrol (Sigma Co). La curva de calibración del resveratrol fue: área de pico = 8839168.45 x concentración de resveratrol (mg mL⁻¹) + 108988.73 (R² = 0.92).



Análisis estadístico de datos

Las pruebas fueron realizadas por triplicado y las diferencias significativas fueron analizadas mediante ANOVA y test Duncan ($\alpha = 0.05$, programa Infostat).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Extracción de los compuestos fenólicos

El rendimiento del extracto etanólico fue de 10.56 ± 0.23 g extracto seco/ 100g tegumento deslipidizado seco, y 9.92 ± 0.22 g extracto seco/ 100g tegumento seco. Este valor fue inferior al detectado en el Capítulo 1 (aprox. 16%, **Figura 5**) dado que se trató de un tegumento de diferente año de cosecha

Los fenoles totales del extracto fueron de 93.18 ± 3.32 g/ 100g extracto de tegumento deslipidizado seco, es decir 9.84 ± 0.21 g fenoles totales/ 100g tegumento deslipidizado seco. En el trabajo de Duh *et al* (1992) informaron 1.99g de compuestos fenólicos cada 100g de cáscara (caja) de maní, utilizando etanol como solvente de extracción. Estos resultados indicarían que el tegumento de maní es una fuente mayor de compuestos fenólicos y antioxidantes naturales que la caja del maní.

Los porcentajes de actividad secuestrante de radicales libres para las concentraciones de 1, 5 y $10\mu\text{g/mL}$ del extracto etanólico de tegumento deslipidizado fueron de 31.5 ± 0.9 , 89.4 ± 4.1 y 97.1 ± 0.3 , respectivamente. Yen and Duh (1994) encontraron una actividad secuestrante de radicales libres del 89.3% de inhibición en $1500\mu\text{g/mL}$ de extracto metanólico de caja de maní. Es decir que el extracto etanólico del tegumento de maní poseería mayor actividad como secuestrante de radicales libres que los extractos de caja de maní.

2. Purificación de los extractos crudos

➤ Partición con solventes:

En la **Tabla 1** se observan los valores de rendimientos de partición, contenido de fenoles totales y actividad atrapadora de radicales libres respectivamente de las particiones DCM, ETOAC y H_2O del extracto etanólico crudo.

Según el análisis estadístico de esta tabla (Anova y test Duncan $\alpha = 0.05$), se puede observar que el extracto ETOAC resultó con mayor rendimiento de materia seca (43.5 g extracto ETOAC/ 100g extracto etanólico seco) y fenoles totales (83.6 g fenoles/ 100g extracto ETOAC), con diferencias significativas con respecto a los extractos H₂O y DCM, siendo éste último el de menor rendimiento debido a la escasa polaridad del solvente.

En cuanto a actividad secuestrante de radicales libres, no se encontraron diferencias significativas entre las particiones ETOAC (39.72%) y H₂O (39.66%), las cuales dieron porcentajes significativamente mayores comparados con el DCM (0.20%). De acuerdo a estos resultados se continuaron purificando las particiones de ETOAC y H₂O.

Tabla 1. Rendimiento de materia seca, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante (actividad secuestrante de radicales libres, DPPH) de las particiones con DCM, ETOAC y H₂O del extracto etanólico de tegumento deslipidizado.

Extracto	Rendimiento g materia seca/ 100g extracto seco	g fenoles/ 100g extracto seco	% Actividad Secuestrante de Radicales Libres
DCM	19.98 ± 0.66 C ^a	4.9 ± 0.2 C	0.20 ± 0.00 B
ETOAC	43.50 ± 1.18 A	83.6 ± 8.1 A	39.72 ± 0.21 A
H₂O	32.65 ± 0.98 B	66.8 ± 3.2 B	39.66 ± 1.16 A

^a Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas (Anova, Duncan $\alpha = 0,05$).



➤ **Cromatografía en columna (CC):**

Por separación en columna se recolectaron 8 y 9 fracciones de los extractos de ETOAC y H₂O, respectivamente, con diferentes colores al UV, las cuales se detallan en la **Tabla 2**. Una fotografía de la columna cromatográfica del extracto ETOAC se muestra en la **Figura 14**.

En las **Figuras 15, 16 y 17** se muestran los porcentajes de extracción de materia seca, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante, respectivamente, de cada fracción de la **Tabla 2**.

Para el extracto ETOAC, las dos primeras fracciones, que presentaron coloración al UV verde (fracción I) y amarillo (fracción II), dieron rendimientos bajos, de 1.68 y 2.07 g materia seca / 100g extracto ETOAC, respectivamente. La fracción III mostró color celeste brillante, lo cual podría indicar la presencia de resveratrol (Ingham 1976). Esta fracción tuvo un rendimiento de 24.97g/ 100g extracto ETOAC. Las fracciones V a VIII mostraron el mismo color al UV (púrpura), lo cual indicaría que su composición sería similar. Estas fracciones dieron los mayores rendimientos, 52.1g/ 100g extracto ETOAC (**Tabla 2 y Figura 15**).

Para el extracto acuoso (H₂O) no se observó la presencia del color celeste brillante asociado al resveratrol. Pero se encontraron diferentes colores en las fracciones II a IV (celeste, verde y amarillo al UV) que podrían indicar la presencia de flavonoides glicosidados (Wagner, *et al.* 1984; Harborne, 1973; Mabry, *et al.* 1970) (**Tabla 2**). Las fracciones que dieron los mayores rendimientos fueron las últimas de color púrpura (de V a IX), las cuales sumaron un 78.5% del total de extracto H₂O (**Figura 15**).

En cuanto al contenido de fenoles totales (**Figura 16**), para las fracciones de ETOAC, en general no se encontraron diferencias significativas, y los valores resultaron entre 63.5 g fenoles /100g (fracción V) y 109.0 g fenoles/100g (fracción II). Mientras que para los extractos H₂O se encontraron diferencias significativas entre las fracciones, resultando la



fracción I con los menores contenidos de fenoles (13.2 g fenoles/ 100g fracción) y las fracciones III y IV con los mayores valores, 82.1 y 86.3 g/100g fracción respectivamente, sin diferencias significativas entre estas.

En cuanto a actividad secuestrante de radicales libres (**Figura 17**), para las fracciones del extracto ETOAC se encontraron escasas diferencias significativas, en general las primeras fracciones dieron los menores valores (fracciones I a V). Los porcentajes de actividad se encontraron entre 37.3% (fracción III) y 49.8% (fracción VI). Para las fracciones del extracto H₂O se encontraron diferencias significativas más marcadas, siendo la fracción I la de menor actividad (4.0%) y la fracción VIII la de mayor actividad (42.5%).

Tabla 2. Valores promedios \pm error estándar de mL de solvente descartado antes de la recolección de las fracciones, mL recolectados y color al UV de cada fracción de los extractos de ETOAC y H₂O.

Nº de Fracción	ETOAC		H ₂ O	
	<i>mL</i>	<i>Color UV</i>	<i>mL</i>	<i>Color UV</i>
<i>mL solvente descartado inicialmente</i>	34.8 \pm 1.5		28.5 \pm 0.5	
I	11.6 \pm 1.7	Verde	5.6 \pm 0.1	Sin color
II	17.9 \pm 1.0	Amarillo	10.2 \pm 0.1	Celeste claro
III	31.4 \pm 1.0	Celeste brillante	24.7 \pm 0.1	Verde
IV	42.8 \pm 0.3	Celeste claro	33.7 \pm 0.1	Amarillo
V	75.9 \pm 1.7	Púrpura	53.7 \pm 0.2	Púrpura
VI	104.6 \pm 2.6	Púrpura	83.7 \pm 0.1	Púrpura
VII	151.9 \pm 1.6	Púrpura	113.7 \pm 0.1	Púrpura
VIII	244.3 \pm 1.2	Púrpura	153.7 \pm 0.1	Púrpura
IX			242.7 \pm 0.1	Púrpura



Figura 14. Columna cromatográfica del extracto ETOAC.

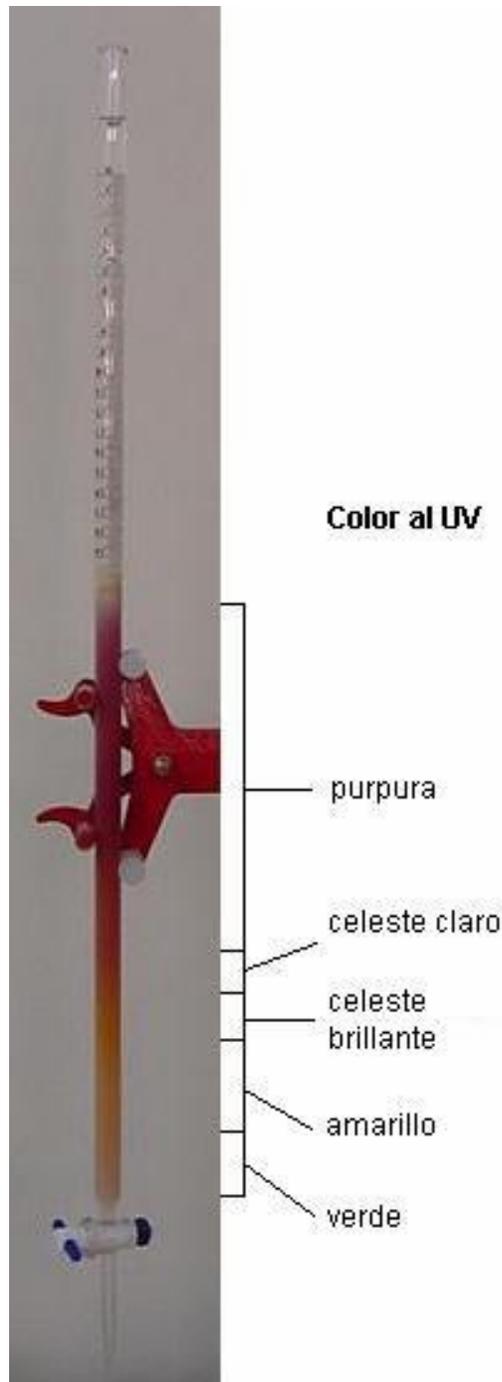




Figura 15. Rendimientos de extracción (g materia seca/ 100g extracción total) de las fracciones obtenidas por CC de los extractos ETOAC y H₂O. Letras distintas indican diferencias significativas (Anova, Test Duncan $\alpha = 0.05$).

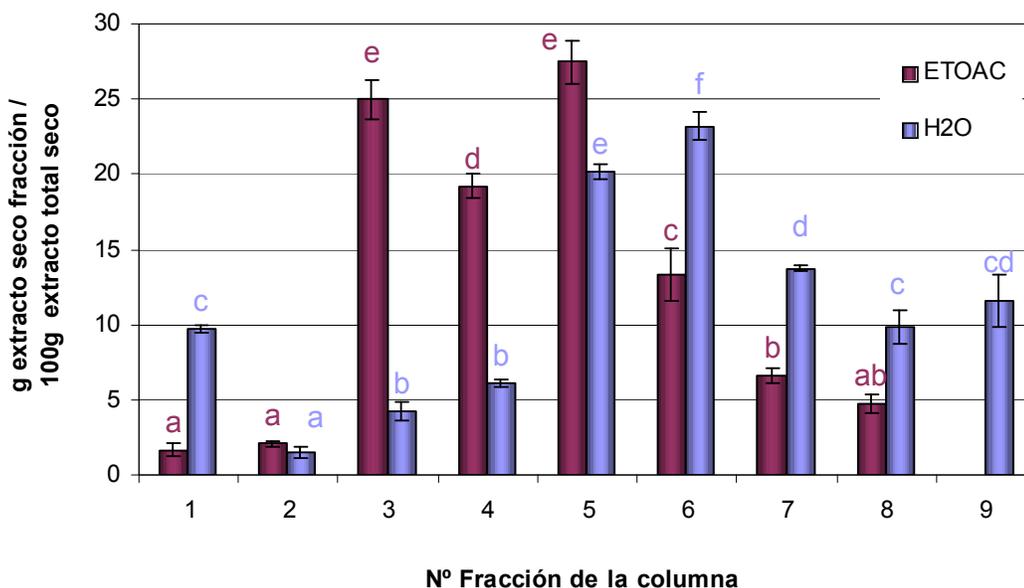


Figura 16. Contenidos de fenoles totales (g fenol/100g extracto seco) de las fracciones obtenidas por CC de los extractos ETOAC y H₂O. Letras distintas indican diferencias significativas (Anova, Test Duncan $\alpha = 0.05$).

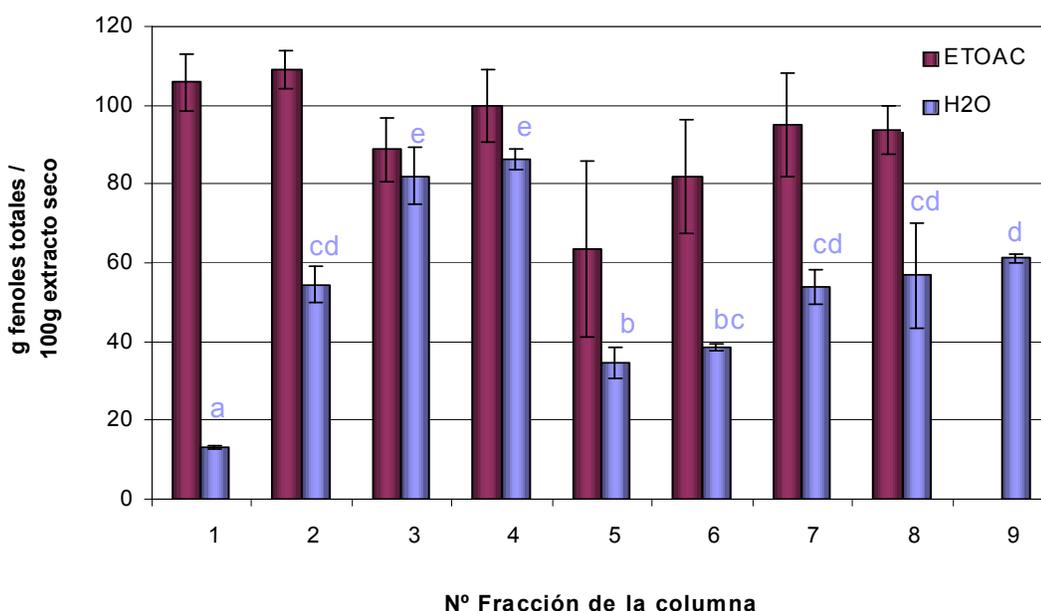
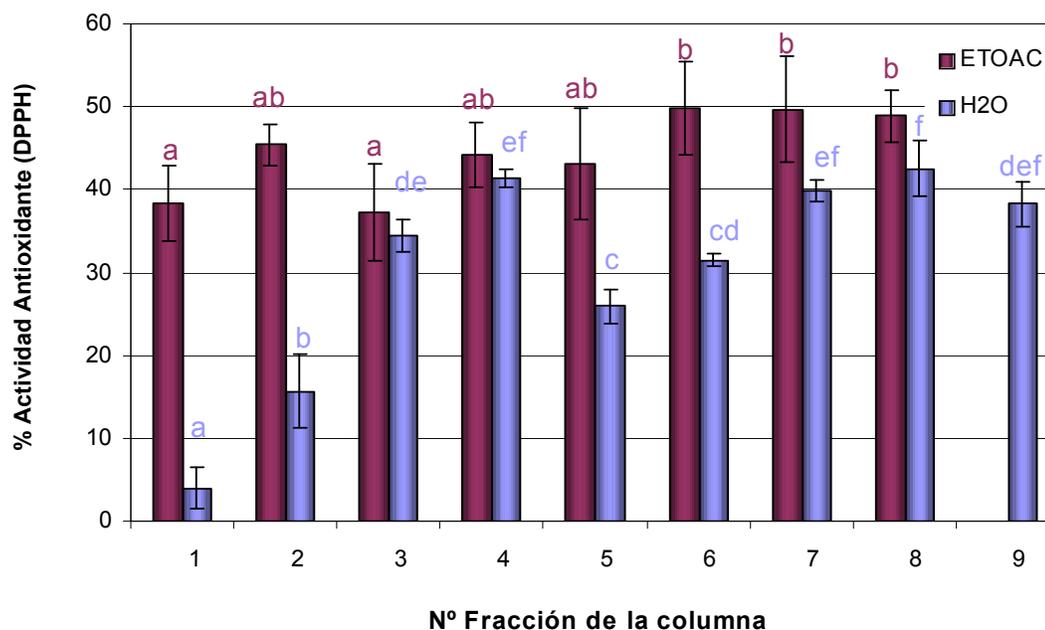




Figura 17. Porcentajes de actividad antioxidante (DPPH, 1µg extracto/mL) de las fracciones obtenidas por CC de los extractos ETOAC y H₂O. Letras distintas indican diferencias significativas (Anova, Test Duncan $\alpha = 0.05$)



3. Identificación de algunos componentes fenólicos

➤ Cromatografía en capa delgada (CCD):

Por medio de la cantidad de manchas cromatográficas en CCD se analizó la pureza y la presencia de flavonoides y resveratrol de los extractos ETOAC y H₂O y las fracciones obtenidas de la columna.

Extracto ETOAC:

La cromatografía en capa delgada (**Tabla 3**) resolvió diferentes puntos al UV (365nm) de las primeras fracciones (I a VII). Las últimas fracciones presentaron franjas de corrida. En UV 365nm se observaron un punto amarillo en la fracción I (Rf 0,47) y una destacada mancha celeste brillante en II y III (Rf 0.91). Al revelarse con ácido difenil bórico,

aparecieron manchas verdes, amarillas y naranjas en las fracciones I a VII. Lo que podría indicar que corresponden a flavonoides mono y di-glicosidados y agliconas (Wagner *et al.*, 1984; Harborne, 1973; Mabry *et al.*, 1970).

El resveratrol fue identificado solamente en las fracciones II y III, por la presencia de un punto celeste brillante a Rf 0.91, cuyo color no cambió en presencia de vapor de NH₃. Este compuesto no apareció en el extracto crudo de etanol, ni en las particiones ETOAC y H₂O debido, posiblemente, a su baja concentración.

Tabla 3. Colores y valores de Rf de los puntos separados por CCD en sílica gel de las fracciones ETOAC obtenidas de cromatografía en columna.

Rf de CCD ³	Color (UV)								
	<i>Fracciones de la columna cromatográfica extracto ETOAC</i>								<i>Resveratrol estándar</i>
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>	<i>VIII</i>	
0.36	púrpura	púrpura							
0.47	amarillo	amarillo	amarillo						
0.53	púrpura	púrpura							
0.61	púrpura ¹	púrpura ¹							
0.63				púrpura	púrpura	púrpura	púrpura		
0.67				púrpura	púrpura	púrpura	púrpura		
0.79			púrpura	púrpura	púrpura	púrpura	púrpura	púrpura	
0.89			púrpura	púrpura	púrpura ²	púrpura ²	púrpura ²		
0.91		celestes fluorescente	celestes fluorescente						celestes brillante

¹ El color púrpura al UV cambió a anaranjado con el rociado con de ác. difenil bórico.

² El color púrpura al UV cambió a verde claro con ác. difenil bórico

³ Sistema de solvente EtOAc:HAc:H₂O (17:1:2).



Extracto de H₂O:

En la cromatografía en capa delgada del extracto acuoso se observaron colores celestes y púrpura en las primeras fracciones H₂O (fracción I Rf entre 0.35-0.40 y fracción VI Rf entre 0.55-0.62) (**Tabla 4**), que con ácido difenil bórico se transformaron en naranja, lo que indicaría que pueden ser flavonoides glicosidados (Wagner, *et al.* 1984; Harborne, 1973; Mabry, *et al.* 1970). En las fracciones de V a IX se observaron manchas de colores púrpura.

Al comparar con el estándar de resveratrol no se encontró ninguna fracción con punto similar, por lo que se descartó la presencia de este compuesto en las fracciones de H₂O.

Tabla 4. Colores y valores de Rf de los puntos separados por CCD en silica gel de las fracciones H₂O obtenidas de cromatografía en columna.

Rf de CCD ²	Color (UV)									
	Fracciones de la columna cromatográfica extracto H ₂ O									Resveratrol estándar
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
0.14			púrpura						púrpura	
0.20				púrpura	púrpura	púrpura	púrpura	púrpura		
0.30					púrpura	púrpura	púrpura	púrpura	púrpura	
0.35	celeste ¹	celeste ¹								
0.40			púrpura ¹	púrpura ¹						
0.45		amarillo	amarillo							
0.55	celeste	celeste	celeste ¹	púrpura ¹						
0.62		celeste	celeste	púrpura	púrpura ¹					
0.70	celeste	celeste	celeste		púrpura	púrpura	púrpura	púrpura		
0.80		púrpura	púrpura				púrpura	púrpura	púrpura	
0.90					púrpura	púrpura	púrpura			celeste brillante
0.95	amarillo									

¹ El color púrpura al UV cambió a anaranjado con el rociado con de ác. difenil bórico.

² Sistema de solvente EtOAc:HAc:H₂O (17:1:2).



➤ **Cromatografía en papel (CP):**

Mediante corridas en papel con solvente MeOH:H₂O (2:1) de los extractos crudos y las fracciones de las columnas se observaron puntos de colores amarillos, celestes, naranjas, verdes y púrpuras al UV, y algunos cambiaron de color al ser revelados con NH₃.

Para el extracto ETOAC, los colores al UV y Rf fueron los siguientes: púrpura Rf 0.03-0.04, amarillo Rf 0.12-0.14, celeste Rf 0.26-0.28 (cambió a verde con NH₃), púrpura Rf 0.7-0.9.

Para el extracto H₂O, se observaron los siguientes puntos: amarillo Rf 0.12, naranja Rf 0.29, púrpura 0.7-0.9 (algunos puntos cambiaron a verde con NH₃).

El Rf promedio del resveratrol en el sistema de CP con metanol:agua 2:1 fue de 0.61 ± 0.07 . El color de la mancha es incolora en luz visible, y celeste brillante al UV, no modificándose el color con amoníaco.

Los extractos en los cuales se encontraron manchas con Rf similares al resveratrol y colores idénticos al UV y con NH₃, fueron las fracciones donde se observó el color celeste brillante de la columna (fracciones II y III), de los extractos ETOAC.

Los extractos sin purificar por columna no presentaron esta mancha, posiblemente por la baja concentración del resveratrol en los extractos o particiones crudos.

En general, las primeras fracciones de la CC (desde I a VI) del extracto ETOAC mostraron colores amarillo, celeste y verde, mientras que las últimas no mostraron estos colores, sino manchas alargadas de color púrpura al visible y UV, las cuales algunas mostraron cambio de color con NH₃.

Las fracciones y extractos crudos que presentaron manchas púrpuras con Rf de 0.6-0.9 fueron reveladas con vainillina en HCl, y estas cambiaron a color rojo (visible), lo cual



indicó que podrían ser compuestos con grupos flavan-3-ol y proantocianidinas (Porter, 1989). Estas fracciones representaron la mayor parte en peso del extracto (fracciones V a VIII con 52.1% del peso del extracto ETOAC, y fracciones de V a IX con 78.5% del peso del extracto H₂O, **Tabla 2 y Figura 15**). Estos compuestos ya han sido estudiados y encontrados en extractos de tegumento de maní, los cuales se sabe que poseen alta actividad antioxidante (Masquelier, 1987, US patent n° 4,698,360; Louis, 1999).

Con los resultados de CCD y CP se puede concluir que los extractos del tegumento de maní mostraron grandes cantidades de compuestos del tipo proantocianidinas, los cuales serían los responsables mayoritarios de la actividad antioxidante. Además, los extractos tuvieron resveratrol, otro compuesto muy conocido y estudiado en uva, vino (Langcake y Pryce, 1976; Mattivi y Reniero, 1992; Mattivi, 1993; Kanner *et al.*, 1994; Korhammer *et al.*, 1994; Celotti *et al.*, 1996; Waffo Teguo *et al.*, 1996) y maní (Ingham, 1976; Sobolev *et al.*, 1995; Sanders y McMichael, 1997; Sobolev y Cole, 1999; Sanders *et al.*, 2000), con gran actividad antioxidante y propiedades beneficiosas para la salud de los consumidores (Jang *et al.*, 1997; Arichi *et al.*, 1982; Kimura *et al.*, 1985, 1995; Klatsky *et al.*, 1992).

A fin de asegurar la presencia de este compuesto se analizaron las fracciones que presentaron manchas similares al resveratrol (II y III del extracto ETOAC) mediante HPLC y RMN.

➤ **Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN):**

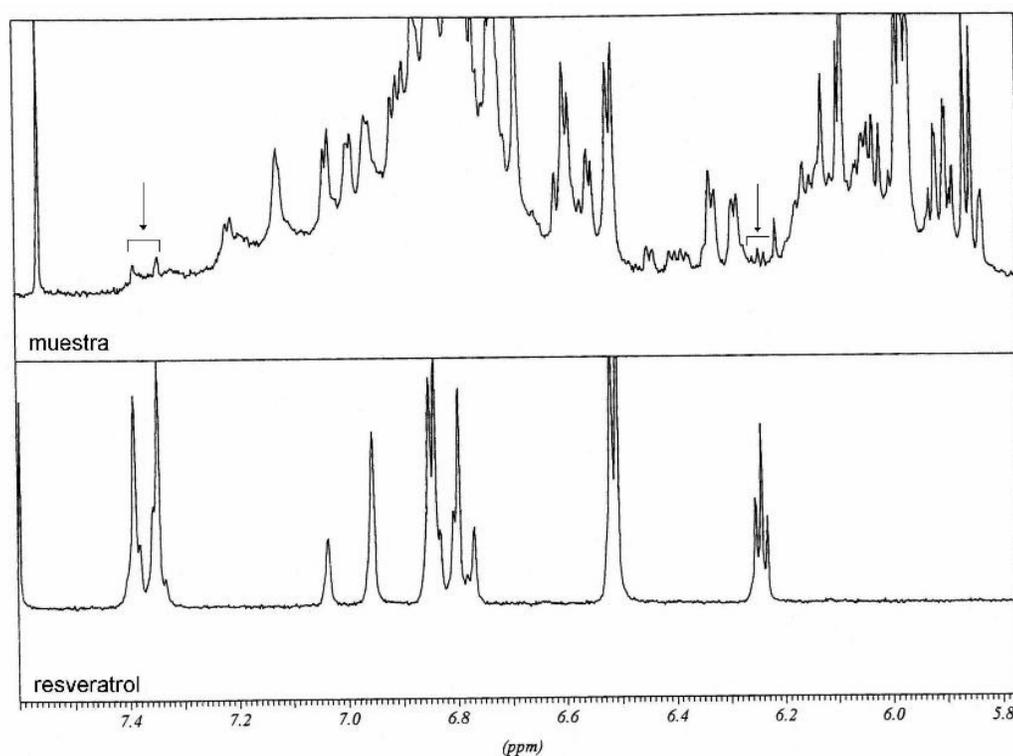
En la **Figura 18** se muestran los espectros de RMN para el resveratrol y la muestra formada por las fracciones II y III (ETOAC) que presentaron el color celeste brillante.

Mediante la comparación de ambos espectros se observó en el patrón y la muestra un triplete a 6.26ppm y un doblete a 7.37ppm, lo que indicaría la presencia de este compuesto en la muestra. Pero además la muestra tuvo diferentes picos entre 6.3-7.2ppm



respecto al estándar de resveratrol, lo que correspondería a otros compuestos de estructura fenólica.

Figura 18. Espectros de RMN para (a) la fracción celeste brillante de CC del extracto ETOAC-EED y (b) resveratrol.



4. Cuantificación de resveratrol por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

En la **Figura 19** se pueden observar dos corridas en HPLC, la primera corresponde al resveratrol patrón, y la segunda a la muestra correspondiente a la fracciones celestes obtenidas de CC del extracto ETOAC (II y III). De acuerdo a esta Figura el tiempo de retención del resveratrol fue 3.77 minutos, y en la muestra se obtuvo un pico con el mismo tiempo de

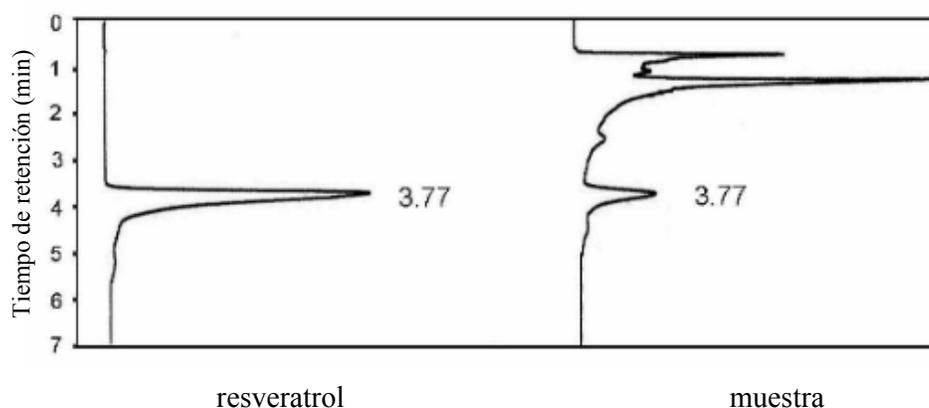


retención. El cual incrementó su área con el agregado de una pequeña cantidad de resveratrol patrón a la muestra.

El contenido de resveratrol resultó en $91.4 \pm 7.3\mu\text{g}$ resveratrol por g de extracto seco etanólico de tegumento desengrasado, y $9.07 \pm 0.72\mu\text{g}$ resveratrol por g de tegumento seco de maní.

En otros trabajos relacionados a resveratrol en uva y vino, este compuesto fue encontrado en concentraciones entre 0.031-7.17ppm (Mattivi 1993; Celotti *et al* 1996). En maní de Estados Unidos, el resveratrol fue encontrado en niveles de 0.02-1.79 $\mu\text{g/g}$ (Sanders *et al* 2000), en tegumento 0.65 $\mu\text{g/g}$ y en productos de maní alrededor de 0.018-7.873 $\mu\text{g/g}$ (Sobolev and Cole 1999). En comparación con estos valores el tegumento de maní argentino tuvo mayor contenido de resveratrol que el maní y productos de maní de USA. Esto puede deberse a las diferentes condiciones de suelo, clima, cosecha y procesamiento, ya que la producción de resveratrol (como fitoalexina) en la semilla de maní es como respuesta frente a infecciones o daños.

Figura 19. Corridos de HPLC de resveratrol y la fracción celeste CC, ETOAC-EED. Los valores de R_t se expresan en minutos.





CONCLUSIONES

➤ **Partición con solventes:** los solventes que dieron los mayores rendimientos en extracto seco, fenoles totales y actividad antioxidante fueron el acetato de etilo y el agua. Por este motivo se continuaron purificando estos extractos.

➤ **Cromatografía en columna (CC):** para todos los extractos, las primeras fracciones, que presentaron coloración al UV verde, celeste, amarillo, dieron rendimientos muy bajos, los mayores rendimientos se obtuvieron de las últimas fracciones de color púrpura al UV y al visible, las cuales corresponderían a proantocianidinas (grupos flavan-3-ol), según análisis por cromatografía en papel y revelado con vainillina.

En cuanto al contenido de fenoles totales, para los extractos ETOAC en general no se encontraron diferencias significativas entre las fracciones, mientras que si se encontraron diferencias entre las fracciones del extracto H₂O, de las cuales las 2 primeras contuvieron bajas cantidades de fenoles.

En cuanto a actividad antioxidante, la primera fracción del extracto ETOAC resultó con menor porcentaje de actividad antioxidante que el resto de las fracciones. En general no se encontraron diferencias significativas entre las últimas fracciones de los extractos ETOAC.

➤ **Cromatografía en capa delgada (CCD) y en papel (CP):** de acuerdo a los análisis de las corridas de los extractos crudos y las fracciones de la columna, y en comparación con bibliografía, se encontró la presencia de diferentes tipos de flavonoides, mono y diglicosidados y agliconas en las primeras fracciones de la columna del extracto EtOAC, mientras que en la últimas predominan las proantocianidinas. Además se compararon corridas en diferentes sistemas con resveratrol patrón, y se encontró coincidencia en las fracciones de la columna (II y III de ETOAC) que presentaron color celeste brillante al UV. En los extractos crudos y en los de partición no se encontró la presencia de resveratrol, posiblemente por su baja concentración en estos extractos.



- **Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN):** Al comparar los espectros de ^1H del resveratrol y la muestra color celeste de la fracción obtenida por CC del extracto ETOAC se detecta la presencia de resveratrol en dicha muestra, junto a otros compuestos de tipo fenólico.
- **Identificación y cuantificación de resveratrol mediante HPLC:** la muestra analizada presentó un pico con el mismo R_t del resveratrol patrón, el cual se utilizó para cuantificar el contenido del mismo en la muestra. Los resultados en contenido de resveratrol de los extractos y el tegumento seco dieron valores superiores a datos publicados sobre maní de USA.

Capítulo 3

*Aplicación y Determinación de la Actividad
Antioxidante de los Extractos de Tegumento de Maní
sobre Productos Alimenticios*

INTRODUCCION

Los tejidos vivos pueden permanecer sin oxidarse debido a la presencia natural de antioxidantes en las células. Cuando los tejidos se rompen o degradan debido a los tratamientos de procesamiento de los alimentos se comienzan a formar compuestos pro-oxidantes, peróxidos y otros radicales oxigenados. Además, la mayoría de los antioxidantes naturales se destruyen, por ello se hace necesario agregarlos (antioxidantes tanto naturales como sintéticos) para conservar el alimento hasta su consumo (Fennema, 1993; St. Angelo, 1996).

Los antioxidantes alimenticios, naturales o sintéticos, actúan, en muy bajas concentraciones, como inhibidores de radicales libres, interfiriendo en el mecanismo fundamental de la autooxidación de los lípidos (St. Angelo, 1996; Carelli *et al.*, 2000).

Los antioxidantes sintéticos son los más utilizados en la industria tanto alimentaria, como farmacéutica, de plásticos, pinturas, etc. por sus ventajas en cuanto a bajos costos de obtención, alta efectividad, facilidad de aplicación y control, versatilidad y disponibilidad comercial en grandes cantidades y en forma estandarizada. Sin embargo, la desventaja fundamental es su toxicidad, por ello se encuentran regulados por normas nacionales e internacionales, y no todos los compuestos son permitidos en todos los países por igual (Valenzuela *et al.*, 2000). El principal problema es que se ha encontrado que muchos de los antioxidantes sintéticos más comunes (como el BHA y BHT) poseen propiedades cancerígenas, probadas en ratones (Ito *et al.*, 1982; Imida *et al.*, 1983), y además no se conocen con exactitud si existen otros mecanismos de toxicidad crónica en el organismo debido a que su aplicación es relativamente reciente. Este tema es muy discutido a nivel científico, porque muchos argumentan que en las concentraciones que se agregan a los alimentos estos efectos serían generalmente insignificantes.

Actualmente, existe una creciente presión para aumentar el uso de antioxidantes de origen natural y sustituir a los sintéticos, sin embargo este reemplazo no ocurre con la dinámica deseada. Son varios los problemas. Cuando se compara la efectividad de los

antioxidantes naturales con la de los sintéticos en igualdad de condiciones, ninguno de origen natural puede equiparar en efectividad a los sintéticos. El costo de los antioxidantes naturales es mayor (a veces hasta un factor de 10) al costo de los sintéticos, ya que los primeros requieren procesos de purificación más complicados, y en consecuencia más costosos, mientras que los sintéticos son producidos a partir de derivados del petróleo de muy bajo costo y con rendimientos muy altos. Quizás el único argumento que se puede esgrimir a favor de los antioxidantes naturales es justamente su condición natural, habitualmente asociada a sustancias inocuas o de muy baja toxicidad cuando se les compara con sus símiles sintéticos. Sin embargo, deberán transcurrir varios años aún para que los antioxidantes naturales representen una supremacía en el mercado de estos productos, que por lo demás es un mercado mundial de varios millones de dólares y un monopolio de un número muy restringido de compañías productoras (Valenzuela *et al.*, 2000).

A pesar de las desventajas, los antioxidantes naturales son cada vez más variados y más estudiados, fundamentalmente debido a la existencia de numerosos trabajos de investigación relacionados a la disminución de enfermedades cardiovasculares, cáncer y envejecimiento por el consumo de alimentos con antioxidantes naturales (Arichi *et al.*, 1982; Kimura *et al.*, 1985, 1995; Masquelier, 1987; Klatsky *et al.*, 1992; Jacob, 1994; Fitch Haumann, 1994; Jang *et al.*, 1997; Louis, 1999). Es por ello que existe un número muy grande de compuestos y extractos provenientes de productos vegetales con propiedades antioxidantes. Pero se puede decir que solo algunos cuentan con las ventajas en cuanto efectividad y facilidad de empleo para ser aplicados comercialmente en los alimentos. Sin embargo se están realizando innumerables investigaciones al respecto tendiendo a efectivizar los métodos de obtención de modo de disminuir los costos y elevar los rendimientos y disponibilidad.

Debido a que los compuestos fenólicos obtenidos a partir del tegumento de maní demostraron poseer actividad antioxidante como secuestrantes de radicales libres, detallado en el Capítulo 1, en este Capítulo se describe la aplicación de estos compuestos sobre productos alimenticios de alto contenido graso, como aceite de girasol refinado y productos de maní, a fin de determinar su actividad en la protección frente a oxidaciones lipídicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres ensayos de aplicación de los compuestos antioxidantes del tegumento de maní sobre alimentos:

1. Ensayos sobre aceite de girasol

Materiales:

Se utilizaron los extractos de tegumento de maní runner blanchado (Cosecha 1998) obtenidos de acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo 1 con algunas modificaciones, y aceite de girasol refinado provisto por la empresa Aceitera General Deheza (General Deheza, Córdoba, Argentina).

Metodologías:

Se realizó la oxidación acelerada de aceite refinado de girasol con agregado de los extractos, en estufa a 60°C, en tres ensayos, tomando como control aceite refinado sin agregados y como referencia BHT (Duh and Yen, 1997).

- a. **Ensayo 1:** Con el fin de evaluar los extractos metanólicos sin deslipidizar y deslipidizado, y el solvente metanol, frente al aceite control y BHT, se prepararon, y colocaron en estufa a 60°C durante 19 días, los siguientes tratamientos con 100g de aceite de girasol refinado en beakers de 250mL:

Control: aceite sin el agregado de antioxidantes.

MEOH: aceite con el agregado de 1mL de metanol.

EM: aceite con el agregado de 0.21% p/p de extracto metanólico de tegumento sin desengrasar.

EMD: aceite con el agregado de 0.21% p/p de extracto metanólico de tegumento desengrasado.

BHT: aceite con el agregado de 0.02% p/p BHT.

Los extractos metanólicos se obtuvieron en una extracción (temperatura ambiente, oscuridad, 24hs) con 75mL de solvente a partir de 5g de tegumento molido (con y sin grasa). El desengrasado del tegumento se realizó en dos extracciones a temperatura ambiente, oscuridad, durante 24hs cada extracción, con 50mL de hexano cada 5 g de tegumento.

La concentración de los extractos obtenidos fue de 175 ± 10 mg/mL, y fueron aplicados 1,2mL de cada uno sobre el aceite, por lo que la concentración de extracto seco en el aceite resultó de 0.21%.

Todos los aceites fueron homogeneizados con varilla de vidrio.

- b. **Ensayo 2:** Con el fin de evaluar los extractos etanólicos y el solvente etanol, frente a aceite control y extracto metanólico como referencia, se prepararon y colocaron en estufa a 60°C durante 15 días, los siguientes tratamientos con 100g de aceite de girasol refinado en beackers de 250mL:

Control: aceite sin el agregado de antioxidantes.

ETOH: aceite con el agregado de 1mL de etanol.

EMD: aceite con el agregado de 0.16% p/p de extracto metanólico de tegumento desengrasado.

EE: aceite con el agregado de 0.16% p/p de extracto etanólico de tegumento sin desengrasar.

EED: aceite con el agregado de 0.16% p/p de extracto etanólico de tegumento desengrasado.

Los extractos de metanol y etanol se obtuvieron en una extracción (temperatura ambiente, oscuridad, 24hs) con 100mL de solvente a partir de 5g de tegumento molido (desengrasado y sin desengrasar). El desengrasado del tegumento se realizó en dos extracciones a temperatura ambiente, oscuridad, durante 24hs cada extracción, con 50mL de hexano cada 5g de tegumento.

La concentración de los extractos obtenidos fue de 130 ± 10 mg/mL, y fueron aplicados 1,2mL de cada uno sobre el aceite, por lo que la concentración de extracto seco en el aceite resultó de 0.16%.

Todos los aceites fueron homogeneizados con varilla de vidrio.

- c. **Ensayo 3:** Con los extractos descritos en el Capítulo 1, obtenidos con diferentes solventes puros (EM: metanol, EE: etanol, EA: acetona y EH: agua) y mezcla etanol:agua (EEH 7:3), se realizó la prueba de actividad antioxidante por el agregado de 0.5% de estos extractos sobre aceite refinado de girasol. Para cada tratamiento se colocaron 6 ± 0.05 g aceite refinado girasol en beakers de 50ml. Se utilizó como control aceite sin agregado de extractos ni BHT y como referencia aceite con el agregado de 0,02% BHT. El ensayo se realizó mediante oxidación acelerada de los aceites en estufa a 60°C, durante 5 días de almacenamiento.

Los extractos fueron obtenidos a partir de 10g de tegumento y dos extracciones, con un total de 250mL de cada solvente. El extracto fue filtrado y evaporado hasta sequedad. 0.03g de cada extracto seco se disolvieron en 1mL cada solvente y fueron agregados al aceite.

Todos los aceites fueron homogeneizados con varilla de vidrio.

Para los ensayos de oxidación acelerada de aceite de girasol se determinó el deterioro de los aceites tratados por medición, a intervalos durante el tiempo de tratamiento, de:

- **Indice de Peróxido (IP):** según metodología AOAC, 1980 (método n° 28.022/23). Se expresó en meq de oxígeno por Kg de materia grasa.
- **Indice de Acidez (IA):** según AOAC, 1980 (método N° 16.211-16.213). Se expresó en porcentajes de ácidos grasos libres en el aceite valorado, expresado en porcentaje en peso de ácido oleico (PM 282).

2. Ensayo sobre productos de maní tostado recubierto con miel

Materiales:

Se utilizó maní “blanqueado” tipo Runner cosecha 2000, y tegumento de maní tipo Runner cosecha 2000 (empresa Lorenzati, Ruetsch y Cia., Ticino, Córdoba, Argentina).

Metodologías:

a. Obtención de antioxidantes naturales a partir del tegumento de maní

Los antioxidantes naturales se obtuvieron a partir del tegumento de maní mediante 3 extracciones de 188g de tegumento de maní (previamente desengrasado con 50mL de hexano cada 5g de tegumento, por extracción a temperatura ambiente) en erlenmeyers de 1000mL, a temperatura ambiente y oscuridad, durante 6-8 horas, utilizando un total de 2500 mL de etanol. Los extractos filtrados se juntaron y se evaporaron hasta sequedad en evaporador rotatorio (en vacío, 40°C).

Sobre el extracto etanólico seco se determinó el contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu según Waterman y Mole, 1994) y actividad secuestrante de radicales libres (Joeux *et al.* 1995 y Viturro *et al.* 1999).

b. Obtención del maní tostado con miel:

Los productos fueron elaborados en la planta de Ticino de la empresa Lorenzati y Ruetsch, Córdoba, basado en la metodología de la patente N° 4.647.463 de USA (Hoover, 1987) innovando sobre el proceso y por el agregado de sustancias antioxidantes.

Se prepararon tres tipos de maní tostado con miel (MTM): MTM sin antioxidantes (MTM), MTM con BHT (MTM-BHT), MTM con antioxidantes naturales obtenidos del tegumento de maní (MTM-AN), según los siguientes procedimientos:

➤ **Maní tostado (MT):** se obtuvo por tostado de 5.37Kg de gramos de maní “blanqueado” en un horno industrial rotativo a una temperatura de 140°C, durante 30 minutos.

➤ **Maní tostado con miel (MTM):** se realizó el recubrimiento, en pailas industriales, de 5.37 Kg de maní tostado con una *jalea* usada al 5% del peso del maní (50% de azúcar, 15% de agua, 35% de miel), e inmediatamente se adicionó una *mezcla sólida* al 10% del peso del maní (70% de azúcar impalpable, 20% de sal, 10% de harina de trigo).

Obtención de la *jalea*: se pesaron los ingredientes y fueron colocados en un recipiente de vidrio para ser llevados a fuego, en constante movimiento hasta alcanzar la solubilización, logrando así la homogeneización de la mezcla.

Obtención de la *mezcla sólida*: se pesaron sus constituyentes y fueron mezclados para obtener la uniformidad de la misma.

➤ **Maní tostado con miel, con agregado de antioxidantes naturales (MTM-AN):** se recubrieron (siguiendo el mismo procedimiento que para MTM) 5.37 Kg de maní tostado con una *jalea* al 5% del peso del maní y una *mezcla sólida* al 10% del peso del maní. Dicha mezcla fue la misma nombrada anteriormente, con la sola excepción que a la jalea se le incorporó 0,02% de extracto etanólico seco de tegumento de maní.

➤ **Maní tostado con miel, con el agregado de antioxidantes artificiales (MTM-BHT):** se recubrieron 5.37 Kg de maní tostado con una *jalea* al 5% del peso del maní y una *mezcla sólida* que representó el 10% del total, siguiendo el mismo procedimiento que para MTM. Se procedió a obtener el maní tostado con miel incluyendo en la jalea el 0,02% de BHT.

b. Determinación del grado de oxidación durante el almacenamiento

➤ **Almacenamiento:** Los cuatro productos fueron almacenados en bolsas flexibles de polietileno “Ziploc” (20 x 30 cm), con sellado hermético a las siguientes temperaturas: -15°C (freezer), 23°C (estufa) y 40°C (estufa), por un período aproximado de cuatro

meses. Durante éste período de tiempo se realizaron 7 extracciones de cada muestra, con un lapso de 21 días entre cada extracción.

- **Índice de Peróxido (IP):** Se determinó el índice de peróxido (AOAC, 1980) sobre la materia grasa de los productos almacenados. Se utilizaron aproximadamente 10 gramos de muestra de maní molida para la extracción de materia grasa con éter de petróleo en frío. El valor de Índice de Peróxido se expresó en meq de O₂/ Kg materia grasa.
- **Valor de Malondialdehído (MDA):** Se determinó colorimétricamente según el método de Heath and Packer (1968; González and Pignata, 1994). Una muestra de 100mg de maní triturado se homogeneizó en 2.5mL de agua destilada. Se agregó un volumen igual de una solución de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) 0.5% en 20% ácido tricloroacético. La mezcla se incubó a 95°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo colocando los tubos de reacción en un baño de hielo. Se centrifugaron las muestras a 10000g durante 30 minutos. El sobrenadante fue removido y se midió la absorción de la muestra a 532nm, restando el valor de absorción no específico a 600nm (Espectrofotómetro con arreglo de diodo, Hewlett Packard 8452A, USA). El valor de MDA presentado fue calculado en relación a un coeficiente de extinción de 155mM, es decir: valor de MDA = valor de absorción / 155 (Kosugi *et al.*, 1989).

3. Ensayo sobre productos de maní frito salado

Materiales:

Se utilizó maní frito “blanqueado” tipo Runner cosecha 2002, y tegumento de maní tipo Runner cosecha 2002 (empresa Lorenzati, Ruetsch y Cia., Ticino, Córdoba, Argentina).

Metodologías:

a. Obtención de antioxidantes naturales a partir del tegumento de maní

Los antioxidantes naturales se obtuvieron a partir del tegumento de maní molido, mediante la extracción de 140g de tegumento de maní (sin desengrasar) en erlenmeyers de 1000mL, a temperatura ambiente y oscuridad, con agitación durante 1 hora, utilizando un total de 1000 mL de etanol. El extracto filtrado se evaporó hasta sequedad en evaporador rotatorio (en vacío, 40°C). El extracto seco obtenido fue deslipidizado con 100mL de n-hexano, en dos etapas por agitación manual. El n-hexano fue separado totalmente por decantación y luego por evaporación hasta sequedad del extracto (vacío, 40°C).

Sobre el extracto etanólico seco se determinó el contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu según Waterman y Mole, 1994) y actividad secuestrante de radicales libres (Joeux *et al.* 1995 y Viturro *et al.* 1999).

b. Obtención del maní frito salado:

Los productos fueron elaborados en la planta de Ticino de la empresa Lorenzati y Ruetsch, Córdoba. Se prepararon tres tipos de maní frito salado (MFS): sin antioxidantes (MFS), con antioxidantes naturales obtenidos del tegumento de maní (MFS-AN), con BHT (MFS-BHT) y con BHA (MFS-BHA), según los siguientes procedimientos:

➤ **Maní frito salado (MFS):** 600g de gramos de maní frito “blanqueado” fueron rociados con 11mL de etanol puro. El etanol fue evaporado colocando el maní en horno a

30°C durante 10 minutos. El producto fue glaseado con 4mL de aceite de maní y salado con 22g de sal fina.

➤ **Maní frito salado con antioxidantes naturales (MFS-AN):** 600g de maní frito “blanqueado” fueron rociados con una solución de 0.12g de antioxidante natural en 11mL de etanol. El producto fue secado, glaseado y salado de la misma forma que MFS. La proporción del antioxidante resultó de 0.02% (p/p).

➤ **Maní frito salado con BHT (MFS-BHT):** 600g de maní frito “blanqueado” fueron rociados con una solución de 0.06g de BHT en 11mL de etanol. El producto fue secado, glaseado y salado de la misma forma que MFS. La proporción del antioxidante resultó de 0.01% (p/p).

➤ **Maní frito salado con BHA (MFS-BHA):** 600g de maní frito “blanqueado” fueron rociados con una solución de 0.06g de BHA en 11mL de etanol. El producto fue secado, glaseado y salado de la misma forma que MFS. La proporción del antioxidante resultó de 0.01% (p/p).

c. Determinación del grado de oxidación durante el almacenamiento

➤ **Almacenamiento:** Los cuatro productos fueron almacenados en bolsas flexibles de polietileno “Ziploc” (20 x 30 cm), con sellado hermético a las siguientes temperaturas: 23°C (ambiente) y 40°C (estufa), por un período aproximado de cuatro meses y medio. Durante éste período de tiempo se realizaron 6 extracciones de cada muestra, con un lapso de 28 días entre cada extracción.

➤ **Índice de Peróxido (IP):** Se determinó el índice de peróxido (AOAC, 1980) sobre la materia grasa de los productos almacenados. Se utilizaron aproximadamente 10 gramos de muestra de maní molida para la extracción de materia grasa con éter de

petróleo a temperatura ambiente. El valor de Índice de Peróxido se expresó en meq de O₂/ Kg materia grasa.

- **Índice de Anisidina (IAN):** El objetivo de esta técnica fue determinar el contenido de aldehídos (principalmente 2-alquenes y 2,4-dienales) en aceites y grasas animales y vegetales, por reacción de una solución de ácido acético de los compuestos aldehídicos de un aceite y la p-anisidina, luego midiendo la absorción a 350nm. El valor de p-anisidina se define por convención como 100 veces la densidad óptica medida a 350nm en una cubeta de 1cm de una solución conteniendo 1.00g de aceite en 100mL de una mezcla de solvente y reactivo (IUPAC, 1987).

El índice o valor de anisidina de las muestras se determinó colorimétricamente según el método IUPAC n° 2.504 (1987). Se pesaron exactamente entre 0.01 y 0.2g de materia grasa (extraída de las muestras de maní con éter de petróleo a temperatura ambiente). La muestra fue disuelta en un tubo de ensayo con 6mL de n-hexano (PA, Dorwil, Buenos Aires, Argentina). Se determinó la absorción de la mezcla grasa-hexano (Ab) a 350nm (Espectrofotómetro con arreglo de diodo, Hewlett Packard 8452A, USA) utilizando n-hexano como blanco. Se tomaron 4mL de la mezcla grasa-hexano y se colocaron en un tubo de ensayo al cual se le adicionó 1mL de una solución de p-anisidina: 0.25g cloruro de p-anisidina (BDH reagent, Poole, England) en 100mL de ácido acético glacial (PA, Dorwil, BsAs, Argentina). La mezcla se incubó durante 10 minutos exactos a temperatura ambiente, y se determinó su absorción (Am) a 350nm, utilizando como blanco una mezcla de 4mL de hexano y 1mL de solución de p-anisidina.

El valor o índice de p-anisidina se calculó mediante la fórmula:

$$\text{IAN} = [6 \times (1.25 \times A_m - A_b)] / (\text{g materia grasa})$$

- **Prueba sensorial descriptiva:** se utilizó un panel constituido por jueces que fueron previamente entrenados de acuerdo a lo recomendado por Lawless y Heymann (1999) y por lo realizado sobre productos de maní por Grosso *et al.* (2000). La finalidad de esta parte del estudio fue conocer cuanti y cualitativamente los atributos sensoriales del producto y como cambian los mismos a lo largo del almacenaje.

Procedimiento:

La prueba descriptiva fue realizada por un grupo de 15 personas (jueces entrenados), reclutados según los siguientes criterios descritos en Plemmons y Resurreccion (1998): Interesados en participar, disponibles para cada sesión (tanto para el entrenamiento como para la evaluación), que estén capacitados para expresarse verbalmente sobre el producto, consumidores de maní o sus subproductos al menos una vez al mes, edad entre 18 y 65 años, no fumadores, sin alergia alimentaria y con buena dentición. Los jueces fueron entrenados durante 5 días, 2 horas por día. Al finalizar el entrenamiento cada juez estuvo capacitado para describir la intensidad de los atributos previamente establecidos de los productos, utilizando una escala lineal no estructurada en un rango de 0 a 150. Durante el entrenamiento se describieron y definieron los siguientes atributos:

Apariencia:

- **Color marrón:** Apariencia asociada al color marrón.
- **Rugosidad:** Apariencia asociada con una superficie irregular, despareja.
- **Brillo:** Cantidad de luz reflejada por la superficie.
- **Pulverulencia:** Apariencia asociada al desprendimiento de polvo que se encuentra adherido superficialmente.

Sabor:

- **Maní tostado:** Sabor y aroma asociado con un maní tostado en un punto medio.
- **Oxidado:** Sabor y aroma asociado con aceite o grasa rancia o vieja.
- **Maní Crudo / poroto:** Sabor y aroma asociado con maní poco tostado o crudo.

Gusto:

- **Dulce:** Es el gusto percibido en la lengua cuando se prueba una solución de sacarosa.
- **Salado:** Es el gusto percibido en la lengua cuando se prueba una solución de cloruro de sodio.

- **Amargo:** Es el gusto percibido en la lengua cuando se prueba una solución de cafeína.
- **Ácido:** Es el gusto percibido en la lengua cuando se prueba una solución de ácido cítrico.

Textura:

- **Dureza:** Fuerza necesaria para comprimir y romper un alimento con los molares.
- **Crujiente:** Magnitud de sonido generado al masticar con los molares.
- **Residuo en los dientes:** Cantidad de muestra que queda en o sobre los dientes.

Para cada atributo se utilizaron productos de referencia, y fueron asignadas sus intensidades en una escala de 0-150. Además para cada atributo se utilizó maní tostado como de referencia, muestra que se denomina "warm up" (Plemmons y Resurreccion, 1998). En la **Tabla 5** se definieron las intensidades de los atributos para las referencias y el maní "warm up".

La prueba descriptiva se realizó con el panel de jueces entrenados. A cada juez se le entregaron 5 gramos de cada muestra. Los jueces evaluaron el producto por triplicado y a dos temperaturas diferentes (23°C y 40°C).

Tabla 5: Atributos y referencias, según intensidades de los mismos utilizados para la prueba descriptiva.

Atributos	Referencia estándar	Intensidad de atributos (escala 0-150)	Intensidad de maní de referencia (“Warm-Up”)
Color marrón	Cartón	46	18
Rugosidad	Copos de maíz*	93	36
Brillo	Cartón con celofán	94	15
Pulverulencia	Maní con Harina	79	11
Maní tostado	Maní Tostado	81	57
	Colorado**		
Maní Oxidado	Maní Oxidado	82	6
Sabor Cartón	Cartón	66	12
Maní Crudo	Maní Crudo	75	17
Dulce	Glucosa 2%	20	16
	5%	50	16
	10%	100	16
Salado	Cloruro de sodio 0,2%	25	11
	0,35 %	50	11
	0,5 %	85	11
Ácido	Ácido cítrico 0,05%	20	3
	0,08%	50	3
	0,15%	100	3
Amargo	Cafeína 0,05%	20	6
	0,08%	50	6
	0,15%	100	6
Dureza	Almendras #	69	47
Crujiente	Copos de Maíz *	110	62
Residuo en dientes	Maní Crudo	90	55

* Copos de maíz Granix, Elaborado en la Provincia de BS. AS., Republica Argentina.

** Maní Tostado Colorado, tipo Runner, tamaño 40/50, blanchado.

Almendras obtenidas comercialmente en Gran Diet, Provincia de Córdoba.

Análisis estadístico de datos

Todos los datos experimentales fueron obtenidos en tres repeticiones. Sobre los resultados se realizaron los siguientes cálculos estadísticos utilizando el programa Infostat (versión 1.1, 2002, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC):

- Determinación de medias y desvíos estándar.
- Análisis de varianza (Anova) y test de Duncan ($\alpha = 0.05$), para las muestras por día de tratamiento.
- Análisis de correlación entre las variables estudiadas en el análisis de almacenamiento de las muestras (Indice de Peróxido, MDA, Indice de Anisidina, Intensidad de atributos sensoriales).
- Regresión: para conocer el efecto de las variables independientes (tiempo y temperatura) en el estudio de almacenaje sobre las variables dependientes (Indice de Peróxido, MDA, Indice de Anisidina, Intensidad de atributos sensoriales), para desarrollar modelos de predicción de dicho efecto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Ensayos sobre aceite de girasol

En estos ensayos se observó que los extractos no se solubilizaron totalmente en el aceite, lo cual provocaría una disminución en su eficacia como antioxidante para este tipo de producto. A pesar de esto, los resultados de los extractos de tegumento de maní en la protección frente a la oxidación del aceite de girasol fueron positivos.

➤ Índice de Peróxido

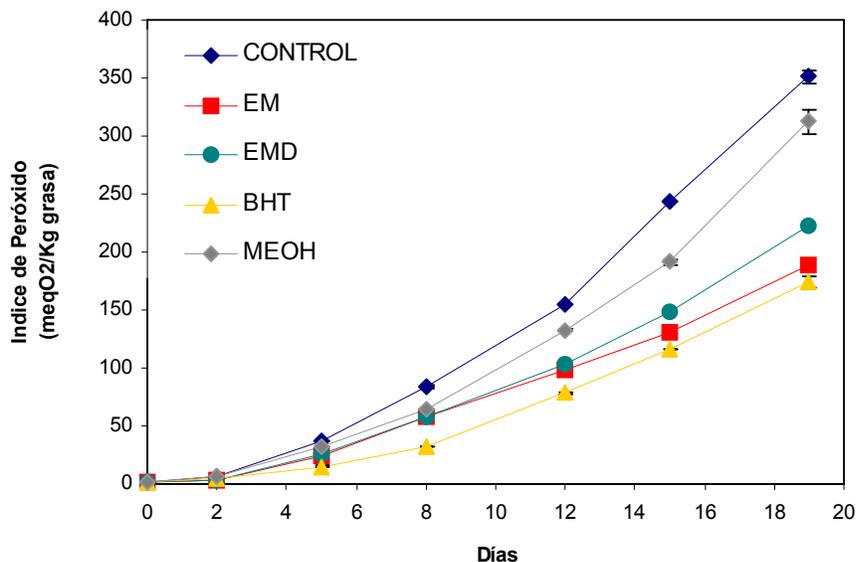
a. Ensayo 1

En la **Figura 20** se muestra el gráfico con los valores obtenidos de índice de peróxido en función de los días de tratamiento.

Del análisis estadístico (ANOVA y test Duncan $\alpha = 0.05$) se encontró que los extractos metanólicos de tegumento presentaron actividad antioxidante para las concentraciones estudiadas, aunque menor que el BHT. Se observó que en los primeros días (hasta día 12) no existieron diferencias significativas entre extracto desengrasado y sin desengrasar. Por otro lado el metanol también mostró una leve protección frente a la oxidación, menor a los extractos EM y EMD.

Por otro lado, también se observó que a partir del día 15, existieron diferencias significativas entre los extractos metanólicos, desengrasado (EMD) y sin desengrasar (EM), siendo el extracto sin desengrasar el que obtuvo mayor actividad antioxidante. Esto se podría explicar teniendo en cuenta que los extractos metanólicos son insolubles en el aceite tratado por la diferencia de polaridad, y el extracto de tegumento con grasa poseería mayor cantidad de compuestos apolares que el extracto desengrasado, favoreciendo la solubilidad en el aceite de estos componentes lo que aumentaría el contacto para el efecto antioxidante.

Figura 20. Prueba de oxidación acelerada sobre aceite de girasol refinado con el agregado de extractos metanólicos de tegumento de maní, BHT y metanol.



De esta prueba se obtuvieron las ecuaciones de regresiones polinómicas (95% nivel confianza) de la **Tabla 6**.

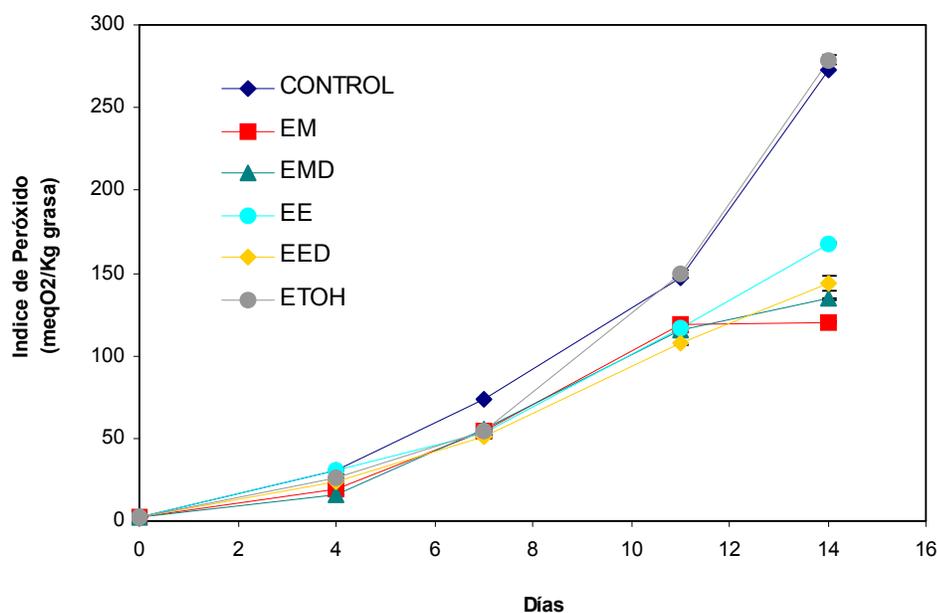
Tabla 6. Coeficientes de regresión lineal de segundo grado de la prueba de oxidación, según la **Figura 20**.

<i>Tratamiento</i>	<i>constante</i>	<i>días</i>	<i>días²</i>	<i>R²</i>	<i>R² ajustado</i>
CONTROL	-2.801174	4.561239	0.750696	0.998139	0.997801
EM	-3.433299	4.997175	0.269751	0.996929	0.996371
EMD	-1.767719	3.468479	0.440154	0.998836	0.998625
BHT	0.078967	1.093302	0.430566	0.997143	0.996623
MEOH	2.000679	1.555003	0.768092	0.997542	0.997096

b. Ensayo 2

En la **Figura 21** se muestra el gráfico de la prueba de oxidación realizada comparando ahora la actividad antioxidante de extractos etanólicos y metanólicos.

Figura 21. Prueba de oxidación acelerada sobre aceite de girasol refinado con el agregado de extractos metanólicos, etanólicos de tegumento de maní y etanol.



De los datos obtenidos y el análisis estadístico de cada día de tratamiento (Anova y test Duncan $\alpha 0,05$) se observó que todos los extractos estudiados tuvieron actividad antioxidante, aunque siempre en menor grado que el BHT. El etanol no mostró diferencias significativas con respecto al aceite control. No se encontraron diferencias significativas entre extractos metanólicos y etanólicos, hasta el día 14, en donde el extracto EM dio el menor valor de índice de peróxido, seguido por EMD, EED, y por último EE (con diferencias significativas).

De esta prueba se obtuvieron las ecuaciones de las regresiones polinómicas (95% nivel confianza) de la **Tabla 7**.

Tabla 7. Coeficientes de regresión lineal de segundo grado para la prueba de oxidación según la **Figura 21**.

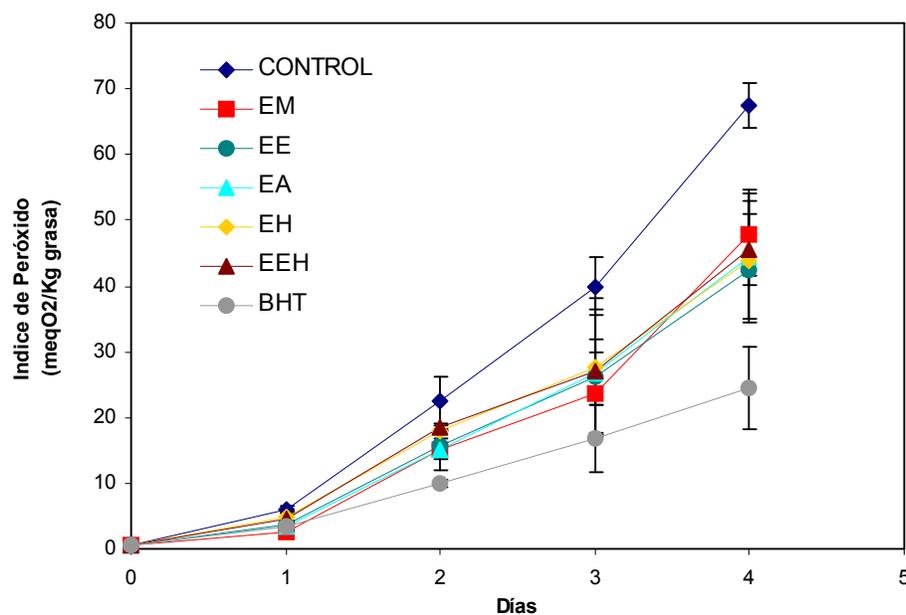
<i>Tratamiento</i>	<i>constante</i>	<i>días</i>	<i>días²</i>	<i>R²</i>	<i>R² ajustado</i>
CONTROL	6.317473	-0.841488	1.375540	0.990553	0.987854
EM	-3.408948	8.181590	0.099365	0.943455	0.927299
EMD	-2.590432	6.220065	0.293795	0.970687	0.962312
EE	3.070934	3.656868	0.585335	0.997057	0.996217
EED	1.159794	4.542883	0.416380	0.995359	0.994033
ETOH	7.167458	-4.953724	1.710463	0.994020	0.992312

c. Ensayo 3

En la **Figura 22** se muestra el gráfico obtenido utilizando los extractos de metanol, etanol, acetona, agua y mezcla etanol:agua (70:30).

De acuerdo al análisis estadístico (Anova y test Duncan $\alpha = 0.05$) se encontró que todos los extractos tuvieron actividad antioxidante, sin diferencias significativas entre ellos, aunque siempre menor al BHT. Para estos extractos, la actividad antioxidante como secuestrante de radicales libres había mostrado diferencias significativas (ver **Figura 7** del **Capítulo 1**).

Figura 22. Prueba de oxidación acelerada sobre aceite de girasol refinado con el agregado de extractos de metanol (EM), etanol (EE), acetona (EA), agua (EH) y etanol:agua (EEH 70:30) del tegumento de maní y BHT.



De esta prueba se obtuvieron las ecuaciones de las regresiones polinómicas (95% nivel confianza) de la **Tabla 8**.

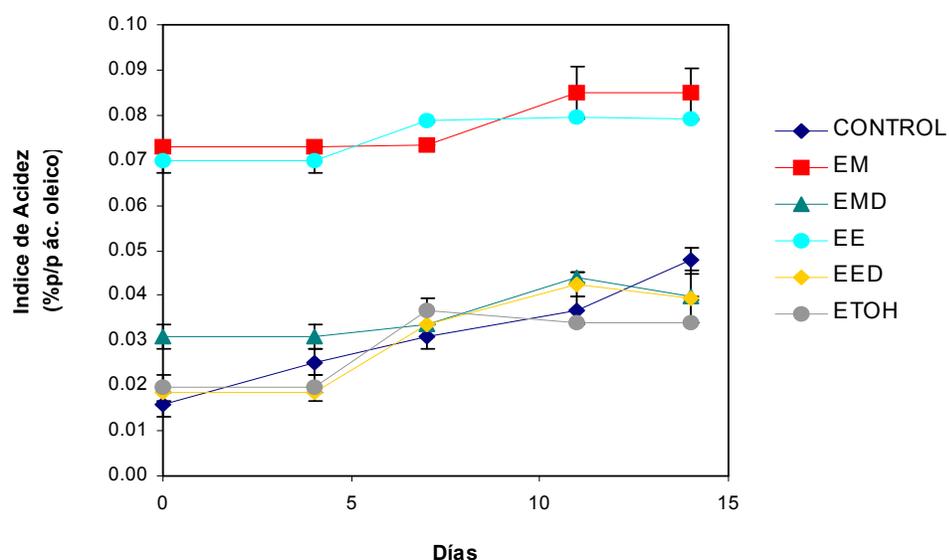
Tabla 8. Coeficientes de regresión lineal de segundo grado de la prueba de oxidación según la **Figura 22**.

<i>Tratamiento</i>	<i>constante</i>	<i>dias</i>	<i>dias²</i>	<i>R²</i>	<i>R² ajustado</i>
CONTROL	0.224714	3.810571	3.242857	0.983435	0.978702
EM	0.633857	-0.025710	2.896429	0.934474	0.915753
EE	0.040571	3.571857	1.764286	0.874448	0.838577
EA	0.070429	2.713143	2.100714	0.867166	0.829214
EH	0.022143	5.036214	1.481071	0.859399	0.819227
EEH	0.145714	4.485071	1.690357	0.950856	0.936815
BHT	0.209714	3.278571	0.712857	0.852652	0.810553

➤ **Indice de acidez:**

En la **Figura 23** se muestra el gráfico de la prueba de oxidación n° 2 en la cual se comparan los índices de acidez de extractos etanólicos y metanólicos.

Figura 23. Indice de Acidez de la prueba de oxidación acelerada sobre aceite de girasol refinado con el agregado de extractos metanólicos, etanólicos de tegumento de maní y etanol.



De los datos obtenidos y el análisis estadístico de cada día de tratamiento (Anova y test Duncan α 0,05) se observó que para todos los tratamientos el índice de acidez se incrementó levemente con el tiempo de almacenamiento, sin diferencias significativas entre el control, muestra con etanol y extractos etanólicos y metanólicos desengrasados, mientras que los aceites con extractos etanólicos y metanólicos sin desengrasar mostraron índices de acidez significativamente superiores a las otras muestras, pero sin diferencias significativas entre ellos.

De esta prueba se obtuvieron las ecuaciones de las regresiones polinómicas (95% nivel confianza) de la **Tabla 9**.

Tabla 9. Coeficientes de regresión lineal de segundo grado para el índice de acidez de la prueba de oxidación según la **Figura 23**.

<i>Tratamiento</i>	<i>constante</i>	<i>días</i>	<i>días²</i>	<i>R²</i>	<i>R² ajustado</i>
CONTROL	0.030438	-0.001654	0.000207	0.857837	0.817219
EM	0.072234	-0.000065	0.000079	0.614191	0.503960
EMD	0.029699	0.000750	0.000010	0.521468	0.384745
EE	0.068890	0.001323	-0.000039	0.660071	0.562949
EED	0.033041	0.000206	0.000027	0.574344	0.452729
ETOH	0.017575	0.002583	-0.000098	0.648724	0.548359

2. Ensayo sobre maní tostado recubierto con miel

a. Obtención de los compuestos antioxidantes del tegumento de maní

El rendimiento total de la extracción con etanol fue de 11.7 g de extracto seco cada 100 g de tegumento de maní desengrasado seco.

El extracto etanólico obtenido contuvo 93.2 ± 3.3 g de fenoles totales (expresado como fenol) cada 100 gramos de extracto etanólico seco, lo que equivale a 10.9 ± 0.4 g de fenoles totales cada 100 gramos de tegumento deslipidizado seco.

La actividad secuestrante de radicales libres de una solución de $1\mu\text{g/mL}$ de extracto etanólico fue del 31.5 ± 0.9 %.

b. Obtención del maní tostado con miel

En la **Figura 23** se muestran fotografías de los productos elaborados. Como se puede observar el agregado de los antioxidante naturales (MTM-AN) no alteró el color del producto final al ser comparado con las muestras MTM y MTM-BHT.

Figura 23. Productos elaborados a base de maní tostado



Maní Tostado
(MT)



Maní Tostado
con miel
(MTM)



Maní Tostado
con miel y
antioxidante
natural
(MTM-AN)



Maní Tostado
con miel y BHT
(MTM-BHT)

c. Grado de oxidación de los productos en el almacenamiento

➤ Indice de Peróxido

En la **Figura 24** se muestran las gráficas de Índice de Peróxido en función del tiempo, por muestra, para las temperaturas -15°C , 23°C y 40°C .

En la **Tabla 10** se detallan los coeficientes de regresión de 2° orden para las curvas de Índice de Peróxido en función del tiempo, para 23°C y 40°C y para cada muestra, ya que para -15°C no varía el Índice de Peróxido con el tiempo de almacenamiento. En la **Tabla 11** se muestran los coeficientes de regresión lineal de 2° orden, para Índice de Peróxido en función del tiempo y la temperatura, para cada muestra.

Figura 24. Índice de Peróxido en función del tiempo, por muestra, para temperaturas -15°C , 23°C y 40°C .

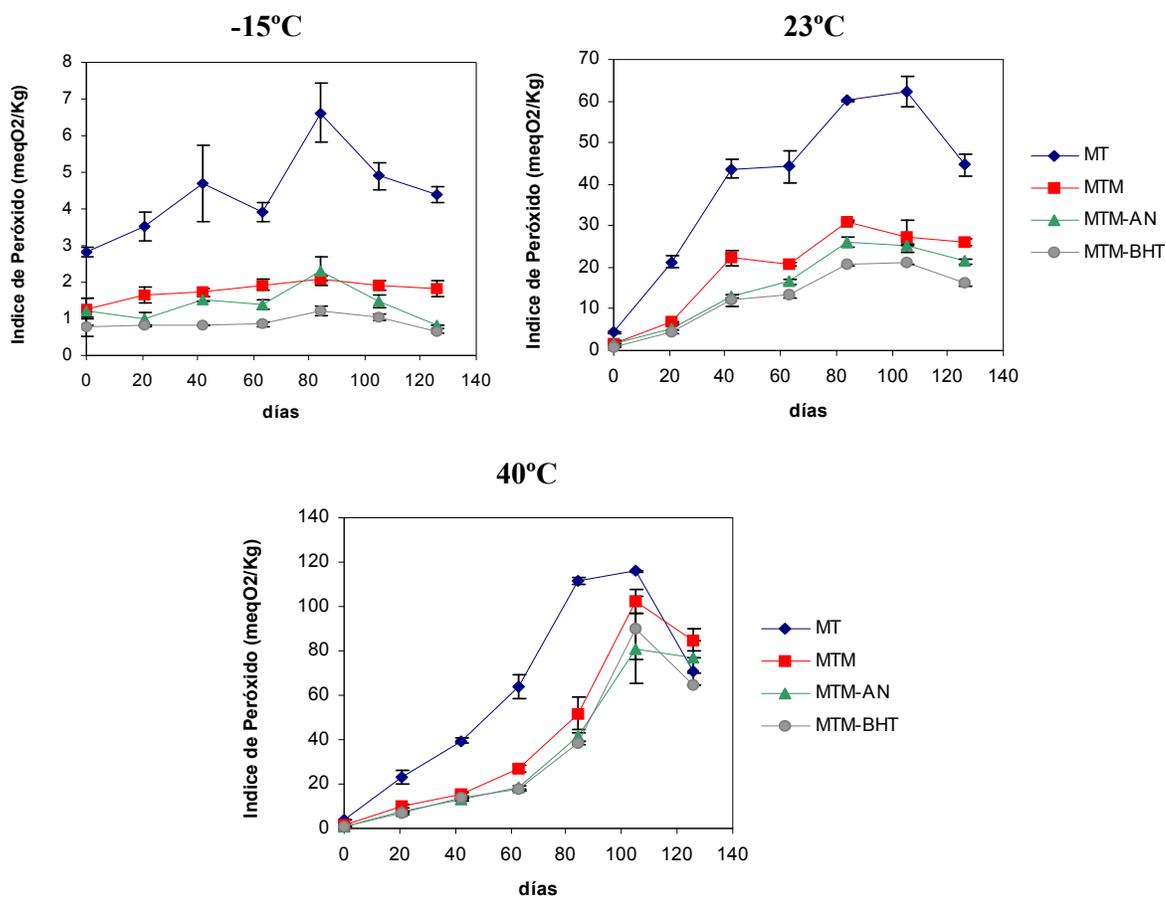


Tabla 10. Coeficientes de regresión lineal de 2° orden para las curvas de Índice de Peróxido en función del tiempo (23°C y 40°C).

Muestra	T (°C)	Coeficientes de regresión			
		[Ordenada al origen]	[días]	[días] ²	R ²
MT	23	2.063690	1.200051	-0.006562	0.925988
	40	-8.085238	1.928716	-0.009115	0.809792
MTM	23	0.036667	0.563019	-0.002811	0.897494
	40	-1.311310	0.387645	0.003276	0.873506
MTM-AN	23	-0.427738	0.423971	-0.001852	0.921161
	40	-0.005238	0.163019	0.004169	0.883647
MTM-BHT	23	-0.872619	0.382007	-0.001836	0.915109
	40	-2.036310	0.309235	0.002720	0.784089

Tabla 11. Coeficientes de regresión lineal de 2° orden para Índice de Peróxido en función del tiempo y temperatura.

Muestra	Coeficientes de regresión					
	[Ordenada al origen]	[días]	[días] ²	[T°]	[T°] ²	R ²
MT	-143.097098	1.063543	-0.005348	9.337776	-0.128494	0.738827
MTM	-64.406722	0.322423	0.000122	3.538246	-0.035154	0.631430
MTM-AN	-51.899764	0.203781	0.000711	2.842766	-0.027848	0.620345
MTM-BHT	-41.252457	0.233288	0.000274	1.889446	-0.010972	0.582948

Según el análisis estadístico realizado, se pudo concluir:

- Para la **temperatura de -15°C** los valores de peróxido de todas los productos se mantienen constantes, y no se supera el valor máximo permitido por el CAA (10 meq O_2/Kg de materia grasa) durante el tiempo estudiado.
Por otro lado, en general, se encontraron diferencias significativas entre MT y los demás productos, sin diferencias entre ellas (MTM, MTM-AN y MTM-BHT), siendo estos últimos quienes mostraron los menores valores de Índice de Peróxido.
- Para la **temperatura de 23°C** , las muestras presentaron oxidación con el tiempo, siendo más pronunciada dicha oxidación para MT, mostrando diferencias significativas con respecto a los otros productos (MTM, MTM-AN y MTM-BHT), las cuales en algunos casos mostraron diferencias entre MTM y los productos con antioxidantes. Estas últimas presentaron menores valores de peróxido.
- Utilizando las ecuaciones de regresión para la temperatura 23°C (**Tabla 10**), para el caso de MT superaría el valor permitido por el CAA a partir del día 7, mientras que para MTM se superaría a partir del día 20, para MTM-AN a partir del día 28, y para MTM-BHT a partir del día 34. Es decir que los productos con antioxidantes mostraron mayor estabilidad en el tiempo de almacenaje.
- Para la **temperatura de 40°C** , las muestras mostraron una tendencia aún más pronunciada a la oxidación. En general, las muestras MT dieron mayores Índice de Peróxido, seguidas por MTM y por último las muestras con antioxidantes (MTM-AN y MTM-BHT), aunque no se encontraron diferencias significativas entre estas dos últimas.
- Utilizando las ecuaciones de regresión a 40°C , en el caso de MT se superaría el valor permitido por el CAA aproximadamente a partir del día 10 (según las regresiones de la **Tabla 10**), mientras que para MTM se superaría a partir del día 24, para MTM-AN a partir del día 33, y para MTM-BHT a partir del día 31. Es decir que los productos con antioxidantes mostraron mayor estabilidad con el tiempo.

- En relación a las regresiones lineales de segundo orden obtenidas (**Tablas 10 y 11**), se encontró un mejor ajuste para las regresiones de Índice de Peróxido en función del tiempo, para las temperaturas 23 y 40°C ($R^2 > 0.75$).
- En la curva de MT de la **Figura 24 – 23°C** y en todas las muestras de la **Figura 24 – 40°C** se observan incrementos de los índices de peróxido con el tiempo y una caída a partir del día 105. Esto se explica por el proceso de oxidación de los lípidos, que reconoce básicamente las 3 etapas de la reacción en cadena por radicales libres: la *iniciación* con un aumento gradual del índice de peróxido, la *propagación* donde la autooxidación se dispara y se produce el fenómeno de enranciamiento, y la última etapa de *terminación* en donde comienza a decrecer el índice de peróxido debido a que la descomposición de los hidroperóxidos es mayor que la de formación de peróxidos (Fennema, 1993; Eli, 2000).

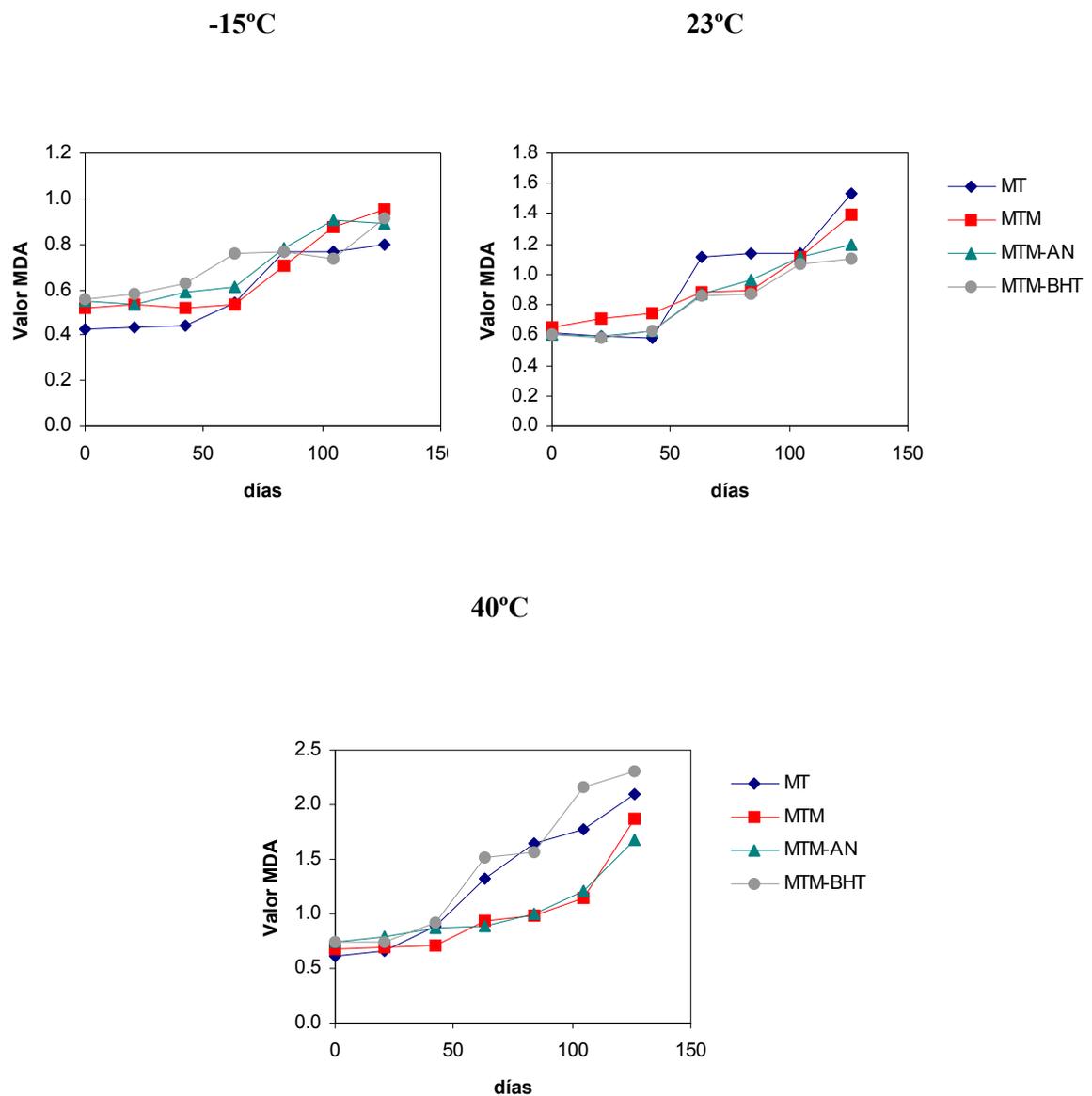
➤ Valor de MDA

En la **Figura 25** se observan gráficos de valores de MDA en función del tiempo de almacenamiento para las temperaturas de -15, 23 y 40°C, para las muestras MT, MTM, MTM-AN y MTM-BHT.

De estos gráficos, para todas las muestras, se encontraron tendencias crecientes de valores de MDA a lo largo del tiempo de almacenamiento para las tres temperaturas. Esta tendencia fue más pronunciada para 40°C, seguida por 23°C, y para -15°C la tendencia creciente fue más leve. Por otro lado, para las temperaturas -15°C y 23°C no se observaron diferencias significativas entre los valores de MDA de las distintas muestras. Mientras que para 40°C se observaron diferencias significativas a partir del día 63, siendo las muestras MTM y MTM-AN las de menores valores de MDA, sin diferencias significativas entre ellas.

En general puede decirse que se encontró tendencia creciente de valor de MDA con el tiempo, pero no se observaron diferencias significativas entre los valores de MDA para las muestras con y sin antioxidantes.

Figura 25. Curvas de Valor de MDA en función del tiempo para las muestras MT, MTM, MTM-AN y MTM-BHT, para las temperaturas -15 , 23 y 40°C .



Con lo expuesto en cuanto a índice de peróxido y MDA, se puede concluir que los productos con recubrimiento con miel mostraron mayores lapsos de aptitud en comparación con el maní tostado, y el agregado de antioxidantes naturales aportó, también, estabilidad ante la oxidación, con escasas diferencias significativas con respecto al BHT.

3. Prueba con maní frito salado

a. Obtención de los compuestos antioxidantes del tegumento de maní

El rendimiento total de la extracción con etanol fue de 8.0 g de extracto seco cada 100 g de tegumento de maní desengrasado seco.

El extracto etanólico obtenido contuvo 49.4 ± 2.6 g de fenoles totales (expresado como fenol) cada 100 gramos de extracto etanólico seco, lo que equivale a 3.9 ± 0.2 g de fenoles totales cada 100 gramos de tegumento seco.

La actividad secuestrante de radicales libres de una solución de $1\mu\text{g/mL}$ de extracto etanólico fue del 34.0 ± 2.2 %.

b. Obtención del maní frito salado

Se pudo observar que el agregado de los antioxidante naturales (MFS-AN) no alteró el color del producto final al ser comparado con las muestras sin antioxidantes (MFS) y con antioxidantes sintéticos (MFS-BHA y MFS-BHT).

c. Grado de oxidación de los productos en el almacenamiento

➤ Indice de Peróxido

En la **Figura 26**, se muestran las gráficas de Índice de Peróxido en función del tiempo, por muestra, para las temperaturas 23°C y 40°C.

En la **Tabla 12** se detallan los coeficientes de regresión de 2° orden para las curvas de Índice de Peróxido en función del tiempo, para 23°C y 40°C y para cada muestra.

Figura 26. Índice de Peróxido en función del tiempo
para las muestras de maní frito salado y para temperaturas 23 y 40°C.

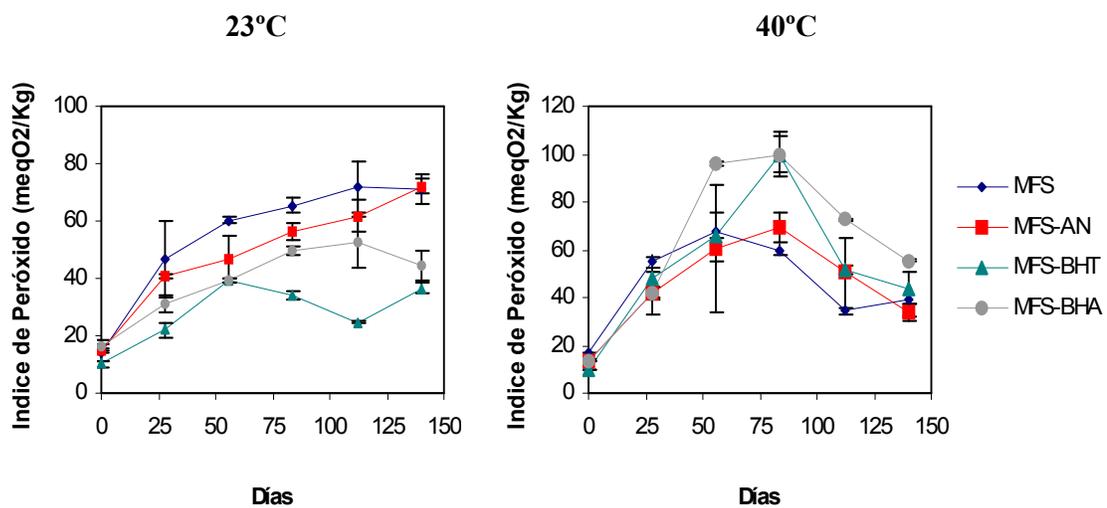


Tabla 12. Coeficientes de regresión lineal de 2º orden para las curvas de **Índice de Peróxido** de las muestras de maní frito en función del tiempo (23°C y 40°C).

Muestra	T (°C)	Coeficientes de regresión			R ²
		[Ordenada al origen]	[días]	[días] ²	
MFS	23	17.750848	0.996215	-0.004488	0.816149
	40	23.643932	1.060722	-0.007288	0.669191
MFS-AN	23	18.184784	0.624356	-0.001838	0.910384
	40	12.663059	1.333463	-0.008512	0.652753
MFS-BHA	23	15.654072	0.647349	-0.003068	0.853865
	40	8.388063	2.076272	-0.012608	0.881929
MFS-BHT	23	11.92482	0.472821	-0.002398	0.648315
	40	8.533088	1.791213	-0.011234	0.765959

Según el análisis estadístico realizado en cuanto a **Índice de Peróxido** para las muestras de maní frito, se pudo concluir:

- Para la **temperatura de 23°C** los valores de peróxido de todas los productos se incrementaron con el tiempo de almacenamiento.
- En general, se encontraron diferencias significativas entre MFS y los demás productos a partir del día 56, resultando MFS con los mayores índices de peróxido durante todo el ensayo. Se encontraron escasas diferencias significativas entre MFS-AN y MFS-BHA, mientras que los productos con BHT resultaron con valores de peróxido significativamente menores.
- Para la **temperatura de 40°C**, las muestras presentaron una oxidación con el tiempo más pronunciada que para 23°C.

- Se encontraron escasas diferencias significativas entre los productos, sin embargo se observó una tendencia de oxidación levemente superior para MFS, seguido muy de cerca por MFS-AN en los primeros 28 días. Posteriormente, los valores máximos alcanzados no fueron los esperados para MFS con antioxidantes.
- Los productos MFS alcanzaron los valores máximos de oxidación el día 56, mientras que los demás productos alcanzan el máximo el día 84 (esta tendencia de los peróxidos ya fue aclarada para los productos de maní con miel). Los productos con antioxidantes sintéticos (MFS-BHA y MFS-BHT) dieron valores máximos superiores a los productos MFS y MFS-AN.
- De acuerdo a las curvas obtenidas por regresión para los índices de peróxido, para 23°C, se observa que los antioxidantes naturales brindaron protección frente a la oxidación, sin embargo no tan elevada como los antioxidantes sintéticos. De estos últimos, el BHT mostró una protección levemente mayor en comparación con el BHA.

➤ Indice de Anisidina

En la **Figura 27** se observan gráficos de Índices de Anisidina en función del tiempo de almacenamiento para las temperaturas de 23 y 40°C, para las muestras de maní frito salado.

En la **Tabla 13** se detallan los coeficientes de regresión de 2° orden para las curvas de Índice de Anisidina en función del tiempo, para 23°C y 40°C y para cada muestra.

Figura 27. Curvas de Índice de Anisidina en función del tiempo para las muestras de maní frito y para las temperaturas 23 y 40°C.

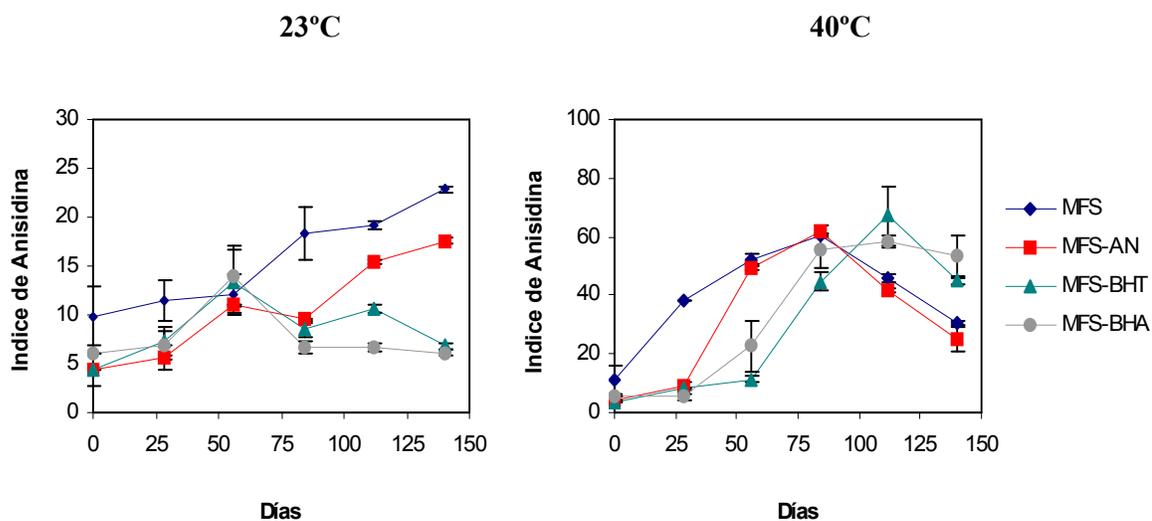


Tabla 13. Coeficientes de regresión lineal de 2º orden para las curvas de Índice de Anisidina de las muestras de maní frito en función del tiempo (23°C y 40°C).

Muestra	T (°C)	Coeficientes de regresión			
		[Ordenada al origen]	[días]	[días] ²	R ²
MFS	23	9.558393	0.060652	0.000254	0.803878
	40	11.410179	1.16672	-0.007425	0.964639
MFS-AN	23	4.183364	0.07382	0.000164	0.892633
	40	-6.859793	1.348394	-0.007931	0.761379
MFS-BHA	23	6.311529	0.099253	-0.000758	0.263977
	40	-2.453101	0.724933	-0.002106	0.813534
MFS-BHT	23	4.100305	0.177473	-0.001129	0.365494
	40	-3.155714	0.607849	-0.001304	0.730001

Según el análisis estadístico realizado en cuanto a **Índice de Anisidina** para las muestras de maní frito salado, se pudo concluir:

- Para la **temperatura de 23°C** los valores de anisidina de los productos MFS y MFS-AN se incrementaron con el tiempo de almacenamiento. Para las muestras con BHA y BHT los valores permanecieron prácticamente constantes, observándose solo para el día 56 un incremento.
- En general, se encontraron diferencias significativas entre MFS y los demás productos, resultando el primero con los mayores índices de anisidina durante todo el ensayo. No se encontraron diferencias significativas entre MFS-AN, MFS-BHA y MFS-BHT hasta el día 84 y a partir del día 112 se observaron mayores valores para MFS-AN.
- Para la **temperatura de 40°C**, las muestras presentaron una oxidación con el tiempo más pronunciada que para 23°C.
- Se encontraron diferencias significativas entre los productos MFS y los demás hasta el día 56, a partir del cual los productos MFS y MFS-AN siguen curvas casi idénticas. Los productos con BHA y BHT resultaron sin diferencias significativas en índice de anisidina a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento.
- Para esta temperatura, en general se observaron tendencias similares a lo ocurrido con el índice de peróxido (incremento inicial y caída al final), lo cual se explica de forma similar ya que los compuestos aldehídicos son también inestables y volátiles, tendiendo a disminuir cuando la oxidación es muy avanzada (Valenzuela *et al.* 2000). En este caso, para MFS y MFS-AN el máximo de oxidación se alcanzó el día 84, mientras que para MFS-BHA y MFS-BHT el máximo resultó el día 112.
- Los resultados en cuanto a índice de anisidina fueron coherentes con los de índice de peróxido, demostrándose que los antioxidantes naturales brindaron protección frente a

la oxidación de los lípidos, aunque los sintéticos (sobre todo el BHT) resultaron los mejores protectores.

➤ **Análisis Sensorial Descriptivo**

De las variables estudiadas en el análisis sensorial descriptivo solo se tuvieron en cuenta los atributos que variaron en función del tiempo, y que estuvieron relacionados con la oxidación de los lípidos, estos fueron: **Sabor a Oxidado**, **Sabor a Cartón** y **Sabor a Maní Tostado**.

En la **Figura 28**, se muestran las gráficas de las intensidades de los atributos sensoriales de Sabor a Oxidado, Sabor a Cartón y Sabor a Maní Tostado, en función del tiempo, para las muestras de maní frito salado, para las temperaturas 23°C y 40°C.

En las **Tabla 14, 15 y 16** se detallan los coeficientes de regresión de 2° orden para las curvas de Intensidad de Sabor a Oxidado, Sabor a Cartón y Sabor a Maní Tostado, respectivamente, en función del tiempo, para 23°C y 40°C y para cada muestra de maní frito salado.

Figura 28. Intensidad de Sabor a Oxidado, Sabor a Cartón y Sabor a Maní Tostado en función del tiempo para las muestras de maní frito salado y para temperaturas 23 y 40°C.

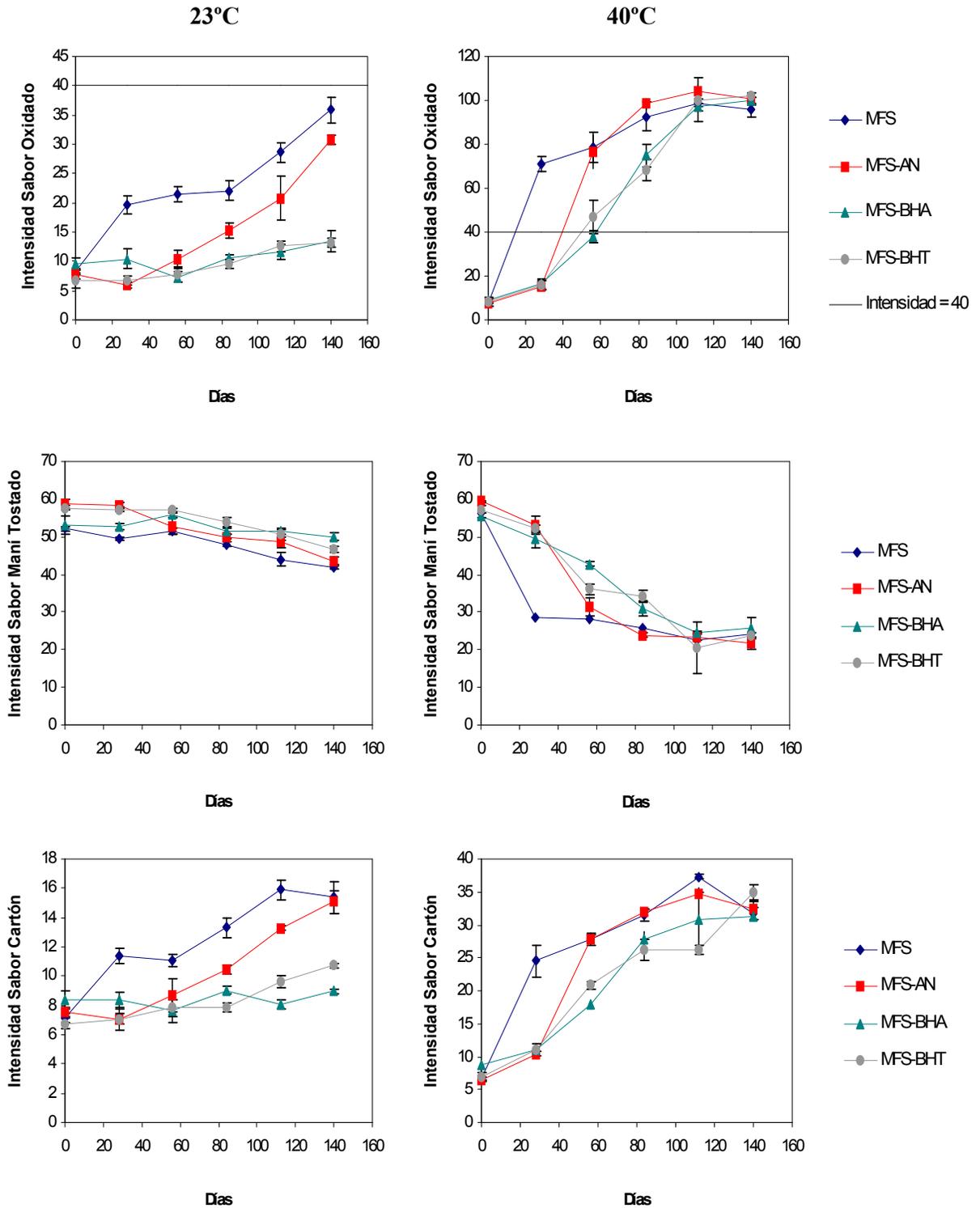


Tabla 14. Coeficientes de regresión lineal de 2° orden para las curvas Intensidad de Sabor a Oxidado de las muestras de maní frito en función del tiempo (23°C y 40°C).

Muestra	T (°C)	Coeficientes de regresión			R ²
		[Ordenada al origen]	[días]	[días] ²	
MFS	23	10.710238	0.173936	-0.000032	0.855335
	40	15.264762	1.632597	-0.007731	0.898489
MFS-AN	23	7.098810	-0.03214	0.001429	0.907957
	40	-5.809758	1.659995	-0.006201	0.898042
MFS-BHA	23	9.91619	-0.040997	0.000483	0.366223
	40	2.255119	0.816054	-0.000493	0.940924
MFS-BHT	23	6.343571	0.018838	0.000242	0.740410
	40	1.945439	0.861247	-0.00065	0.904871

Tabla 15. Coeficientes de regresión lineal de 2° orden para las curvas Intensidad de Sabor a Cartón de las muestras de maní frito en función del tiempo (23°C y 40°C).

Muestra	T (°C)	Coeficientes de regresión			R ²
		[Ordenada al origen]	[días]	[días] ²	
MFS	23	7.554405	0.097009	-0.000276	0.83755
	40	8.208810	0.514783	-0.002455	0.917802
MFS-AN	23	7.190238	0.006577	0.000375	0.902384
	40	3.210177	0.498769	-0.002011	0.923221
MFS-BHA	23	8.387262	-0.008233	0.000084	0.082841
	40	6.680833	0.266585	-0.000569	0.925965
MFS-BHT	23	6.820357	0.002755	0.000182	0.782033
	40	6.467945	0.242564	-0.000362	0.813832

Tabla 16. Coeficientes de regresión lineal de 2° orden para las curvas Intensidad de Sabor a Maní Tostado de las muestras de maní frito en función del tiempo (23°C y 40°C).

Muestra	T (°C)	Coeficientes de regresión			R ²
		[Ordenada al origen]	[días]	[días] ²	
MFS	23	51.683929	-0.005619	-0.000476	0.815024
	40	51.795000	-0.613395	0.003070	0.844635
MFS-AN	23	59.275357	-0.086227	-0.000174	0.862193
	40	62.899155	-0.636285	0.002425	0.917162
MFS-BHA	23	53.130833	0.034449	-0.000425	0.322430
	40	57.276667	-0.365216	0.000900	0.927585
MFS-BHT	23	57.626548	0.012078	-0.000652	0.910914
	40	59.463374	-0.443262	0.001210	0.798836

Según el análisis estadístico realizado, se pudo concluir:

- Para **Sabor a Oxidado**: En ambas temperaturas se observaron incrementos de la intensidad a sabor a oxidado con el tiempo, siendo para 40°C más pronunciada esta tendencia. Esta tendencia es similar a la del índice de peróxido y de anisidina, hasta el día 84, ya que a partir de este día el sabor a oxidado continuó incrementándose.
- Para **23°C**, en general se observó que el producto MFS resultó con intensidades a sabor a oxidado superiores significativamente con respecto a las otras muestras. Para el producto MFS-AN se observó que no se diferenció significativamente de los productos MFS-BHA y MFS-BHT hasta el día 56, a partir del cual el MFS-AN presentó mayores valores de sabor a oxidado. No se encontraron diferencias significativas entre los antioxidantes BHA y BHT a lo largo de todo el ensayo.
- Para **40°C**, en general se observó que las muestras MFS presentaron los mayores valores de sabor a oxidado, diferentes significativamente al resto, hasta el día 56. A

partir del día 56, las muestras MFS y MFS-AN siguen curvas similares, y a partir del día 112 no se encontraron diferencias significativas entre todas las muestras. Se observó que el producto MFS-AN presentó mayores valores de sabor a oxidado con respecto a los antioxidantes sintéticos (BHA y BHT) a partir del día 56. No se encontraron diferencias significativas entre los productos MFS-BHA y MFS-BHT en todo el ensayo.

- De acuerdo a trabajos realizados sobre predicción de calidad en productos de maní (Grosso y Resurrección, 2001) se encontró que para un valor de intensidad de Sabor a Oxidado de alrededor de 40 el producto se considera no aceptable para los consumidores. De acuerdo a la regresión lineal de 2° orden de Sabor a Oxidado en función del Índice de Peróxido, se obtuvo la siguiente fórmula: $IP = 10.154522 + 2.376478 [\text{Intensidad Sabor Oxidado}] - 0.019738 [\text{Intensidad Sabor Oxidado}]^2$ ($R^2 = 0.54864$), con la cual se pudo predecir que cuando se tiene una intensidad de Sabor a Oxidado de 40, el Índice de Peróxido en promedio fue de $73.6 \text{ meqO}_2/\text{Kg}$, valor casi 10 veces superior al valor permitido por el CAA ($10 \text{ meqO}_2/\text{Kg}$). Entre el valor de Intensidad de Sabor a Oxidado y el Índice de Anisidina se obtuvo la siguiente ecuación de regresión lineal de segundo orden: $IAN = -0.723872 + 0.814357 [\text{Intensidad de Sabor a Oxidado}] - 0.003197 [\text{Intensidad Sabor a Oxidado}]^2$ ($R^2 = 0.798801$), y despejando, para Sabor a Oxidado = 40, IAN resultó de 26.7.
- Para predecir el número de días requeridos para alcanzar el valor de 40 de intensidad de sabor a oxidado en las muestras de maní frito salado se utilizaron las ecuaciones de regresiones obtenidas en la **Tabla 14**. Para **23°C**, se requerirían: MFS 174 días, MFS-AN 163 días, MFS-BHA 296 días y MFS-BHT 336 días. Mientras que para **40°C** se requerirían: MFS 16 días, MFS-AN 31 días, MFS-BHA 48 días y MFS-BHT 46 días.
- Para **Sabor a Cartón**: Se observó la misma tendencia y diferencias significativas que para Sabor a Oxidado, para ambas temperaturas.

- Para **Sabor a Maní Tostado**: En ambas temperaturas se observaron disminuciones de la intensidad a sabor a maní tostado con el tiempo, siendo para 40°C más pronunciada esta tendencia.
- Para **23°C**, en general se observaron escasas diferencias significativas entre los productos, siendo MFS el de menores intensidades a sabor a tostado a lo largo del período estudiado.
- Para **40°C**, en general se observó que las muestras MFS presentaron los menores valores de sabor a tostado, diferentes significativamente al resto, hasta el día 56. A partir del día 56, las muestras MFS y MFS-AN siguen curvas similares, y a partir del día 112 no se encontraron diferencias significativas entre todas las muestras. En general, no se encontraron diferencias significativas entre los productos MFS-AN, MFS-BHA y MFS-BHT.
- De acuerdo a las curvas obtenidas por regresión para los Índices de Peróxido, Anisidina y las Intensidades de Sabor a Oxidado, Sabor a Cartón y Sabor a Tostado, en ambas temperaturas, para las muestras de maní frito salado, se puede decir que los antioxidantes naturales brindaron protección frente a la oxidación, sin embargo no tan elevada como los antioxidantes sintéticos.

Análisis de Correlación entre las variables medidas en el almacenamiento: *Índice de Peróxido, Anisidina y Atributos Sensoriales.*

En la **Tabla 17** se presentan los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables estudiadas para maní frito salado. De esta tabla se puede observar que las variables que mostraron buena correlación (coeficiente mayor a 0.7 de signo positivo o negativo, marcados en azul) fueron:

- Entre Índice de Anisidina con Sabor a Oxidado y a Cartón resultaron coeficientes positivos de 0.886 (para ambos), y con Sabor a Maní Tostado coeficiente negativo -0.860 .
- Entre Sabor a Oxidado y Sabor a Cartón resultó un coeficiente positivo 0.959.
- Entre Sabor a Maní Tostado y Sabor a Oxidado resultó un coeficiente negativo de -0.972 , con Sabor a Cartón un coeficiente negativo de -0.925 .

Tabla 17. Coeficientes de Correlación de Pearson y Probabilidades (Infostat) de las variables analizadas para maní frito salado durante el almacenamiento.

Variables	Índice de Peróxido	Índice de Anisidina	Sabor a Maní Tostado	Sabor a Oxidado	Sabor a Cartón
<i>Índice de Peróxido</i>	1	5.92E-08	1.85E-07	8.00E-06	0.000003
<i>Índice de Anisidina</i>	0.524093	1	0	0	0
<i>Sabor a Maní Tostado</i>	-0.499931	-0.860135	1	0	0
<i>Sabor a Oxidado</i>	0.436392	0.886534	-0.971829	1	0
<i>Sabor a Cartón</i>	0.452802	0.886210	-0.925118	0.959402	1

CONCLUSIONES

➤ **Pruebas con aceite de girasol:**

En general los extractos de tegumento de maní no se solubilizaron totalmente en el aceite de girasol, provocando una disminución de la protección frente a la oxidación, así mismo los resultados fueron positivos.

- En cuanto a los valores de índice de peróxido, en general se encontró que todos los extractos dieron menores índices de peróxido en las pruebas de oxidación acelerada con aceite de girasol, con respecto al aceite control (sin agregado de antioxidantes), pero el BHT fue el que dio los menores valores de índice de peróxido en todos los casos.
- En cuanto a índice de acidez, se observaron cambios a lo largo del tiempo en el índice de acidez de los aceites analizados en las pruebas de oxidación acelerada con aceite de girasol.

➤ **Pruebas con maní tostado recubierto con miel:**

De acuerdo a los resultados en cuanto a índice de peróxido y MDA:

- La aplicación de este tipo de recubrimiento en maní tostado mejoró su estabilidad durante el almacenamiento.
- La utilización de antioxidantes provenientes del tegumento de maní no alteró el aspecto ni color de los productos con recubrimiento, y prolongó el tiempo de vida útil de los productos de maní recubierto con miel.

- Los antioxidantes naturales produjeron un incremento de la vida útil de los productos con pocas diferencias con el antioxidante sintético (BHT), pero los primeros cuentan con ventajas sobre todo por aquello respecto a la salud de los consumidores.

➤ **Pruebas con maní frito salado:**

De acuerdo a los resultados en cuanto a índice de peróxido, índice de anisidina y análisis sensorial descriptivo:

- La utilización de antioxidantes provenientes del tegumento de maní no alteró el aspecto ni color de los productos, y prolongó el tiempo de vida útil de los productos de maní frito salado.
- Los antioxidantes naturales demostraron poseer actividad en la prevención de la oxidación de los productos, con poca diferencia con respecto a los sintéticos (BHA y BHT). De estos últimos, el BHT presentó mayor protección para la oxidación que el BHA.

Capítulo 4

Determinación del Proceso Adecuado a Nivel
Laboratorio para la Obtención de Sustancias
Antioxidantes del Tegumento de Maní

INTRODUCCION

Los ensayos a escala laboratorio son necesarios para conocer el comportamiento aproximado de las sustancias a tratar antes de comenzar a realizar los ensayos a escala piloto.

En el Capítulo 1 se determinó el solvente más adecuado para la obtención de los compuestos con actividad antioxidante, y se concluyó que por motivos de rendimientos, actividad antioxidante, toxicidad y facilidad de filtración y evaporación se utilizará como solvente la mezcla etanol:agua 70% de etanol.

En este capítulo se exponen los ensayos de extracción realizados a escala laboratorio utilizando mezcla etanol:agua 70:30 como solvente a fin de obtener el método óptimo de extracción de los compuestos antioxidantes. El tegumento no fue deslipidizado previamente, ya que al utilizarse mezclas etanol:agua los compuestos lipídicos se extraerían en una cantidad mínima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se trabajó con tegumento de maní blanchado provisto por la empresa Lorenzati, Ruetsch y Cia., S.A. (cosecha 2000-2001, Ticino, Córdoba, Argentina).

Metodologías

➤ **Elección del tamaño de partícula del tegumento:**

El tegumento sin deslipidizar fue molido mediante licuadora y tamizado con diferentes tamaños de malla obteniéndose 4 tamaños:

1. Tamaño grande: tegumento retenido por malla nº 10. Tamaño de partícula entre 2 y 10mm.
2. Tamaño medio: tegumento que pasa por malla nº 10, y es retenido en malla nº 20. Tamaño de partícula entre 1 y 2mm.
3. Tamaño pequeño: tegumento no retenido por malla nº 20. Tamaño de partícula menor a 1mm.
4. Tegumento sin moler.

De estos tegumentos se tomaron por duplicado 2.5g y se extrajeron con 50mL de la mezcla etanol:agua 70:30, en erlenmeyer de 150mL, sin agitación durante 24hs, y con agitación mediante agitador magnético a 2000rpm durante 20 minutos, a temperatura ambiente y oscuridad.

Los extractos fueron evaporados hasta sequedad en evaporador rotatorio (vacío, 40°C), y sobre ellos se determinó el rendimiento de extracción en materia seca (g extracto seco/100g tegumento seco extraído), el contenido de fenoles totales del extracto (g fenoles/

100g extracto seco), rendimiento en fenoles totales de la extracción (g fenoles/ 100g tegumento seco) por el método Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole 1994), y el porcentaje de actividad secuestrante de radicales libres para 1µg/mL de extracto con DPPH (según Schmeda-Hirschmann, 1999).

➤ **Cantidad óptima de solvente:**

Se extrajeron, por duplicado, 2,5g de tegumento sin desengrasar y sin moler durante 24 hs, a temperatura ambiente y oscuridad, con diferentes cantidades de solvente etanol:agua 70:30: 50, 75, 100, 125 y 150mL, a fin de encontrar la cantidad mínima de solvente para alcanzar el máximo de extracción, en estas condiciones. La cantidad de solvente mínima para cubrir totalmente el tegumento sin moler fue de 50 mL.

Se compararon las concentraciones de fenoles totales de los extractos obtenidos en mg fenoles totales/mL de solución, y los rendimientos de fenoles totales de cada extracción en g fenoles totales/100g tegumento seco (método Folin-Ciocalteu, según Waterman and Mole, 1994).

➤ **Tiempo óptimo de extracción:**

Se extrajeron, por duplicado, 2.5g de tegumento sin desengrasar, molido tamaño mediano y sin moler, con 50mL de solvente etanol:agua 70:30, a temperatura ambiente, y durante períodos crecientes de tiempo de extracción: 1, 10, 30, 60, 120 y 300 minutos. Las extracciones se realizaron de dos formas:

1. sin agitación,
2. con agitación, mediante agitador magnético a 2000rpm.

➤ **Número óptimo de etapas de extracción:**

Se extrajeron, por duplicado, 2,5g de tegumento sin desengrasar ni moler, con 50mL de solvente etanol:agua 70:30, a temperatura ambiente, con agitación (agitador magnético), durante 20 minutos. Se realizaron hasta 5 etapas de extracción del mismo tegumento con 50 mL de solvente limpio.

➤ **Diagrama de flujo del proceso de extracción:**

De acuerdo a los resultados de los ensayos realizados a escala laboratorio para la obtención de los compuestos fenólicos del tegumento de maní se propuso un diagrama de flujo del proceso para escala laboratorio.

➤ **Propiedades del tegumento:**

Para los tegumentos molidos tamaño mediano y sin moler se determinó el contenido de:

- *Humedad*: por diferencia en peso, en estufa 100°C durante 5hs (según AOAC 1980),
- *Materia grasa*: por soxhlet con hexano durante 12 hs (AOAC 1980),
- *Fenoles totales*: extraídos por 5 extracciones de 2.5g de tegumento con 50mL de solvente etanol:agua 70:30 cada una, a temperatura ambiente, durante 20 minutos, con agitación, y determinados por el Método Folin-Ciocalteu (según Waterman and Mole 1994).

➤ **Propiedades del solvente y los extractos**

Se prepararon 10 extractos de tegumento de maní con solvente etanol:agua 70:30 mediante el siguiente procedimiento:

1. Se colocaron 150g de tegumento molido tamaño mediano fresco en un tubo de vidrio, de dimensiones 40mm de diámetro, 660 mm de altura máxima, provisto de filtro de papel (Whatman 1MM) en la parte inferior.
2. En la primera etapa de extracción se aplicaron 830mL de solvente limpio, por la parte superior del tubo, haciendo recircular el extracto filtrado obtenido por la parte inferior durante 60 minutos, mediante bomba de combustible, caudal de 44mL/min.
3. Después de la primera extracción se dejó percolar el extracto durante 15 minutos, el cual fue recolectado en botella de vidrio color caramelo (aproximadamente 450mL de extracto recuperado).
4. Se repitió la extracción del mismo tegumento en 9 etapas más, con 450mL de solvente fresco cada etapa. Todas las extracciones se realizaron a temperatura ambiente.

Sobre el solvente etanol:agua 70:30 y extractos obtenidos del tegumento de maní se determinaron (20-22°C):

- a. *Concentración de materia seca* (peso extracto seco/mL extracto): por evaporación total del solvente en evaporador rotatorio (40°C, vacío),
- b. *Concentración de fenoles totales* (mg fenoles/mL extracto): según método Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole 1994),
- c. *Densidad* (g/mL o g/cm³): mediante picnómetro normal de 1ml de capacidad, utilizando como referencia agua destilada a 20-22°C. La densidad se calculó mediante la fórmula: $\rho \text{ (g/cm}^3\text{)} = (p'' - p) \cdot D / (p' - p)$, siendo D = densidad del agua (g/cm³) a la temperatura de referencia, p'' = peso en g del picnómetro con el líquido a la temperatura de referencia, p' = peso en g del picnómetro con agua a la temperatura de referencia y p = peso en g del picnómetro vacío (Madrid *et al.*, 1997)
- d. *Viscosidad* (centipoise): por medio de viscosímetro de Ostwald, haciendo circular 20ml de las soluciones y midiendo el tiempo necesario para recorrer dos puntos, utilizando como referencia agua destilada a 20-22°C. La viscosidad aparente se calculó mediante la fórmula: $\mu \text{ (cp)} = (t_m \cdot \mu_a) / (t_a)$, siendo t_m = tiempo de fluido de la muestra a la temperatura de referencia, μ_a = viscosidad del agua a la temperatura

de referencia y t_a = tiempo de fluido del agua a la temperatura de referencia (AOAC, 1980, método n° 10.017).

Por otra parte se determinó la solubilidad del extracto en el solvente etanol:agua 70:30 (Abraham *et al.*, 1988) mediante extracción de 2.5g de tegumento fresco con 100mL de solvente (temperatura ambiente, 20min agitado). El extracto obtenido se filtró y se agregó a 2.5g de tegumento fresco. Este procedimiento se repitió hasta 12 veces.

Análisis estadístico de datos

Las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron analizadas estadísticamente con el programa Infostat (versión 1.1, 2002, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC), mediante Anova y test Duncan ($\alpha = 0.05$).

Se realizaron análisis de correlación (Pearson) y regresiones para las extracciones en función del tiempo y el número de etapas, y entre las variables concentración de materia seca, concentración de fenoles totales, densidad y viscosidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

➤ Elección del tamaño de partícula del tegumento:

En la **Figura 29** se muestran los rendimientos de obtención de materia seca para la extracción con y sin agitación. En la **Figura 30** se muestran los volúmenes de solución retenida para cada tegumento.

Para la extracción sin agitación (**Figura 29**) se puede observar que a medida que aumenta el tamaño de partícula aumenta el porcentaje de extracción, sin diferencias significativas entre el tegumento tamaño grande y el sin moler. Esto puede deberse a que el volumen de solvente retenido aumenta en orden inverso con el tamaño de partícula, debido a una mayor superficie de contacto (**Figura 30**), y al no producirse una agitación, el tegumento molido fino presentó mayor compactación lo cual provocó un menor contacto con la fase solvente, y en consecuencia menor extracción. El tegumento de tamaño pequeño resultó con los menores valores de extracto seco (13.9 ± 0.2 g extracto seco/ 100g tegumento seco), diferente significativamente a los demás. Los tegumentos mediano, grande y sin moler dieron valores entre 17.6-19.8 g extracto seco/ 100g tegumento seco.

Para la extracción con agitación no se observaron diferencias significativas en el rendimiento de extracto obtenido ni en el volumen de solución retenida (**Figuras 29 y 30**) entre los diferentes tamaños de tegumento. Los valores de rendimiento de extracción fueron entre 17.0-17.3 g extracto seco/100g tegumento seco, y los volúmenes de solución retenida fueron entre 3.7-4.2mL/g tegumento seco. Se observó que para la extracción con agitación en comparación con la extracción sin agitación, los rendimientos resultaron inferiores (con diferencias significativas) para el tegumento tamaño pequeño, grande y sin moler; esto pudo deberse a un insuficiente tiempo de contacto. En cuanto al volumen retenido, para la extracción con agitación estos valores resultaron inferiores a la extracción en reposo (con diferencias significativas) en todos los tamaños de tegumento.

En las **Figuras 31, 32 y 33** se muestran los contenidos de fenoles totales de los extractos, el rendimiento de extracción de fenoles del tegumento y actividad antioxidante (secuestrante de radicales libres) de los extractos obtenidos con y sin agitación, respectivamente.

Para la extracción sin agitación (**Figuras 32 y 33**), el tegumento pequeño dio menores contenido de fenoles de los extractos (49.5 ± 1.7 g fenoles totales/100g extracto seco) y actividad antioxidante ($33.0 \pm 2.9\%$). Mientras que los extractos de tegumento mediano, grande y sin moler no mostraron diferencias significativas. Para la extracción con agitación no se encontraron diferencias significativas entre los contenidos de fenoles totales y actividad antioxidante de los diferentes tamaños de tegumento, con valores entre 59.6-60.2g fenoles totales/100g extracto seco y 38.9-39.1% de actividad antioxidante. Además no se encontraron diferencias significativas entre las extracciones con y sin agitación, salvo para el tamaño pequeño, en donde la extracción sin agitación dio valores inferiores de rendimiento de fenoles y actividad antioxidante.

En la **Figura 32** se observa una tendencia similar a la de la **Figura 29**. Es decir que para la extracción sin agitación aumentó el rendimiento de fenoles totales con el aumento de tamaño del tegumento. Mientras que para la extracción con agitación no se observaron diferencias significativas para los diferentes tamaños de partícula. Resultando la extracción con agitación con valores inferiores en rendimiento de fenoles en comparación con la extracción sin agitación.

Se puede concluir parcialmente, que para estos métodos, con y sin agitación, el molido del tegumento no favorece la extracción, aunque permite el uso de una menor cantidad de solvente para cubrir el tegumento, lo cual puede determinar un ahorro en solvente para escalas mayores. Para estos ensayos se utilizó como variable de comparación el rendimiento de fenoles totales de la extracción del tegumento.

Figura 29. Rendimientos de extracción para los tegumentos de diferentes tamaños. Letras diferentes indican diferencias significativas (Anova y test Duncan $\alpha = 0.05$).

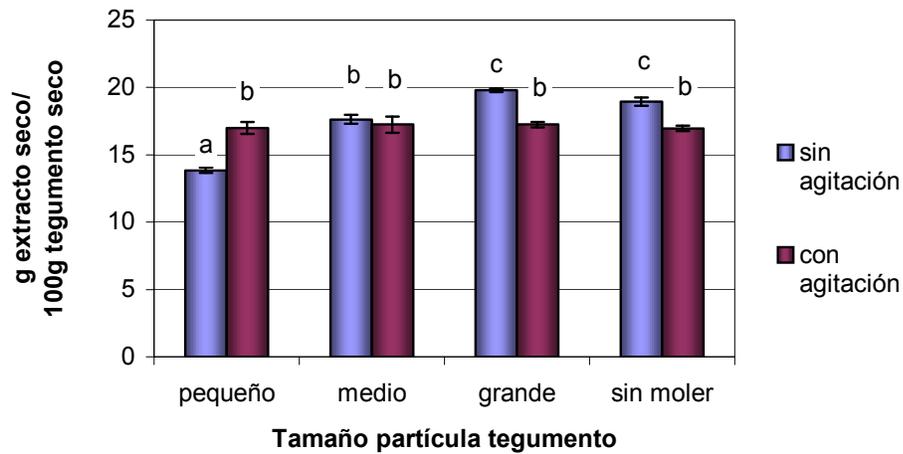


Figura 30. Volumen de solución retenida por gramo de tegumento, para los diferentes tamaños. Letras diferentes indican diferencias significativas (Anova y test Duncan $\alpha = 0.05$).

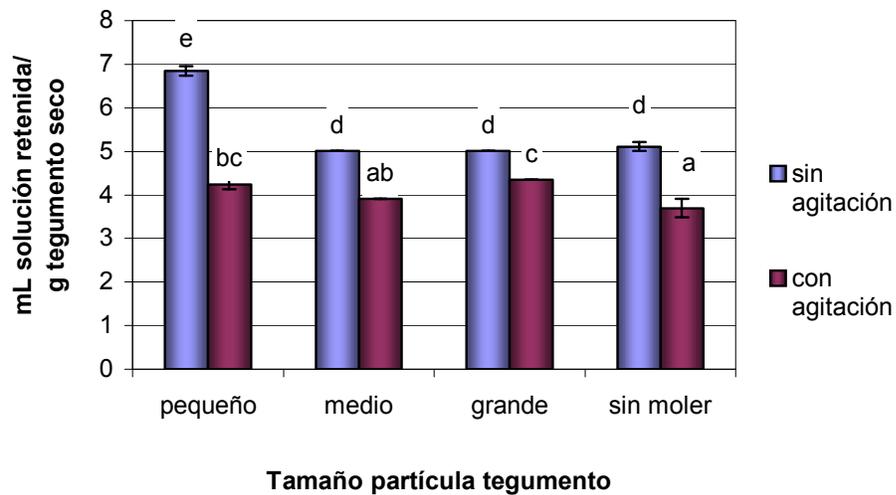


Figura 31. Contenido de fenoles totales de los extractos para los tegumentos de diferentes tamaños. Letras diferentes indican diferencias significativas (Anova y test Duncan $\alpha = 0.05$).

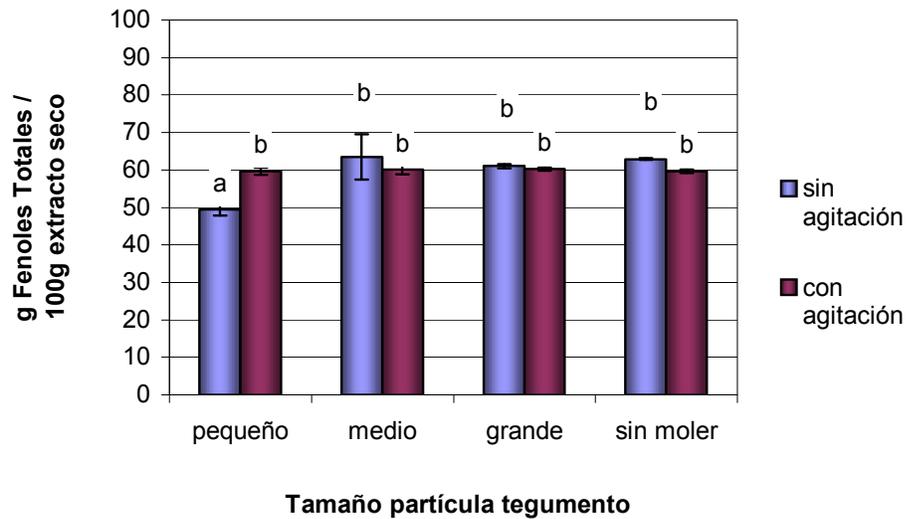


Figura 32. Rendimientos de fenoles totales de los extractos para los tegumentos de diferentes tamaños. Letras diferentes indican diferencias significativas (Anova y test Duncan $\alpha = 0.05$).

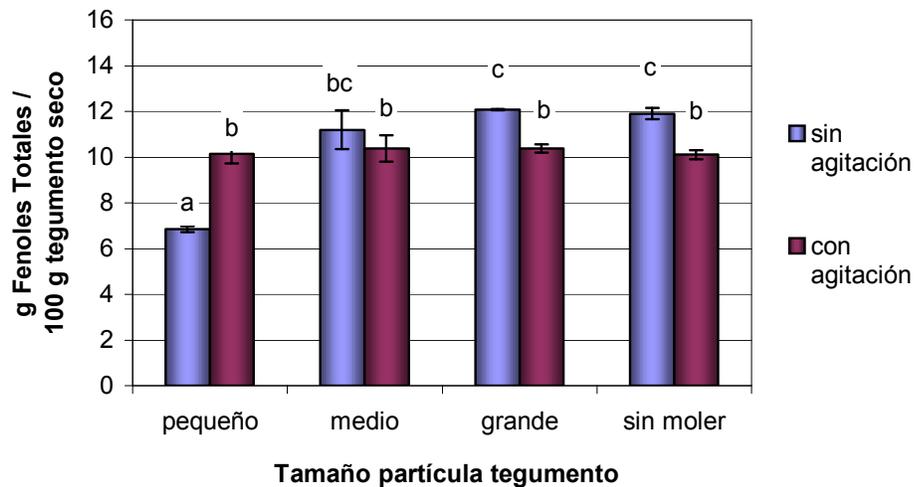
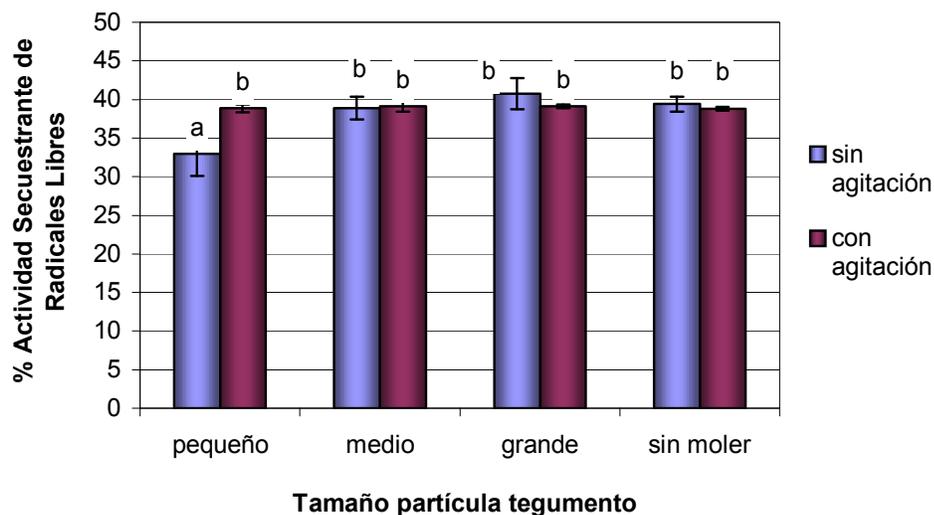


Figura 33. Porcentajes de Actividad Secuestrante de Radicales Libres para los tegumentos de diferentes tamaños. Letras diferentes indican diferencias significativas (Anova y test Duncan $\alpha = 0.05$).



➤ **Cantidad de solvente óptimo:**

En la **Figura 34** se muestran las concentraciones en fenoles totales de los extractos obtenidos. Se puede observar una tendencia hiperbólica entre la disminución de la concentración de fenoles con el aumento del volumen de solvente utilizado, que responde a una ecuación del tipo $y = a/x$, donde y = concentración de fenoles, a = constante y x = volumen de solvente, indicando que es independiente la cantidad de solvente utilizado con respecto a la masa de fenoles extraído. Para 50mL de solvente la concentración de fenoles totales fue de $7.1 \pm 0.6\text{mg/mL}$, y para 150mL la concentración fue $2.1 \pm 0.1\text{mg/mL}$.

En la **Figura 35** se graficaron los rendimientos de extracción de fenoles totales con el aumento de solvente de extracción para la misma cantidad de tegumento. Como se puede observar en este gráfico, no se encontraron diferencias significativas con el aumento de cantidad de solvente, dado que es independiente el rendimiento de fenoles extraídos con el volumen de solvente utilizado, tal como se concluyó en la figura anterior. Es decir que

con el mínimo volumen de solvente para este caso, logrando que se cubra totalmente el tegumento a extraer se obtiene el máximo de extracción de una etapa. El rendimiento de extracción de fenoles resultó entre 11.1-12.7g fenoles totales/100g tegumento seco. La cantidad mínima para 2.5g de tegumento fresco (2.33g de tegumento seco) fue de 50mL de solvente, en una relación mL solvente/g tegumento fresco sin moler y sin deslipidizar de 20/1 (mL solvente/g tegumento seco aproximadamente = 21.5/1).

Figura 34. Concentración de fenoles totales de los extractos obtenidos del tegumento para diferentes cantidades de solvente

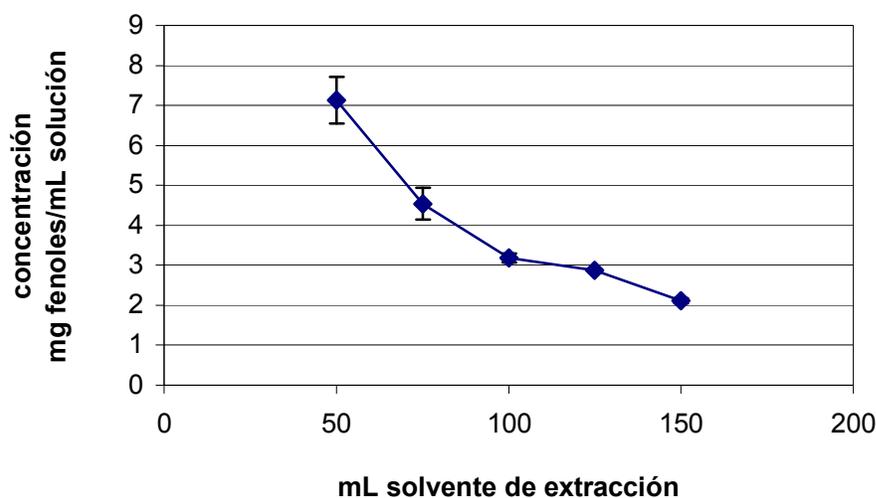
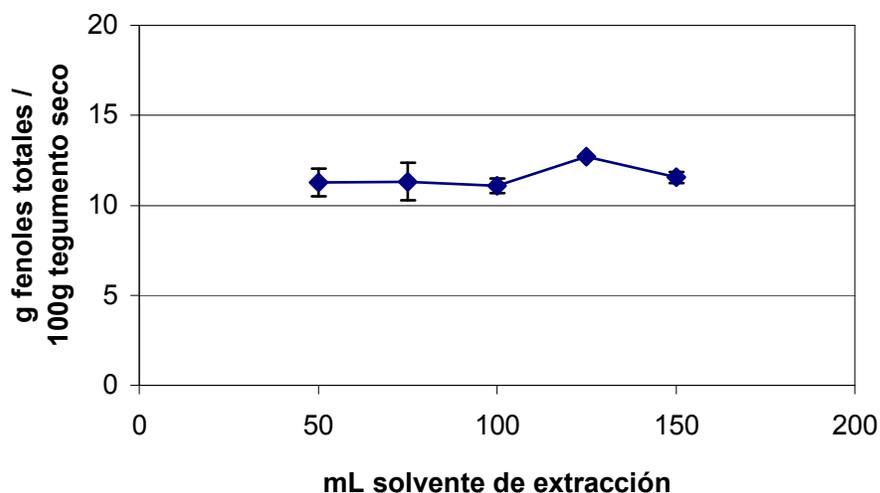


Figura 35. Rendimiento de extracción de fenoles totales del tegumento para diferentes cantidades de solvente.



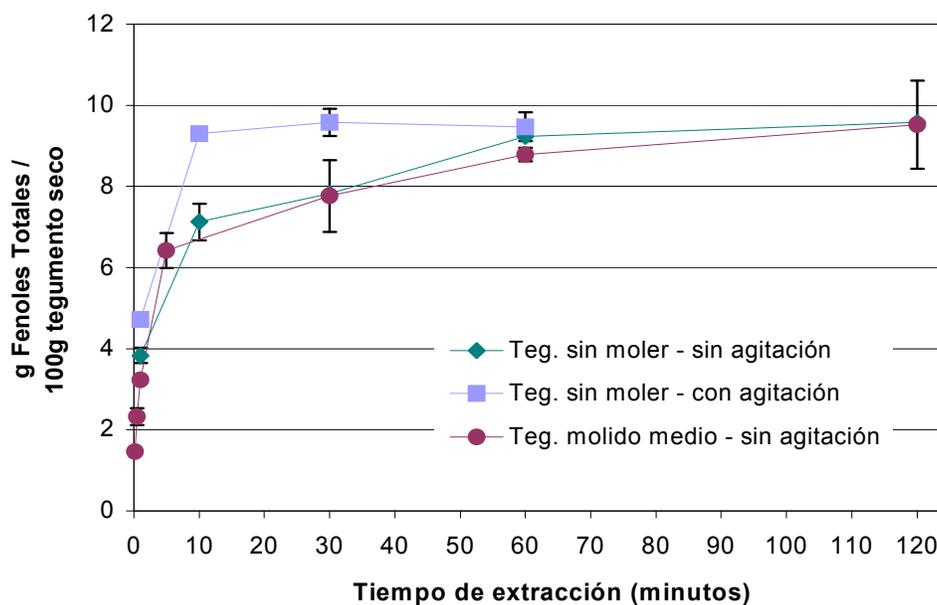
➤ **Tiempo de extracción óptimo:**

En la **Figura 36** se muestra el rendimiento de fenoles totales obtenidos en función del tiempo de extracción del tegumento sin deslipidizar de tamaño mediano y sin moler, mediante extracción en forma pasiva y con agitación.

Se puede observar que para la extracción sin agitación el proceso es más lento que para el método agitado, lográndose el máximo de extracción a los 10 minutos para el proceso agitado (9.3 ± 0.0 g fenoles totales/100g tegumento seco), y a los 60 minutos para la extracción pasiva (9.2 ± 0.0 g fenoles totales/100g tegumento sin moler seco, y 8.8 ± 1.1 g fenoles totales/100g tegumento molido seco).

No se encontraron diferencias significativas entre el tegumento molido y sin moler para la extracción en reposo. Por lo que se volvió a confirmar que el molido del tegumento no mejoró el rendimiento de la extracción de fenoles.

Figura 36. Rendimiento de extracción de fenoles totales en función del tiempo de extracción para proceso sin agitación y con agitación.



De acuerdo a los coeficientes de regresión (R^2) se observó una tendencia logarítmica para las variables: rendimiento de extracción de fenoles (variable dependiente = y) y tiempo (variable independiente = x):

- Tegumento sin moler, extracción sin agitación:

$$y = 1.214437\text{Ln}(x) + 3.974813 \quad (R^2 = 0.983609)$$

- Tegumento molido tamaño mediano, extracción sin agitación:

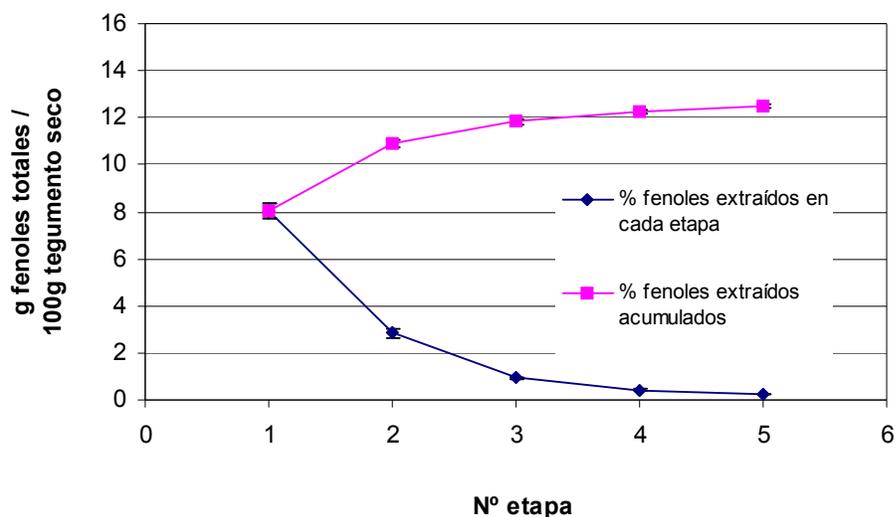
$$y = 1.277416\text{Ln}(x) + 3.559278 \quad (R^2 = 0.985345)$$

- Tegumento sin moler, extracción con agitación:

$$y = 1.220857\text{Ln}(x) + 5.276219 \quad (R^2 = 0.855353)$$

➤ **Número de etapas de extracción**

En la **Figura 37** se graficaron los rendimientos de fenoles totales para extracciones desde 1 a 5 etapas mediante corriente cruzada. Como se puede ver en este gráfico las tres primeras etapas son la que aportan mayores porcentajes de extracción con respecto al total: 64.6% para la primera etapa, 22.7% segunda etapa, 7.5% para la tercera etapa, 3.4% para la cuarta etapa y 1.8% para la quinta etapa. Es decir que se pueden considerar 3 etapas como óptimas, las cuales suman un 95% del extracto total, y al aumentar el número de etapas se estaría incrementando la cantidad de solvente, lo que implicaría aumentar costos por el uso de grandes volúmenes de solvente acompañado por mayores procesos de filtrado y evaporación.

Figura 37. Rendimientos de fenoles totales obtenidos por etapa de extracción

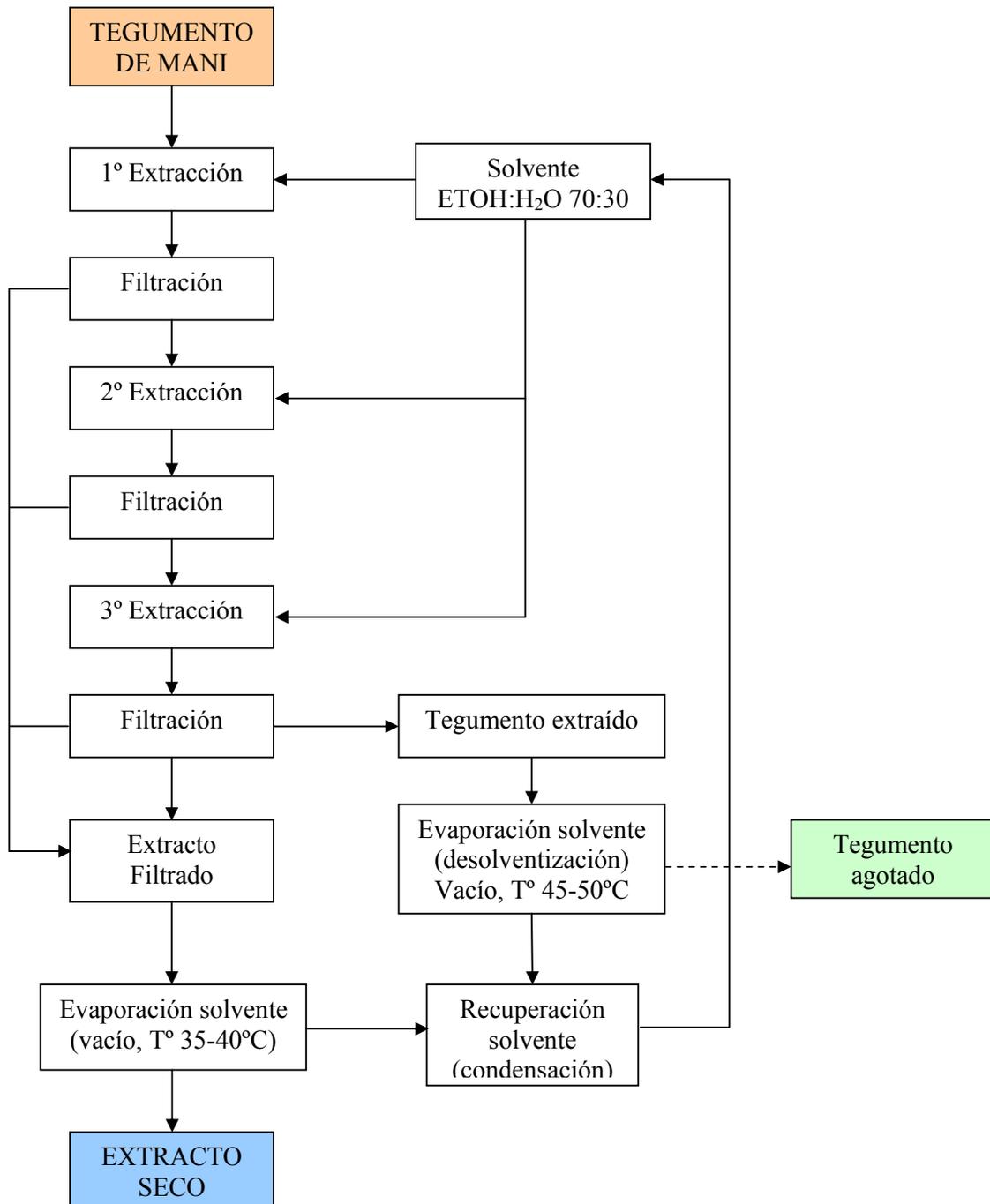
Se observó una tendencia logarítmica entre la variable dependiente “rendimiento de fenoles totales” (y) y la variable independiente “etapa” (x). Se obtuvo la siguiente regresión:

$$y = -4.960951 \ln(x) + 7.247020 \quad (R^2 = 0.923417)$$

➤ Diagrama de flujo del proceso de extracción

En base a los resultados anteriores, en la **Figura 38** se propuso un diagrama de flujo para el proceso de obtención de los compuestos antioxidantes para escala laboratorio, el cual podría ser adaptado para escalas piloto e industrial.

Figura 38. Diagrama de flujo para la extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante del tegumento de maní a escala laboratorio.



➤ **Propiedades del tegumento**

Los contenidos de humedad, materia grasa y fenoles totales del tegumento de maní se detalla en la **Tabla 18**.

De acuerdo al análisis estadístico (Anova, Test Duncan $\alpha = 0.05$) no se encontraron diferencias significativas entre ambos tegumentos.

Tabla 18. Contenido de humedad, materia grasa y fenoles totales del tegumento de maní sin moler y molido tamaño mediano.

	Tegumento sin moler	Tegumento molido tamaño mediano
% humedad	10.56 ± 0.30	10.52 ± 0.29
% materia grasa	7.92 ± 1.72	6.97 ± 0.08
g fenoles totales/ 100g tegumento seco	12.64 ± 0.16	11.64 ± 0.53

Los valores se expresaron en peso de materia seca, excepto el porcentaje de humedad que fue expresado en peso de materia fresca.

➤ **Propiedades del solvente y extractos**

Concentración de materia seca, fenoles totales, densidad y viscosidad:

En la **Tabla 19** se detallan los valores de densidad y viscosidad de los solventes puros agua, etanol 96% y etanol:agua 70:30 (20-22°C).

Al comparar los valores obtenidos experimentalmente para el etanol (96%) y la mezcla etanol:agua (70:30), con los valores de bibliografía (Weast, 1977-1978) estos resultaron

con diferencias muy pequeñas. Los valores encontrados para el etanol 96% fueron: densidad 0.8013g/mL y viscosidad 1.200cp. Para el etanol 70% la densidad fue de 0.8676g/mL.

Tabla 19. Valores de densidad y viscosidad de los solventes puros.

Solvente	Densidad (g/mL)	Viscosidad (centipoise)
agua destilada *	0.9982	0.9664
etanol 96%	0.8049 ± 0.0004	1.1761 ± 0.0024
etanol:agua 70:30	0.8875 ± 0.0006	1.0819 ± 0.0113

* Fuente: Weast, 1977-1978.

En la **Tabla 20** se muestran los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables concentración de materia seca, concentración de fenoles totales, densidad y viscosidad de los extractos.

Se encontró correlación positiva entre la materia seca, fenoles y densidad (coeficientes de Pearson entre 0.93-1.00). La viscosidad no mostró variaciones importantes con el incremento de la concentración de los extractos, aunque dio un coeficiente de correlación relativamente mayor (-0.70) con la densidad.

En las **Figuras 39 a 43** se muestran las gráficas y regresiones lineales de las variables mencionadas.

Para los rangos de concentración entre 0-34.8 mg extracto seco/mL y 0-15.9 mg fenoles totales/mL (**Figura 39**), la concentración de fenoles de los extractos con la concentración de materia seca siguió una tendencia lineal ($R^2 = 0.99$), y aproximadamente la mitad de los componentes del extracto correspondieron a compuestos fenólicos.

Para los mismos rangos de concentración de materia seca y fenoles totales (**Figuras 40 y 41**), la tendencia más aproximada entre la densidad y la concentración de materia seca y concentración de fenoles totales corresponde a una regresión polinómica de segundo orden ($R^2 = 0.94$ y 0.93 , respectivamente). Los valores de densidad estuvieron entre 0.8875 mg/mL para el solvente puro y 0.8995 g/mL para el extracto más concentrado ($34.8 \text{ mg extracto seco/mL}$ y $15.9 \text{ mg fenoles totales/mL}$).

Las regresiones polinómicas de segundo orden entre la viscosidad y la concentración de fenoles totales y la densidad (**Figuras 42 y 43**) dieron coeficientes de regresión (R^2) menores a las regresiones antes mencionadas (entre 0.56 - 0.61 , respectivamente). Los valores de viscosidad estuvieron entre 1.0654 cp (extracto más concentrado $15.86 \text{ mg fenoles totales/mL}$) y 1.1050 cp (extracto $0.4583 \text{ mg fenoles totales/mL}$).

Tabla 20. Análisis de correlación (coeficientes Pearson/probabilidad)

Variables	Concentración materia seca	Concentración fenoles totales	Densidad	Viscosidad
Concentración materia seca	1.00	0.00	0.00	0.10
Concentración fenoles totales	1.00	1.00	0.00	0.09
Densidad	0.93	0.93	1.00	0.06
Viscosidad	-0.63	-0.63	-0.70	1.00

Figura 39. Concentración de fenoles totales en función de la concentración de materia seca de los extractos.

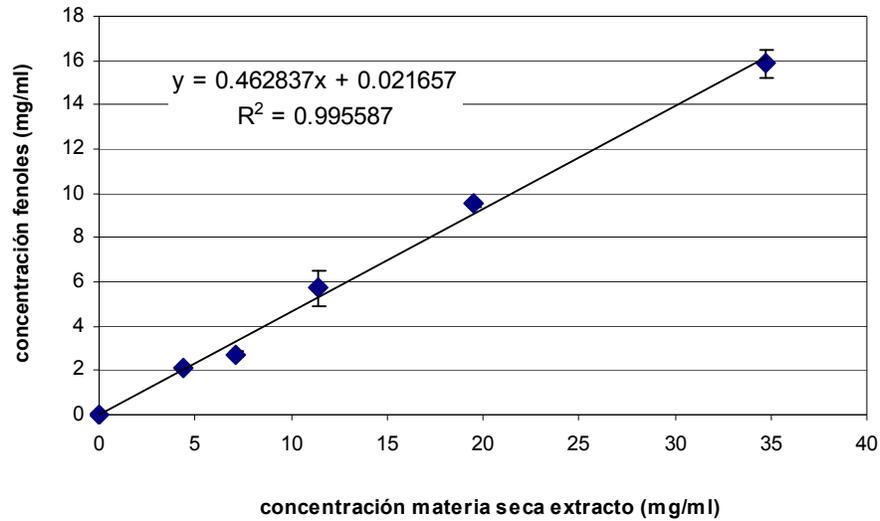


Figura 40. Densidad en función de la concentración de materia seca de los extractos.

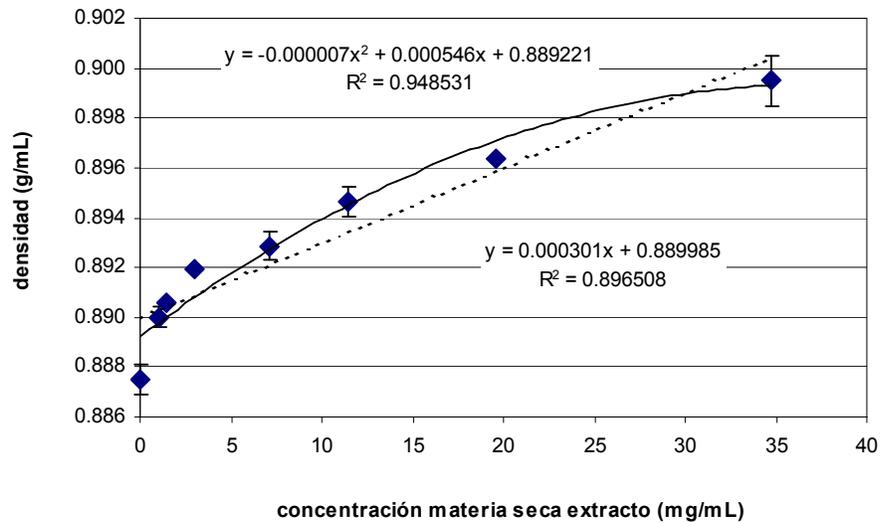


Figura 41. Densidad en función de la concentración de fenoles totales de los extractos.

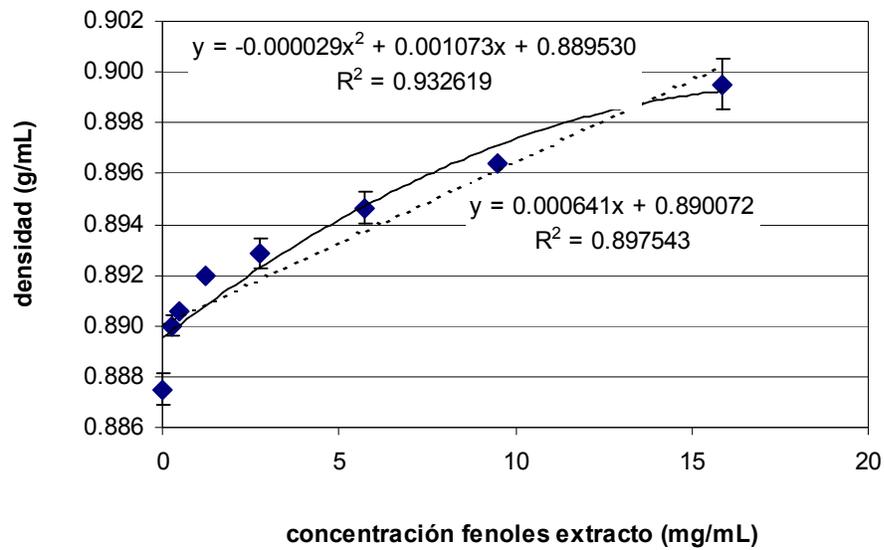


Figura 42. Viscosidad en función de la concentración de fenoles totales de los extractos.

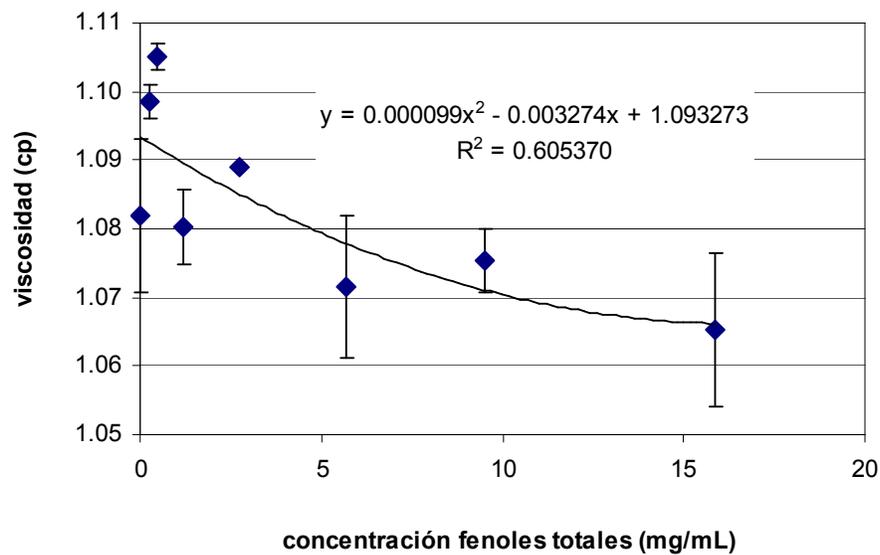
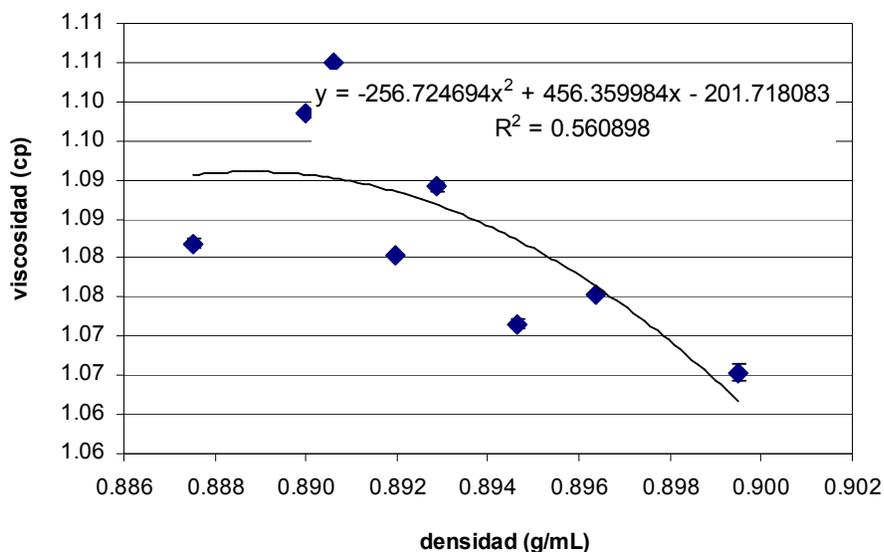


Figura 43. Viscosidad en función de la densidad de los extractos.*Solubilidad del extracto:*

En la **Figura 44** se graficó el incremento de la concentración de fenoles en soluciones obtenidas por extracciones sucesivas de tegumento fresco.

La concentración de los extractos se incrementó de manera lineal en las etapas de extracción. Es decir que no se pudo encontrar el límite máximo de solubilidad del extracto en estas condiciones, aunque se podría decir que la solubilidad fue de por lo menos 39.5mg de fenoles/mL de extracto. Este valor de concentración no se superó en ninguno de los ensayos a escala laboratorio y piloto. Por lo que, en las condiciones dadas de trabajo, no se producirían precipitados que dificulten la extracción.

En la **Figura 45** se graficó el porcentaje de extracción de fenoles del tegumento en función de la concentración del extracto aplicado. Según este gráfico, se observa una tendencia decreciente que responde a una ecuación de regresión cuadrática ($R^2 = 0.90$). A partir de esto se puede decir que para concentraciones bajas de extracto (entre 0 y 4.9mg

fenoles/mL) no se observaron diferencias significativas en la extracción, mientras que para concentraciones altas (entre 28.2 y 32.7mg/mL) los valores de extracción fueron negativos, es decir que si bien la concentración del extracto se incrementó, parte de la solución y los fenoles de la misma quedaron retenidos en el tegumento extraído. Resolviendo la ecuación cuadrática, para una concentración de 21.4mg fenoles/mL la extracción se hace igual a cero.

Figura 44. Incremento de la concentración de fenoles en soluciones obtenidas por extracciones sucesivas de tegumento fresco.

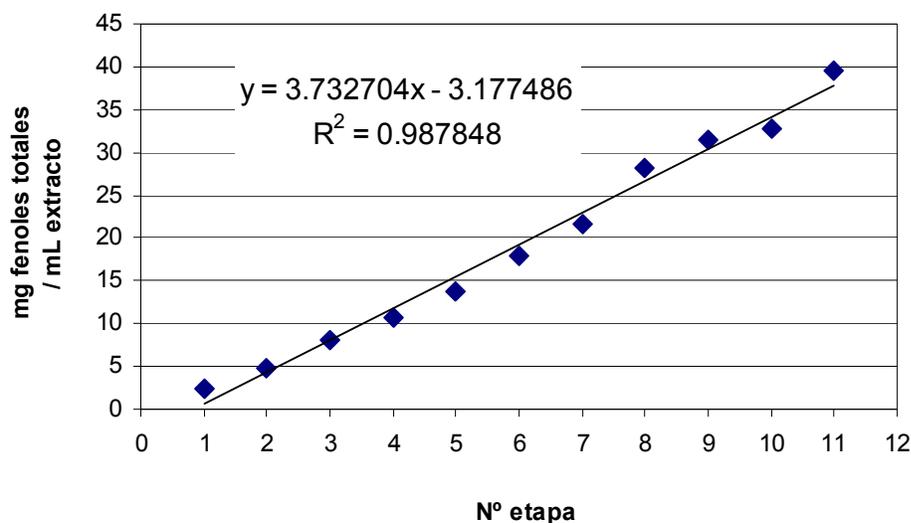
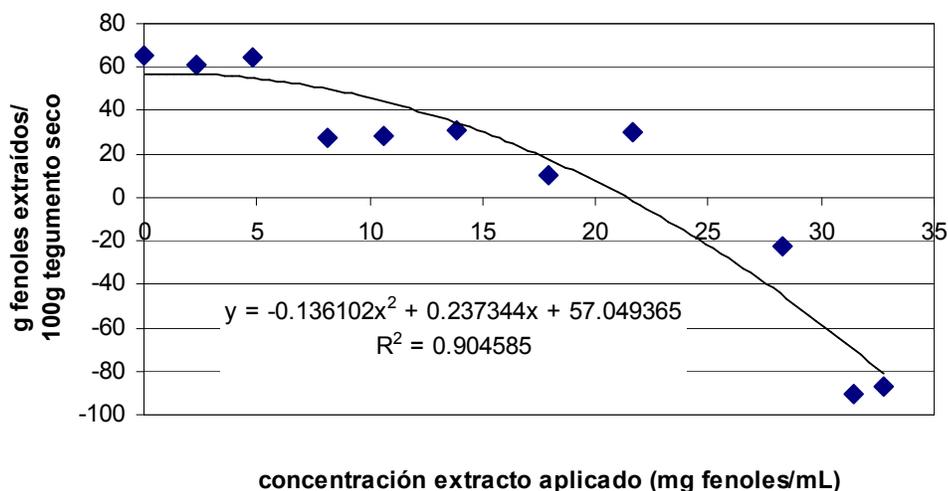


Figura 45. Extracción de fenoles en función de la concentración del extracto aplicado.



CONCLUSIONES

- En el proceso de obtención del extracto no es necesario el desengrasado del tegumento, ya que al utilizar como solvente la mezcla etanol:agua 70:30 los porcentajes de lípidos extraídos no son importantes.
- El tamaño de partícula del tegumento no mejora el porcentaje de extracción. Aunque al disminuir el tamaño de partícula se puede utilizar una cantidad inferior de solvente para la extracción. Sin embargo el tamaño de partícula mínimo aconsejado para el tegumento estaría entre 1-2mm (tamaño mediano), ya que para un tamaño más pequeño los rendimientos de fenoles obtenidos resultaron menores.
- Los tegumentos molidos tamaño mediano (1-2mm) y sin moler no mostraron diferencias significativas en porcentajes de humedad, materia grasa y fenoles totales.
- Se encontró correlación positiva entre las variables de concentración de materia seca, fenoles totales y densidad de los extractos, mientras que la viscosidad dio correlación con valores negativos con respecto a las anteriores.
- Para extractos de concentración de hasta 39.5mg fenoles totales/mL no se observaron precipitados.
- Como conclusión de los resultados obtenidos en los capítulos 1 y 4, y de acuerdo al diagrama de flujo de la **Figura 38** para la obtención de compuestos antioxidantes a partir del tegumento de maní blanqueado a nivel laboratorio:
 1. La extracción del tegumento se puede realizar en tres etapas por corriente cruzada, es decir con solvente limpio cada etapa, en una proporción de 20ml solvente/g de tegumento, durante 20 minutos de agitación, a temperatura ambiente.

2. Después de cada etapa de extracción la separación del extracto se realiza por filtración, con papel de filtro Whatman 1MM, mediante vacío si fuera necesario.
3. Los extractos filtrados se juntan y evaporan hasta sequedad, en evaporador rotatorio (vacío y 40°C máximo), para evitar polimerizaciones de los compuestos fenólicos.
4. El extracto seco se debe almacenar en envases color caramelo, con atmósfera de nitrógeno, y a temperaturas inferiores a 0°C para evitar oxidaciones o polimerizaciones.
5. El solvente recuperado de la evaporación se puede condensar y destilar para su reutilización.

Capítulo 5

Desarrollo del Proceso
de Extracción a Escala Piloto

INTRODUCCION

De acuerdo a ensayos realizados a escala laboratorio se decidió utilizar el solvente etanol:agua (70:30) para la extracción de los compuestos fenólicos del tegumento de maní. El método de extracción requiere la transferencia de masa de un sólido a un líquido, esta operación se denomina lixiviación. La lixiviación es una operación unitaria que significa la disolución preferente de uno o más componentes de una mezcla sólida por contacto de un disolvente líquido (Treybal, 1980; Prabhudesai, 1997).

El éxito de una lixiviación depende de muchos factores: el tratamiento previo del sólido (trituration y molienda), la temperatura, el método de operación: por lotes, continuo o semicontinuo, por aspersión o por inmersión (Treybal, 1980; Perry, 1992).

El objetivo de este capítulo fue desarrollar un método a escala piloto-laboratorio para la lixiviación de los compuestos fenólicos del tegumento que se pueda adaptar posteriormente a una escala industrial.

Para los ensayos a escala piloto se cuenta con un equipo para lixiviación en contracorriente tipo “Rotocel”, diseñado en el ICTA, utilizado previamente para la extracción de aceite de la harina de maní. Por medio de ensayos se decidió que este también podría ser utilizado para la extracción del tegumento. Para ello fue necesario realizar pruebas para adaptar el equipo y determinar las condiciones mediante las cuales se podría optimizar el proceso. Sobre este equipo se compararon diferentes sistemas de extracción (corriente cruzada, y contracorriente), y se determinaron las etapas ideales, cantidad de solvente necesario y concentración de fenoles de los extractos obtenidos.

En los ensayos a escala piloto-laboratorio, el método de cálculo utilizado se puede aplicar a cualquier escala, aunque se requerirían ensayos experimentales para las nuevas condiciones de extracción (nuevos diagramas de equilibrio). Pero los ensayos necesarios pueden simplificarse basándose en la experimentación del ensayo a escala piloto, por ejemplo en lugar de hacer funcionar todo el equipo completo a escala industrial y luego ponerlo a

punto, se podría realizar un ensayo ocupando una etapa del equipo para aproximarse al funcionamiento total, y determinar las etapas ideales y el solvente necesario.

Por otra parte, cuando se desea realizar una extracción a escala industrial se requiere elegir un equipo comercial que mejor se adapte a la magnitud y las características de la producción. Para tomar una decisión acertada es necesario conocer el comportamiento del producto y las materias primas. Por esta razón al realizar ensayos a escala piloto se pueden predecir estos comportamientos y problemas que pueden llegar a surgir en la práctica, que son más difíciles de manejar cuando la escala es muy grande. Por ejemplo la decisión sobre el tamaño de partícula es muy importante definirlo antes de elegir el equipo, ya que el volumen ocupado y los caudales necesarios cambian considerablemente

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se trabajó con tegumento de maní blanqueado tipo Runner (cosecha 2002), provisto por la empresa Lorenzati y Ruesch, Ticino, Córdoba, Argentina.

Metodologías

Descripción del equipamiento para escala piloto de laboratorio utilizado

➤ *Trituradora de cuchillas*

La trituradora o cortadora de cuchillas rotatorias fue diseñada en el ICTA (FCEFYN-UNC) (**Figura 46**), el recipiente contenedor es de acero inoxidable y posee una tapa que permite el cierre hermético. Volumen aproximado de 12 litros. Capacidad de carga de tegumento es de alrededor de 1Kg, cada carga se trituró durante 5 minutos. Capacidad máxima aproximada 10Kg de tegumento por hora. Motor de inducción monofásico (tipo D560194 MEG, Brasil), 1hp, 50Hz, 1450rpm, 220V, 6.5 A.

Figura 46. Trituradora de cuchillas

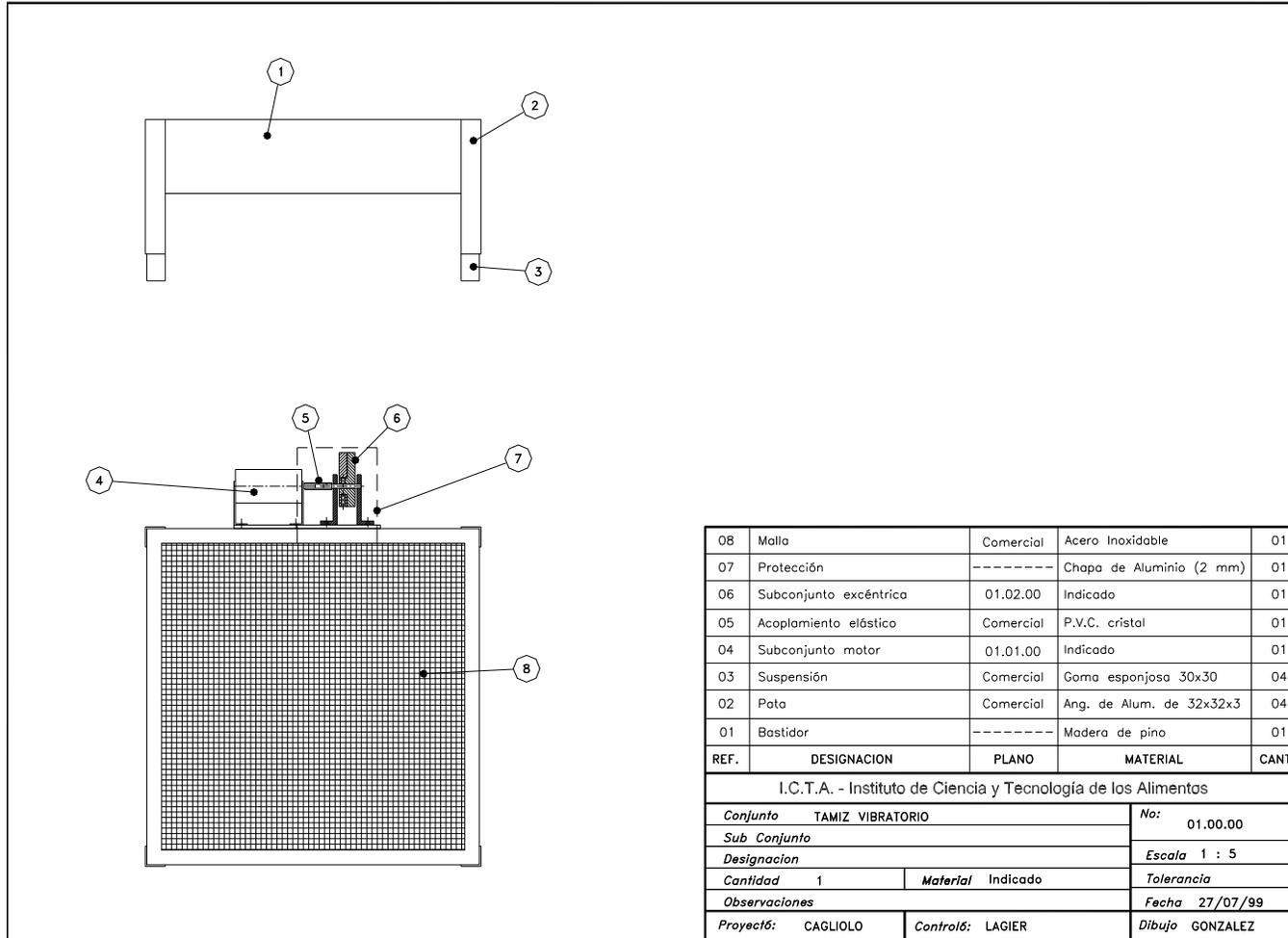


➤ ***Tamiz vibratorio***

El tamiz (diseñado en el ICTA-FCEfyN-UNC) está constituido por una caja rectangular, de dimensiones 44x44x10cm, que constituye las paredes del recipiente donde se coloca el producto. El fondo de dicho recipiente es una malla de tamaño adecuado a la operación que se desee efectuar, en nuestro caso se utilizaron mallas n° 10 y 20. A fin de lograr una buena relación entre rigidez y masa, el material empleado en el bastidor móvil es madera. El dispositivo vibrador, solidario a la caja tamiz, está constituido por un motor. C.C. de velocidad variable acoplado a un rotor provisto de masas excéntricas (Motor 100W, 220V, 50Hz, 7000rpm, Tank, Sewing Machine Motor). El dispositivo cuenta con capacidad de variar tanto la velocidad del motor (frecuencia de la vibración) como la excentricidad de las masas (amplitud de la vibración). Se tiene de este modo la posibilidad de modificar a voluntad y entre amplios límites los parámetros que, según las condiciones de trabajo, determinen el tamizado mas eficiente. El conjunto descripto está apoyado sobre cuatro soportes con sus respectivos tacos elásticos a fin de aislar las vibraciones impidiendo además su transmisión a la mesa de trabajo (altura total 24cm). Los detalles constructivos de los distintos equipos se muestran en el plano de la **Figura 47**. La capacidad de carga de tegumento es aproximadamente de 1Kg, cada carga se tamizaría durante 10 minutos (el tiempo depende del molido y la cantidad de finos que se pretende separar), es decir que la capacidad estaría alrededor de 5-6Kg/h.



Figura 47. Tamiz vibratorio



➤ *Equipo lixiviador*

Se cuenta con un equipo de extracción por solvente con un mecanismo rotativo tipo “Rotocel” de dimensiones para escala piloto de laboratorio esquematizado en las **Figuras 48, 49 y 50**, diseñado en el ICTA (FCEFYN-UNC) por los ingenieros Ricardo Lagier, Jorge Jazni y Carlos Cagliolo.

Dimensiones y funcionamiento:

El equipo cuenta con doce celdas o tubos intercambiables tubulares de 40mm de diámetro, 660 mm de altura máxima aproximada y 830 cm³ de capacidad cada una, con 11 estaciones activas de lavado y una estación para escurrido y extracción del tubo con material lixiviado e introducción del tubo cargado con material a lixiviar.

El lavado se realiza mediante 11 circuitos independientes con sendas bombas de recirculación de solvente con caudal regulable mediante válvulas esféricas y percolación por gravedad. Las etapas de escurrido se pueden incrementar a voluntad por cancelación del respectivo flujo recirculante.

La circulación de la miscela se efectúa a contracorriente mediante introducción de solvente puro y desbordamientos sucesivos de las cubetas colectoras.

Las celdas se disponen sobre un bastidor rotativo accionado manualmente, con una fijación que permiten una fácil remoción de los tubos a través de una tapa superior.

El conjunto rotor se encuentra contenido en un recipiente hermético a fin de evitar escapes de vapor de solvente, siendo todos los componentes eléctricos, tales como los motores de las bombas, a prueba de explosión. Tanto los tubos celdas como la envoltura del rotor son de vidrio transparente a fin de visualizar permanentemente el desarrollo del proceso.

El dispositivo permite reproducir el proceso industrial a escala piloto, contando con la posibilidad de controlar todas las variables intervinientes a fin de realizar ensayos y mediciones que posibilitan la investigación y optimización del mismo. Es importante notar que no obstante las reducidas dimensiones, el aparato simula adecuadamente las condiciones del proceso industrial debido a su configuración, similar a un Rotocel, y a la gran altura del lecho de percolado.

Los componentes en contacto con el sólido, solvente y miscelas son de vidrio “pirex” (celdas o tubos), acero inoxidable (malla de retención del sólido en las celdas y recipiente colector, acero inoxidable AISI 310 Cr-Ni 18-8) y teflón (mangueras y tapones de celdas).

El solvente y miscelas son recirculados mediante bombas de combustible (modelo 637, para Fiat 600-750-850, marca Eli/Fel, Argentina), las cuales son impulsadas por un motor (marca WEG, TE 71, 0.18kW, 50Hz, 910rpm, 0.83A-380V/1.43A-220V, Argentina).

El mecanismo de funcionamiento a contracorriente se esquematiza en la **Figura 51**. El recipiente colector cuenta con 12 puestos, los cuales están comunicados entre sí por rebalse debido a una diferencia de altura de la pared que separa los compartimentos, es decir que el primer puesto rebalsa en el segundo, y así sucesivamente. Esto genera un flujo de extracto desde el puesto de mayor capacidad (entrada del solvente fresco) hasta el de menor capacidad (salida del extracto más concentrado). Por otro lado, el material sólido a extraer se coloca en las celdas (tubos), y mediante un mecanismo de giro manual se puede cambiar de puesto los tubos cada cierto tiempo (tiempo de residencia necesario). Es decir que si el solvente fresco ingresa por el puesto 1 (correspondiente a la válvula 1 y puesto 1 del recipiente colector), el tubo con material sólido fresco ingresa por el puesto 11 (válvula 11 y puesto 11 de la bacha), y gira en sentido contrario al rebalse del recipiente colector, hasta el puesto 1. El puesto 12 no posee válvula, en su lugar existe un orificio sobre la tapa por el cual se realiza el intercambio del tubo con material sólido agotado por otro con material fresco. En este puesto del recipiente colector (el último y de menor capacidad) se produce el escurrido del tubo de salida, y la salida del extracto más concentrado.

Capacidad del equipo:

Caudal máximo de solvente: Se determinó el caudal máximo promedio de las bombas, que fue de 424 ± 107 mL/min, utilizando solvente etanol:agua 70:30.

Capacidad del recipiente colector: se determinó el volumen de cada puesto de este recipiente:

	Puesto	Capacidad (cm ³ \equiv mL)
mayor	1	570
	2	539
	3	523
	4	525
	5	525
	6	535
	7	500
	8	525
	9	445
	10	508
	11	500
menor	12	500
	Total	6194
	Promedio	516

Capacidad de los tubos: la cantidad de material sólido en cada tubo depende del tamaño de partícula del tegumento. Los tubos se llenaron con una altura entre 50-60cm de material sin comprimir ($630-760\text{cm}^3$), de forma que se pueda producir la acumulación de solvente logrando cubrir totalmente el tegumento. Con los lavados el tegumento se va aprisionando por lo que disminuye la altura en el tubo. **Figura 52.**

Temperatura de extracción: el equipo cuenta con una resistencia eléctrica alrededor del recipiente colector, la cual se encuentra aislada, para producir un calentamiento del

extracto. La temperatura es regulada por un sensor de temperatura conectado a un termostato.

En el caso de nuestro material no se realizó calentamiento del solvente de extracción, es decir que se trabajó a temperatura ambiente (20-25°C) debido a que los compuesto extraídos son sensibles a la temperatura.

Figura 48. Esquema general equipo lixivador – Módulo de extracción

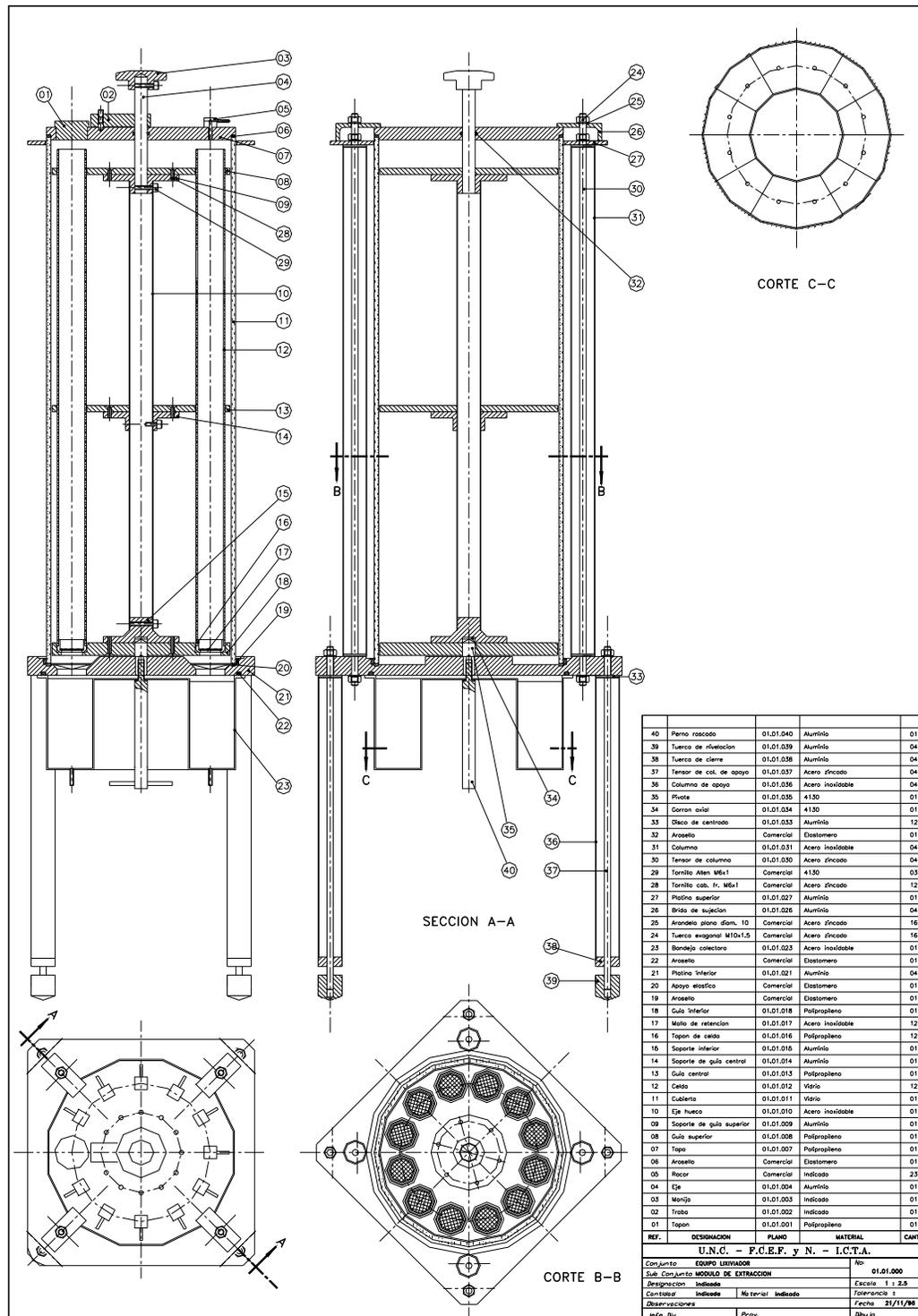


Figura 49. Esquema general equipo lixiviador - Módulo de bombeo

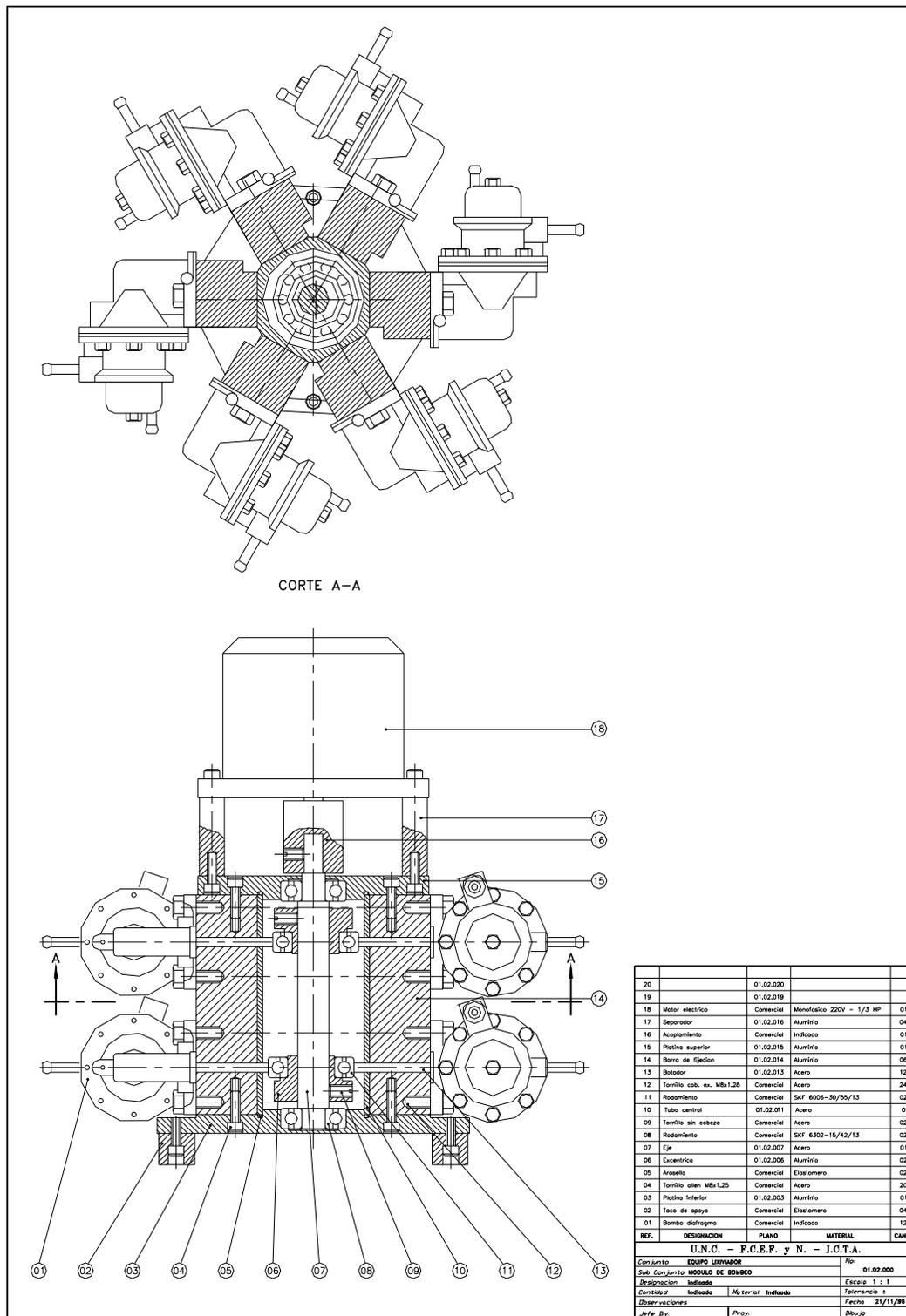


Figura 50. Fotografía del equipo lixiviador Rotocel para escala piloto-laboratorio.



Figura 51. Esquema de funcionamiento del equipo a contra-corriente.

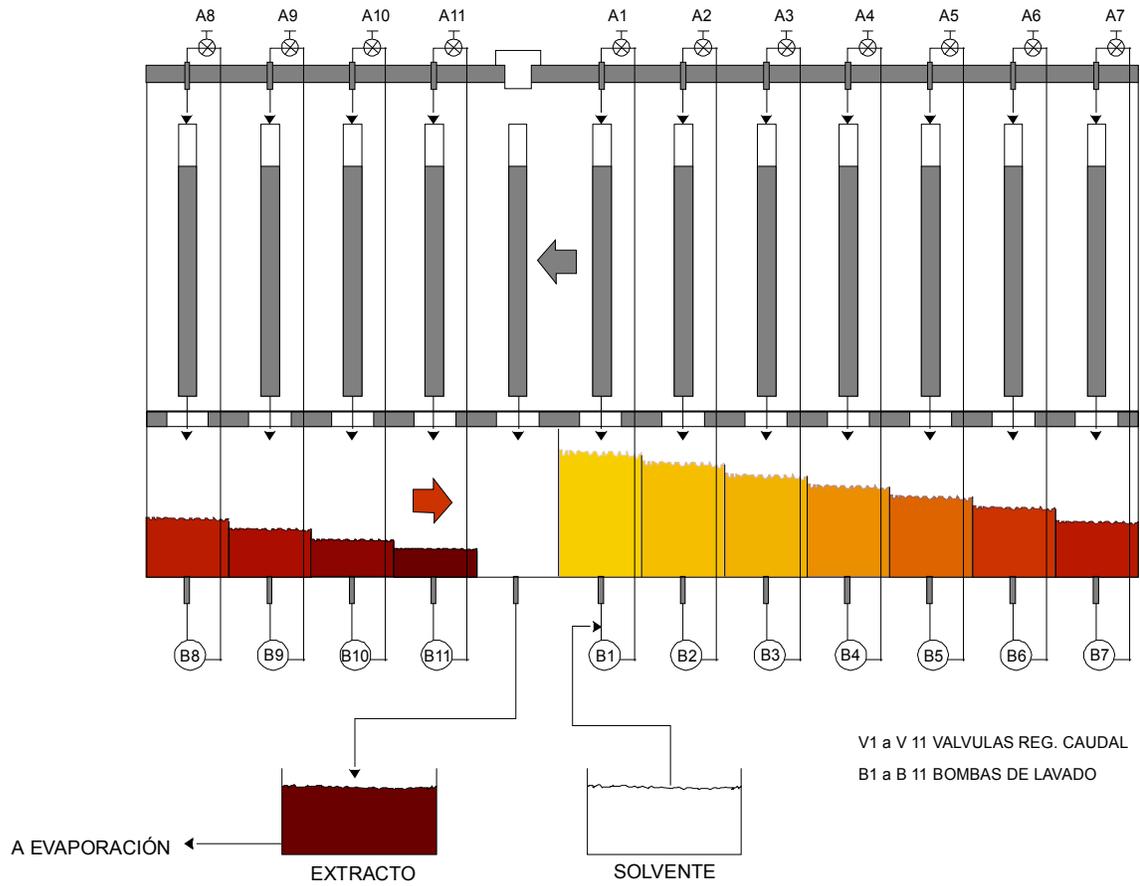
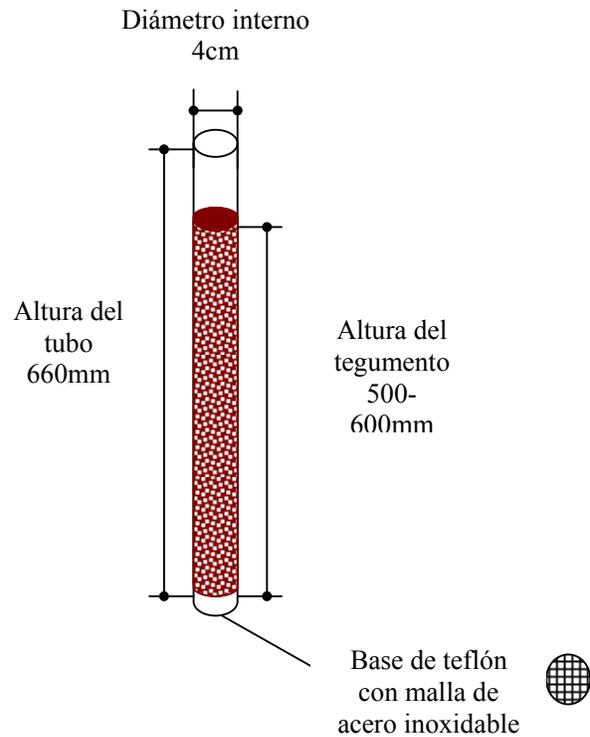


Figura 52. Esquema de un tubo

➤ Pruebas de extracción

Sobre este equipo se realizaron las pruebas para obtener la eficiencia del equipo en la obtención del extracto, utilizando 3 tamaños de partícula: tamaño pequeño (<1mm), mediano (1-2mm) y tegumento sin moler, con solvente etanol:agua 70:30.

El tegumento molido mediante licuadora de cuchillas, fue tamizado en el tamiz vibratorio con la malla correspondiente para obtener los tamaños mediano (pasa por malla 10 y es retenido en malla 20) y pequeño (pasa por malla 20).

Se estableció el porcentaje de extracción de fenoles deseados en un 95%, y se determinaron y compararon entre extracción por corriente cruzada y contra-corriente los siguientes datos:

- *Cantidad de etapas ideales.*
- *Cantidad de solvente necesario.*
- *Concentración de fenoles del extracto obtenido.*

Para llevar a cabo estos cálculos se necesitó previamente conocer:

- *Las propiedades del tegumento:* tamaño de partícula adecuado, contenido de humedad y de fenoles totales (determinados en el capítulo 4).
- *Las propiedades del solvente y extractos fenólicos:* relaciones entre las concentraciones de materia seca, fenoles, densidad y viscosidad (capítulo 4).
- *Condiciones de extracción y caudales* de circulación de solvente y extractos (que dependen del tamaño de partícula, cantidad de tegumento, temperatura).

Por otro lado, los cálculos gráficos y matemáticos se basaron en (Treybal, 1980):

- *Balances de masa:* todo lo que entra es igual a lo que sale, en conjunto y en cada etapa.
- *Diagramas de equilibrio prácticos:* se deben realizar ensayos en condiciones similares a la práctica para determinar:
 - Concentraciones de fenoles en el extracto obtenido (x) y en el tegumento lixiviado (y).
 - Cantidad de solvente retenido por el tegumento (N), para diferentes concentraciones de extracto.

Con estos valores se trazaron curvas de equilibrio “ x vs y ” y “ N vs y ”, y se determinaron gráfica y matemáticamente las etapas ideales, cantidad de solvente y concentración de extracto obtenido, para lograr los porcentajes de extracción definidos (95%).

1. Extracción por corriente cruzada:

Se realizó la extracción por corriente cruzada (Treybal, 1980) en 1 tubo del equipo lixiviador cargado con tegumento fresco, en 10 etapas sucesivas por aplicación de solvente puro (etanol:agua 70:30) con el propósito de determinar:

- Tamaño de partícula más apropiado para la extracción,
- Caudales de solvente y extracto,
- Tiempo necesario de recirculación de solvente para alcanzar la máxima extracción por etapa,
- Número de etapas para lograr una extracción del 95% de los fenoles del tegumento,
- Cantidad de solvente necesario para estas condiciones de extracción, y comparar estos datos con los obtenidos por extracción en laboratorio.

El ensayo se llevó a cabo mediante la siguiente metodología (**Figura 53**):

- a. Se llenó (hasta 55-60cm) un tubo con la cantidad de tegumento fresco necesario, según el tamaño de partícula. Se hizo circular solvente para determinar el tamaño de tegumento adecuado para la extracción.
- b. Una vez decidido el tamaño de tegumento, se llenó un tubo hasta 60cm de altura con 150g de tegumento molido tamaño mediano fresco y se hizo circular solvente limpio hasta que se produce la acumulación del mismo en la parte superior, regulando la apertura de la válvula con precaución de no sobrepasar la altura del tubo.
- c. Se determinó el tiempo requerido hasta que comienza a percolar el extracto por la parte inferior del tubo, el volumen de solvente en el tubo y el volumen de solvente necesario para producir el recirculado.
- d. Desde que comienza la extracción se sacaron muestras (1.5ml) de extracto del puesto de recolección cada 5-10 minutos para determinar la concentración de fenoles con el tiempo de extracción, y el tiempo de recirculado necesario para producir la saturación del solvente. La concentración de fenoles totales de los extractos (mg/mL) se determinó por la técnica Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994).

- e. Se determinó el caudal de solvente de recirculado cada 5-10min., por medición en probeta del volumen recolectado durante 30 segundos.
- f. Luego de 60 minutos de recirculado del extracto se detuvo la entrada y se dejó percolar el mismo durante 15 minutos. Se determinó el solvente retenido en el tegumento (por evaporación del solvente del tegumento o por diferencia entre el solvente aplicado y el recuperado).
- g. Sobre este tegumento extraído se repitió la extracción con solvente limpio de la misma forma descrita, en 10 etapas más, de acuerdo al esquema de la **Figura 54** (corriente cruzada).

Figura 53. Esquema de la prueba de extracción con un tubo.

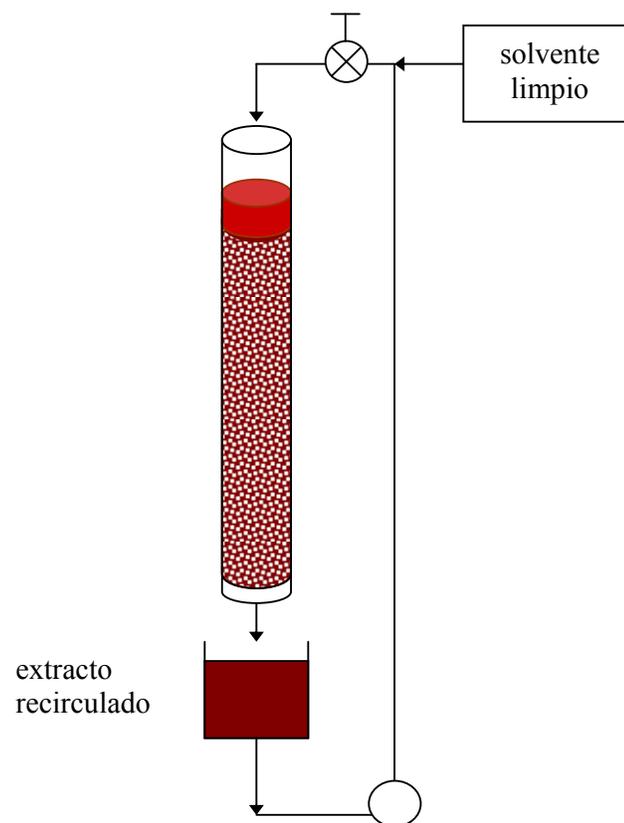
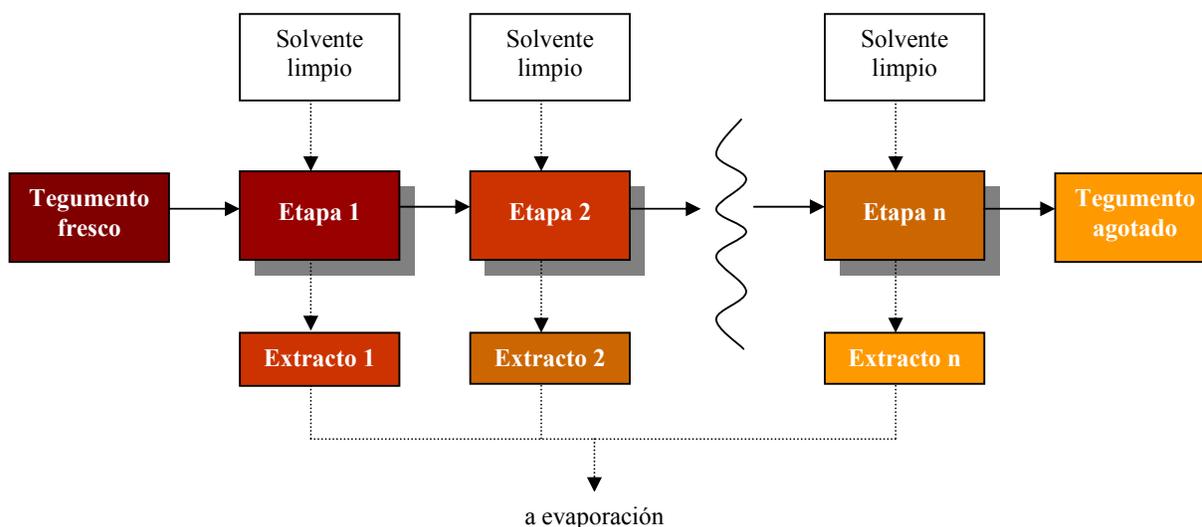


Figura 54. Esquema extracción de un tubo con tegumento por corriente cruzada.



2. Prueba de extracción con un tubo en dos “batches”:

Se realizaron dos “batches” de 7 extracciones sucesivas utilizando un tubo (**Figura 55**), según Nieh and Snyder (1991), con los siguientes propósitos:

- Comparar los porcentajes de extracción con solvente fresco y con extracto de diferentes concentraciones,
- Obtener las concentraciones de fenoles del extracto y del tegumento para trazar las curvas de equilibrio,
- Comparar estos datos con los obtenidos en la extracción por corriente cruzada.

En este ensayo se utilizó la siguiente metodología:

“batch” 1:

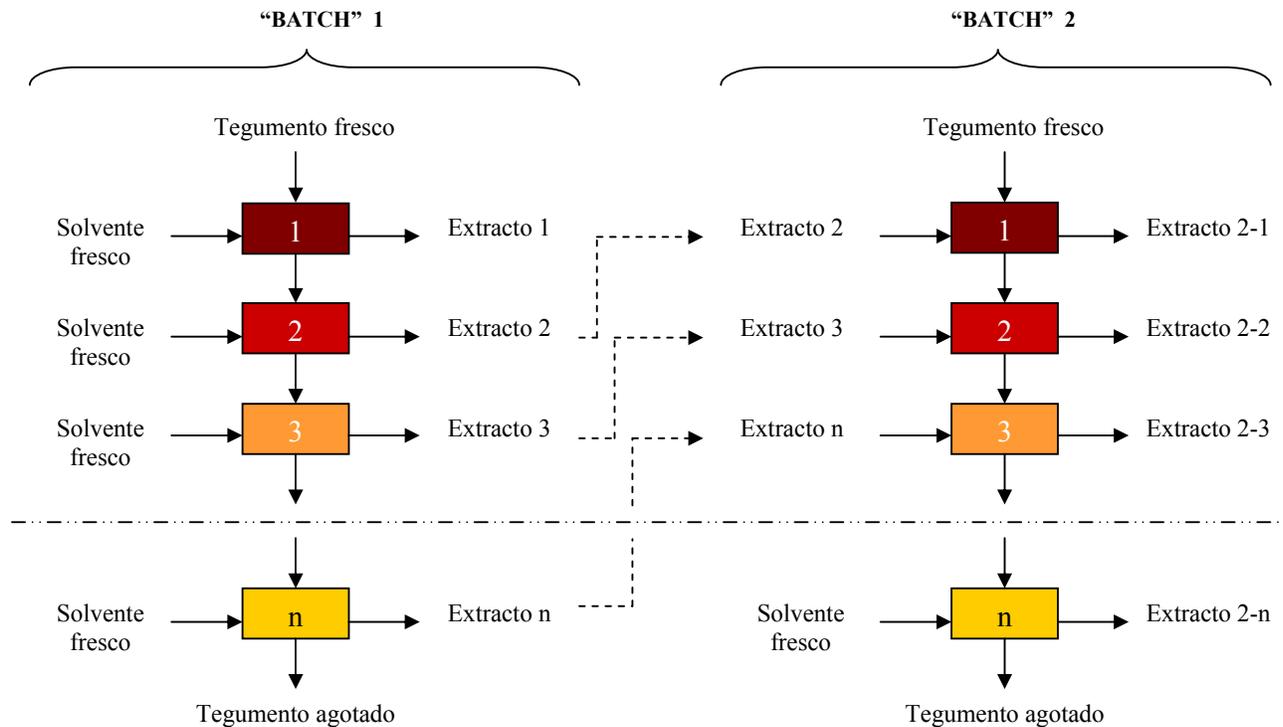
- a. Se colocaron 100g de tegumento fresco molido tamaño mediano, hasta 53-55cm de altura en el tubo.

- b. Se comenzó a hacer circular el solvente limpio, hasta que comenzó a escurrir por abajo. Se dejó escurrir aproximadamente 100ml de extracto y se comenzó a recircular el mismo extracto de salida durante 30 minutos.
- c. Se determinó el tiempo necesario para que comience a percolar el extracto por abajo (t_p), a partir de que comenzó a caer solvente sobre el tegumento ($t_0=0$).
- d. Se midieron los caudales de salida a los 15 y 30 minutos.
- e. Se determinó la cantidad de solvente agregado al comienzo, y el solvente recuperado luego de detener el recirculado y después de 15 minutos de percolado (el tiempo comenzó a contarse desde que el nivel del líquido en el tubo es de 55-50cm).
- f. Se determinó el volumen de solvente total para permitir el recirculado.
- g. Se repitieron los ensayos en 7 etapas de extracción del mismo tegumento, con solvente limpio en cada etapa, para obtener los extractos que luego se utilizaron en el “BATCH” 2.
- h. Se sacaron muestras al final de cada etapa de extracción y se determinó la concentración de fenoles totales de los extractos (mg/mL) por Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994).

“batch” 2:

- a. Se colocaron 98g de tegumento fresco molido tamaño mediano, de esta forma se mantuvo la relación solvente/tegumento igual en los dos “batches”.
- b. Se realizaron 7 etapas de extracción, de la misma forma que para el “BATCH” 1, del tegumento nuevo con los extractos de 2 a 7 del “BATCH” 1, y la última etapa del “BATCH” 2 se realizó con solvente puro.
- c. Se sacaron muestras al final de cada etapa de extracción y se determinó la concentración de fenoles totales de los extractos (mg/mL) por Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994).

Figura 55. Esquema de la extracción por simulación de contra-corriente



3. Prueba a contracorriente con todos los tubos:

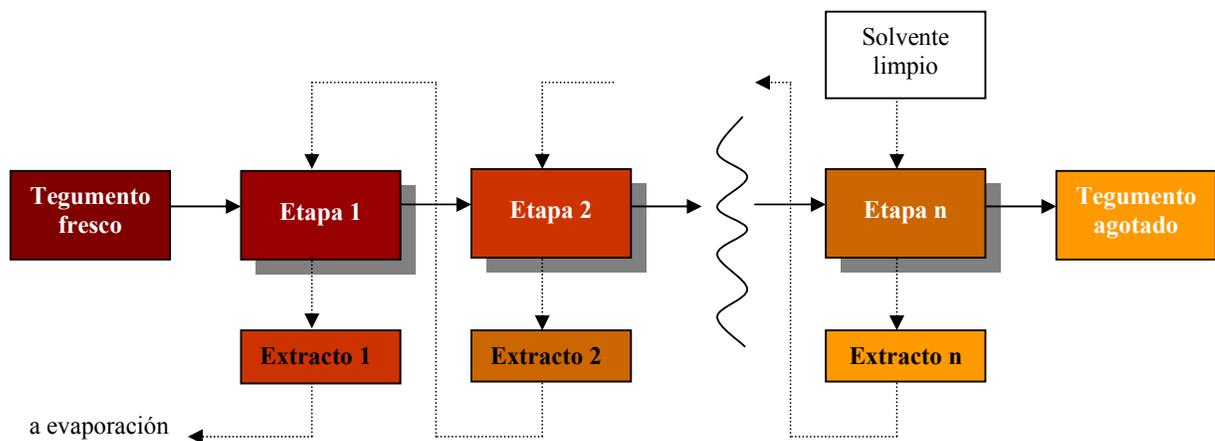
Para determinar la curva de equilibrio en estas condiciones se realizó la extracción del tegumento utilizando todos los puestos del equipo lixiviador según como se esquematiza en la **Figura 56**, con el propósito de determinar las curvas de equilibrio y el rendimiento en cada etapa del equipo en comparación con los datos obtenidos por corriente cruzada, en dos "batches" y los valores obtenidos en laboratorio.

El ensayo se realizó de acuerdo a la siguiente metodología:

- a. Se cargó el recipiente colector del equipo con el solvente limpio (aprox. 7200ml)

- b. Se colocaron 100g de tegumento fresco molido tamaño mediano en los tubos (sin aprisionar, 53-55cm de altura en el tubo).
- c. Se comenzó agregando cada tubo y haciendo circular el solvente de a uno por vez, hasta que se lleno totalmente el equipo con todos los tubos
- d. Se dejaron durante 15 min cada tubo en cada puesto, mientras el solvente circula a contracorriente. Luego, se dejo percolar cada tubo durante 15 min.
- e. Se sacaron muestras de extracto cada 30 minutos a la salida del equipo (al final de los 15 min de percolado), y a la salida de cada tubo, para determinar la concentración de fenoles totales (mg/mL) de cada etapa (Folin-Ciocalteu según Waterman and Mole 1994).
- f. El caudal de entrada de solvente limpio lo fijo el tubo con tegumento agotado (aproximadamente igual al ensayo de contra-corriente simulada).

Figura 56. Esquema de extracción por contra-corriente.



➤ **Cálculos utilizando las curvas de equilibrio**

Con los datos promediados de los ensayos en “batch” y en contracorriente real se realizaron los diagramas de equilibrio y esquema McCabe-Thiele para el cálculos del número de etapas ideales, cantidad de solvente necesario y concentración del extracto obtenido para alcanzar un rendimiento en la extracción de fenoles del 95% (Treybal, 1980).

➤ **Diagrama de flujo para la extracción a escala piloto-laboratorio**

De acuerdo a los resultados obtenidos en este capítulo para la extracción en contracorriente, se propuso un diagrama de flujo del proceso total para escala piloto, en el cual se determinaron los balances de masa de cada etapa del proceso, respetándose que la masa de todo lo que ingresa es igual a lo que sale (Treybal, 1980).

Análisis estadístico de datos

Las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron analizadas estadísticamente con el programa Infostat (versión 1.1, 2002, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC), mediante Anova y test Duncan ($\alpha = 0.05$) y regresiones lineales y logarítmicas.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Extracción por corriente cruzada de un tubo

Elección del tamaño de partícula:

De acuerdo a los ensayos realizados se descartó la utilización de tegumento molido de tamaño pequeño (menor a 1mm) debido a que impide la circulación del solvente. Por este motivo se realizaron los ensayos con tegumento molido tamaño mediano (entre 1-2mm) y sin moler.

En la **Tabla 21** se compara la extracción de los tegumentos sin moler y molido tamaño mediano. De acuerdo a los resultados, sería más eficiente el tegumento molido mediano, ya que se puede utilizar más del doble de tegumento por cada tubo. Por otro lado el nivel de aplastado durante la extracción es menor por lo que el caudal se mantiene relativamente constante, y levemente superior al del tegumento sin moler. El solvente retenido en el tegumento no mostró diferencias significativas entre el tegumento molido y sin moler.

Tabla 21. Comparación en la extracción con un tubo entre tegumento sin moler y molido tamaño mediano

	Tegumento sin moler	Tegumento molido mediano
• Gramos de tegumento que ocupan 60cm de altura en el tubo	60	150
• Altura (cm) en el tubo después de 15 minutos de extracción	50	55
• Caudal de salida (mL/min) después de 15 minutos de recirculado	63.5 ± 0.4	68.2 ± 0.1
• g solvente retenido/ g tegumento seco	3.76 ± 0.91	2.65 ± 0.02

Extracción por corriente cruzada:

En la **Tabla 22** se detallan las características relacionadas a la extracción utilizando un tubo, por corriente cruzada.

En las **Tablas 23 y 24** se detallan los valores obtenidos del extracto recuperado y los sólidos lixiviados para cada etapa.

En las **Figura 57 y 58** se graficaron la concentración de fenoles totales y los porcentajes de extracción por etapa, respectivamente. En las **Figuras 59 y 60** se observan los diagramas de equilibrio “x vs y” y “N vs y”, respectivamente, los cuales son necesarias para los cálculos del número de etapas ideales de extracción, cantidad de solvente y concentración final del extracto obtenido.

De la **Figura 58**, se observa que para extraer el 95% de los fenoles del tegumento original se requirieron 9 etapas, y se utilizaron 3932g de solvente puro, con lo cual la relación g solvente/g materia inerte necesario fue de 41.06. Los valores obtenidos en la extracción en laboratorio (2.25g tegumento fresco = 1.6g materia inerte, con 50ml o 44.4g de solvente por etapa) fueron requiriendo 3 etapas para lograr una extracción del 95% de los fenoles, es decir 113.1g de solvente puro, lo que resultó en 83,41g solvente por g de materia inerte. Si comparamos esta relación solvente/materia inerte entre ambos procesos, se puede observar que en la escala piloto (en donde se aumento un factor de 60 veces el tegumento de la escala laboratorio) la cantidad de solvente se redujo casi al 50% comparada con el proceso en laboratorio. Estos resultados podrían ser de importancia en el momento de aumentar la escala de extracción a industrial.

En la **Figura 61** se graficó el incremento de la concentración del extracto recirculado con el tiempo por etapa. En esta Figura se puede observar que en general a partir de 10-15 minutos de recirculado del mismo extracto se logra una concentración de extracto constante (equilibrio por etapa). Aunque para la primera etapa aparentemente el tiempo requerido para

lograr la estabilización sería superior al de las demás etapas, por practicidad se tomará el mismo tiempo de recirculado para todas las etapas en 15 minutos.

En la **Figura 62** se graficaron los caudales de recirculado del extracto determinado cada 15 minutos durante la extracción. Se puede observar una tendencia creciente del caudal a medida que aumentan las etapas de extracción (caudal = $-0.164987[\text{etapa}]^2 + 3.261097[\text{etapa}] + 36.077644$, $R^2 = 0.887533$), sin diferencias significativas con respecto al tiempo dentro de cada etapa.

Tabla 22. Características de la extracción por corriente cruzada***Condiciones iniciales de la extracción:***

T: Peso tegumento molido mediano	150.00g
Ts: Peso tegumento seco	134.29g
C ₁ : Peso fenoles totales del tegumento	17.83g
NF: Peso de compuestos no fenólicos extraíbles por el solvente	20.70g
B: Peso materia inerte (Ts – C ₁ – NF)	95.76g
Altura inicial del tegumento en el tubo	60cm
Altura al final de las 10 etapas de extracción	56cm
A ₁ : Cantidad solvente etapa inicial	830mL \equiv 737g
Relación [solvente/tegumento seco = A ₁ / Ts] de la etapa 1	6.18mL/g \equiv 5.49g/g
Relación [solvente/materia inerte = A ₁ / B] de la etapa 1	8.66mL/g \equiv 7.69g/g
A ₂₋₁₀ : Cantidad solvente de cada etapa posterior (2 a 10)	450mL \equiv 399g
Relación [A ₂₋₁₀ / B]	4.70mL/g \equiv 4.17g/g
A _T : Cantidad total solvente (10 etapas)	4880mL \equiv 4331g
Relación [A _T / Ts]	36.34mL/g \equiv 32.25g/g
Relación [A _T / B]	50.94mL/g \equiv 45.21g/g
Tiempo total de recirculado del extracto por etapa	60 min
Tiempo de percolado de cada etapa	15 min

Condiciones al final de la extracción:

tp: tiempo requerido para que comience a percolar extracto	5.4 \pm 0.9 min
Caudal del extracto promedio total	44.0 \pm 2.7 mL/min
Cantidad total extracto recuperado (10 etapas)	4289mL \equiv 3829g
Concentración fenoles extracto total recuperado (10 etapas)	3.98mg/mL \equiv 0.0045g/g
Concentración de comp. no fenólicos del extracto total	4.61mg/mL \equiv 0.0052g/g
Pérdida aproximada de extracto	etapa 1: 30mL etapas 2 a 10: 5ml

Tabla 23. Datos de la extracción con un tubo por corriente cruzada en 10 etapas.

SALIDA EXTRACTO RECUPERADO

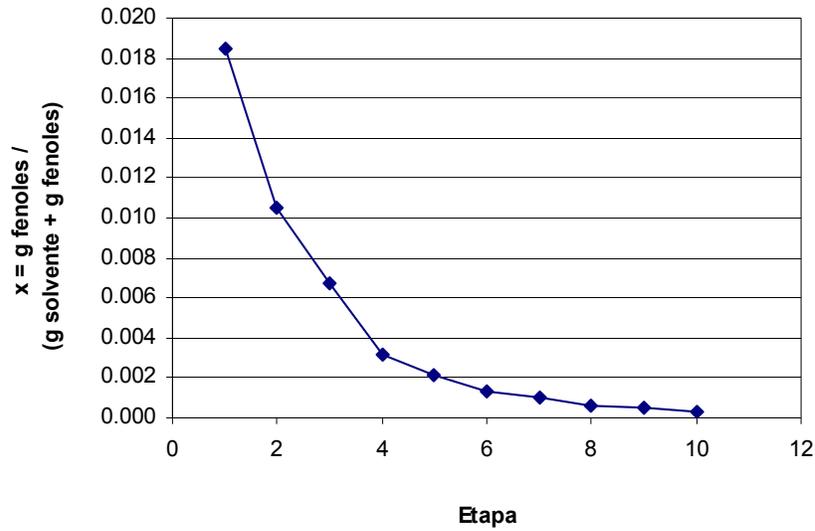
Parámetro	Etapa										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
g extracto recuperado (fenoles + comp. no fenol. + solvente)	384	396	373	392	384	385	386	374	376	379	3829
C = g fenoles extraídos	6.94	4.11	2.48	1.25	0.84	0.52	0.38	0.25	0.19	0.12	17.06
g comp. no fenoles	8.05	4.77	2.88	1.45	0.97	0.61	0.44	0.29	0.22	0.13	19.80
A = g solvente recuperado	369	387	367	389	382	384	385	373	376	379	3792
B= g materia inerte en el extracto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$x = C/(A+C)$	0.0184	0.0105	0.0067	0.0032	0.0022	0.0014	0.0010	0.0007	0.0005	0.0003	0.0045
$x (10^{-3})$	18.441	10.497	6.702	3.209	2.183	1.363	0.974	0.663	0.501	0.306	4.480
$N = B/(A+C)$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 24. Datos de la extracción con un tubo por corriente cruzada en 10 etapas.

SALIDA SOLIDOS LIXIVIADOS

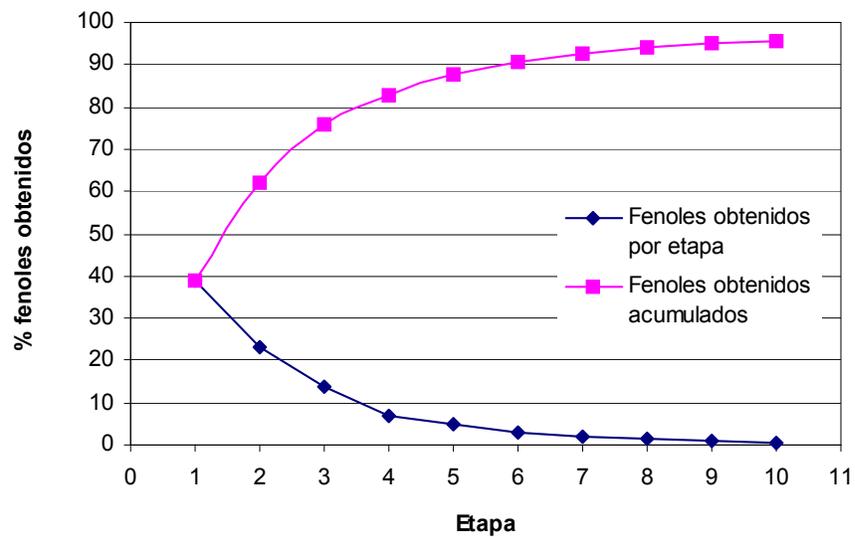
Parámetro	Etapa										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A = g solvente retenido	341	349	377	383	396	407	416	438	457	473	473
C = g fenoles retenidos en el tegumento	10.41	6.25	3.75	2.48	1.63	1.10	0.72	0.47	0.28	0.16	0.16
B= g materia inerte en el tegumento lixiviado	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8
$y = C/(A+C)$	0.0296	0.0176	0.0098	0.0064	0.0041	0.0027	0.0017	0.0011	0.0006	0.0003	0.0003
$y (.10^{-3})$	29.584	17.600	9.845	6.437	4.111	2.706	1.734	1.078	0.617	0.348	0.348
$N = B/(A+C)$	0.2721	0.2695	0.2517	0.2487	0.2410	0.2349	0.2296	0.2184	0.2093	0.2022	0.2022

Figura 57. Concentración de fenoles del extracto por etapa.



Nota: $X = C/(A+C) = \text{g fenoles del extracto} / (\text{g solvente recuperado} + \text{g fenoles del extracto})$

Figura 58. Porcentaje de fenoles extraídos por etapa.



Nota: $\% \text{ fenoles extraídos} = (\text{g fenoles extraídos por etapa}) \times 100 / (\text{g fenoles totales del tegumento inicial})$

Figura 59. Gráfico de equilibrio y vs x

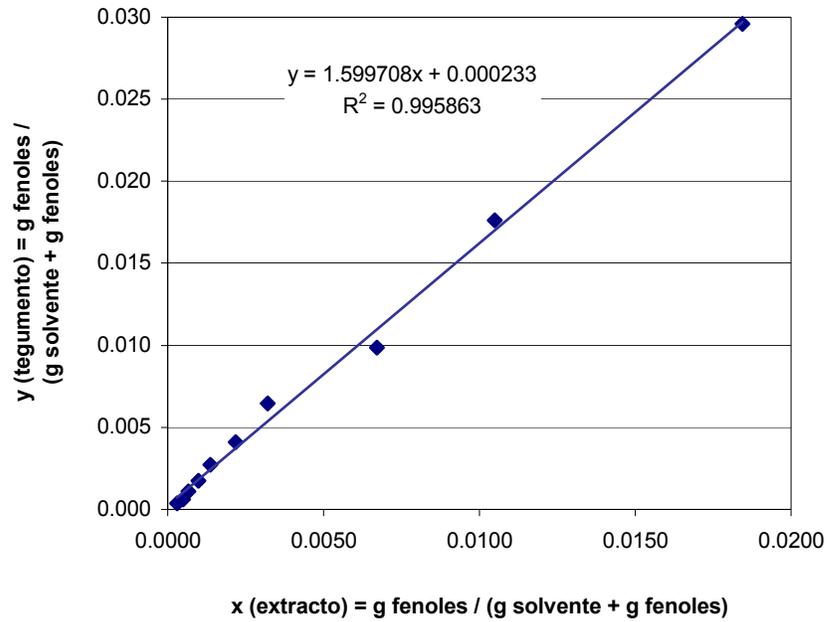


Figura 60. Equilibrio N vs x,y

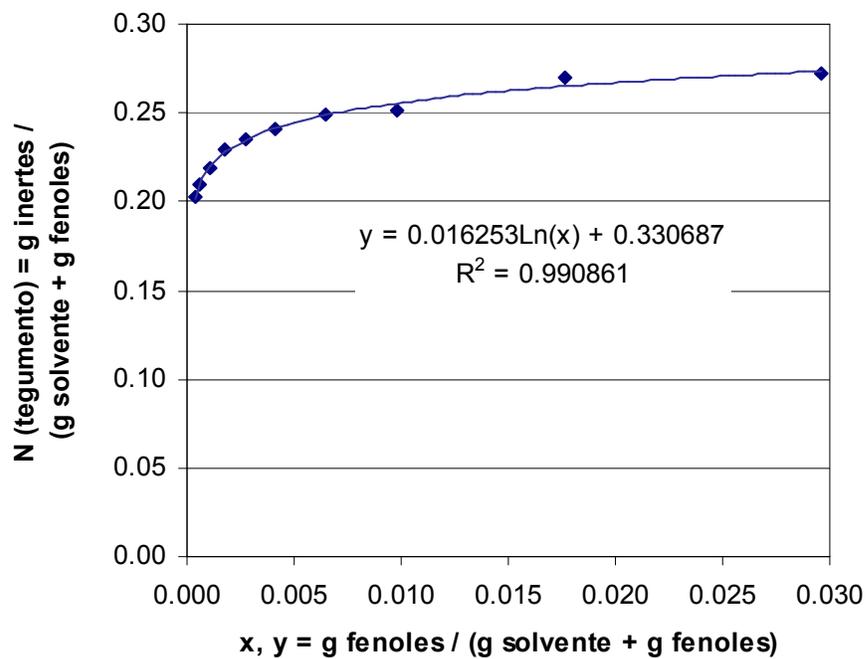


Figura 61. Concentración de fenoles en función del tiempo de extracción.

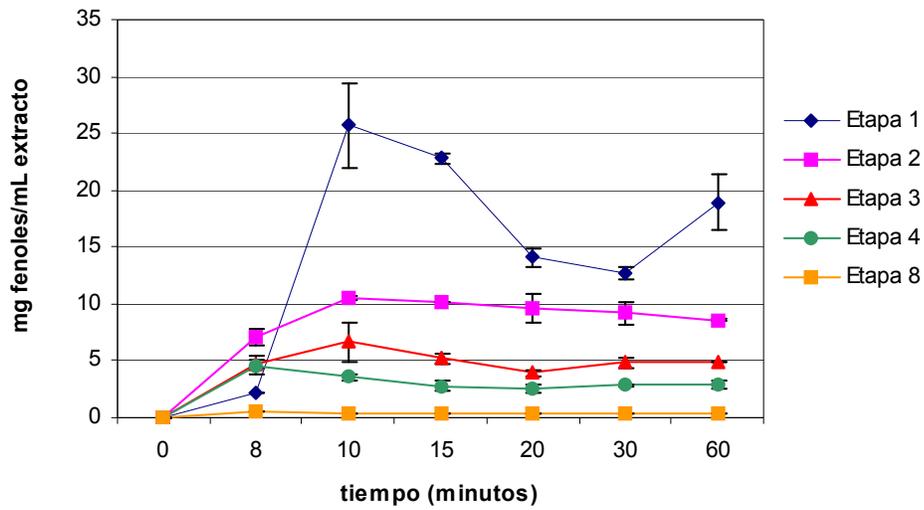
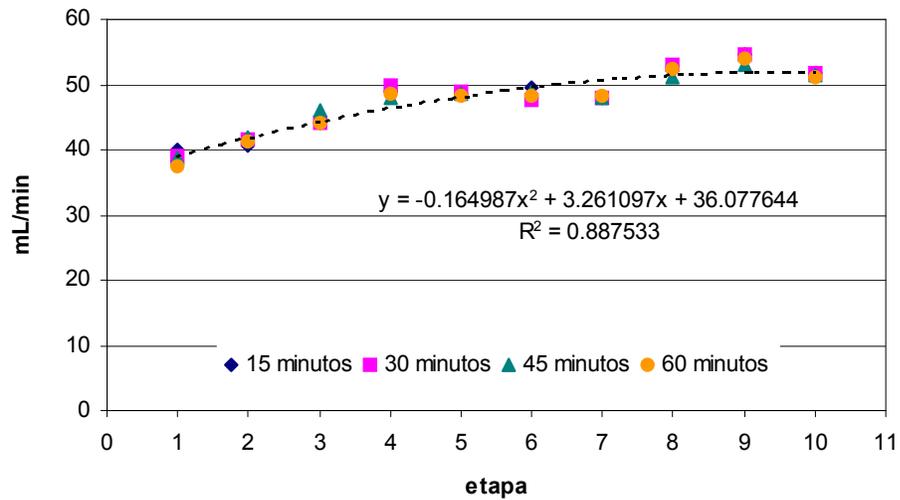


Figura 62. Caudales de recirculado del extracto, cada 15 minutos de extracción.



2. Prueba de extracción en dos “batches”:

En la **Tabla 25** se detallan las condiciones iniciales y finales de la extracción para cada “batch”.

En las **Tablas 26 y 27** se detallan los valores obtenidos del extracto recuperado y los sólidos lixiviados para cada etapa en ambos “batches”.

En la **Figura 63** se graficó la concentración de fenoles totales de los extractos obtenidos en cada etapa. Se observó la disminución de la concentración del extracto en etapas sucesivas, observándose que para el “batch” 2 las concentraciones fueron superiores pero tienden a decrecer las diferencias con respecto al “batch” 1 con las etapas. Esto se debería a la disminución de la diferencia de concentración entre los extractos del “batch” 2 con respecto a los extractos de cada etapa correspondiente del “batch” 1.

En la **Figura 64** se observan los porcentajes de extracción de los fenoles con respecto al tegumento inicial por “batch” y por etapa. Para la primera etapa, en donde se utiliza el tegumento sin solvente, para el “batch” 2 la extracción es significativamente menor al “batch” 1, mientras que en las etapas siguientes no existieron diferencias significativas en los porcentajes de extracción entre ambos “batches”.

En el capítulo 4 (**Figura 45**) se observó que los porcentajes de extracción disminuyen con la concentración del extracto aplicado. Este hecho se observó también para el “batch” 2 en comparación con el “batch” 1, mientras mayor fue la concentración del extracto menor fue el porcentaje de extracción, sobre todo para la etapa 1 en donde la concentración del extracto aplicado fue relativamente elevada (4.66mg fenoles/mL extracto aplicado). En las etapas siguientes las concentraciones fueron inferiores y casi no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de extracción de los “batches” 1 y 2.

Por otro lado, probablemente el tiempo también tenga influencia, es decir que para alcanzar el equilibrio y lograr la máxima extracción el tiempo necesario para la primera etapa (extracto

más concentrado) sería superior al de un extracto con menor concentración de fenoles (etapas posteriores). Esto último se puede observar en la **Figura 61** de la extracción por corriente cruzada de un tubo, en donde para la primera etapa (con tegumento fresco sin solvente, y en la cual circula el extracto de mayor concentración) el tiempo en alcanzar la concentración del equilibrio fue superior para la primera etapa, ya que se requirió un tiempo extra hasta que el tubo se llenó de solvente y se estabilizó el recirculado. Este último efecto podría tener mayor importancia que la concentración del extracto aplicado.

En las **Figura 65 y 66** se graficaron los diagramas de equilibrio x vs y , N vs y , necesarios para los cálculos del número de etapas ideales de extracción, cantidad de solvente y concentración final del extracto obtenido. De estos gráficos se observaron tendencias similares al ensayo de un solo tubo, y muy poca variación entre “batch”, prácticamente sin diferencias significativas. Con estos diagramas se podrían realizar los cálculos para determinar el número de etapas ideales en contracorriente y la cantidad de solvente necesaria para lograr la extracción deseada.

En la **Figura 67** se detallan los valores de caudales de extracto para cada “batch” determinado cada 15 minutos. Se pudo observar que con el tiempo y de una etapa a otra existió una leve tendencia creciente del caudal del extracto.

Tabla 25. Características de la extracción en dos “batches”

<i>Condiciones iniciales de la extracción</i>	“BATCH” 1	“BATCH” 2
T: Peso tegumento molido mediano	100.00g	98.00g
Ts: Peso tegumento seco	89.18g	87.40g
C ₁ : Peso fenoles totales del tegumento	10.38g	10.17g
NF: Peso de compuestos no fenólicos extraíbles por el solvente	12.00g	11.76g
B: Peso materia inerte (Ts – C ₁ – NF)	66.80g	65.47g
Altura inicial del tegumento en el tubo	55cm	53cm
Altura al final de las 7 etapas de extracción	45cm	43cm
A ₁ : Cantidad solvente etapa inicial	800mL \equiv 710g	784mL \equiv 696g
Relación [solvente/tegumento seco = A ₁ / Ts] de etapa 1	9.0mL/g \equiv 8.0g/g	
Relación [solvente/materia inerte = A ₁ / B] de la etapa 1	12.0mL/g \equiv 10.6g/g	
A ₂₋₇ : Cantidad solvente de cada etapa posterior (2 a 7)	510mL \equiv 453g	500mL \equiv 444g
Relación [A ₂₋₇ / B]	7.6mL/g \equiv 6.8g/g	
A _T : Cantidad total solvente (7 etapas)	3860mL \equiv 3426g	3784mL \equiv 3358g
Relación [A _T / Ts]	43.3mL/g \equiv 38.4g/g	
Relación [A _T / B]	57.8mL/g \equiv 51.3g/g	
Tiempo total de recirculado del extracto por etapa	30 min	
Tiempo de percolado de cada etapa	15 min	
<hr/>		
<i>Condiciones al final de la extracción</i>		
tp: tiempo requerido para que comience a percolar extracto	1.88 \pm 0.13 min	
Caudal del extracto promedio total	87.00 \pm 3.95 mL/min	96.57 \pm 4.05 mL/min
Cantidad total extracto recuperado (7 etapas)	3520mL \equiv 3140g	3435mL \equiv 3067g

Tabla 26. Datos de la extracción con un tubo simulando contra-corriente.

SALIDA EXTRACTO RECUPERADO

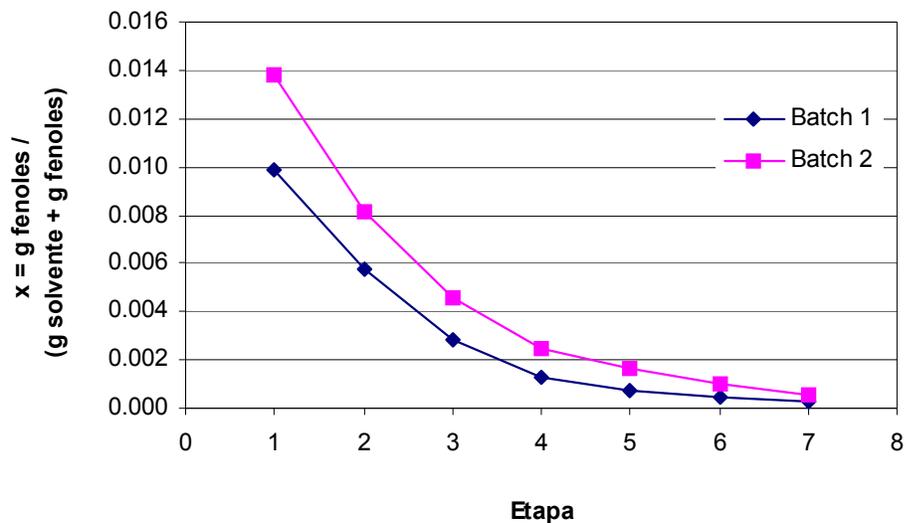
Parámetro	“batch”	Etapa							Total
		1	2	3	4	5	6	7	
g extracto recuperado (fenoles + comp. no fenol. + solvente)	1	457	452	450	445	445	445	445	3140
	2	445	443	433	437	441	436	432	3067
C = g fenoles extraídos	1	4.448	2.601	1.267	0.579	0.313	0.195	0.134	9.538
	2	6.061	3.581	1.984	1.085	0.723	0.458	0.227	14.119
g comp. no fenoles	1	5.162	3.019	1.470	0.672	0.364	0.227	0.155	11.069
	2	7.034	4.156	2.303	1.259	0.840	0.531	0.263	16.386
A = g solvente recuperado	1	448	446	448	444	444	445	445	3119
	2	432	436	429	435	440	435	431	3037
B= g materia inerte en el extracto	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
$X (.10^{-3})= C/(A+C)$	1	9.837	5.799	2.821	1.303	0.705	0.439	0.301	3.048
	2	13.850	8.153	4.604	2.490	1.643	1.050	0.526	4.628
N= B/(A+C)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 27. Datos de la extracción con un tubo en dos “batches”.

SALIDA SOLIDOS LIXIVIADOS

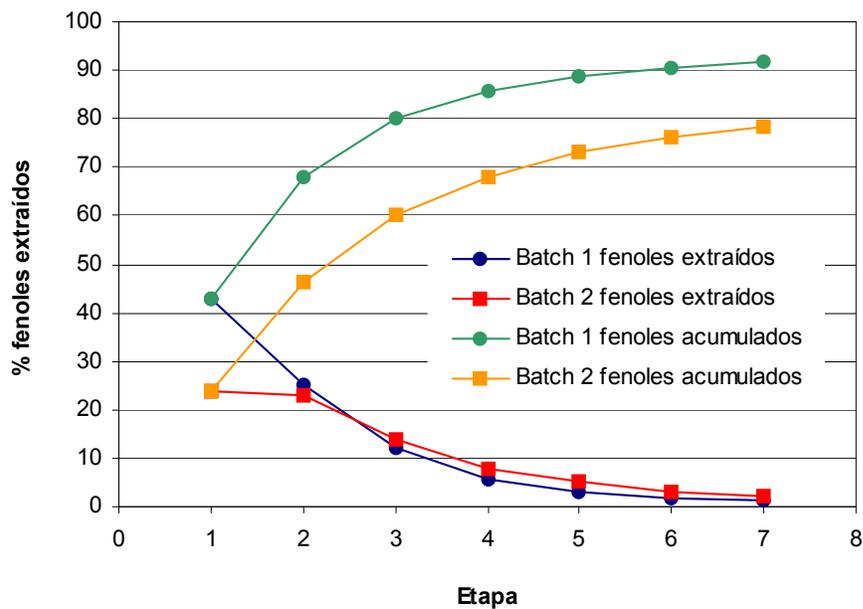
Parámetro	“batch”	Etapa							Total
		1	2	3	4	5	6	7	
A = g solvente retenido	1	236	238	239	243	246	250	253	253
	2	235	238	249	254	255	260	268	268
C = g fenoles retenidos en el tegumento	1	5.672	3.045	1.765	1.180	0.864	0.666	0.531	0.531
	2	7.400	5.037	3.611	2.829	2.293	1.965	1.736	1.736
B= g materia inerte en el tegumento lixiviado	1	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75
	2	65.42	65.42	65.42	65.42	65.42	65.42	65.42	65.42
$Y (.10^{-3}) = C/(A+C)$	1	23.477	12.625	7.346	4.842	3.494	2.660	2.092	2.092
	2	30.505	20.689	14.292	10.996	8.912	7.505	6.436	6.436
$N = B/(A+C)$	1	0.276	0.277	0.278	0.274	0.270	0.266	0.263	0.263
	2	0.270	0.269	0.259	0.254	0.254	0.250	0.243	0.243
$y/N = C/B$	1	0.0850	0.0456	0.0264	0.0177	0.0129	0.0100	0.0080	0.0080
	2	0.1131	0.0770	0.0552	0.0432	0.0351	0.0300	0.0265	0.0265

Figura 63. Concentración de fenoles del extracto por etapa.



Nota: $X = C / (A + C) = \text{g fenoles del extracto recuperado} / (\text{g solvente recuperado} + \text{g fenoles del extracto})$

Figura 64. Porcentaje de fenoles extraídos por etapa.



Nota: $\% \text{ fenoles extraídos} = (\text{g fenoles extraídos por etapa}) \times 100 / (\text{g fenoles totales del tegumento inicial})$

% fenoles acumulados = % fenoles extraídos en esa etapa + % fenoles extraídos en las etapas anteriores

Figura 65. Curva de equilibrio y vs x.

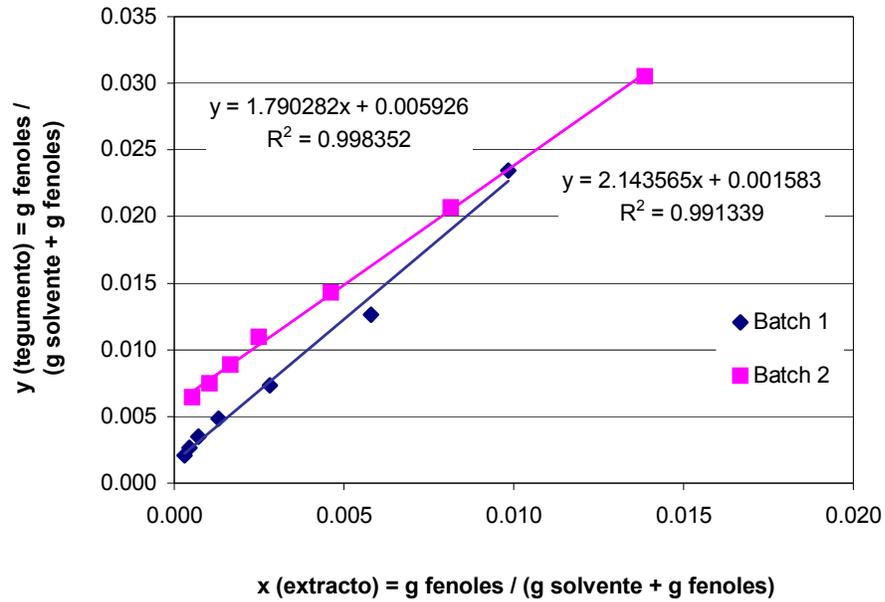


Figura 66. Curva de equilibrio N vs x,y.

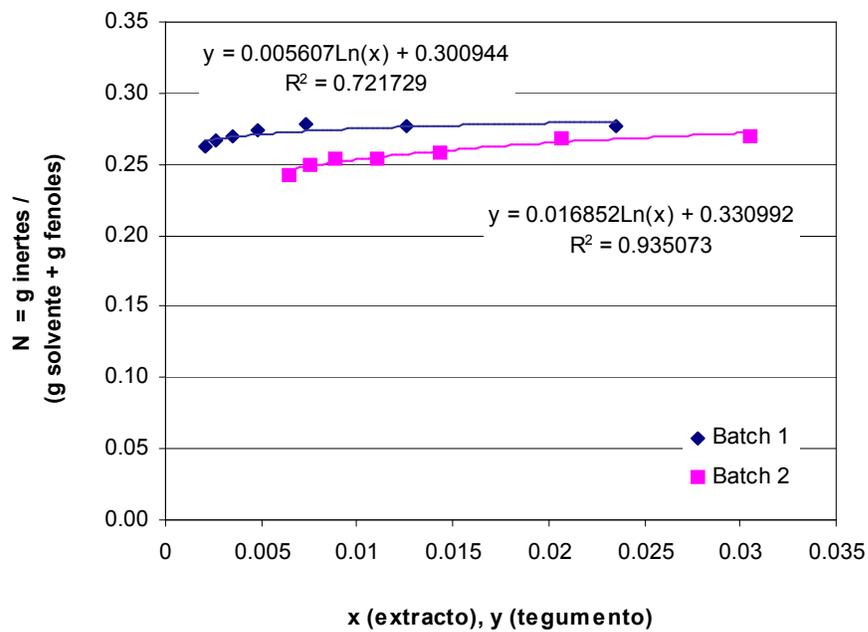
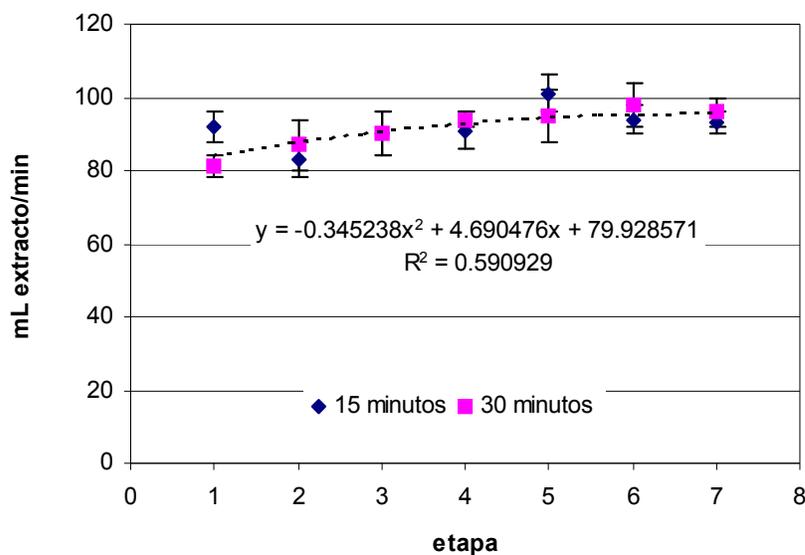


Figura 67. Caudales de recirculado del extracto, cada 15 minutos de extracción.



3. Prueba a contracorriente

En la **Tabla 28** se detallan las condiciones iniciales y finales de la extracción a contracorriente.

En las **Tablas 29 y 30** se detallan los datos obtenidos del extracto recuperado a la salida de cada puesto y el tegumento de cada tubo, respectivamente, luego de la extracción de 12 tubos con tegumento fresco.

En las **Figura 68 y 69** se grafican los equilibrios “x vs y” y “N vs y”, respectivamente, y las regresiones de las curvas de equilibrio. Se puede observar que nuevamente las regresiones no mostraron diferencias significativas si se comparan con las extracciones a corriente cruzada y en 2 “batches”.

Tabla 28. Características de la extracción a contracorriente

<i>Condiciones iniciales de la extracción</i>	POR ETAPA	TOTAL
T: Peso tegumento molido mediano de cada tubo	100.00g	1200.00g
Ts: Peso tegumento seco	89.18g	1070.16g
C ₁ : Peso fenoles totales del tegumento	10.38g	124.57g
NF: Peso de compuestos no fenólicos extraíbles por el solvente	12.05g	144.57g
B: Peso materia inerte (Ts – C ₁ – NF)	66.75g	801.02g
Altura inicial del tegumento en el tubo	≅ 55cm	
Altura al final de la extracción	≅ 45cm	
A: Cantidad solvente total aplicado	1999mL ≅ 1774g	23990mL ≅ 21291g
Cantidad de solvente en el recipiente colector	550mL ≅ 488g	6605mL ≅ 5862g
Cantidad solvente aplicado sobre los tubos	1449mL ≅ 1286g	17385mL ≅ 15429g
Relación [solvente/tegumento seco = A / Ts]	16.2 mL/g ≅ 14.4g/g	16.2 mL/g ≅ 14.4g/g
Relación [solvente/materia inerte = A / B]	21.7mL/g ≅ 19.3g/g	21.7mL/g ≅ 19.3g/g
Tiempo total de recirculado del extracto por etapa	15 minutos	
Tiempo de percolado de cada etapa	15 minutos	
<hr/> <i>Condiciones al final de la extracción</i> <hr/>		
tp: tiempo requerido para que comience a percolar extracto (promedio)		2 minutos
Caudal del extracto promedio total		96.6 ± 14.6 mL/min
Cantidad total extracto recuperado (12 etapas)		13640mL ≅ 12198g
Concentración fenoles extracto total recuperado (12 etapas)		5.18 ± 0.04mg/mL

Tabla 29. Datos de la extracción por contra-corriente.

SALIDA EXTRACTO RECUPERADO

Parámetro	Etapa										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
g extracto recuperado (fenoles + comp. no fenol. + solvente)	1039	1044	1049	1054	1059	1064	1069	1074	1079	1084	1088
C = g fenoles extraídos	0.151	0.230	0.351	0.537	0.820	1.252	1.912	2.919	4.459	6.809	10.399
g comp. no fenoles	0.175	0.267	0.408	0.623	0.951	1.453	2.218	3.388	5.174	7.903	12.069
A = g solvente recuperado	1039	1044	1048	1053	1057	1061	1065	1068	1070	1069	1065
B = g materia inerte en el extracto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$X (.10^{-3}) = C/(A+C)$	0.145	0.220	0.335	0.510	0.775	1.178	1.791	2.726	4.151	6.328	9.670
$N = B/(A+C)$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 30. Datos de la extracción por contra-corriente.

SALIDA SOLIDOS LIXIVIADOS

Parámetro	Etapa										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A = g solvente retenido	247	242	238	233	229	224	221	218	216	217	221
C = g fenoles retenidos en el tegumento	0.108	0.130	0.156	0.187	0.224	0.269	0.402	0.673	1.134	1.931	3.345
B = g materia inerte en el tegumento lixiviado	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75	66.75
$Y (.10^{-3}) = C/(A+C)$	0.439	0.536	0.655	0.801	0.980	1.199	1.817	3.081	5.220	8.837	14.929
$N = B/(A+C)$	0.271	0.276	0.281	0.286	0.291	0.297	0.302	0.306	0.307	0.306	0.298
$y/N = C/B$	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.004	0.006	0.010	0.017	0.029	0.050

Figura 68. Curva de equilibrio y vs x.

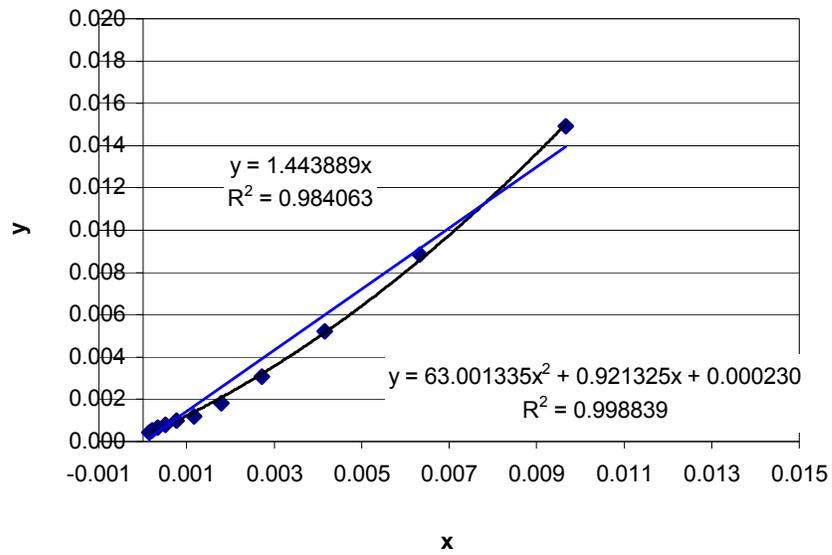
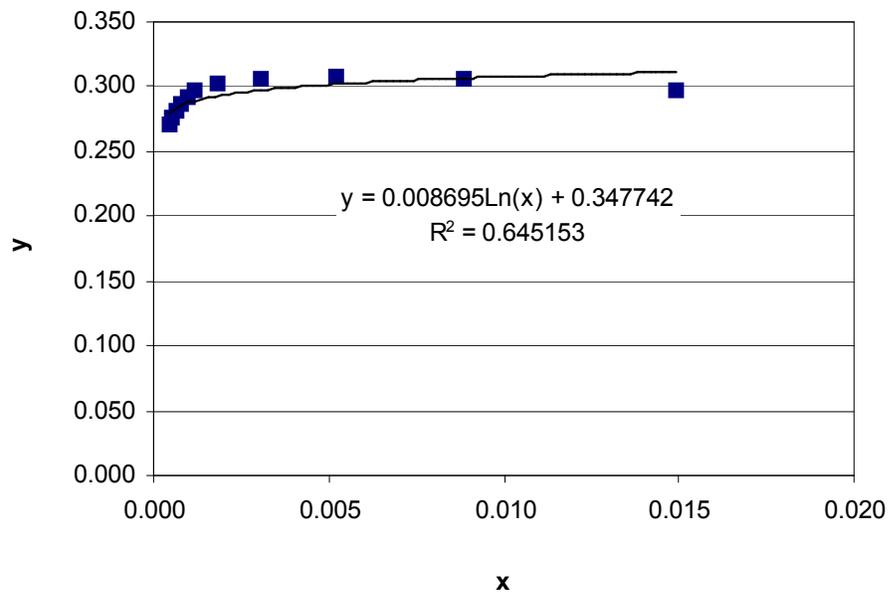


Figura 69. Curva de equilibrio N vs y.



Cálculos utilizando las curvas de equilibrio

En la **Figuras 70 y 71** se graficaron los diagramas de equilibrio promediados utilizando los datos de los ensayos en “batch” y en contracorriente real. Con estas regresiones se realizaron los cálculos del número de etapas ideales, cantidad de solvente necesario y concentración del extracto obtenido para alcanzar un rendimiento en la extracción de fenoles del 95% a fin de comparar estos valores con los de corriente cruzada en escala laboratorio y piloto (Treybal, 1980).

Para realizar estos cálculos se utilizó el método gráfico de McCabe-Thiele (Treybal, 1980). La **Figura 72** muestra el diagrama McCabe-Thiele obtenido con los datos del equilibrio x-y, y los siguientes datos de operación (en base a 15 minutos de recirculación de extracto y 15 minutos de percolación):

SÓLIDOS A LIXIVIAR: ENTRADA F

$B(F) = \text{g materia inerte}$	66.75g
$A(F) = \text{g solvente}$	0g
$C(F) = \text{g fenoles del tegumento}$	10.38g
$F = A(F) + C(F)$	10.38g
$N(F) = B/(A+C)$	6.430
$y(F) = C/(A+C)$	1

SÓLIDOS LIXIVIADOS: SALIDA E(11)

Para una extracción del 95% de los fenoles

$C(E11) = \text{g fenoles retenidos} = C(F) - 0.95C(F)$	0.519g
$B(E11) = \text{g materia inerte}$	66.75g
$\text{g fenoles/g materia inerte} = y/N = C/B$	0.0078
$N(11) = B/(A+C) = \text{valor obtenido por la regresión entre los datos "N vs y/N" del equilibrio}$	0.2806
$E(11) = A + C = B/N$	238g
$A(E11) = \text{g solvente} = E - C$	237g

$$y(E11) = C/(A+C) \quad 0.00218$$

SOLUCIÓN CONCENTRADA: SALIDA(R1)

$$C(R1) = \text{g fenoles del extracto} = C(F) - C(E11) \quad 9.86\text{g}$$

$$x(R1) = C/(A+C) = \text{valor supuesto} \quad \mathbf{0.01829}$$

$$R1 = A+C \quad 539\text{g}$$

$$A(R1) = \text{g solvente del extracto} = R1 - C(R1) \quad 529\text{g}$$

$$N(R1) = B/(A+C) \quad 0.00$$

SOLVENTE: ENTRADA R(12)

$$A(R12) = A(E11) + A(R1) = \text{Resultado} \quad \mathbf{767\text{g}}$$

$$C(R12) = \quad 0\text{g}$$

$$R(12) = A + C = \quad 767\text{g}$$

$$x(12) = C/(A+C) \quad 0$$

$$N(R12) = B/(A+C) \quad 0$$

Para realizar los cálculos se partió de un valor supuesto de $x(R1)$, con el cual, mediante balances de masa, se calculó el resultado de la cantidad de solvente necesaria para obtener esa concentración de extracto final y ese valor de contenido de fenoles del tegumento de salida. Por prueba y error se fue corrigiendo el valor supuesto de $x(R1)$ hasta lograr un número entero de etapas ideales para la extracción.

De acuerdo al diagrama McCabe-Thiele (**Figura 72**) obtenido para estos datos, para lograr una extracción del 95% de los fenoles del tegumento inicial se requieren 7 etapas, 767g de solvente cada 15 minutos (caudal de solvente de entrada al equipo debería ser 51.13g/min), y se obtiene una concentración de extracto final de 0.01829 g fenoles/(g fenoles + g solvente). La relación g solvente/g materia inerte resulta de 11.48g/g, lo cual indica que utilizando contracorriente se ahorra 4 veces la cantidad de solvente utilizado en corriente cruzada piloto, y 8 veces es el ahorro comparando con la escala laboratorio a corriente cruzada.

La capacidad resultante de lixiviación es de:

- 200g/h tegumento fresco,
- 1533g/h solvente fresco y
- 1101g/h extracto concentrado

Figura 70. Curva de equilibrio y vs x.

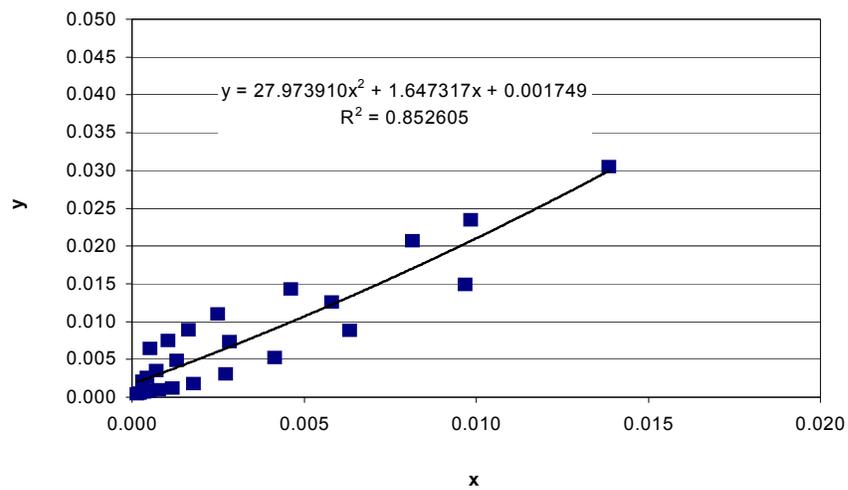


Figura 71. Curva de equilibrio N vs y.

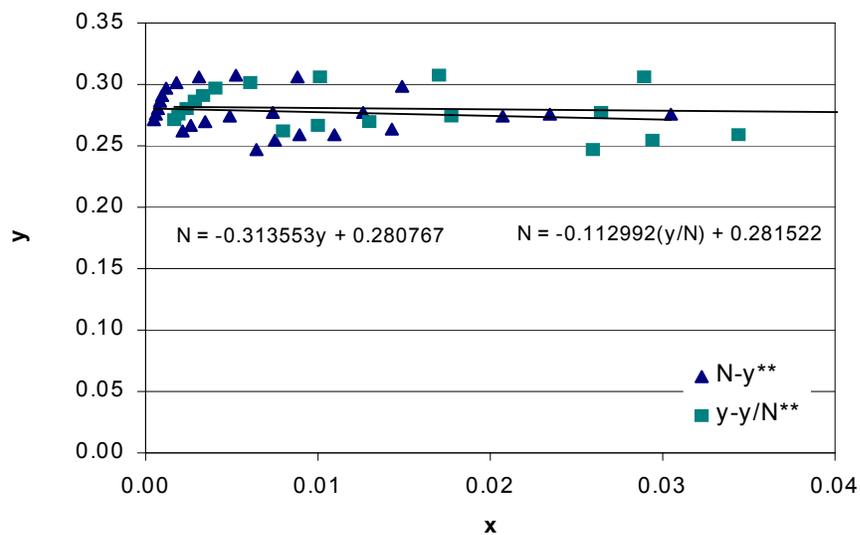
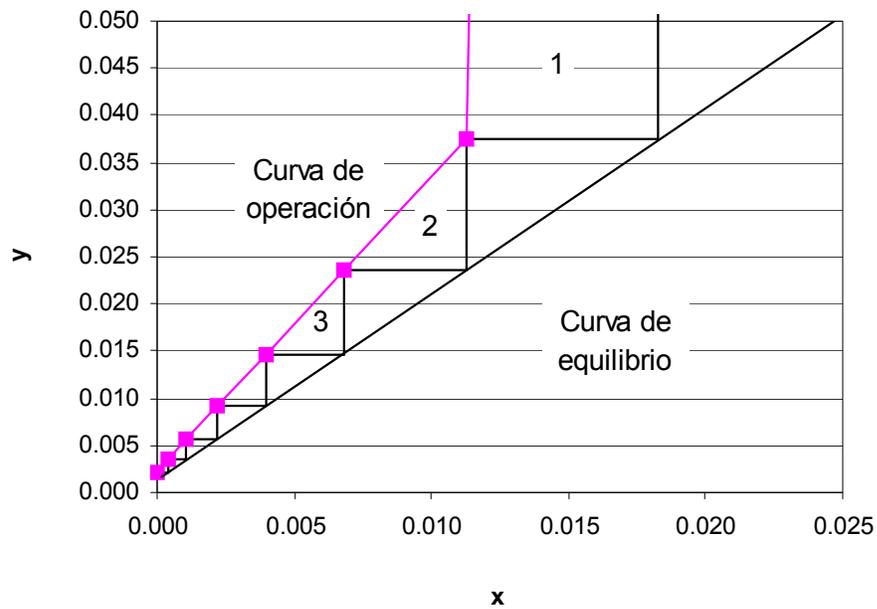


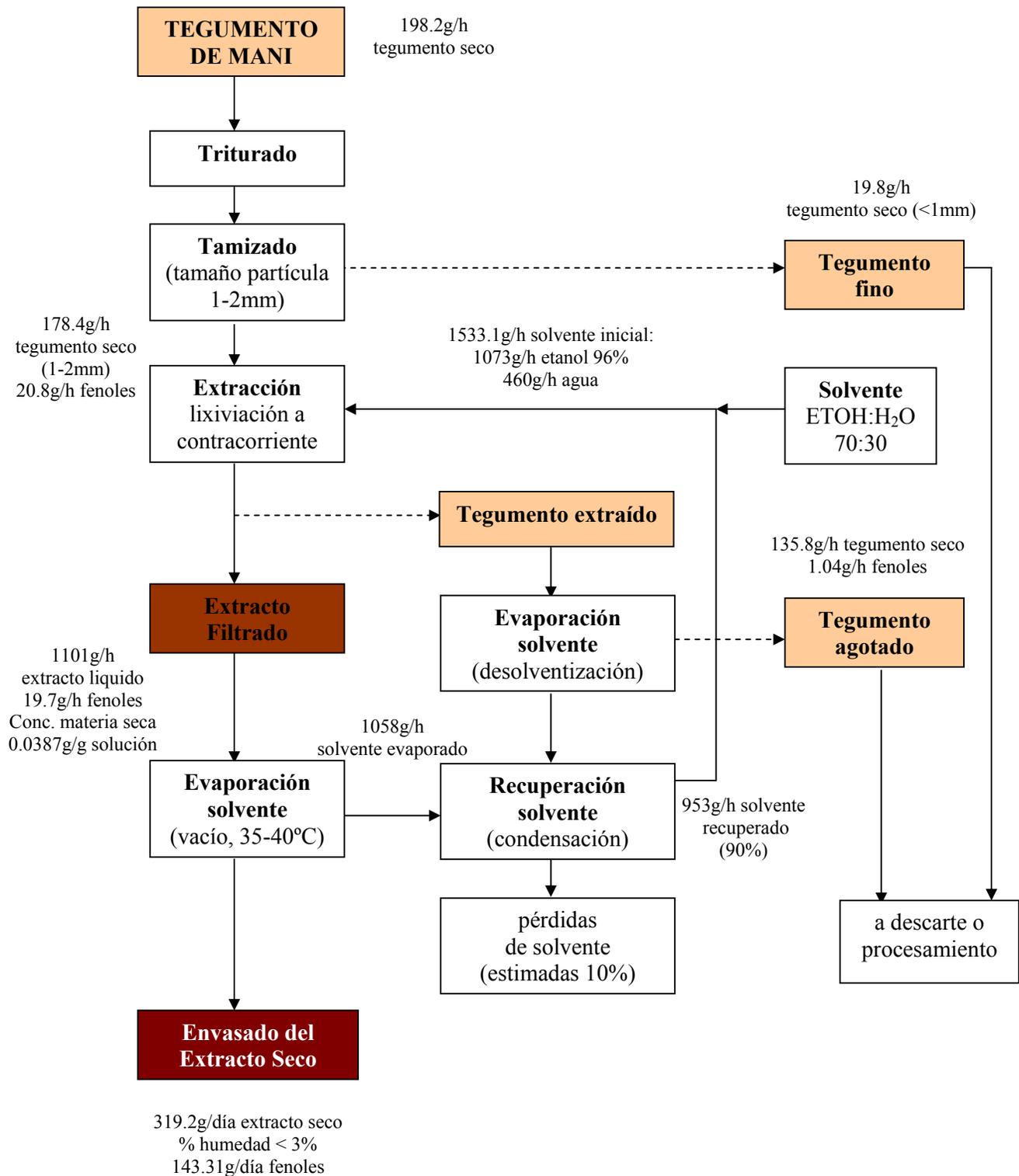
Figura 72. Diagrama McCabe-Thiele para determinar el número de etapas ideales.



➤ **Diagrama de flujo para la extracción a escala piloto-laboratorio**

En la **Figura 73** se propuso un diagrama de flujo para el proceso de extracción de los compuestos antioxidantes a partir de tegumento de maní, y los balances de masa de materia primas y productos de cada etapa de acuerdo a los resultados de los ensayos a escala laboratorio y piloto.

Figura 73. Diagrama del proceso para escala piloto-laboratorio.
Balance de masa ideal de materias primas y productos.



CONCLUSIONES

- **Tamaño de partícula:** el tegumento molido tamaño mediano dio mejores resultados para la extracción en el equipo lixiviador, porque no impide la circulación del solvente, y se puede mejorar la relación masa/volumen ocupado.
- **Método de lixiviación para escala piloto:** el método a contracorriente dio mejores resultados en cuanto a ahorro de solvente (4 veces menos cantidad de solvente) para un mismo porcentaje de extracción al compararlo con la extracción por corriente cruzada.
- **Contracorriente continua:** Utilizando este equipo de lixiviación, 100g de tegumento fresco molido (1-2mm), con 15 minutos de circulación y 15 minutos de percolado del extracto, y extrayendo el 95% de los fenoles totales, se requirieron: 7 etapas (tubos o celdas), 767g de solvente (cada 15 minutos, caudal 51g/min), y se obtuvo un extracto de 0.01829g fenoles/(g fenoles + g solvente). Es decir que la capacidad de lixiviación fue de 200g/h tegumento fresco, 1533g/h solvente fresco y 1101g/h extracto concentrado.

ANEXO

Evaluación de la Factibilidad y Rentabilidad del
Proceso Desarrollado, para su Posterior
Transferencia a Nivel Industrial



INTRODUCCION

La evaluación económica de proyectos compara sus costos y beneficios económicos con el objetivo de emitir un juicio sobre la conveniencia de ejecutar dichos proyectos en lugar de otros. La evaluación económica puede aplicarse también a múltiples decisiones menores (subproyectos) en la formulación de los mismos (conveniencia de trabajar con dos o tres turnos, fuentes de energía, compra de equipos nuevos o usados, calidad del producto, publicidad, empleados, capacitación, investigación y desarrollo, etc.) (Fontaine, 1999).

El proceso de evaluar implica *identificar, medir y valorar* los costos y los beneficios pertinentes de distintas alternativas de proyectos para lograr los objetivos propuestos, a los efectos de establecer cuál de ellos es más conveniente ejecutar (Fontaine, 1999).

Para identificar los costos y los beneficios de un proyecto, debe primeramente definirse la situación “base” o “sin proyecto”, para ello el evaluador establece qué es lo que sucedería durante el horizonte de la evaluación en el caso de que no se ejecute el proyecto que se considerará en la situación “con proyecto”. La tarea del evaluador es estimar (para un horizonte o período de evaluación) los flujos de costos y beneficios de las alternativas “con proyecto”, y restar de éstos flujos estimados para la situación “sin proyecto” (Fontaine, 1999).

El ciclo de los proyectos puede dividirse en (Fontaine, 1999):

- *El perfil de proyectos*: cuando nace la idea se realiza un estudio preliminar o “perfil”, el cual permite determinar la factibilidad técnica de llevar adelante la idea, estimando aproximadamente los costos y beneficios. De este estudio se puede decidir entre: continuar con un estudio de prefactibilidad, archivar el proyecto para un futuro, o desechar completamente el proyecto.
- *El estudio de prefactibilidad*: persigue disminuir los riesgos de la decisión, buscando mejorar la calidad de la información que tendrá a su disposición la autoridad que decidirá sobre la ejecución del proyecto. Este estudio demanda tiempo y dinero para trabajos de campo e investigación, aunque puede contar con información de fuentes secundarias y



entregar rangos de variación bastante amplios para los costos y beneficios. Este estudio es revisado por un equipo de evaluadores competentes, quienes pueden decidir entre: continuar con un estudio de factibilidad, reconsiderar en otro momento, reestudiar o descartar completamente el proyecto.

- *El estudio de factibilidad:* incluye los mismos capítulos que el estudio de prefactibilidad, pero en mayor profundidad y menor rango de variación. Requiere entonces mayores investigaciones y precisiones en terreno. Este estudio establece definitivamente la localización, el tamaño, la tecnología, el calendario de ejecución, puesta en marcha, etc. Este estudio lleva a la aprobación final del proyecto, o a lo sumo a su postergación o modificaciones menores.
- *La ejecución de proyectos:* El estudio de factibilidad incluye un capítulo destinado al plan de ejecución del proyecto y la organización necesaria. La ejecución del proyecto puede ser efectuada por la entidad dueña o por terceros.
- *Las etapas de un proyecto:* Los proyectos son ejecutados en etapas predefinidas, las cuales tienen importancia porque pueden dar lugar a cambios. Por ejemplo la construcción de plantas pilotos, entre otros, para seleccionar la mejor tecnología.
- *Evaluaciones ex-post:* Las evaluaciones de los resultados de los proyectos cumplen el propósito de aprender de los errores de estimación para adquirir experiencia y mejorar los futuros proyectos.

En este capítulo del trabajo se realizó una evaluación aproximada de la factibilidad y rentabilidad del proceso de obtención de antioxidantes naturales a partir de tegumento de maní para escala industrial, esta última fue adaptada a la producción de maní blanchado de la empresa Lorenzati, Ruetsch y Cía S.A. (Ticino, Córdoba, Argentina).

En primer lugar se estudió el mercado de los insumos y los productos antioxidantes; en segundo lugar se realizó el estudio técnico de la ingeniería del proyecto (equipos, áreas, etc.)



de la planta de producción; en tercer lugar el cálculo de la inversión inicial necesaria en equipos, activos intangibles y capital de trabajo; en cuarto lugar se realizó un análisis de los costos de producción directos e indirectos; y por último la evaluación económica en cuanto a rentabilidad estimada para un período de producción de 10 años.

Lorenzati, Ruetsch y Cía S.A. es una compañía dedicada al acopio, secado, selección y comercialización de maní, localizada en el corazón mismo de la zona de producción. Las primeras actividades comenzaron en el año 1967 con forma de Empresa Unipersonal, y consistían en acopio de cereales y oleaginosas y fletes. La capacidad de producción de maní del año 1999 fue:

Capacidad de Acopio (Maní en Cáscara)	34.000 tns
Capacidad de Secado (Maní en Cáscara)	1.140 tns/día
Selección (Maní Tipo Confitería)	155 tns/día
Capacidad de Producción Maní “Blanched” (para pasta y grana de maní)	50 tns/día

Se decidió trabajar con respecto a la producción de esta empresa ya que es una importante empresa productora de tegumento de Córdoba, acopia y procesa el 12% de la producción total de maní de la República Argentina, y fue proveedora del tegumento para los estudios en este proyecto.

Para el año 2002 la producción de maní blanchado en el país fue de 80000 Tn, y la empresa Lorenzati, Ruetsch y Cia. produjo 15500 toneladas (3.5 Tn/h), de las cuales 1500Tn se destinaron al mercado interno y 14000 Tn a exportación.



MATERIALES Y METODOS

Una vez definido y probado el proceso de extracción de estos compuestos antioxidantes a nivel piloto en el **Capítulo 5**, se realizó una evaluación de costos y factibilidad de producción a escala industrial, según la capacidad de producción de tegumento de la empresa Lorenzati, Ruetsch y Cia. S.A (Ticino, Córdoba, Argentina), como una posible ampliación de la planta para el procesado del tegumento, se realizó un estudio de prefactibilidad aproximado según el procedimiento descrito por Baca Urbina (1995):

1. **Estudio del mercado:** con el fin de verificar la posibilidad real de inserción del producto en el mercado, se estudió la oferta, demanda, y precios de las materias primas (maní, tegumento, solvente), los productos (sustancias antioxidantes) y productos sustitutos (otros antioxidantes con los que puede llegar a competir).

2. **Estudio Técnico:** se determinó:
 - 2.1. **Tamaño óptimo de la planta industrial,** teniendo en cuenta los equipos disponibles, los insumos, la demanda, la tecnología, etc.

 - 2.2. **Localización de la planta.**

 - 2.3. **Ingeniería del proyecto:** basado en el proceso productivo establecido y de producción continua, el tamaño y la localización de la planta, se analizaron y seleccionaron los posibles equipos, se realizó el diagrama de flujo total, y el cálculo de las áreas particulares y total de la planta.

 - 2.4. **Análisis organizativo y administrativo:** se determinó el personal necesario según las características de la planta y teniendo en cuenta el marco legal.

3. **Estudio económico:** según datos obtenidos de bibliografía, empresas similares y proveedores de equipos y servicios, considerando un período de trabajo de 10 años, se determinaron aproximadamente:



- 3.1. **Inversión inicial** en activos tangibles (equipos, muebles y útiles, obra civil), intangibles (ingeniería, puesta a punto, capacitación, etc.) y capital de trabajo.
- 3.2. **Costos de producción** directos (materia prima, combustible, electricidad, mano de obra directa, etc.) e indirectos (mantenimiento, mano de obra indirecta, seguros e impuestos, depreciaciones, rentas, etc.).
- 3.3. **Estado de resultados:** análisis de la Utilidad Neta y Flujo de Fondos Netos (FFN) del proyecto, que son el beneficio real de la operación de la planta. Se calcula estableciendo la diferencia entre los Ingresos y todos los Costos e Impuestos de la planta.
- 3.4. **Balance general:** se calcula según la fórmula $\text{Activo} = \text{Pasivo} + \text{Capital}$
- 3.5. **Punto de equilibrio** o producción mínima económica: nivel de producción en el que son exactamente iguales los ingresos por ventas y la suma de costos fijos y variables.
- 3.6. **Tiempo de recupero del capital.**
- 3.7. **Evaluación económica del proyecto:** a fin de determinar si el proyecto es rentable económicamente se calcularon el Valor Actual Neto (VAN) y la Tasa Interna de Rendimiento (TIR). Se consideró una tasa de descuento del 12%.



RESULTADOS Y DISCUSION

1. ESTUDIO DE MERCADO

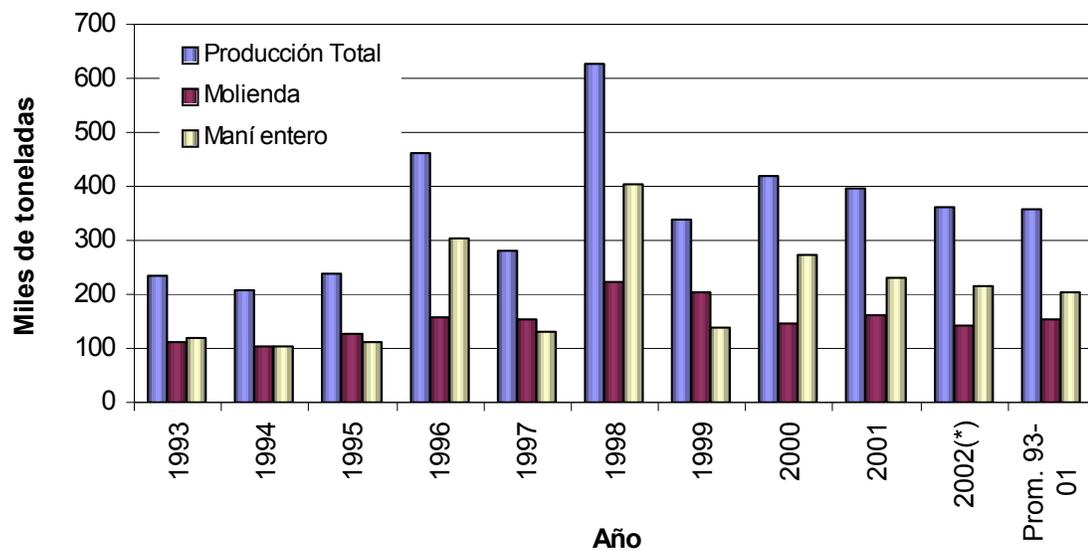
1.1. Mercado de los insumos

Las principales **materia primas** requeridas para la producción de estos antioxidantes naturales son:

- **Tegumento de maní:** proviene del proceso de blanchado de maní, e implica alrededor del 4% del peso de maní procesado (Woodroof, 1983).

La producción nacional de maní en la Argentina de los últimos 10 años se puede resumir en la **Figura 74**.

Figura 74. Producción nacional de maní



Fuente: INDEC, CIARA, 2002. () valor estimado*



De este gráfico se puede observar que en los últimos 10 años el promedio de maní producido destinado a maní entero fue de 202000 Tn. De este valor, alrededor del 95% se destina a maní confitería. Entre el 30-40% del maní confitería se destina a maní blanchado, lo que significa una producción de aproximadamente 80000 Tn de maní blanchado, y en consecuencia 3300Tn de tegumento sin aplicaciones industriales de importancia.

La empresa Lorenzati & Ruetsch S.A. ha crecido de forma importante en los últimos años, y es una de las principales productoras de maní blanchado de la provincia de Córdoba, por esto sería interesante poder transferir el trabajo a esta empresa, para la producción de compuestos antioxidantes del tegumento (subproducto sin aplicación industrial) que además podrían ser utilizados sobre productos de confitería a base de maní obtenidos en esta misma empresa. Esta empresa cuenta con una capacidad de producción de maní blanchado, destinado a la elaboración de productos tipo pasta y grana de maní, maní frito salado, tostado y tostado con recubrimientos, de alrededor de 50Tn/día, es decir 2Tn/día de tegumento.

Para el año 2002 la producción de maní blanchado en el país fue de 80000 Tn, y la empresa Lorenzati, Ruetsch y Cia. produjo 15500 toneladas (3.5 Tn/h), de las cuales 1500Tn se destinaron al mercado interno y 14000 Tn a exportación.

El tegumento no posee un precio de venta, ya que es un subproducto desechado, no comercializado, por lo que la verdadera materia prima sería el maní entero, y como el 4% corresponde a tegumento, se podría aproximar un precio como el 4% del precio del maní entero destinado a maní blanchado. Es decir que si consideramos que el precio del maní crudo es de alrededor de 0.58U\$\$/Kg, el precio del tegumento podría calcularse como 0.023U\$\$/Kg.

Los precios en general varían año a año dependiendo de múltiples factores como la demanda interna y externa, la oferta, los precios internacionales de exportación, la inflación, etc.



- **Etanol:** se produce en grandes cantidades y en diferentes empresas nacionales. Una empresa muy importante productora de alcohol en Córdoba es Porta S.A., la cual podría ser la proveedora del etanol para una posible producción a escala industrial de estos antioxidantes.

El precio aproximado del alcohol a granel es de 0.95 \$/litro + IVA, para una conversión 1U\$\$ = 3.10\$, el valor del alcohol sería de 0.31 U\$\$/litro + IVA (Porta S.A.).

- **Agua:** la empresa cuenta con pozos de agua, por lo que los costos de este insumo estarían incorporados en el costo de producción final, en donde estarán incluidos los procesos de extracción y purificación del agua.

1.2. Mercado de los productos antioxidantes

- **OFERTA:** Los productos con los cuales este tipo de antioxidantes podría competir serían otros antioxidantes naturales y sintéticos más comunes aplicados en la industria de alimentos:

- *Antioxidantes naturales:*

- Tocoferoles
- Extractos de romero
- Formulados comerciales de tocoferoles (γ y δ tocoferol 50-70% en aceite de girasol o almidón, con el agregado de ascorbil-palmitato, extracto de romero, ácido cítrico, etc.)

- *Antioxidantes sintéticos:*

- BHT
- BHA
- TBHQ
- Propilgalato



- Mezclas comerciales (en forma sólida o líquida, mezcla de antioxidantes sintéticos más el agregado de sinérgicos como el ácido cítrico en propilenglicol o aceite de girasol, etc.)

De todos ellos los más ampliamente utilizados sobre alimentos son los antioxidantes sintéticos, preferentemente en forma de formulados o mezclas listos para aplicar. Estos resultan de costos muy bajos, altísima eficiencia, y amplio campo de aplicación, pero cuentan con muchas restricciones en cuanto a cantidades permitidas. En general no se puede sobrepasar el 0.02% en peso con respecto al contenido graso del alimento (CAA, 1969).

Los antioxidantes naturales son bastante más caros y muchas veces no es posible aplicarlos a cualquier tipo de alimento, pero no tienen problemas en las cantidades aplicadas, y cuentan además con numerosas ventajas a nivel salud de los consumidores, por ejemplo retardan el envejecimiento, previenen el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Arichi *et al.*, 1982; Kimura *et al.*, 1985, 1995; Masquelier, 1987; Klatsky *et al.*, 1992; Jacob, 1994; Fitch Haumann, 1994; Jang *et al.*, 1997; Louis, 1999). Por otro lado, como ya se mencionó en los Antecedentes Generales, en la actualidad existe una creciente tendencia hacia los productos de origen natural, lo que podría también beneficiar al mercado de estos productos.

En la Argentina no se producen antioxidantes sintéticos, y existe una producción mínima de algunos antioxidantes naturales como los tocoferoles a partir de aceites vegetales. Es decir que la mayoría de las industrias necesitan importar estos productos o adquirirlos mediante agentes intermediarios de importación, lo cual implica un incremento de los costos.

Precios aproximados:

- *Sintéticos*

BHA (90% pureza, Sigma)	78.8 U\$\$/Kg
BHT (99% pureza, Sigma)	35.8 U\$\$/Kg



Solución TBHQ (30% materia activa, con ácido cítrico, en propilenglicol, Argold)	10.5 U\$\$/Kg
▪ <i>Naturales</i>	
Tocoferol α (95% pureza, Sigma)	250.2 U\$\$/Kg
Tocoferol γ (95% pureza, Sigma)	1034.0 U\$\$/Kg
Tocoferoles mezcla (aprox. 50% en aceite, Argold)	70.0 U\$\$/Kg

Los compuestos antioxidantes del tegumento de maní contarían entonces con las siguientes ventajas y desventajas competitivas con respecto a productos similares:

- *Ventajas:*
 - Posibilidad de producción a partir de insumos totalmente nacionales.
 - Al ser de origen totalmente natural, en principio no poseería restricciones en su consumo, y los controles para su aprobación como aditivo alimentario sería relativamente simple.
 - Posibilidad de ser aplicados en productos de maní y similares, con buenas características de actividad (comprobadas en este y otros trabajos). Es decir que podrían ser aplicados en productos obtenidos en la misma empresa, dando una utilidad a un subproducto como el tegumento no explotado.
 - Posibilidad de extender la producción y comercialización para otras empresas.

- *Desventajas:*
 - Al ser naturales implicarían mayores costos, aunque este aspecto será evaluado al final de este capítulo.
 - Al ser un producto totalmente nuevo requeriría grandes inversiones en publicidad e investigación. Se necesitarían mayores investigaciones en cuanto a sus aplicaciones industriales sobre alimentos.



- **DEMANDA:** Como este trabajo está orientado a la producción de antioxidantes para el uso en la misma empresa productora de maní blanchado, la demanda estará fijada por la cantidad de antioxidante requerido para los productos a base de maní producidos en la misma empresa.

Se estima que para una producción de 10Tn/día de productos a base de maní, se podría aplicar entre un 0.5 – 1% de antioxidante de tegumento, es decir se requerirían 100Kg/día de antioxidantes si fuera necesario agregar antioxidantes a todos los productos elaborados.

Podría existir la posibilidad de vender los antioxidantes a otras empresas, pero este aspecto cae fuera de la intención del trabajo: en este estudio se pretende estudiar algunas herramientas y datos necesarios para calcular, en caso necesario, las proyecciones a escalas o volúmenes de producción y venta mayores.

1.3. Comercialización y distribución de los productos

Como este tipo de productos no es de consumo masivo, y será consumido en la misma empresa productora, no existiría una cadena de comercialización y distribución, salvo dentro de la misma empresa, de un área o rubro de producción a otro. En caso de vender los productos a otras empresas, la cadena de distribución estaría, en principio, dentro de un nivel industrial o mayorista.



2. ESTUDIO TECNICO

2.1. Tamaño

Para tener una referencia en la elección del tamaño de la planta a instalar (capacidad de producción) se deben tener en cuenta algunos factores como:

- Tamaño del mercado (oferta, demanda, importaciones y exportaciones)
- Disponibilidad de materias primas y suministros
- Capital disponible

En nuestro caso el tamaño de la planta estuvo determinado por el volumen de producción de tegumento de maní de la empresa en la cual se realizó el estudio. Pero en caso que se pretendan realizar en algún momento mayores producciones, utilizando tegumento de otras empresas, se podría calcular un tamaño de planta estimado para el doble de capacidad de la misma empresa. Es decir que la capacidad estimada de procesamiento estaría alrededor de **4Tn/día** de tegumento de maní.

2.2. Localización

La empresa se localiza en Ticino (Córdoba, Argentina), y cuenta con un predio de 10has. dentro del cual se distribuyen diferentes galpones de 20x60m. En uno de estos galpones se podría instalar la planta para el procesamiento del tegumento.



2.3. Ingeniería del proyecto

2.3.1. Algunas características y propiedades físico-químicas de las materias primas.

➤ *Tegumento de maní*

En la **Tabla 31** se detallan algunas características (tamaño de partícula, densidad, humedad y contenido de fenoles) de los tegumentos sin moler, molidos tamaño mediano y pequeño.

Tabla 31. Tamaño de partícula, densidad, humedad y contenido de fenoles totales del tegumento de maní son moler y molidos tamaño mediano y pequeño.

Tegumento	Tamaño de partícula (mm)	Densidad a granel ^a (g/cm ³)	Humedad ^b (%)	Fenoles totales ^b (% en base seca)
Tegumento sin moler	1-10	0.08	9-10	11-14
Tegumento molido mediano	1-2	0.02	9-10	11-14
Tegumento molido fino	< 1	0.04	9-10	11-14

^a Valor aproximado: calculado por el volumen (cm³) ocupado por 100g de tegumento.

^b Valores obtenidos en los capítulos 1 y 3.

➤ *Solventes (20-22°C)*

En la **Tabla 32** se detallan la densidad, viscosidad y punto de ebullición de los solventes utilizados para el proceso de extracción de fenoles del tegumento de maní.



Tabla 32. Densidad, viscosidad y punto de ebullición de los solventes etanol, agua y etanol:agua 70:30.

Solvente	Densidad (g/cm ³)	Viscosidad (cp)	Punto ebullición (°C)
Etanol 96%	0.8049 ^a	1.1761 ^a	78.2 ^a
Agua destilada	0.9982 ^b	0.9664 ^b	100.0 ^b
Etanol:agua 70:30	0.8875 ^a	1.0819 ^a	84.7 ^c

^a Datos determinados en capítulo 4.

^b Fuente: Weast, 1977-1978..

^c Dato estimado: Propiedad mezcla = Propiedad azeótropo (etanol 96%) x 0.70 + Propiedad agua pura x 0.30. (Perry, 1992).

Para el **etanol** existen restricciones debido a su inflamabilidad y toxicidad (Weast, 1977-1978; International Chemical Safety Cards ICSC 0044, 1993).

Peligros:

- *Incendio:* Altamente inflamable. Punto de inflamación: 13°C. Temperatura de autoignición: 363°C.
- *Explosión:* las mezclas vapor/aire son altamente explosivas. Límites de inflamabilidad o explosividad de los vapores de etanol en aire: superior 18.95 % - inferior 3.28 % en volumen de aire.
- *Exposición:* presenta consecuencias agudas y crónicas por ingesta, inhalación, contacto con piel y ojos. Límites de exposición humana en el aire 1000ppm (parte de vapor x 10⁶ partes de aire contaminado por volumen a 25°C y 760mmHg) o 1900 mg/m³.
- *Reactividad química:* Reacciona lentamente con hipoclorito cálcico, óxido de plata y amoníaco, originando peligro de incendio y explosión. Reacciona violentamente con oxidantes fuertes tales como, ácido nítrico o perclorato magnésico, originando peligro de incendio y explosión.



Precauciones:

- *Utilización de equipos de protección personal:* protecciones respiratorias, manos y ojos.
- *Instalaciones de seguridad:* lavaojos.
- *Manipulación y almacenamiento:* Utilizar todos los equipos de protección personal. Evitar las llamas. NO producir chispas, NO fumar, NO poner en contacto con oxidantes fuertes. Almacenamiento a prueba de incendio. Separado de oxidantes fuertes.
- *Derrames o fugas:* Eliminar el residuo con abundante agua, con las precauciones de manipuleo antes mencionadas.
- *Medidas a tomar en caso de contacto con el producto:* *En general:* en todos los casos luego de aplicar los primeros auxilios, derivar al médico. *Contacto con la piel:* Quitar las ropas contaminadas, aclarar y lavar la piel con agua y jabón. *Contacto con los ojos:* Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad). *Inhalación:* Aire limpio, reposo. *Ingestión:* Enjuagar la boca.
- *Medidas a tomar en caso de incendio o explosión:* *Medidas de extinción apropiadas:* Utilizar polvos, espumas resistente al alcohol, agua en grandes cantidades, dióxido de carbono. *Productos de descomposición:* Vapores y gases de combustión. *Equipos de protección personal especiales:* trajes aluminados y equipo autónomo de respiración. *Instrucciones especiales para combatir el fuego:* Mantener fríos los recipientes y demás instalaciones con pulverización de agua.
- *Disposición final de los residuos:* los restos de producto químico deberían eliminarse por incineración o mediante cualquier otro medio de acuerdo a la legislación local. El envase contaminado, debe tratarse como el propio residuo químico. No verter en ningún sistema de cloacas, sobre el piso o extensión de agua.



2.3.2. Descripción del proceso de producción

➤ Etapas principales y equipos:

En la **Figura 75** se detalla el diagrama de flujo del proceso, incluyendo los balances de masa de materias primas y productos.

Se estima una capacidad de procesamiento de 4000Kg de tegumento fresco/día. Si los tiempos de producción fueran: 16h/día, 24días/mes y 11meses/año, la producción anual sería de 1056Tn/año de tegumento fresco.

A continuación se detallan las etapas del proceso y posibles equipos de escala industrial que podrían adaptarse para este tipo de producto. Aunque para poder conocer más detalles de especificaciones se requerirían pruebas a escala piloto-industrial para cada tipo de equipo. Este servicio es ofrecido generalmente por los proveedores del equipamiento, y el costo de estas pruebas forma parte del costo final del mismo.

1. *Ingreso del tegumento de maní*: el tegumento es separado en la planta de blanchado y almacenado en “big-bags” de 1x1x1.60m. Luego se transportaría hasta la planta de extracción (300m).
2. *Triturado*: Trituradora o cortadora de cuchillas rotatorias, con capacidad 4000Kg tegumento fresco/ día, 250Kg/h. **Figura 76**.

Estas cortadoras se utilizan para materiales fibrosos. Comprende un rotor con cuchillas uniformemente espaciadas sobre la periferia, de forma que el corte se haga sobre las cuchillas estacionarias de la cubierta. El producto se hace pasar por cribas y el tamaño máximo se controla mediante la abertura de la criba, el diseño y funcionamiento del molino. A partir de una criba de malla 20 (hasta malla 80) el sistema de recolección es neumático. Para nuestro material la criba deberá permitir el paso de partículas entre 1-2mm (malla 10), con sistema de recolección neumático. Generalmente las cortadoras rotatorias se fabrican en acero o acero inoxidable.



Un equipo con características similares al de la Figura, para procesar 338lb/h o 153kg/h de desechos de papel, a 920rpm con un rotor de 25cm, y longitud de cuchillas de 46cm, de las cuales 5 son móviles y 5 fijas, con una potencia del motor de 13hp (Perry 1992).

3. *Tamizado*: para eliminar los finos,

- Zaranda o tamiz metálico de vibración mecánica horizontal, malla n° 16-20 (tamaño de partícula obtenida por debajo menor a 1mm). Se deberá regular el proceso de triturado y tamizado para que las pérdidas por tegumento fino no supere el 10% del tegumento inicial. Capacidad de tamizado 4000Kg tegumento fresco/día.
- Almacenamiento de tegumento molido en “big-bags” 1x1x1.60m.



Figura 75. Diagrama de flujo del proceso propuesto para escala industrial.
Balance de masa ideal de materias primas y productos.

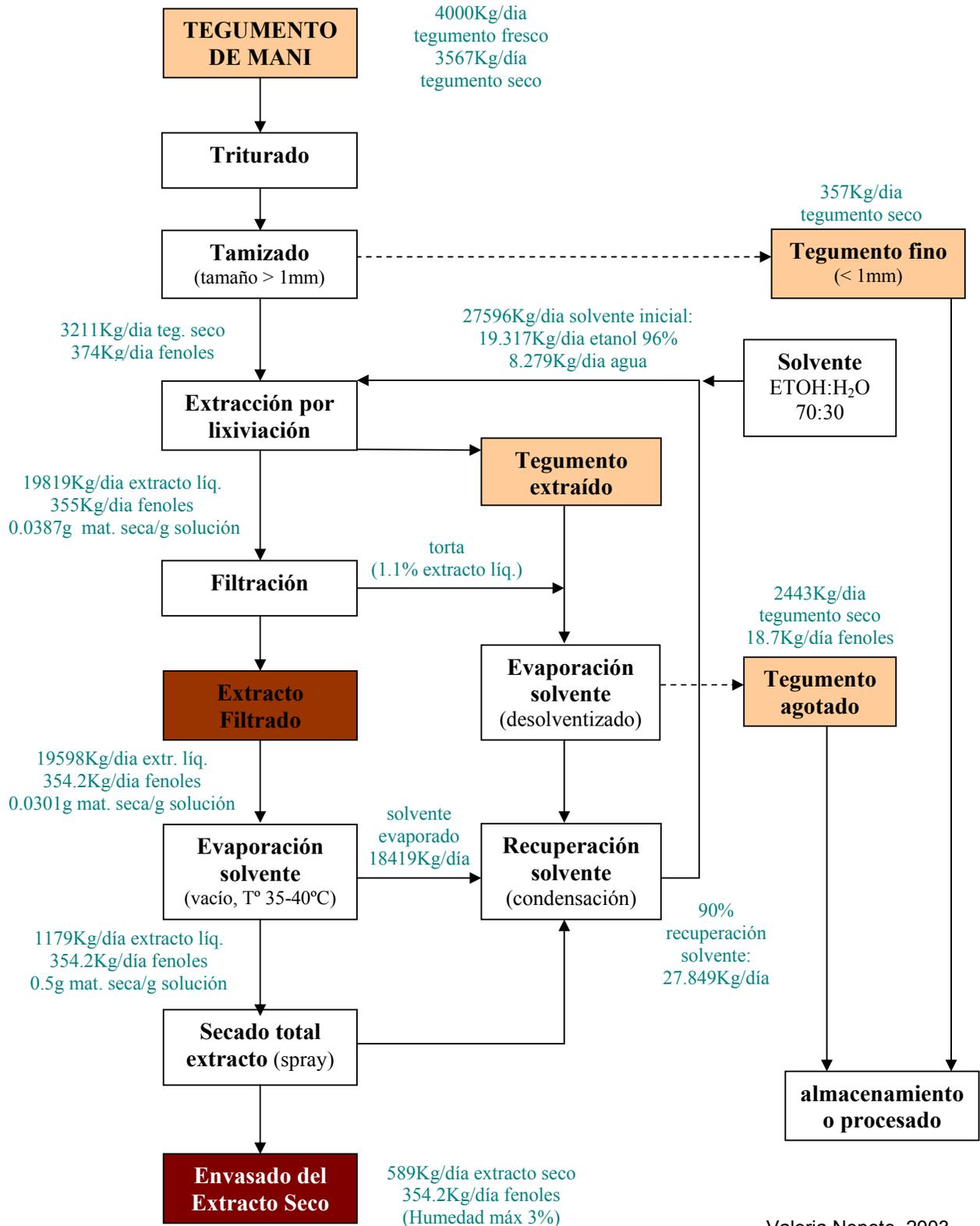
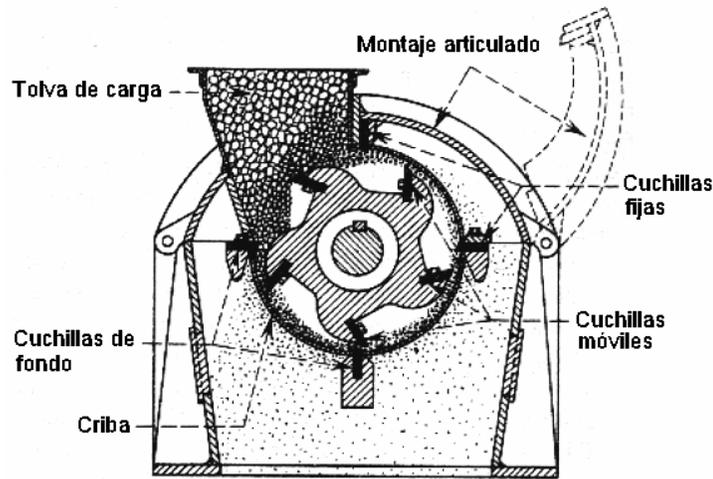




Figura 76. Cortadora de cuchillas rotatorias con estructuras de acero
(*Sprout, Waldron Companies, Perry, 1992*).



4. *Extracción con solvente:*

- Equipo lixiviador tipo rotativo o “Rotocel” (**Figuras 77 y 78**). Este es un extractor de percolación continuo de contacto múltiple. Consiste en un rotor dividido en celdas con paredes, con pisos permeables al líquido que giran alrededor de un eje central. Los compartimentos pasan en forma sucesiva por el punto de alimentación, varios rocíos de disolvente, una sección de drenaje y una estación de descarga (donde se abre el piso para descargar los sólidos extraídos). La estación de descarga está continua, en forma de circunferencia, al punto de alimentación. La extracción a contracorriente se logra mediante la alimentación de disolvente fresco, exclusivamente en el último compartimento, con el efluente que procede del que sigue. El Rotocel es simple y económico y requiere poco espacio (Schweitzer, 1997). Este tipo de equipo lo manufacturan vario fabricantes nacionales y extranjeros.

La capacidad calculada de acuerdo a los datos de equilibrio del capítulo 5, extrapolados a la cantidad de tegumento a procesar industrialmente es: 27.600Kg/día o 1.725Kg/h de caudal de solvente y 3.600Kg/día, 225Kg/h de material sólido fresco.



Concentración de fenoles del extracto a la salida del lixiviador 0.02 Kg/Kg extracto líquido, extracción del 95% de los fenoles totales del tegumento.

- 2 tanques etanol 96%, 50000litros.
- 1 tanques agua, 50000litros.
- 1 tanque solvente mezcla, 50000litros.
- 1 Tanques de almacenamiento del extracto diluido acero inoxidable, 50000 litros.
- Almacenamiento de finos y tegumento extraído seco en “big-bags” 1x1x1.60m.

Figura 77. Lixiviador Rotocel (Schweitzer, 1997).

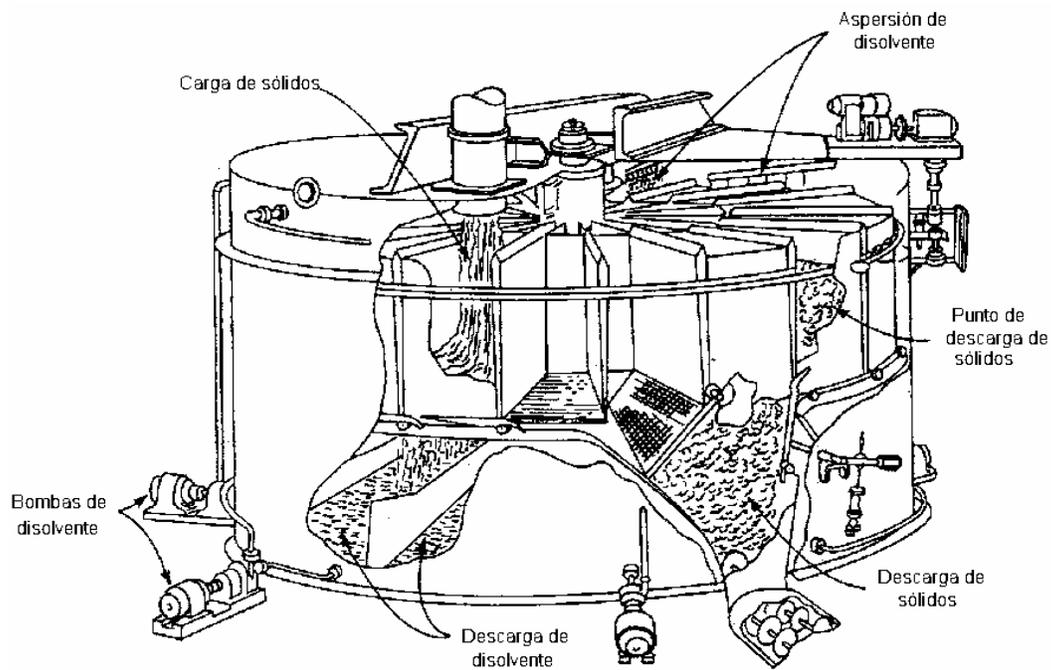
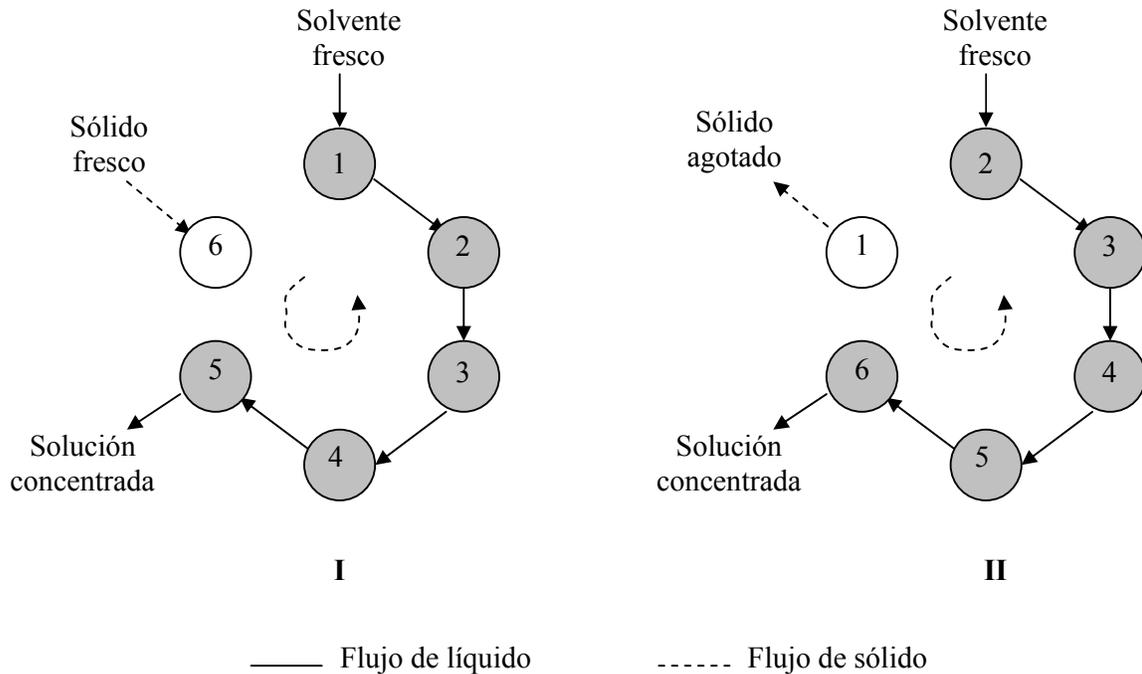




Figura 78. Principio funcionamiento del extractor Rotocel (Treybal, 1980).



5. *Filtración del extracto*: Un tipo de filtro muy utilizado, por la rapidez de filtración, mecanismo continuo de filtración y separación de la torta, son los filtros de tambor rotatorio por vacío. Se caracteriza por un tambor montado sobre un eje horizontal, cubierto en la porción cilíndrica por un medio filtrante, sobre una estructura de apoyo constituida por una rejilla que permite el drenado. Los materiales básicos de construcción pueden ser plásticos o metálicos. Las dimensiones en término de área de filtración varían desde 0.37 a 93m². Estos filtros cuentan con un arreglo de válvula giratoria en el muñón de apoyo del eje del tambor para facilitar la eliminación del filtrado y del líquido lavado y permitir la entrada de aire, en caso necesario, para el retrosoplado de la torta. Por medio de válvulas se controla la duración de cada ciclo. La mayor parte de estos filtros se alimentan al operar el tambor con aproximadamente el 35% de su circunferencia sumergida en el precipitado, pero este porcentaje se puede regular. La mayoría de los filtros de tambor operan con una velocidad de rotación que varía entre 0.1 a 10 rpm. Por lo general, se proporcionan impulsores de velocidad variable con el objeto de permitir los ajustes necesarios para los cambios en la formación de la torta y las velocidades de

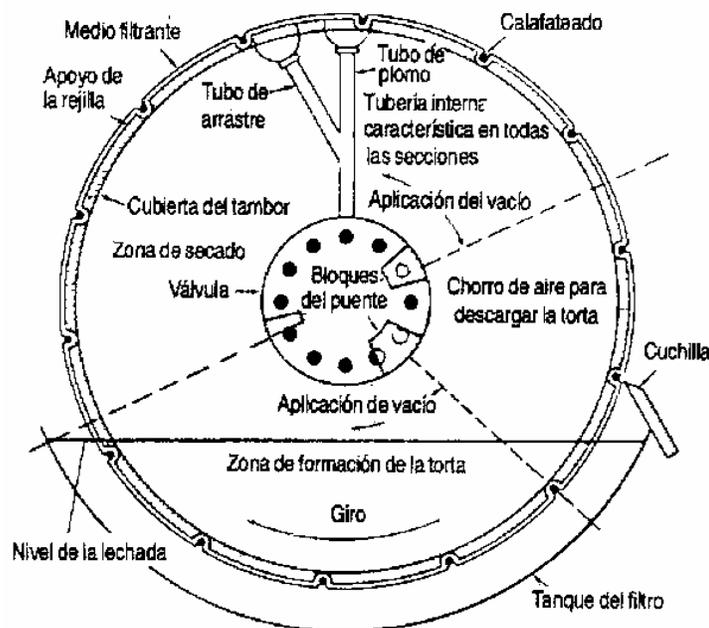


drenado. En los filtros con descarga por cuchilla el medio filtrante está calafateado dentro de las ranuras de la rejilla del tambor y la torta se elimina mediante una cuchilla colocada justo antes de que se vuelva a sumergir el tambor. La cuchilla sirve, principalmente, para dirigir la torta, desprendida por medio del retrosoplado con aire, a la rampa de descarga, ya que el contacto real con el medio causaría su desgaste rápidamente. En la **Figura 79** se muestra un esquema de filtro al vacío de tambor rotatorio, con descarga de cuchilla (Perry, 1992).

El tipo, porosidad y área del medio filtrante influirá en el costo, y dependerá del comportamiento de la solución a filtrar.

Para este equipo se requeriría una capacidad de filtración de 20000Kg solución/día (1250Kg/h). Se estima una pérdida en peso seco del extracto de un 17% como máximo, correspondiente a compuestos no fenólicos en suspensión. Se estimará un contenido del 20% en peso de solución en la torta.

Figura 79. Esquema de un filtro al vacío de tambor giratorio, con descarga de cuchilla. (Perry, 1992).





6. *Evaporación del extracto:*

- Evaporador de película descendente (**Figura 80**), de múltiples efectos continuo. En este tipo de equipo se alimenta el líquido por la parte superior de los tubos y fluye hacia abajo por las paredes, en forma de una película. Por lo común, la separación del vapor y el líquido tiene lugar en el fondo. La caída de presión a través de los tubos suele ser muy pequeña y la temperatura de ebullición del líquido es sustancialmente la misma que la del cabezal de vapor. El evaporador de película descendente se utiliza mucho para la concentración de materiales sensibles al calor, puesto que el tiempo de retención es muy pequeño, el líquido no se calienta en exceso al pasar por el evaporador y los coeficientes de transferencia de calor son elevados, incluso a temperaturas bajas de ebullición. Además cuentan con ventajas de bajos costos, superficie amplia de calentamiento, necesidad de poco espacio. El principal problema que presentan estos evaporadores de tubos largos es la distribución del material de alimentación de los tubos. Resulta esencial que todas las superficies de los tubos estén mojadas continuamente para evitar problemas de recalentamiento y formación de escamas y esto se puede lograr con recirculación del líquido. Otra desventaja es la necesidad de espacio vertical elevado. El material más apropiado para productos alimenticios es el acero inoxidable pulido. Los evaporadores pueden arreglarse en múltiples efectos, en alimentación paralela (producto y vapor pasan paralelamente de un efecto a otro) o inversa (contracorriente), para economizar el consumo de energía y elevar la superficie de evaporación. Según el material a evaporar y la disponibilidad de vapor se podrá calcular el número de efectos necesarios y el mejor sistema de aprovechamiento del vapor. Además se logra una mayor eficiencia en la evaporación si se adiciona previamente un intercambiador de precalentamiento, el cual puede utilizar el vapor de agua condensado de los evaporadores.

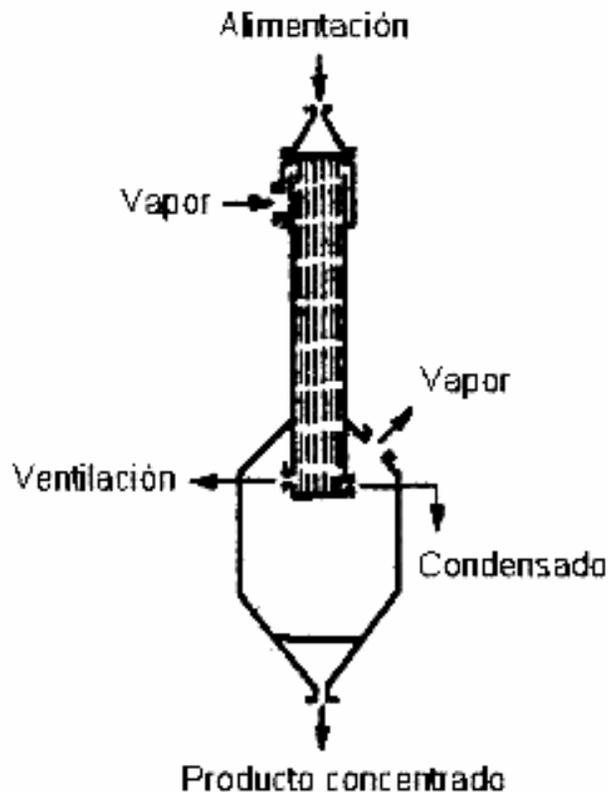
Se requeriría una capacidad de evaporación 20000Kg/día (1250Kg/h) de solución, hasta lograr una disminución a 50% de sólidos en el extracto concentrado. Además, al tratarse de un producto termosensible, el cual no debería superar temperaturas de 40°C, se requeriría la utilización de vacío para disminuir la temperatura de ebullición.

- Tanque pulmón de ingreso de extracto al evaporador, 200 litros.



- Tanque de extracto concentrado, 5000litros.

Figura 80. Evaporador de película descendente. (Perry, 1992).



7. *Secado del extracto:*

- Secador spray o por aspersion. En general consta de una cámara cilíndrica grande, vertical, en la cual el material que se va a desecar se atomiza en forma de pequeñas gotitas y dentro de la cual se alimenta un gran volumen de gas caliente para lograr la evaporación del líquido de las gotitas. La transferencia de calor y de masa se logran mediante el contacto directo del gas caliente con las gotitas dispersadas. Después de la desecación, el gas enfriado y los sólidos se separan. Esto se logra de un modo parcial en la base de la cámara de desecación. Un esquema típico de secador con atomizador



de disco en corriente paralela se muestra en la **Figura 81**. Este tipo de secador requiere generalmente un ciclón recolector de finos acoplado a la salida del aire húmedo. Las partículas finas pueden ser recuperadas y adicionadas al producto seco final o reinsertadas en la alimentación del líquido concentrado, para obtener una granulometría mayor del producto. Estos equipos se utilizan principalmente para productos sensibles a la temperatura, como leche, jugos, pigmentos, etc. Existen diferentes arreglos de los equipos secadores, acoplados a ciclones, vibrofluidizadores y transporte neumático. Los vibrofluidizadores son secadores de sólido de lecho fluido, que cumplen la función de completar la desecación del sólido obtenido del secador por aspersión, permiten mejorar la eficiencia de secado con menores temperatura de aire aplicado. En la **Figura 82** se observa una instalación típica de secador por atomización (de disco) con un enfriador neumático del producto. En la **Figura 83** se observa un esquema que incluye un secador spray, un vibrofluidizador y un ciclón de recuperación de finos.

Para el diseño de estos equipos es necesario conocer las siguientes variables:

1. La forma y el tamaño de partículas que se busca en el producto.
2. Las propiedades físicas en la alimentación: humedad, viscosidad, densidad, etc.
3. Las temperaturas máximas de gas de entrada y el producto.

De todas formas para conocer en exactitud el comportamiento del producto, las dimensiones, y condiciones temperatura se requieren ensayos a escala piloto-industrial.

Para nuestro producto las temperaturas máximas de aire no deberían superar los 80-90°C, preferiblemente al vacío, teniendo en cuenta la presencia de etanol en la solución y para evitar el deterioro de los compuestos fenólicos.

La capacidad de secado se calculó en 1200litros/día extracto líquido, 600Kg/día de extracto seco.

- Tanque pulmón de ingreso de extracto concentrado al secador, 100 litros.
- Silo de almacenamiento de extracto seco, capacidad 2000Kg, aprox. 1m³.



Figura 81. Secador spray, con atomizador de disco, corriente paralela (Perry, 1992)

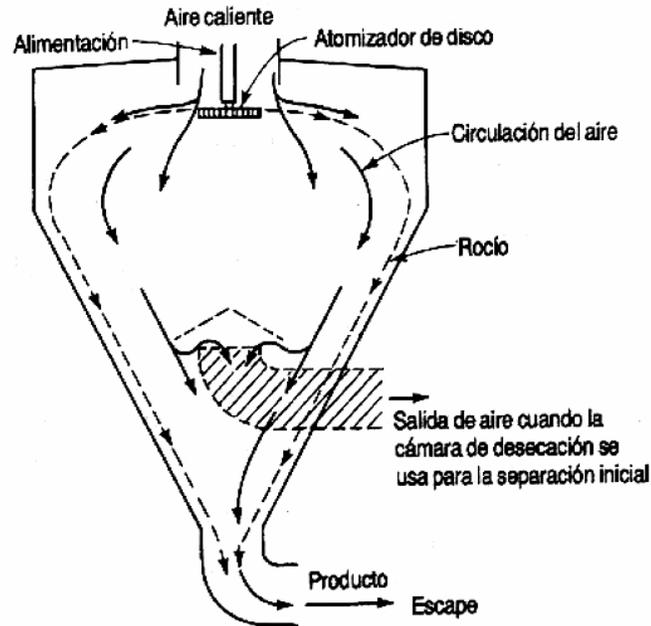


Figura 82. Instalación típica de un secador de rocío (del tipo de disco), incluyendo enfriador neumático del producto (Perry, 1992)

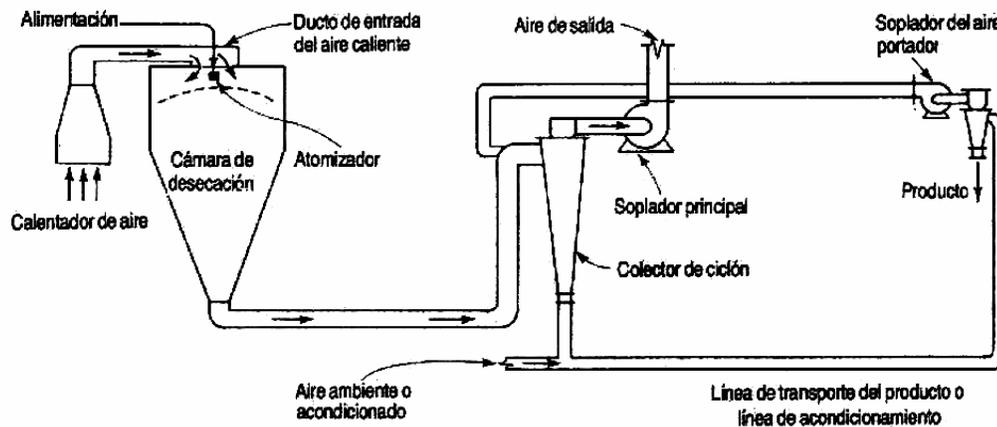
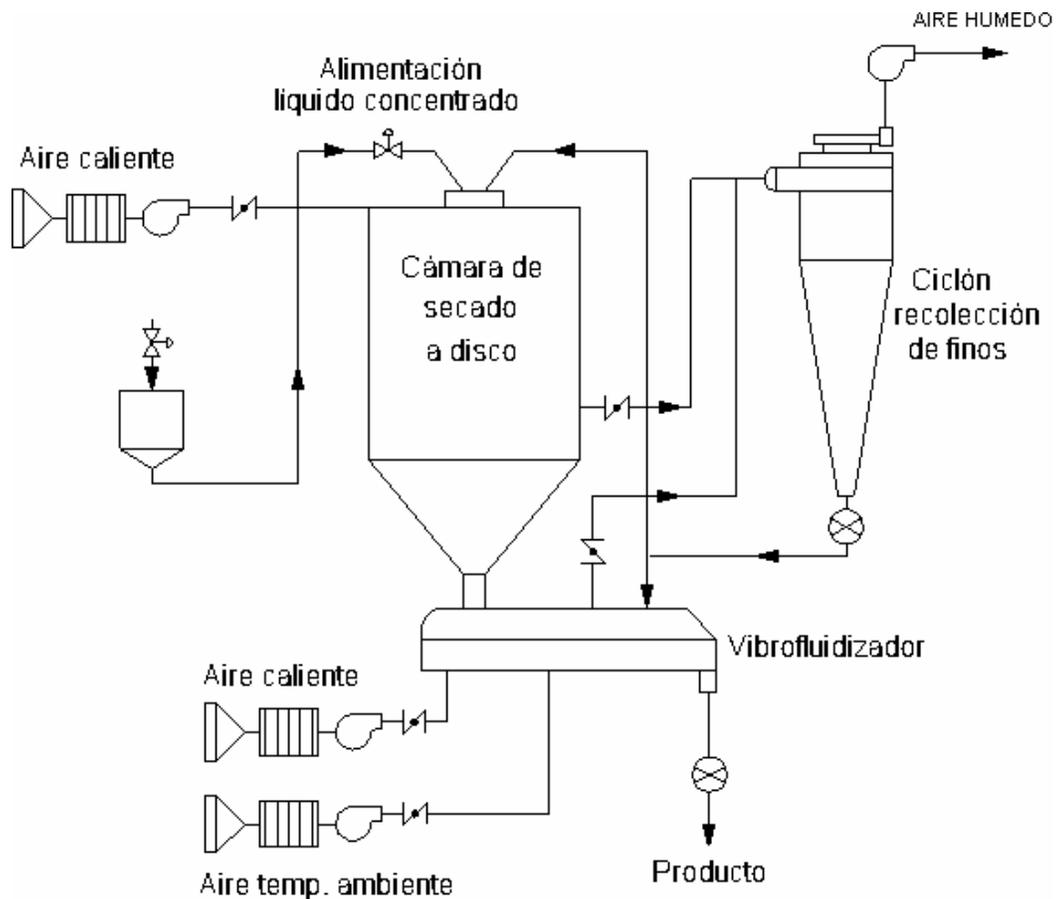




Figura 83. Esquema de secador spray con ciclón de recolección de finos y vibrofluidizador



8. *Envasado:*

- De acuerdo al tipo de producto sensible al aire, luz y temperatura, se preferirían envases herméticos, impermeables al O₂. Esos pueden ser bolsas de papel con capas múltiples, película de aluminio y polietileno. El envasado puede realizarse en vacío o por inyección de nitrógeno.

Existen en el mercado diferentes tipos de envasadoras o llenadoras de bolsas por gravedad, para este tipo de producto y envase. La velocidad de llenado, forma de pesado y sellado de la bolsa dependerá del tamaño de las bolsas y la exactitud en peso que se pretenda, lo cual también influirá en el costo final del equipamiento.



La máquina llenadora debería contar con una capacidad de llenado y sellado de capacidad 600Kg/día de extracto seco. Considerando bolsas de 5 Kg, la velocidad requerida sería de 120 bolsas por día (8 bolsas/h).

- Depósito de producto terminado: se requerirá un espacio físico destinado al almacenamiento del producto terminado envasado.

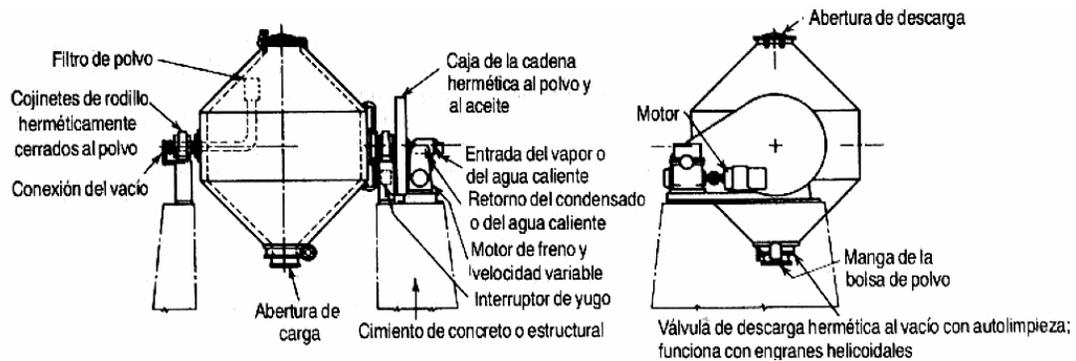
➤ **Otros procesos:**

1. *Desolventización del tegumento extraído:* Un equipo secador posiblemente aplicable para este tipo de producto es el secador rotatorio al vacío (contacto indirecto, por lotes), porque se busca la recuperación del solvente. El secador más simple de este tipo es el de doble cono, esquematizado en la **Figura 84**. Las paredes inclinadas de los conos permiten vaciar rápidamente los sólidos. El calor se suministra por circulación de agua caliente o vapor por un encamisado que rodea al casco. En algunos diseños se utilizan tubos o serpentines de placa internos para proporcionar una superficie de calentamiento adicional. El vacío se aplica y mantiene por cualquiera de los métodos tradicionales (chorros de vapor, bombas de vacío, etc.), para mantener temperaturas bajas de evaporación cuando el producto es sensible a la temperatura, cuando existe peligro de explosión o cuando se quiere recuperar el solvente. Sin embargo no siempre resulta económico reducir la presión interna a niveles extremadamente bajos (menores a 5mm Hg).

La capacidad calculada para este equipo sería de aproximadamente 12000Kg/día material sólido humedecido o 10000kg/día de solvente evaporado.



Figura 84. Secador rotatorio al vacío de doble cono (*Stokes Equipment Division, Pennwalt Corp., Perry, 1992*)



2. *Recuperación del solvente*: la recuperación del solvente puede realizarse por condensación de los vapores de solvente provenientes de las operaciones de evaporación del extracto y secado del extracto y tegumento agotado. Existen diferentes diseños de condensadores, en general pueden ser intercambiadores de calor, que utilicen agua refrigerada o proveniente de pozo (10°C). Un equipo común es el intercambiador de tubo y coraza, en donde el agua refrigerante circula por la coraza, y el vapor del solvente a condensar por los tubos.

La capacidad calculada para este intercambiador de calor sería de aproximadamente 28.000litros/día, estimando una recuperación del 90% del solvente.

El solvente condensado se podría reformular para su utilización en la extracción.

3. *Transporte del tegumento seco*: cintas transportadoras. Capacidad 4000Kg/día, 250Kg/h. Longitud de acuerdo a las distancias recorridas.
4. *Transporte del tegumento humedecido*: cintas transportadoras aisladas. Capacidad 12000kg/día, 750Kg/h.
5. *Transporte de solventes*: bombas centrífugas a prueba de solventes, de fugas y explosión. Cañerías aisladas antiexplosión, acero inoxidable.
6. *Transporte de polvos neumático*, capacidad 600Kg/día (37.5Kg/h) de extracto seco.



Todos las partes de los equipos en contacto con el extracto deberán ser de acero inoxidable, y los mecanismos aislados y a prueba de explosión.

Los tegumentos finos y agotados secos se pueden juntar y almacenar hasta su procesamiento como alimento para ganado.

➤ **Servicios auxiliares:**

1. *Tratamiento de agua:* El agua proveniente de pozo tendría dos aplicaciones:
 - a. Agua para solvente de extracción y producción de vapor: aproximadamente 20.000litros/día de agua requerirían un ablandamiento en torres de intercambio iónico (catiónica y aniónica). Almacenamiento en tanque de 50000litros para el agua de solvente, y en tanques pulmón de 5000litros de agua para caldera, para el agua tratada y el agua recirculada del condensador.
 - b. Agua para limpieza en general y consumo: No requiere tratamiento especial, solo control de carga microbiana. En el caso de que se sobrepase el límite aceptable se podrá tratar con cloro.
Almacenamiento en tanque cisterna de agua potable de 150000 litros de capacidad, y 1 tanques de reserva de 20000 litros, para abastecer toda la planta, refrigeración, servicios de limpieza, sanitarios, etc.
2. *Limpieza de equipos:* mediante sistema CIP. Se requerirían 3 tanques con: sosa cáustica, ácido nítrico y agua, de 1000 litros de capacidad. Intercambiador tubular de calor y bombas centrífugas para el calentamiento y transporte de las sustancias de limpieza.
3. *Calderas*
La caldera se requiere para la producción de vapor utilizado en las etapas del proceso que signifiquen tratamiento térmico como calentamiento y evaporación, y para la limpieza y esterilización de los equipos.



Una caldera muy común de uso industrial es la de tipo humotubular, de tres pasos, a base de combustión de gas natural (calor liberado: 630800 W/m^2 y consumo de $5 \text{ m}^3/\text{h}$), con recirculado del agua condensada, para economizar agua limpia. Capacidad de producción de vapor estimada: $15 \text{ m}^3/\text{h}$ a 10 Kg/cm^2 de presión. Capacidad calórica de 2.000 kcal/h .

El agua a ser utilizada en la caldera debe ser ablandada para evitar problemas de incrustaciones y recalentamientos. Los límites recomendados para los constituyentes del agua que se usa en caldera son: Sólidos disueltos 3500 ppm , alcalinidad 700 ppm , dureza 0 , sílice 100 ppm , turbidez 175 ppm , aceite 7 ppm , fosfatos residuales 140 ppm .

Accesorios: válvula de retención, tablero eléctrico, manómetro, control de nivel, electrobomba, etc.

Requisitos de espacio aproximado: 50 m^2 .

4. *Tratamiento de aire*

Para las etapas de secado por aspersión, y para el funcionamiento de los transportes neumáticos de polvos, cierre neumático de válvulas en las etapas de producción, y envasado, se requiere aire comprimido y filtrado.

Para válvulas neumáticas, y envasadora se utiliza aire comprimido, y no es necesario filtrarlo.

Se estima una necesidad de 1000 litros/h de aire comprimido, para lo cual se requeriría un compresor de 10 HP .

A la salida de los compresores se ubicarán filtros de aire para evitar el paso de lubricantes, y partículas finas.

Para el calentamiento del aire para las etapas de secado se puede emplear un calentador de aire, a gas natural.



2.3.3. Cálculo de las áreas de la planta

En la **Tabla 33** se realizaron estimaciones de las áreas necesarias para cada etapa de producción.

Tabla 33. Areas aproximadas de la planta

AREAS	m ² aproximados	Observaciones
1. ALMACENAMIENTO tegumento de maní	9	En zona cercana a la entrada planta de producción, a fin de evitar largos tramos de cintas transportadoras. Con espacio suficiente para movimiento de personas.
2. ALMACENAMIENTO SOLVENTES Y SOLUCIONES	20	Fuera de la planta, a distancia adecuada, con sistema de seguridad antiexplosión.
3. TRITURADO	4	Los equipos están distanciados de modo de facilitar el acceso a personas, su limpieza y armado.
4. TAMIZADO	9	
5. LIXIVIACION	30	
6. FILTRACION	9	
7. EVAPORACIÓN	40	Equipos instalados con espacio para acceso a personas. Provisto de escaleras, para el acceso a las zonas altas.
8. SECADO	50	Área separada del resto por paredes y restringido acceso a personas no autorizadas. Provisto de lugar para acceso a personas, con escaleras y plataformas.
9. ENVASADO	16	Suficiente espacio para operarios.
10. OTROS PROCESOS Desolventizado Condensador solvente TOTAL	10 20 30	Los equipos están distanciados de modo de facilitar el acceso a personas, su limpieza y armado.
11. ALMACENAMIENTO DE PRODUCTO	30	Calculado para el traslado de mercadería, y circulación de montacargas.
12. LIMPIEZA 3 Tanques 1 intercambiador tubular TOTAL	10 5 15	Los tanques están al aire libre, cerca de la planta, separados de los silos de leche, marcada la zona con cerco y carteles de precaución.
13. SERVICIOS AUXILIARES Caldera Hornos de aire Compresores Tratamiento de agua TOTAL	20 15 20 20 90	Habitaciones separadas de la planta, por seguridad. Horno, cerca del área de secado.
14. OFICINAS: Producción y Laboratorio	30	Oficina de producción y laboratorio, dentro de la planta de elaboración.
15. SANITARIOS	25	Fuera de la planta de producción.
16. MANTENIMIENTO	20	Anexa a la planta, a fin de facilitar en traslado de equipos, etc.
17. DEPOSITO DE AGUA	45	Zona cercana a la planta de producción y tratamiento de agua.
TOTAL	472	



2.3.4. Distribución de la planta

El proceso es continuo y se debería tener en cuenta el criterio de que no se crucen corrientes de producto elaborado con materias primas, es decir que la ubicación de las áreas debería ser tal que la materia prima ingrese por un extremo y salga el producto final por el otro.



2.4. Organización de la empresa

En la **Tabla 34** se detalla el personal estimado para la empresa. Primeramente se determinó el número de personas que integrarían el personal total necesario para este proceso dentro de la empresa. La gerencia general, administración y ventas pueden descontarse en el caso que la empresa ya tenga personal asignado a esas tareas.

Tabla 34. Personal necesario para la empresa.

AREA	N° PERSONAS		CARGO	CAPACITACIÓN
	Por turno	total		
1. GERENCIA GENERAL				
Gerencia general	1	1	Gerente gral.	Ing. Químico
Secretaría	1	1	Secretaria	Nivel terciario
TOTAL		2		
2. PRODUCCIÓN				
▪ GERENCIA	1	1	Gerente Prod.	Ing. Químico
▪ PRODUCCIÓN				
Supervisión	1	1	Supervisor	Ing. Qco o Industrial.
Operación	1	2	Operario	Secundario Completo
Envasado	1	2	Operario	Secundario Completo
Laboratorio y Aseguramiento de Calidad	1	1	Laboratorista	Técnico qco. o Bromat.
Mantenimiento	1	1	Técnico	Técnico
TOTAL		8		
3. ADMIN. Y VENTAS				
▪ GERENCIA	1	1	Gerente	
▪ REC. HUMANOS	1	1	Encargado	Licenciado Adm. Emp.
▪ DPTO. CONTABLE				
Contaduría y Finanzas	1	1	Contador	Contador Público
▪ VENTAS				
Comercialización y atención al cliente	1	1	Encargado	Licenciado Adm. Emp.
▪ COMPRAS	1	1	Encargado	Ingeniero
TOTAL		5		
TOTAL DE EMPLEADOS		15		



2. ESTUDIO ECONOMICO

2.1. Análisis de la inversión inicial

La inversión Inicial se define (Baca Urbina, 1995) como la suma de:

- Inversión fija: Activos Tangibles
 Activos Intangibles
- Capital de trabajo

➤ **Inversión Fija:** En la **Tabla 35** se detalla la inversión fija necesaria en equipos, montaje e instalación, muebles y útiles (Activos tangibles). Los datos fueron estimados y obtenidos de bibliografía o empresas proveedoras de equipos industriales.

➤ **Activos Intangibles:** En la **Tabla 36** se detallan los activos intangibles estimados.

➤ **Capital de Trabajo**

El capital de trabajo se calcula como la diferencia entre el Activo circulante y el Pasivo Circulante:

- **ACTIVO CIRCULANTE (AC)**

El activo circulante está compuesto por:

1. Inventarios
2. Cuentas a Cobrar
3. Caja y Bancos: 10% de los inventarios y cuentas a cobrar



1. Inventarios

	<i>Stock de trabajo</i>	<i>Costo unitario</i> (U\$S)	<i>Costo total</i> (U\$S)
<i>Materia prima (1 día):</i>			
Tegumento	4000 Kg	0.023	92
Etanol	19317 Kg	0.371	7163
 <i>Producto en proceso</i> <i>(1 día):</i>			
Extracto del lixiviador	19819 Kg	4.13	81865
 <i>Producto terminado</i> <i>(10 días):</i>			
	5893 Kg	5.47	32238
<i>Total inventarios (U\$S)</i>			121358

2. Cuentas a Cobrar

Se calculan como el monto de venta diario multiplicado por el período promedio de recuperación (ppr). Para nuestro caso se estimarán ventas a 30 días (ppr = 30 días).

$$\text{Cuentas a cobrar} = ((589.3 \text{ kg/día} \times 5.47\text{U\$S/Kg}) \times 30 \text{ días}) = \text{U\$S } 96713$$

3. Caja y Bancos

Se calcula como el 10% de los Inventarios + Cuentas a cobrar = **U\\$S 12895**

TOTAL ACTIVO CIRCULANTE = U\\$S 230965

▪ PASIVO CIRCULANTE (PC)

La Tasa Circulante se calcula como: $TC = AC / PC$. Generalmente para las industrias la TC es de 2.5.

$$\text{Pasivo Circulante} = \text{Activo circulante} / 2,5 = \text{U\$S } 92386$$



- **CAPITAL DE TRABAJO = AC – PC = US\$ 138579**

En la **Tabla 37** se detalla la inversión Inicial Total estimada para este tipo de planta industrial.

Para cubrir las erogaciones en concepto de inversión fija total y por capital de trabajo, consideramos que la totalidad del capital requerido será aportada por los accionistas; debido a esto no consideraremos los costos financieros.

**Tabla 35.** Inversión Fija estimada en Activos Tangibles.

CONCEPTO	Nº de equipos	U\$S por equipo	Costo total U\$S	
MAQUINARIAS				
Trituradora	1	30000	30000	
Zaranda	1	10000	10000	
Lixiviador continuo	1	200000	200000	
Tanque etanol	50000litros	2	10000	20000
Tanque agua	50000litros	1	10000	10000
Tanque solvente mezcla	50000litros	1	10000	10000
Tanque extracto diluido	50000litros	1	10000	10000
Filtro rotativo (área filtrante 12m ²)	1	100000	100000	
Evaporador	1	200000	200000	
Tanque pulmón	200litros	2	200	400
Tanque extracto conc.	5000litros	1	1000	1000
Secador spray/ciclón/transp. neumático	1	300000	300000	
Silo extracto seco	1m ³	1	15000	15000
Envasadora	1	15000	15000	
Tratamiento agua	1	5000	5000	
Desolventizador	1	200000	200000	
condensador solvente	1	15000	15000	
Bombas	aprox. 20	200	4000	
Ventiladores	2	1000	2000	
Cintas transportadoras	3	20000	60000	
Caldera	1	20000	20000	
Compresores	1	15000	15000	
Horno aire	1	10000	10000	
Sistema CIP	1	7000	7000	
Sistema de vacío	1	30000	30000	
Equipos de laboratorio	varios	100000	100000	
Cañerías y válvulas		150000	150000	
Total maquinarias			1539400	
MONTAJE E INSTALACION (10% de los equipos)			153940	
OBRA CIVIL				
Planta	500 m ²	250/m ²	125000	
Oficinas	50 m ²	400/m ²	20000	
Terreno	10000 m ²	4/m ²	40000	
Total Obra Civil			185000	
MUEBLES Y UTILES				
varios			15000	
vehículos			20000	
Total muebles y útiles			35000	
SUBTOTAL			1913340	
EXTRAS	1% del sub-total		19133	
TOTAL			1932473	

**Tabla 36.** Inversión Fija estimada en Activos Intangibles

CONCEPTO	% de los act. tangibles	COSTO (US\$)
Planeación e integración del proyecto	1%	19325
Ingeniería del proyecto	5%	96624
Capacitación al personal	1%	19325
Costo de puesta en marcha	5%	96624
Imprevistos	3%	57974
TOTAL	15%	289871

Tabla 37. Inversión Inicial Total estimada en US\$

INVERSION FIJA	Activos tangibles	1932473
	Activos intangibles	289871
	TOTAL	2222344
CAPITAL DE TRABAJO		138579
INVERSION INICIAL TOTAL (US\$)		2360923



3.a. Análisis de costos

COSTOS DE PRODUCCION

En la **Tabla 38** se detallan los costos de producción estimados para un año de producción.

De esta tabla se encontró que el valor del costo directo unitario fue de 4.13 U\$/kg de producto, mientras que el costo total unitario fue de 5.47 U\$/kg. Estos valores fueron inferiores a los precios de mercado de los antioxidantes sintéticos formulados como el TBHQ (10 U\$/kg), y naturales como los tocoferoles (70 U\$/kg).

Los **costos totales de producción** se calcularon como la suma de los costos directos y los costos indirectos de producción.

Los costos de **materia prima** se calcularon a partir de los balances de masa de la **Figura 74**. Los costos se estimaron por el precio de mercado de las materias primas.

El consumo de **gas natural** se estimó de la siguiente forma:

- caldera: consumo 25m³/h
- Calentador de aire: consumo 20m³/h
- Extras: 5m³/h.

Consumo Total: 50m³/h x 16 h/día x 24 día/mes x 11meses/año = 211200m³/año.

Costo aproximado del gas incluyendo impuestos, es de U\$ 0.15 m³.

Costo: U\$ 31680/año.

La **energía eléctrica** necesaria se determinó de acuerdo a la **Tabla 39**.

La **mano de obra de producción directa e indirecta** se calcularon en la **Tabla 40**.



Las **depreciaciones y amortizaciones** se calcularon de acuerdo a las siguiente tasas:

- Edificios: amortización en 50 años, 2% anual.
- Máquinas y equipos grandes: amortización en 25 años, 4% anual.
- Máquinas y equipos chicos: en 10 años, 10% anual.
- Vehículos: amortización en 5 años, 20% anual.
- Activos intangibles: amortización en 10 años, 10% anual.
- Muebles y Utiles: amortización en 5 años, 20% anual.

En la **Tabla 41** figura un esquema de las amortizaciones proyectadas.

**Tabla 38.** Presupuesto de costos de producción anual

CONCEPTO	CANTIDAD	PRECIO (US\$)/ cantidad	COSTO ANUAL (US\$)
Producción extracto kg/año	155574		
<u>COSTOS DIRECTOS</u>			
MATERIA PRIMA			
tegumento, kg/AÑO	1056000	0.023	24288
etanol Kg/año	5795059	0.371	2148845
(-) recuperación 90% etanol	-5215553	0.371	-1933961
TOTAL Materia Prima			239173
EMBALAJE			
“big-bags”	2112	25	52800
Envase x 5Kg, unidades/año	360000	0.4	144000
TOTAL embalaje			196800
COMBUSTIBLE			
Gas natural (m ³ /año)	211200	0.15	31680
ELECTRICIDAD			
Consumo (Kw/año)	912764		
Extras (15% consumo)	136915		
Total (Kw/año)	1049679	0.13	136458
MANO DE OBRA DIRECTA			19200
OTROS (1% de los equipos)			19325
TOTAL COSTOS DIRECTOS			642635
COSTO DIRECTO UNITARIO (US\$/Kg producto)			4.18
<u>COSTOS INDIRECTOS</u>			
MANTENIMIENTO (1% equipos)			19325
MANO DE OBRA INDIRECTA			32400
SEGUROS E IMPUESTOS (1% inv. fija)			19325
RENTAS (limpieza)			24000
DEPRECIACIONES Y AMORTIZACIONES			111323
SUBTOTAL COSTOS INDIRECTOS			206373
OTROS (1% costos indirectos)			2064
TOTAL COSTOS INDIRECTOS			208436
TOTAL COSTOS DE PRODUCCION			851072
COSTOS DE PRODUCCION UNITARIO (US\$/Kg producto)			5.47

**Tabla 39.** Consumo de energía eléctrica estimado

CONCEPTO	Consumo Kw/h	Costo (U\$S/h)	Costo (U\$S/año)
Precio aproximado = 0.13 U\$S/Kw			
Bombas	23		
Trituradora	10		
Zaranda	11		
2 Ventiladores	10		
Compresor	11		
Lixiviador	23		
Filtro rotativo	15		
Secador	4		
Bombas de vacío	45		
Desolventizador	15		
Calentador de aire	15		
Envasadora	30		
Alumbrado p/500m2 (10W/m2)	5		
SUBTOTAL	216		
Extras 15% del subtotal	32		
TOTAL Kw/h	249	32	136458

Tabla 40. Costos de mano de obra de producción

MANO DE OBRA	N° DE PUESTOS	SUELDO MENSUAL(U\$S) *	SUELDO TOTAL ANUAL (U\$S) *
DIRECTA			
Operarios produc.	2	300	3600
Operarios envase	2	300	3600
Laboratoristas	1	400	4800
SUBTOTAL	5		19200
INDIRECTA			
Gerente de prod.	1	1500	18000
Superv. de planta	1	800	9600
Técnicos mantenim.	1	400	4800
SUBTOTAL	3		32400
TOTAL	8		51600

* Incluye el 30% de las prestaciones



Tabla 41. Detalle de Depreciaciones y Amortizaciones de Bienes Tangibles e Intangibles.
Período de trabajo estimado para 10 años.

Período	Edificios	Máq. y Equipos Grandes	Máq. y Equipos Chicos	Muebles y Útiles	Activos Intangibles	Terreno	TOTAL
VALOR*	145000	1358400	181000	35.000	289871	40000	2009271
Tasa deprec. anual	2%	4%	10%	20%	10%	---	
año 1	2900	54336	18100	7000	28987	-----	111323
año 2	2900	54336	18100	7000	28987	-----	111323
año 3	2900	54336	18100	7000	28987	-----	111323
año 4	2900	54336	18100	7000	28987	-----	111323
año 5	2900	54336	18100	7000	28987	-----	111323
año 6	2900	54336	18100	0	28987	-----	104323
año 7	2900	54336	18100	0	28987	-----	104323
año 8	2900	54336	18100	0	28987	-----	104323
año 9	2900	54336	18100	0	28987	-----	104323
año 10	2900	54336	18100	0	28987	-----	104323
VALOR RESIDUAL	116000	815040	0	0	0	40000	971040

* Valor detallado en Tabla de Inversión Fija

COSTOS ADMINISTRATIVOS

Los costos de administración se calculan como la suma de la mano de obra administrativa, gastos de administración y ventas (estimados como el 7% de lo facturado) y gastos generales.

En la **Tabla 42** se detalla la mano de obra administrativa.

Se estimaron 10000 U\$S/año de gastos generales, los cuales incluyen viajes, capacitación del personal, etc.



En caso de que se decida vender el producto, el precio podría fijarse en 10U\$\$/kg, con lo cual el ingreso por ventas anual sería de 1555739 U\$\$. En este caso los gastos de administración y ventas serían de 108902 U\$\$/año, en donde se incluyen publicidad, transporte, almacenamiento y distribución. Con esto, los costos administrativos anuales llegarían a 230502 U\$\$/año, y el costo unitario sería de 1.48 U\$\$/kg. Es decir que el costo total del producto ascendería a 6.95 U\$\$/Kg.

Tabla 42. Costos de mano de obra administrativa

MANO DE OBRA	N° DE PUESTOS	SUELDO MENSUAL(U\$) *	SUELDO TOTAL ANUAL (U\$) *
Gerente general	1	3000	36000
Secretaria gerencia	1	800	9600
Gerente de Admin. y Vtas.	1	1500	18000
Recursos Humanos	1	1000	12000
Contable y Finanzas	1	1000	12000
Ventas	1	1000	12000
Compras	1	1000	12000
TOTAL	7	9300	111600

* Incluye el 30% de las prestaciones

En las **Tablas 43 y 44** se detallan los costos de producción y administrativos, respectivamente, para el período de producción de 10 años.

COSTOS VARIABLES Y COSTOS FIJOS

Los costos de producción y administrativos pueden clasificarse también en costos fijos y costos variables. Los costos fijos son independientes del volumen de la producción, mientras que los costos variables dependen de este volumen.

En la **Tabla 45**, se detallan los costos, discriminados entre costos variables y fijos.

**Tabla 43.** Costos de Producción, período de trabajo de 10 años

CONCEPTO	año 1	año 2	año 3	año 4	año 5	año 6	año 7	año 8	año 9	año 10
VOLUMEN PRODUCCION (kg)	155574	155574	155574	155574	155574	155574	155574	155574	155574	155574
COSTOS DIRECTOS										
MATERIA PRIMA										
tegumento	24288	24288	24288	24288	24288	24288	24288	24288	24288	24288
Envase	196800	196800	196800	196800	196800	196800	196800	196800	196800	196800
Solvente	214885	214885	214885	214885	214885	214885	214885	214885	214885	214885
COMBUSTIBLE	31680	31680	31680	31680	31680	31680	31680	31680	31680	31680
ELETRICIDAD	136458	136458	136458	136458	136458	136458	136458	136458	136458	136458
MANO OBRA DIRECTA	19200	19200	19200	19200	19200	19200	19200	19200	19200	19200
OTROS	19325	19325	1925	1925	1925	19325	19325	19325	19325	19325
TOTAL CTS. DIRECTOS (US\$)	642635									
COSTOS INDIRECTOS										
MANTENIMIENTO	19325	19325	19325	19325	19325	19325	19325	19325	19325	19325
MANO OBRA INDIRECTA	32400	32400	32400	32400	32400	32400	32400	32400	32400	32400
SEGUROS E IMPUESTOS	19325	19325	19325	19325	19325	19325	19325	19325	19325	19325
RENTA limpieza	24000	24000	24000	24000	24000	24000	24000	24000	24000	24000
DEPREC. Y AMORTIZAC.										
Edificios	2900	2900	2900	2900	2900	2900	2900	2900	2900	2900
Máquinas y Equipos Grandes	54336	54336	54336	54336	54336	54336	54336	54336	54336	54336
Máq y Eq Chicos	18100	18100	18100	18100	18100	18100	18100	18100	18100	18100
Muebles y Utiles	7000	7000	7000	7000	7000	0	0	0	0	0
Activos Intangibles	28987	28987	28987	28987	28987	28987	28987	28987	28987	28987
OTROS	2064	2064	2064	2064	2064	2064	2064	2064	2064	2064
TOTAL CTS. INDIRECTOS (US\$)	208436	208436	208436	208436	208436	201436	201436	201436	201436	201436
TOTAL COSTOS PROD. (US\$)	851072	851072	851072	851072	851072	844072	844072	844072	844072	844072
COSTO UNITARIO (US\$/Kg)	5.47	5.47	5.47	5.47	5.47	5.43	5.43	5.43	5.43	5.43

**Tabla 44.** Costos de Administración, período de trabajo de 10 años

CONCEPTO	año 1	año 2	año 3	año 4	año 5	año 6	año 7	año 8	año 9	año 10
Volumen producción (Kg)	155574									
Mano Obra administrativa	111600	111600	111600	111600	111600	111600	111600	111600	111600	111600
Gs. Generales	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
Gs. de Ventas y distribución	108902	108902	108902	108902	108902	108902	108902	108902	108902	108902
COSTO TOTAL ADMIN. Y VTAS. (US\$)	230502									
COSTO UNITARIO (US\$/KG)	1.48									
COSTO UNITARIO TOTAL (US\$/Kg)	6.95	6.95	6.95	6.95	6.95	6.91	6.91	6.91	6.91	6.91

**Tabla 45.** Presupuesto de Costos Variables y Fijos, período de trabajo de 10 años

CONCEPTO	año 1	año 2	año 3	año 4	año 5	año 6	año 7	año 8	año 9	año 10
VOLUMEN PRODUCCION (Tn)	155574	155574	155574	155574	155574	155574	155574	155574	155574	155574
COSTOS FIJOS										
MO directa	19200	19200	19200	19200	19.200	19200	19200	19200	19200	19.200
MO indirecta (prod. y admin.)	144000	144000	144000	144000	144000	144000	144000	144000	144000	144000
Amortizaciones	111323	111323	111323	111323	111.323	104323	104323	104323	104323	104323
Mantenimiento	19325	19325	19325	19325	19.325	19325	19325	19325	19325	19.325
Seguros e Impuestos	19325	19325	19325	19325	19.325	19325	19325	19325	19325	19.325
Gs Generales	10000	10000	10000	10000	10.000	10000	10000	10000	10000	10.000
Otros	21388	21388	21388	21388	21.388	21388	21388	21388	21388	21.388
TOTAL CTS. FIJOS (US\$)	344561	344561	344561	344561	344561	337561	337561	337561	337561	337561
COSTOS VARIABLES										
Materia prima										
tegumento	24288	24288	24288	24288	24288	24288	24288	24288	24288	24288
etanol	214885	214885	214885	214885	214885	214885	214885	214885	214885	214885
embalaje	196800	196800	196800	196800	196800	196800	196800	196800	196800	196800
Electricidad	136458	136458	136458	136458	136458	136458	136458	136458	136458	136458
Combustible	31680	31680	31680	31680	31680	31680	31680	31680	31680	31680
Renta limpieza	24000	24000	24000	24000	24000	24000	24000	24000	24000	24000
Gs. De Ventas y Distrib.	108902	108902	108902	108902	108902	108902	108902	108902	108902	108902
TOTAL CTS. VARIABLES (US\$)	737013	737013	737013	737013	737013	737013	737013	737013	737013	737013
TOTAL COSTOS (US\$)	1081.574	1081.574	1081.574	1081.574	1081.574	1074574	1074574	1074574	1074574	1074574
COSTO UNITARIO TOTAL (US\$/kg)	6.95	6.95	6.95	6.95	6.95	6.91	6.91	6.91	6.91	6.91

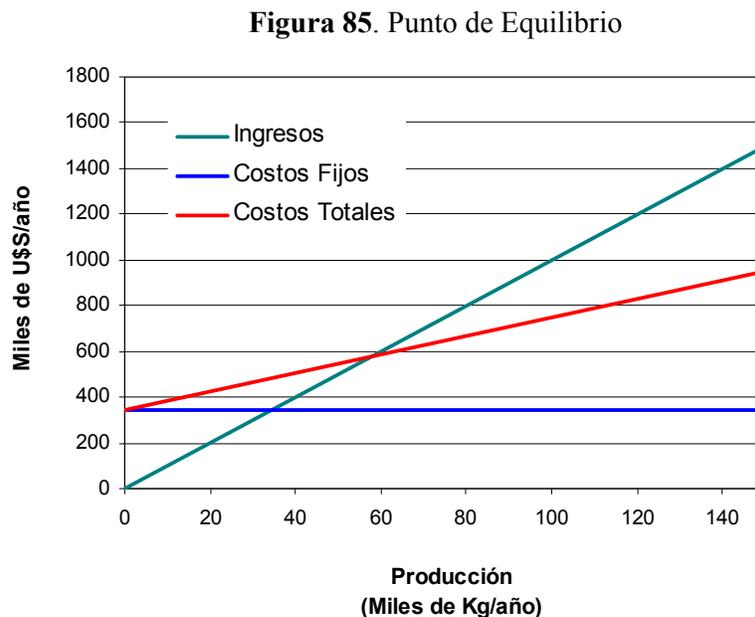
Punto de Equilibrio

El punto de equilibrio se define como el nivel de producción en el que son exactamente iguales los ingresos por ventas y la suma de costos fijos y variables (Baca Urbina, 1995).

La utilidad de su determinación es que se puede calcular la mínima producción a la que debe operarse para no incurrir en pérdidas, sin que esto signifique que haya ganancias suficientes para que el proyecto sea rentable.

El ingreso anual estimado de este proyecto fue de 1555739 U\$\$/año.

En el siguiente gráfico (**Figura 85**) se muestra el punto de equilibrio para la producción, que corresponde a la producción mínima económica.



Según este gráfico el punto de equilibrio fue:

Producción mínima económica = 57.79 Tn/año de extracto

Ingreso por venta = U\$\$ 577936/año = Costo Total.

Estado de resultados

El estado de resultados se define como el análisis de la Utilidad Neta y flujo de fondos netos del proyecto, que son en forma general el beneficio real de la operación de la planta. Se calcula estableciendo la diferencia entre los Ingresos y todos los Costos e Impuestos de la planta. La importancia del estado de resultados es que permite la determinación de los Flujos de Fondos Netos (FFN), que son las cantidades que se usan en la evaluación económica, los cuales mientras mayor sean (en valores positivos), mayor será la rentabilidad económica del proyecto (Baca Urbina, 1995).

La **Tabla 46** muestra los Flujos de fondos netos, considerando el impuesto a las ganancias.

El valor actual del impuesto a las ganancias es de 35% sobre la utilidad bruta (considerando las amortizaciones como costos).

**Tabla 46.** Flujo de Fondos Netos (FFN) considerando el impuesto a las ganancias

CONCEPTO	INV. INICIAL	año 1	año 2	año 3	año 4	año 5	año 6	año 7	año 8	año 9	año 10	VALOR RESIDUAL
Producción total prevista (Kg/año)		155574	155574	155574	155574	155574	15574	155574	155574	155574	155574	
+ Ingresos totales (+ IVA) precio vta. U\$S10/Kg		1555739	1555739	1.555739	1555739	1555739	1555739	1555739	1555739	1555739	1555739	
- Costos Producción (incluye amort.)		851072	851072	851072	851072	851072	844072	844072	844072	844072	844072	
UTILIDAD MARGINAL		704668	704668	704668	704668	704668	711668	711668	711668	711668	711668	
- Costos de Adm. Y Vtas.		230502	230502	230502	230502	230502	230502	230502	230502	230502	230502	
UTILIDAD BRUTA		474166	474166	474166	474166	474166	481166	481166	481166	481166	481166	
- Impuesto a las ganancias (35% utilidad bruta)		165958	165958	165958	165958	165958	168408	168408	168408	168408	168408	
UTILIDAD NETA		308208	308208	308208	308208	308208	312758	312758	312758	312758	312758	
+ Amortizaciones		111.323	111323	111323	111323	111323	104323	104323	104323	104323	104323	
FLUJO DE FONDOS NETO (U\$S)	-2360924	419531	419531	419531	419531	419531	417081	417081	417081	417081	417081	971040

Tiempo de recupero del capital

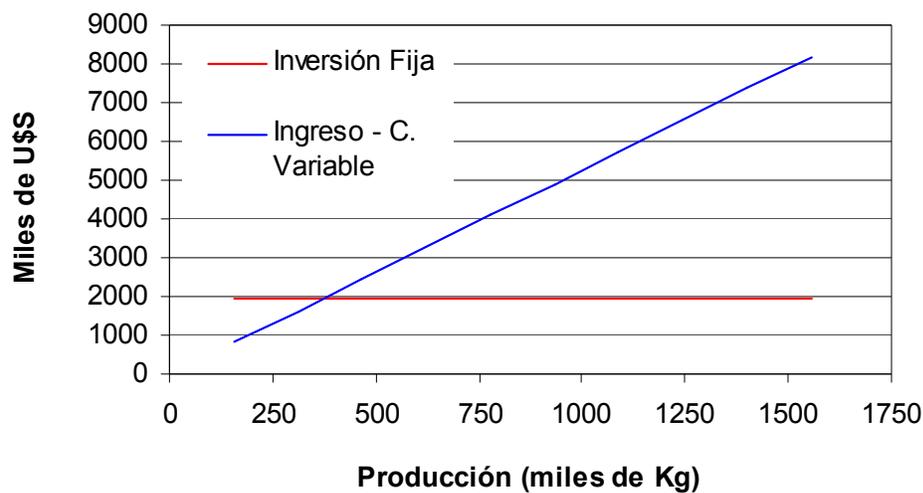
En la **Tabla 47** se resumen los valores acumulados de producción, y los ingresos – costos variables, para el período de 10 años. En la **Figura 86** se graficaron los Ingresos – Costos variables en función del volumen de producción. Según los resultados se observó que se recuperaría el capital invertido en los tres primeros años de producción.

Tabla 47. Tiempo de recupero del capital

VALORES ACUMULADOS	año 1	año 2	año 3	año 4	año 5	año 6	año 7	año 8	año 9	año 10
Producción (Tn)	156	311	467	622	778	933	1.089	1.245	1.400	1.556
Ingresos – Costos Variab.*	819	1637	2456	3275	4094	4912	5731	6550	7369	8187
Inversión fija*	1932	1932	1932	1932	1932	1932	1932	1932	1932	1932

* en miles de U\$\$

Figura 86. Tiempo de recupero del capital



3.b. Evaluación económica del proyecto

Cálculo del valor actual neto (VAN)

El VAN, consiste en descontar o trasladar al presente todos los flujos futuros del proyecto, a una tasa de descuento determinada (o tasa de interés), sumar todas las ganancias y restarlas a la inversión inicial en tiempo cero (Baca Urbina, 1995).

Si el VAN es mayor que cero, se aceptará la inversión, dado que un valor positivo significa ganar la tasa de descuento más el valor positivo del resultado, en términos del valor del dinero en tiempo cero (Baca Urbina, 1995).

$$\text{VAN} = - I_0 + \sum \text{FFN}_n / (1+k)^n$$

I_0 : inversión inicial total

FFN_n : flujo de fondos netos en cada uno de los períodos considerados

n : nº de períodos considerados

k : tasa de oportunidad del capital = 12%, considerado como un valor normal de intereses de financiación.

En el último período considerado se debe sumar al FFN de ese año, el valor residual de la inversión.

Cálculo del VAN considerando el impuesto a las ganancias.

Según los datos de la tabla de los FFN económicos de capítulo anterior, se calcula el VAN de este proyecto (**Tabla 48**).

Tabla 48. Cálculo del VAN del proyecto

	INICIO	año 1	año 2	año 3	año 4	año 5	año 6	año 7	año 8	año 9	año 10
FFNe (miles U\$S)	-2361	420	420	420	420	420	417	417	417	417	1388
k	12%										
VAN	U\$S 283176										

Este resultado indica que el proyecto se podría aceptar, ya que un VAN positivo significa que sería rentable. Es decir que realizando el proyecto aumentará la riqueza de los accionista en U\$S 283.176 a lo largo de los 10 años que abarca el período de estudio.

Cálculo de la tasa interna de rendimiento (TIR)

El TIR es la tasa de descuento que hace que el VAN sea igual a cero; es decir, igual a la suma de los flujos descontados a la inversión inicial (Baca Urbina, 1995).

Para aceptar la inversión, el valor que se obtenga de la TIR debería ser mayor que la tasa de descuento del 12% utilizada para calcular el VAN (Baca Urbina, 1995).

Cálculo del TIR considerando el impuesto a las ganancias.

$$0 = -I_0 + \sum FFN_n / (1+TIR)^n$$

$$I_0 = \sum FFN_n / (1+TIR)^n$$

Reemplazando los datos de los FFN económicos, se despeja la TIR:

$$\boxed{\text{TIR} = 15 \%}$$

Es decir, que la TIR para este proyecto, en estas condiciones de producción, es de un 15%. Este valor supera a la tasa de descuento considerada (12%), pero con poca diferencia, lo que significa que el proyecto es rentable, aunque para aumentar la rentabilidad se podría incrementar el precio del producto.

CONCLUSIONES

En base a los resultados estimados en este capítulo se puede concluir:

- Los antioxidantes del tegumento de maní cuentan con ventajas en cuanto a otros antioxidantes del mercado (naturales y sintéticos), ya que éstos últimos no son producidos en nuestro país, y se deben importar.
- Para una empresa con una capacidad de producción de 4 Tn/día de tegumento, se podría obtener un rendimiento aproximado de 590Kg/día de extracto seco en base a compuestos antioxidantes del tegumento de maní.
- La inversión inicial necesaria para la instalación de una planta, incluyendo los activos tangibles (maquinaria, obra civil, etc.) e intangibles (ingeniería), se podría estimar en alrededor de U\$S 2400000.
- El costo total unitario estimado del producto resultó en 6.95U\$S/kg.
- Si se estima un valor de venta del producto en 10 U\$S/kg, la inversión inicial se recuperaría en 3 años de producción
- En base a los valores positivos obtenidos de VAN y TIR, el proyecto resultaría rentable para un período de producción de 10 años.

CONCLUSIONES
GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

➤ **Composición porcentual del tegumento**

Los componentes mayoritarios (65%) del tegumento lo constituyeron otros componentes diferentes a grasas, proteínas, y cenizas, dentro de los cuales se encuentran los compuestos fenólicos con contenidos entre 12-13%.

➤ **Solvente de extracción**

De acuerdo a los valores de rendimientos de materia seca, fenoles totales y actividad antioxidante de los extractos obtenidos con diferentes solventes, se decidió utilizar la mezcla etanol:agua 70:30 como solvente de extracción, debido a que no es tóxico, extrae bajas cantidades de compuestos lipídicos por lo cual no es necesario deslipidizar el tegumento, y además al contener un alto porcentaje de etanol facilita la filtración, evaporación y recuperación del solvente.

➤ **Identificación de algunos compuestos fenólicos y cuantificación de resveratrol en el tegumento:**

En general se observó la presencia de flavonoides mono y diglicosidados y agliconas y grandes cantidades de proantocianidinas, las cuales pueden ser los responsables de la mayor parte de la actividad antioxidante del tegumento. De la purificación de extractos del tegumento se identificó t-resveratrol, y se lo cuantificó en cantidades de $9.07 \pm 0.72 \mu\text{g}$ resveratrol /g tegumento de maní seco, valor superior a los encontrados en trabajos sobre maní de USA.

➤ **Aplicación de los compuestos antioxidantes sobre alimentos:**

En todas las pruebas de la utilización de los extractos del tegumento de maní sobre alimentos (aceite y productos de maní) se encontró un aumento en la vida útil de los productos, debido a la protección frente a la oxidación por estos compuestos, aunque siempre menor a los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT. Para los productos de maní (recubierto con miel y frito) los antioxidantes naturales agregados no alteraron el aspecto, color, ni la aceptabilidad de los consumidores.

➤ **Proceso de obtención a escala laboratorio:**

Se encontró que no es necesario el deslipidizado del tegumento, y el molido del mismo en un tamaño entre 1-2mm permite el ahorro de solvente. La extracción del tegumento puede realizarse en tres etapas por corriente cruzada, es decir con solvente limpio cada etapa, en una proporción de 20ml solvente/g de tegumento, durante 20 minutos de agitación, a temperatura ambiente. Después de cada etapa de extracción la separación del extracto se realizaría mediante filtración y vacío si fuera necesario. Los extractos filtrados se juntan y evaporan hasta sequedad, en evaporador rotatorio (vacío y 40°C máximo), para evitar polimerizaciones de los compuestos fenólicos. El extracto seco tiene que almacenarse en envases protegidos de la luz, con atmósfera de nitrógeno para evitar oxidaciones o polimerizaciones.

➤ **Proceso de extracción a escala piloto-laboratorio:**

El tamaño de partícula con mejores resultados fue entre 1-2mm. Con el método de extracción en contracorriente se obtuvo un ahorro de solvente 4 veces superior al compararse con el método de corriente cruzada. Si se realiza la extracción por contracorriente, en forma continua para 100g de tegumento fresco molido (1-2mm), con 15 minutos de circulación y 15 minutos de percolado del extracto, y extrayendo el 95% de los fenoles totales, se requieren: 7 etapas (tubos o celdas), 767g de solvente (cada 15 minutos, caudal 51g/min), y se obtiene un extracto de 0.01829g fenoles/(g fenoles + g solvente). Es decir que la capacidad de lixiviación es de 200g/h tegumento fresco, 1533g/h solvente fresco y 1101g/h extracto concentrado.

➤ **Estimación del proceso a escala industrial:**

Al realizarse la evaluación de factibilidad del proceso para una producción industrial (capacidad de procesamiento: 4Tn tegumento/día, rendimiento aproximado: 590Kg/día de producto), se estimó una inversión inicial de U\$S 2.400.000. Los costos unitarios para la producción de estos compuestos resultaron inferiores al precio de mercado de los antioxidantes sintéticos más utilizados. En base a los valores positivos obtenidos de VAN y TIR, el proyecto resulta rentable para un período de producción de 10 años.



En base a estas conclusiones, se puede decir que el tegumento de maní es una fuente interesante de antioxidantes naturales, aplicable sobre productos alimenticios. La extracción de estos compuestos es relativamente simple, e implica un beneficio para las industrias procesadoras de maní blanchado, ya que puede dar un valor agregado y una utilidad a un producto actualmente desechado o aplicado solo en la alimentación animal como es el tegumento de maní.



BIBLIOGRAFIA

1. Abraham G., Hron R.J. and Koltun S.P. 1988. Modeling the Solvent Extraction of Oilseeds. *JAOCs*, Vo. 65, no.1, 129-135.
2. Agbor-Egbe T. and Rickard J. E. 1990. Identification of Phenolic Compounds in Edible Aroids. *J. Sci. Food Agric.* 51: 215-221.
3. AOAC. 1980. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Editor: Horwitz W. 13th Edition. Washington, DC.
4. Arichi, H.; Kimura, Y.; Okuda, H.; Baba, K.; Kozawa, M.; Arichi, S. 1982. Effects of Stilbene Compounds of the Roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc. On Lipid Metabolism. *Chem. Pharm. Bull.* 1982, 30: 1766-1770.
5. Baca Urbina G. 1995. Evaluación de Proyectos. 3^a edición. McGraw-Hill.
6. Bolsa de Comercio de Rosario, 2001. Reporte especial de oleaginosas. Maní. 19/10/2001. Número 3. Departamento de Capacitación de la Bolsa de Comercio de Rosario. www.bcr.com.ar
7. Cámara Argentina del Maní. 2001. Datos de Estadísticas de Producción y Exportaciones de maní. 1988/2001.
8. Cámara Manisera de Córdoba. 2001. La actividad manisera hoy.
9. Carelli A.A., Bodnariuk P. and Crapiste G.H. 2000. Efectividad de los Antioxidantes en el Aceite de Girasol. *Aceites y Grasas*, año 10, n° 39, junio 2000: 227-2231.
10. Celotti, E.; Ferrarini, R.; Zironi, R.; Conte, L. S. 1996. Resveratrol Content of Some Wines Obtained from Dried Valpolicella Grapes: Recioto and Amarone. *J. Chromatogh. A.* 730: 47-52.
11. CIARA. 2002. Cámara de la Industria Aceitera de la República Argentina. Anuario Estadístico de Oleaginosas. Producción y Exportaciones Argentinas de Oleaginosas y Derivados. www.ciara.com.ar
12. Código Alimentario Argentino (CAA). Ley 18.284. Capítulo VII: Alimentos Grasos. Ministerio de Salud y Acción Social. Argentina. Fecha Sanción: 18/06/1969
13. Código Alimentario Argentino (CAA). Ley 18.284. Capítulo XVIII: Aditivos Alimentarios. Ministerio de Salud y Acción Social. Argentina. Fecha Sanción: 18/06/1969.



14. Dorner, J. W.; Cole, R. J.; Sanders, T. H.; Blankenship, P D., 1989. Interrelationship of Kernel Water Activity, Soil Temperature, Maturity, and Phytoalexin Production in Preharvest Aflatoxin Contamination of Drought-Stressed Peanuts. *Mycopathologia*. 105:117-128
15. Duh P., Yeh D., Yen G. 1992. Extraction and Identification of an Antioxidative Component from Peanut Hulls. *JAOCS*. 69 (8): 814-818.
16. Duh P., Yen G. 1997. Antioxidant Efficacy of Methanolic Extracts of Peanut Hulls in Soybean and Peanut Oils. *JAOCS*. 74 (6): 745-748.
17. Eli, P., 2000. Comparación de diferentes métodos para medir la estabilidad de grasas y aceites. *Aceites y Grasas*. Diciembre 2000. N° 41, Año 10: 557-561
18. Fennema. 1993. *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
19. Fitch Haumann, B., 1994. Antioxidants: Health implications. *INFORM. JAOCS*. Vol 5, N° 3. Marzo 1994: 242-252.
20. Fontaine, E. R. 1999. *Evaluación social de proyectos*. 12ª edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. Alfaomega S.A. Santafé de Bogotá, Colombia.
21. González, C.M. and Pignata, M.C. 1994. The influence of Air Pollution on Soluble Proteins, Chlorophyll degradation, MDA, Sulphur and Heavy Metals in Transplanted Lichen. *Chemistry and Ecology*. Vol 9: 105-113.
22. Gopala Krishna A. G. y Prabhakar J. V. 1994. Antioxidant Constituents of Peanut Oil. *JAOCS*. 71 (11): 1245-1249.
23. Grosso, N.R. and Guzmán C.A. 1995. Chemical Characteristics of Argentinian Groundnut Cultivars. *International Arachis Newsletter* 15: 17-18.
24. Grosso, N.R. and Guzmán C.A. 1995. Chemical Composition of aboriginal peanut (*A. hypogaea*) seeds from Perú. *Journal of Agric. and Food Chem.* 43: 102-105.
25. Grosso, N. R., G. M. Walker, M. S. Chinnan and A. V. A. Resurreccion. 2000. Sensory ratings and hexanal content of cracker coated and roasted peanuts stored at different temperatures. *IFT Annual Meeting Technical Program*. Dallas, Texas (USA)
26. Grosso, N. R. and Resurreccion, A. V. A.. 2001. Predicting the quality of cracker coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. *Journal of Food Science* (en consideración, 2001).
27. Harborne J. B. 1973. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall. 33-80.



28. Heath, R.L and Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. In Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acids Peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189-198.
29. Hoover, M. W. 1987. Roasted honey coated nut product and method for making same. Patent Number 4.647.463. United States Patent.
30. Imida, K.; Fukushima, S.; Shivai, T.; Ohtani, M; Nakanish, K.; Ito, N. 1983. Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ -glutamyl transpeptidase-positive foci development in the liver of rats. Carcinogenesis, 4: 885-889.
31. Ingham, J. L., 1976. 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a Phytoalexin from Groundnuts (*Arachis hypogaea* L.). Phytochemistry, 15: 1791-1793.
32. International Chemical Safety Cards, ICSC 0044: Ethanol. Prepared in the context of cooperation between the International Programme on Chemical Safety & the Commission of the European Communities © IPCS CEC 1993.
33. Ito N.; Hagiwara A.; Shibata M.; Ogiso T.; and Fukushima S. 1982. Induction of Squamous Cell Carcinoma in the Forestomack of F334 Rats Treated with Butylated Hydroxyanisole. Gann, 73: 332-334.
34. IUPAC, 1987. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 7th Edition. Method Number 2.504. Determination of the p-Anisidine Value (p-AV). Blackwell Scientific Publications. Boston, MA and Oxford, UK.
35. Jacob, R. A, 1994. Nutrition, Health and Antioxidants. INFORM. JAOCS. Vol 5. N° 11. November 1994: 1271-1275.
36. Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.O.; Sloninger, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Mehta, R.G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M., 1997. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. Science 1997, 275:218-220.
37. Joyeux, M.; Lobstein, A.; Anton, R. and Mortier, F. 1995. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. Planta Medica 61, 126-129.
38. Kanner J., Frankel E., Granit R., German B., Kinsella J.E. 1994. Natural Antioxidants in Grape and Wines. J. Agric. Food Chem. 42: 64-69.
39. Kimura, Y.; Okuda, H.; Arichi, S. 1985. Effects of Stilbenes on Arachidonate Metabolism in Leukocytes. Biochem. Biophys. Acta. 834: 275-278.



40. Kimura, Y.; Okuda, H.; Kudo, M., 1995. Effects of Stilbenes Osilates from Medicinal Plants on Arachidonate Metabolism and Degranulation in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Ethnopharmacol.* 45: 131-139.
41. Klatsky, A. L.; Amstrong, M. A.; Friedman, G. D. 1992. Alcohol and Mortality. *Ann. Intern. Med.* 1992, 117: 646-654.
42. Korhammer S., Reniero F., and Mattivi F. 1994. An Oligostilbene from Vitis Roots. *Phytochemistry.* 38 (6): 1501-1504.
43. Kosugi, H; Jojima, T. and Kikugawa, K. 1989. Thiobarbituric acid-reactive Substances from Peroxidized Lipids. *Lipids* 24: 873-881.
44. Krapovickas A. y Gregory W. C.. 1994. Taxonomía del género *Arachis*. *Bonplandia.* 8 (1-4): 1-187
45. Lambelet P., Saucy F. and Löliger J. 2000. Mecanismos de Acción de los Antioxidantes. *Aceites y Grasas*, año 10, nº 39, junio 2000: 217-220.
46. Langcake P., and Pryce R.J. 1976. The Production of Resveratrol by *Vitis Vinifera* and other members of the Vitaceae as a Response to Infection or Injury. *Physiological Plant Pathology.* 9: 77-86.
47. Lawless, H. T. and H. Heymann. 1999. *Sensory Evaluation of Food*. Chapman & Hall Food Science Book, Aspen Publisher, Inc.: Gaithersburg, Maryland, pp 1-825
48. Louis, Roberta. 1999. Masquelier's OPC Aids Heart & Immune System. *Well Being Journal* Vol. 8, No. 5 ~ September/October 1999.
49. Mabry T.J., Markham K.R. and M.B. Thomas. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag.
50. Madrid, A.; Cezano, I. and Vicente J.M. 1997. *Manual de Aceites y Grasas Comestibles*. AMV Ediciones. 1ª edición. pp: 147-148.
51. Masquelier, Jack. 1987. Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof. US Patent 4,698,360 , October 6, 1987.
52. Mattivi F., Reniero F. 1992. Oligostilbenes from the Roots of Genus *Vitis*. XVIth International Conference. Lisboa, Portugal, July 13-16, 1992.
53. Mattivi, F., 1993. Solid-Phase Extraction of trans-resveratrol from Wines form LC Analysis. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 196:522-525.



54. Nieh C.D. and Snyder H.E. 1991. Solvent Extraction of Oil From Soybean Flour II – Pilot Plant and Two-Solvent Extractions. *JAOCS*, Vol. 68, no 4, 250-253.
55. Perry R. H. 1992. *Manual del Ingeniero Químico*. 6ª Edición. McGraw-Hill. México.
56. Plemmons, L. E. and Resurrección, A. V. A., 1998. A warm-up sample improves reliability of responses in descriptive analysis. *J. Sensory Studies*. 13:359-376.
57. Porter L.J., 1989. Tannins. *Methods in plant biochemistry*. Vol. 1: 389-419.
58. Prabhudesai R. K. 1997. “Leaching”, in “Scweitzer P.A. *Handbook of separation Techniques for Chemical Engineers*”. 3th edition. McGraw-Hill. NY. USA.
59. Sanders, T. and McMichael, R., 1997. Occurrence of Resveratrol in Edible Peanuts. *Abstr. Papers Am. Chem. Soc.* 1997: 214, 33 – AGFD.
60. Sanders, T.H.; McMichael R. W. Jr. and Hendrix K.W. 2000. Occurrence of Resveratrol in Edible Peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. N° 48 (4): 1243-1246.
61. Scalbert A., Duval L., Peng S., Monties B. and Du Penhoat C. 1990. Polyphenols of *Quercus robur L.* *Journal of Chromatography*, 502: 107-119.
62. Schmeda-Hirschmann, G.; Razmilic, I.; Gutierrez, M. I. and Loyola, J. L. 1999. Proximate Composition and Biological Activity of Food Plants Gathered by Chilean Amerindians. *Economy Botany* 53, 177-187.
63. Schweitzer P. A. 1997. *Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers*. 3th Edition. McGraw-Hill. N.Y. USA.
64. Singh R.P., Chidambara Murthy K.N. and Jayaprakasha G.K. 2002. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. *J. Agric. Food Chem.* 50: 81-86.
65. Six, Pauline. 1994. Current Research in Natural Food Antioxidants. *INFORM, JAOCS*, Vol 5, N°6: 679-687.
66. Sobolev V.S. and Cole R.J. 1999. Trans-Resveratrol Content in Commercial Peanut and Peanut Products. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 47, N° 4: 1435-1439.
67. Sobolev, V. S.; Cole, R. J. and Dorner, J. W. 1995. Isolation, Purification and Liquid Chromatographic Determination of Stilbene Phytoalexins in Peanuts. *Journal of AOAC International*. Vol. 78, N°5, 1995.
68. St. Angelo, A. J., 1996. Lipid Oxidation in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 36(3): 175-224.



69. Tapia A., Feresin G., Bustos D., Astudillo L., Theoduloz C. and Schmeda-Hirschmann G. 1999. Biologically Active Alkaloids and a Free Radical Scavenger from *Prosopis species*. XII Simposio Nacional de Química Orgánica. 1999. Córdoba. Argentina.
70. Treybal R. E. 1980. Operaciones de Transferencia de Masa. Segunda Edición. Mc Graw-Hill. México, D.F.
71. Valenzuela, A., Sanhueza, J. Y Nieto S. 2000. Rancidez oxidativa en la industria de nutrición animal: el uso racional de los antioxidantes. Aceites y Grasas, año 10, n° 39, junio 2000: 201-216.
72. Viturro, C.; Molina, A. and Schmeda-Hirschmann, G. 1999. Free radical scavengers from *Mutisia friesiana* (Asteraceae) and *Sanicula graveolens* (Apiaceae). Phytotherapy Research 13, 422-424.
73. Waffo Teguo P., Decendit A., Krisa S., Deffieux G., Vercauteren J., and Mérillon J.M. 1996. The Accumulation of Stilbene Glycosides in *Vitis Vinifera* Cell Suspension Cultures. J. Nat. Prod. 59: 1189-1191.
74. Wagner, H.; Bladt, S. and Zgainski, E.M. 1984. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag, New York. 163-192.
75. Waterman P. G. and Mole S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Cientific Publications, Oxford, UK.
76. Weast, 1977-1978. Handbook of Chemistry and Physics. 58th edition.
77. Woodroof J. G. 1983. Peanuts, Production, Processing, Products. 3th Edition. Avi Publishing Company, Inc. U.S.A.
78. Yen G., Duh P. 1994. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. J. Agric. Food Chem. 42: 629-632.
79. Yen G., Duh P. 1995. Antioxidant Activity of Methanolic Extracts of Peanut Hulls from Various Cultivars. JAOCS. 72 (9): 1065-1067.
80. Yen G., Duh P., Tsai C. 1993. Relationship between Antioxidant Activity and Maturity of Peanut Hulls. J. Agric. Food Chem. 41: 67-70.