

**UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE
DIOS**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



TESIS

**“Optimización del proceso de extracción supercrítica de
escualeno de las semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*)”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

AUTOR:

Bach. MENDOZA MAMANI, Bruno

ASESOR:

Mtro. MONTALVAN APOLAYA, Pedro Saul

CO-ASESOR:

Dr. CHAÑI PAUCAR, Larry Oscar

Puerto Maldonado, abril de 2026

**UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE
DIOS**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



TESIS

**“Optimización del proceso de extracción supercrítica de
escualeno de las semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*)”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

AUTOR:

Bach. MENDOZA MAMANI, Bruno

ASESOR:

Mtro. MONTALVAN APOLAYA, Pedro Saul

CO-ASESOR:

Dr. CHAÑI PAUCAR, Larry Oscar

Puerto Maldonado, abril de 2026

DEDICATORIA

A mi amada esposa Betsabe que siempre a estado atenta durante el desarrollo hasta la culminación de mis proyectos.

También, quisiera dedicar este logro a mis padres en especial a mi querida madre que siempre ha estado pendiente durante mi desarrollo profesional.

BRUNO

AGRADECIMIENTOS

Sin lugar a duda agradezco a Dios por brindarme buena salud y la capacidad académica necesaria para avanzar en mis proyectos, así como por guiarme de manera constante.

Expreso mi gratitud a la UNAMAD, institución donde cursé mi carrera profesional, y a la UNAAT por permitirme utilizar su laboratorio de investigación para ejecutar mi proyecto y fortalecer mi integración a la comunidad científica.

Quiero agradecer de una manera especial al Dr. Chañi Paucar Larry Oscar, por su apasionada labor de maestro e investigador que durante el desarrollo de mi tesis ha estado inculcando e inspirado al campo de la investigación.

También agradezco a los docentes que, a lo largo de mi formación, compartieron sus conocimientos y experiencias. En especial, reconozco al Mtro. Montalvan Apolaya Pedro Saul por su dedicación como maestro e investigador, cuya orientación e inspiración fueron fundamentales durante el desarrollo de mi tesis. Extiendo mi agradecimiento a mi amigo Joselito, bachiller en ingeniería agroindustrial e investigador de la UNAAT, por su apoyo científico en este proceso.

Finalmente, agradezco a mi familia, que siempre se mantiene atenta y brinda su respaldo en cada logro alcanzado.

PRESENTACIÓN

El presente trabajo de investigación optimiza el proceso de extracción del extracto de semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*) rico en escualeno, empleando dióxido de carbono en estado supercrítico. El contenido de escualeno analizamos mediante cromatografía de gases. El proceso de extracción supercrítica se ejecutó en un equipo a escala de laboratorio en las instalaciones de la Universidad Nacional Autónoma Altoandina de Tarma.

El trabajo de tesis está estructurado en cuatro capítulos, conforme al reglamento de grados y títulos de la UNAMAD. A continuación, se presenta una síntesis de su contenido:

Capítulo I. Se plantea el problema de investigación y se formulan los objetivos e hipótesis. Además, se expone la justificación del estudio y se describen las consideraciones éticas pertinentes.

Capítulo II. Este capítulo desarrolla el estado del arte del tema de estudio. Se organiza en tres secciones: Antecedentes, Marco Teórico y Definición de Términos. La bibliografía empleada corresponde a fuentes actualizadas, con énfasis en artículos científicos disponibles en bases de datos especializadas.

Capítulo III. En esta sección se detallan las metodologías y técnicas aplicadas en el estudio. Se detallan el tipo de investigación, el diseño experimental, la población y muestra, los procedimientos de laboratorio y el tratamiento de datos.

Capítulo IV: Finalmente, este capítulo presenta los resultados obtenidos y su discusión a la luz de la bibliografía más reciente disponible.

RESUMEN

La escasa información sobre la optimización del extracto oleoso de semillas de quinilla limita su aprovechamiento en aplicaciones industriales de alto valor. Este estudio tiene como objetivo optimizar la obtención del extracto oleoso mediante tecnología de fluidos supercríticos. Se realizaron extracciones supercríticas variando: Presión (100, 250 y 400 bar), temperatura (40, 55 y 70 °C) y flujo masico (Scale Reading del fluxómetro: 50, 80 y 110 mm) empleando un diseño Box-Behnken. Estas combinaciones permitieron evaluar su efecto en el rendimiento del extracto y determinar la condición óptima. El mayor rendimiento (12,08 %) se alcanzó a 55 °C, 100 bar y 50 mm, mientras que el menor (0,49 %) se registró a 40 °C, 400 bar y 80 mm. El extracto optimizado presentó un contenido de escualeno de 17,91 %, valor superior al arroz, germen de trigo y albahaca. Además, el extracto incluyó otros compuestos bioactivos relevantes, entre ellos *trielaidin* (27.12 %), *glyceryl 1,3-distearate* (13.72 %), *1,2-Epoxyoctadecane* (7.61 %), *E,E,Z-1,3,12-Nonadecatriene-5,14-diol* (6.41 %) y *(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester* (5.47 %). En conclusión, el extracto oleoso obtenido bajo condiciones óptimas presenta un elevado contenido de escualeno y una diversidad de compuestos bioactivos que constituyen una fuente promisoría para las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Palabras clave: Escualeno; cromatografía de gases; extracto oleoso; CO₂ supercrítico.

ABSTRACT

The limited information available on optimizing the oil extract from cinchona seeds restricts its use in high-value industrial applications. This study aims to optimize oil extract production using supercritical fluid technology. Supercritical extractions were performed by varying pressure (100, 250, and 400 bar), temperature (40, 55, and 70 °C), and mass flow (Flowmeter scale readings: 50, 80, and 110 mm) using a Box-Behnken design. These combinations allowed for the evaluation of their effect on extract yield and the determination of the optimal conditions. The highest yield (12.08%) was achieved at 55 °C, 100 bar, and 50 mm, while the lowest (0.49%) was recorded at 40 °C, 400 bar, and 80 mm. The optimized extract had a squalene content of 17.91%, a higher value than that of rice, wheat germ, and basil. Furthermore, the extract included other relevant bioactive compounds, among them trielaidin (27.12%), glyceryl 1,3-distearate (13.72%), 1,2-epoxyoctadecane (7.61%), E,E,Z-1,3,12-nonadecatriene-5,14-diol (6.41%), and (E)-9-octadecenoic acid ethyl ester (5.47%). In conclusion, the oil extract obtained under optimal conditions exhibits a high squalene content and a diversity of bioactive compounds, making it a promising resource for the food, cosmetic, and pharmaceutical industries.

Keywords: Squalene; gas chromatography; oily extract; supercritical CO₂.

INTRODUCCIÓN

La quinilla (*Manilkara bidentata*) es una especie maderable de la amazonia peruana. En Madre de Dios, constituye una de las especies más explotadas para la obtención de madera utilizada en la construcción de muebles y casas (Báez et al., 2019). Sin embargo, en esta región aún se desconocen otros usos de la quinilla. En otros países esta especie tiene usos tradicionales, se han reportado su potencial cicatrizante, antiinflamatorio, antimicrobiano y otras actividades biológicas (Teixeira et al., 2019).

Las semillas de quinilla constituyen una fuente potencial de diversos compuestos bioactivos, entre los que destacan *2,6,10,14,18-pentamethyl- 2,6,10,14,18-eicosapentaene* (74,9%), *9-octadecenoic acid, (Z)- 2,3- dihydroxypropyl ester* (79,9%), *(Z)-ethyl oleate* (92,8%), *Z,E-2-methyl-3,13-octadecadien-1-ol* (80,5%) y *5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxyaldehyde* (50,3%) (Powder-george & Mohammed, 2018). Además, el aceite de las semillas de *M. bidentata* posee un alto potencial para la producción de biocombustibles, de manera similar al aceite obtenido de las semillas de mahua, una especie de la misma familia (Pavan et al., 2021).

El presente trabajo de investigación evaluó el proceso de obtención de extracto oleoso de semillas de quinilla utilizando tecnología de fluidos supercríticos. Para la extracción se empleó dióxido de carbono como solvente. Las condiciones operativas se ajustaron considerando las variables de presión, temperatura y flujo másico del solvente. Los ensayos experimentales se diseñaron bajo el modelo Box-Behnken, con tres variables independientes: temperatura, presión y flujo másico. La optimización del proceso de extracción buscó maximizar la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos, empleando para ello la metodología de superficie de respuesta. En conjunto, este estudio contribuye a la valorización de los recursos no de la amazonia, y promueve nuevas investigaciones orientadas al aprovechamiento integral de las semillas de quinilla.

ÍNDICE DE CONTENIDO

PRESENTACIÓN

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN..... 1

1.1. Descripción del problema..... 1

1.2. Formulación del problema..... 2

1.2.1. Problema general 2

1.2.2. Problemas específicos..... 2

1.3. Objetivos 2

1.3.1. Objetivo general 2

1.3.2. Objetivos específicos 3

1.4. Variables..... 3

1.4.1. Variables independientes..... 3

1.4.2. Variables dependientes..... 3

1.5. Operacionalización de variables..... 4

1.6. Hipótesis..... 4

1.6.1. Hipótesis general 4

1.6.2. Hipótesis específicas..... 4

1.7. Justificación..... 5

1.8. Consideraciones éticas 6

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO..... 7

2.1. Antecedentes de estudio 7

2.2. Marco teórico 10

2.2.1. Descripción botánica 10

2.2.2. Usos de la quinilla	10
2.2.3. Potencial fitoquímico de las semillas de quinilla	11
2.2.4. Escualeno y sus aplicaciones	12
2.2.5. Proceso de extracción supercrítica	12
2.2.6. Extracción estática	14
2.2.7. Extracción dinámica	14
2.2.8. Cromatografía de gases	14
2.3. Definición de términos	17
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	18
3.1. Tipo de estudio.....	18
3.2. Diseño del estudio	18
3.3. Población y muestra	19
3.4. Métodos y técnicas	20
3.4.1. Acondicionamiento de las semillas de quinilla	20
3.4.2. Proceso de extracción supercrítico	23
3.4.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	28
3.5. Tratamiento de datos	30
CAPÍTULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	31
4.1. Efecto de las variables independientes sobre el rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE	31
4.2. Análisis de superficie respuesta	33
4.3. Composición del extracto de quinilla obtenido por SFE.....	41
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equipo de extracción supercrítico escala laboratorio.....	13
Figura 2. Equipo de cromatografía de gases.	16
Figura 3. Semillas de quinilla.....	20
Figura 4. Secado de las semillas de quinilla por liofilizado.....	21
Figura 5. Descascarillado de las semillas de quinilla.....	22
Figura 6. Empacado al vacío de las semillas de quinilla	22
Figura 7. Acondicionamiento del lecho de extracción.....	24
Figura 8. Colecta del extracto de quinilla.....	25
Figura 9. Pesado del extracto de quinilla.....	26
Figura 10. Diagrama de operaciones para la obtención del extracto de quinilla	27
Figura 11. Cromatógrafo de gases (SHIMADZU, GC-2010 PLUS)	28
Figura 12. Rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE	32
Figura 13. Extractos de semillas de quinilla obtenidos a 1) 100 bar, 55 °C, 50 mm y 2) 400 bar, 40 °C, 80 mm.....	32
Figura 14. Residuos vs ajustes para rendimiento global de los extractos de quinilla obtenidos SFE (% , m/m)	35
Figura 15. Distribución normal de residuos para rendimiento global de los extractos de quinilla obtenidos SFE (% , m/m).....	35
Figura 16. Rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción presión (bar) y temperatura (°C)	36
Figura 17. Rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción flujo másico de CO ₂ (mm) y presión (bar)	37
Figura 18. Rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción flujo másico de CO ₂ (mm) y temperatura (°C)	37
Figura 19. Superficie 3D del rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción presión (bar) y temperatura (°C)	38

Figura 20. Superficie 3D del rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción temperatura (°C) y flujo másico de CO ₂ (mm)	38
.....	39
Figura 21. Superficie 3D del rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción flujo másico de CO ₂ y presión (bar)	39
Figura 22. Condiciones óptimas del proceso SFE para la obtención de extracto de quinilla	40
Figura 23. Perfil cromatográfico de los compuestos bioactivos del extracto de semillas de quinilla obtenido por SFE (400 bar, 40 °C, 50 mm)	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables	4
Tabla 2. Taxonomía de <i>Manilkara bidentata</i>	10
Tabla 3. Niveles de las variables independientes del proceso de extracción supercrítica	18
Tabla 4. Diseño Box-Behnken para el proceso de extracción supercrítica de escualeno de las semillas de quinilla	19
Tabla 5. Condiciones de análisis CG-MS.....	29
Tabla 6. Análisis de varianza para superficie de respuesta del rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE.....	34
Tabla 7. Coeficientes codificados	34
Tabla 8. Soluciones de superficie respuesta	40
Tabla 9. Metabolitos bioactivos identificados en el extracto de semillas de quinilla extraído a 400 bar, 40 °C y 50 mm.....	42
Tabla 10. Actividades biológicas y mecanismos de acción del escualeno	44

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Descripción del problema

Las semillas de quinilla representan una fuente valiosa de aceites y extractos oleosos, que tienen aplicaciones potenciales tanto en la medicina tradicional como en la cosmética y la industria alimentaria. Sin embargo, su aprovechamiento aún está limitado por varios factores, entre los que destaca la falta de investigaciones tecnológicas avanzadas que permitan optimizar el proceso de extracción y conservación de estos compuestos bioactivos. Actualmente, el proceso más utilizado para extraer los aceites de estas semillas se basa en métodos convencionales, como la extracción con solventes o prensado en frío, que pueden no ser los más eficientes ni los que mejor preservan las propiedades de los extractos oleosos (Cheng et al., 2024).

Una de las tecnologías innovadoras que ha mostrado gran potencial en la extracción de aceites y compuestos bioactivos de diversas semillas es la extracción mediante fluidos supercríticos. Esta tecnología verde utiliza dióxido de carbono (CO_2) en su estado supercrítico, lo que permite una extracción más limpia, eficiente y sin residuos tóxicos, a la vez que conserva mejor los compuestos sensibles al calor o a los solventes. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha desarrollado suficientemente el uso de esta técnica para la obtención de extractos oleosos de quinilla, lo que limita la posibilidad de aprovechar su potencial agroindustrial y de comercializar productos de mayor calidad (Santana et al., 2023).

Una fuente potencial de escualeno son las semillas de quinilla, producido por un árbol distribuido en la amazonia, esta especie es explotado en las concesiones forestales para la producción de madera (López Varas, 2021). Cabe destacar

que el escualeno es un compuesto con importantes propiedades biológicas; comercialmente se obtiene del aceite del hígado de tiburón. La importancia económica de este compuesto radica en sus diversas aplicaciones, que incluyen la fabricación de medicamentos, alimentos funcionales y cosméticos (Cheng et al., 2024). En la actualidad se está explorando nuevas fuentes naturales de este compuesto, con la finalidad de sustituir la fuente tradicional, en la literatura se ha reportado recientemente algunas fuentes alternativas de escualeno, como el salvado de arroz y las semillas de amaranto (Sahu et al., 2018).

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Cuáles son las condiciones óptimas para la obtención de extractos ricos en escualeno a partir de las semillas de quinilla empleando tecnología supercrítica?

1.2.2. Problemas específicos

¿Cómo influyen la presión, la temperatura y el flujo másico del solvente en el rendimiento del extracto oleoso de las semillas de quinilla cuando se aplica la tecnología de fluidos supercríticos?

¿Cuáles son las condiciones óptimas de presión, temperatura y flujo másico del solvente para obtener extractos de las semillas de quinilla ricos en compuestos bioactivos?

¿Cuál será la composición fitoquímica del extracto oleoso obtenido de las semillas de quinilla mediante la tecnología de fluidos supercríticos?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar las condiciones óptimas para la obtención de extractos ricos en escualeno a partir de las semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*) con dióxido de carbono supercrítico.

1.3.2. Objetivos específicos

Evaluar el rendimiento de los extractos oleosos de las semillas de quinilla bajo diferentes condiciones de presión, temperatura y caudal másico de dióxido de carbono en estado supercrítico.

Optimizar y evaluar el proceso de extracción supercrítica de las semillas de quinilla utilizando la metodología de superficie de respuesta.

Determinar la composición de los metabolitos bioactivos presentes en el extracto oleoso de las semillas de quinilla obtenido mediante tecnología supercrítica.

1.4. Variables

1.4.1. Variables independientes

Temperatura (°C)

Presión (bar)

Flujo masico del solvente (mm)

1.4.2. Variables dependientes

Rendimiento de escualeno (% , m/m)

1.5. Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de variables

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ITEMS
Condiciones de extracción (Variable independiente)	Conjunto de parámetros físico-operativos que controlan la solubilidad, selectividad y transferencia de masa del CO ₂ supercrítico para extraer escualeno de semillas de quinilla. Chañi Paucar et al, (2022)	Se manipula mediante la variación programada de presión, temperatura y flujo másico de CO ₂ en el sistema de extracción supercrítica.	Presión	100 - 40	Registrar la presión estable del extractor durante la fase dinámica (bar).
			Temperatura	40 - 70	Registrar la temperatura real medida por el termopar durante la extracción (°C).
			Flujo másico del solvente	50 - 110	Registrar el flujo másico promedio durante la fase dinámica (m/m).
Rendimiento del proceso (Variable dependiente)	Proporción de escualeno extraído respecto al contenido inicial del material, expresado como eficiencia de recuperación. Chañi Paucar et al, (2022)	Se cuantifica mediante el porcentaje de escualeno presente en el extracto recuperado respecto al peso seco inicial de la muestra.	Rendimiento del proceso	g	Registrar la masa inicial de semillas secas utilizadas (g).
					Registrar la masa total del extracto obtenido (g).
					Registrar la concentración de escualeno en el extracto (g).
					Calcular el rendimiento en g masa de escualeno / masa seca de semillas.
					Calcular el rendimiento porcentual: $(g \text{ escualeno} / \text{masa semilla seca}) \times 100$.

Fuente: Chañi Paucar et al, (2022)

1.6. Hipótesis

1.6.1. Hipótesis general

La presión, temperatura y flujo masico del dióxido de carbono supercrítico no influyen en el rendimiento de extracto rico en escualeno de las semillas de quinilla.

1.6.2. Hipótesis específicas

El rendimiento de los extractos oleosos de las semillas de quinilla no está influenciado por las diferentes condiciones de presión, temperatura y caudal másico de dióxido de carbono en estado supercrítico.

La evaluación del proceso de extracción supercrítica de las semillas de quinilla utilizando la metodología de superficie de respuesta no es óptima.

La composición de los metabolitos bioactivos presentes en el extracto oleoso de las semillas de quinilla obtenido mediante tecnología supercrítica no contenía escualeno.

1.7. Justificación

La extracción de extracto oleoso de las semillas de quinilla empleando fluidos supercríticos presenta claras ventajas en términos de eficiencia, selectividad, sostenibilidad, preservación de la calidad del producto y rentabilidad. Por estas razones, se justifica su uso en la obtención de aceites y otros compuestos bioactivos presentes en las semillas de quinilla, favoreciendo un proceso de extracción más limpio, controlado y respetuoso con el medio ambiente (Santana et al., 2023).

Manilkara bidentata, es una especie arbórea utilizada para la producción de madera, el cual se destina para la fabricación de muebles y casas en las regiones de la Amazonia del Perú y de otros países (López Varas, 2021). Los frutos de esta especie son consumidos en Puerto Rico, donde se les conoce con el nombre de Ausubo o también Balata, la pulpa posee características sensoriales muy particulares comercializada en su estado natural (Cruz Aguilar, 2022).

Las semillas presentan compuestos bioactivos con gran potencial para la fabricación de medicamentos, cosméticos y alimentos funcionales (Powder-George & Mohammed, 2018). El escualeno es uno de los bioactivos que se puede extraer de las semillas de *M. bidentata* utilizando solventes orgánicos (Cheng et al., 2024). Sin embargo, los métodos de extracción empleando solventes orgánicos presentan algunas desventajas, como la toxicidad, baja selectividad y requieren de operaciones adicionales para obtener el extracto libre del solvente de extracción.

Una alternativa ecoamigable para la obtención de compuestos bioactivos, es la extracción empleando tecnología de altas presiones, utilizando solventes GRAS como el dióxido de carbono, agua, etanol y la mezcla de estos dos últimos. El dióxido de carbono en estado supercrítico es uno de los más empleados debido a su facilidad para retirarlo del extracto, selectividad, temperaturas bajas de operación y no toxicidad (Santana et al., 2023).

La extracción con CO₂ supercrítico requiere de optimización para determinar las mejores condiciones de extracción, entre las variables que tienen mayor influencia, son la temperatura y presión, esto debido a que estos parámetros termodinámicos permiten modificar el poder de solubilizar el analito de interés (Chañi-Paucar, Santana, Albarelli, et al., 2022a). Otros parámetros estudiados, son el flujo masico, tamaño de partícula, tiempo de extracción, geometría del lecho, entre otros. La optimización de procesos u operaciones unitarias se puede realizar empleando la metodología de superficie de respuestas, en cuyo caso se tienen que definir límites mínimos y máximos de las variables a evaluar y escoger el mejor diseño para una optimización económica y eficiente en términos de número de experimentos.

1.8. Consideraciones éticas

Esta investigación se realizó en base a los lineamientos éticos establecidos por la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios (UNAMAD) y las normativas nacionales, como el Decreto Supremo N.º 0082005-SA del Reglamento Ético en Investigación en el Perú. La presente investigación se desarrolló utilizando semillas de *Manilkara bidentata*, comúnmente conocida con el nombre de quinilla en la Amazonia. Para su desarrollo se solicitó autorización al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR). En respuesta a la solicitud, la entidad ambiental asignó el código de autorización N° 17-MAD-TAM/AUT-IFL-2023-03 a favor de Bruno Mendoza Mamani y emitió la Resolución Gerencial Regional N° 1349-2023-GOREMAD-GRFFS, estos documentos acreditan la adquisición de 1 kg de semillas de quinilla en tiendas especializadas agroforestales de la ciudad de Pucallpa (Vivero Forestal Pucallpa).

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de estudio

Cheng et al. (2024), reportaron los últimos hallazgos sobre las actividades biológicas, las fuentes de organismos naturales y genéticamente modificados (OGM), las tendencias de las tecnologías de extracción y los sistemas de suministro de escualeno, proporcionando perspectivas innovadoras para la producción y aplicación a gran escala del escualeno. Cabe destacar que este compuesto bioactivo mejora la función inmune, resiste la sensibilidad de la piel y ejerce efectos hipolipidémicos. También posee propiedades antioxidantes, antitumorales, antibacterianas y desintoxicantes; en cuanto a las fuentes principales de escualeno se destacan la quinilla (*Manilkara bidentata*), granada, salvado de arroz, soja, oliva, palma, calabaza y bacalao.

Baky et al. (2022), realizaron una revisión sistematizada amplia en diferentes bases de datos (*PubMed*, *Google Scholar*, *Web of Science*, *Scopus* y *Reaxys*), la búsqueda abarco publicaciones científicas desde 1990 hasta la actualidad. *M. bidentata*, es una especie de la familia Sapotaceae, las especies de esta familia han sido reportadas por su contenido en saponinas triterpenoides, estos compuestos presentan propiedades farmacológicas con beneficios potenciales para la salud. Entre las saponinas triterpenoides reportadas en la literatura están el ácido protobásico, ácido 16- α -hidroxiprotobásico, bayogenina y derivados del ácido oleanólico. En la medicina popular se destacan su actividad antiinflamatoria, antiulcerosa, antimicrobiana, citotóxica, antihipercolesterolemica, antioxidante y actividades inmunomoduladoras. Se concluyo, que las especies de la familia

sapotaceas presentan compuesto del tipo saponinas triterpenoides con actividad biológica importante para la farmacología y medicina.

Patel et al. (2022), investigaron sobre las fuentes microbianas que podrían ser alternativas sostenibles para la producción de escualeno. Cabe mencionar, que este compuesto bioactivo se obtiene del aceite de hígado de los tiburones de aguas profundas (*Squalus* spp.), en el que representa entre el 40 y el 70% de la masa hepática. Para satisfacer la creciente demanda de escualeno debido a sus efectos beneficiosos para la salud humana, cada año se sacrifican entre tres y seis millones de tiburones de aguas profundas, lo que pone en grave peligro los ecosistemas marinos. Para superar esta práctica insostenible, las fuentes microbianas de escualeno podrían ofrecer una alternativa viable al escualeno de origen vegetal o animal, aunque solo se han encontrado unos pocos microorganismos que son capaces de sintetizar hasta un 30% de escualeno de biomasa seca por vías biosintéticas nativas.

Chen et al. (2021), evaluaron los efectos protectores de la suplementación con escualeno sobre el crecimiento, el estado oxidativo y la función hepática de pollos de engorde. Los resultados evidenciaron que el escualeno aumentó la abundancia de ARNm de la enzima NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 y disminuyó la abundancia de ARNm de la enzima caspasa 3 en el hígado de pollos de engorde expuestos al diquat ($P < 0,05$). Por lo tanto, se afirma que el escualeno puede aumentar la ganancia de peso, mejorar el estado oxidativo y aliviar las lesiones hepáticas en pollos de engorde expuestos al diquat.

Tarhan (2021), desarrolló un nuevo y rápido método de análisis para la fuente más importante de escualeno vegetal. Para ello se compararon las técnicas UV-visible, de fluorescencia y FTIR para la cuantificación de escualeno en aceite de semilla de amaranto. El mejor modelo de calibración se obtuvo a partir de espectros normales en espectroscopia FTIR ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) con el RMSEC más bajo de 0,0930, RMSECV de 0,1301 y el R cuadrado más alto de 0,9989 para calibración. Los resultados de este estudio revelaron que la espectroscopia FTIR acoplada con la regresión PLS podría utilizarse para una cuantificación

rápida, precisa y respetuosa con el medio ambiente del escualeno presente en muestras de amaranto.

Powder-George y Mohammed (2018), estudiaron la composición de fitoquímicos presentes en las semillas de *M. bidentata* por cromatografía acoplada a un detector de masas (CG-MS). Para la identificación de los compuestos, los investigadores aplicaron un método de extracción con diferentes solventes orgánicos (hexano, cloroformo, acetato de etilo, etanol y metanol). Los resultados del estudio muestran que, fue posible identificar 39 compuestos, siendo los mayores constituyentes, el 2,6,10,14,18-pentametil-2,6,10,14,18-eicosapentaeno (74,9%), ácido 9-octadecenoico, (Z)- 2,3- éster dihidroxipropílico (80%), (Z)-oleato de etilo (92,8%), Z,E-2-metil-3,13-octadecadien-1-ol (80,5 %) y 5-(hidroximetil)-2-furancarboxialdehído (50,3 %). Estos resultados muestran la presencia de compuestos bioactivos de alto valor biológico, con potencial uso para productos bioactivos.

Rhourri-Frih et al. (2013), identificaron nuevos compuestos bioactivos presentes en las resinas de la especie *M. bidentata*. Los experimentos fueron conducidos utilizando materia prima colectada en la Guayana Francesa. La resina obtenida de las muestras fue sometidas a extracción utilizando acetato de etilo y etanol, utilizando varios métodos (Soxhlet, extracción asistida por calentamiento, extracción asistida por ultrasonido y extracción acelerada por solvente). Los extractos obtenidos se analizaron por HPLC con detección por dispersión de luz evaporativa. A partir del estudio se determinaron compuestos nuevos, denominados *urs-12-enes* (3β -O-acetyl- α -amyrin y 3β -O-trans cinnamyl- α -amyrin) y un derivado tipo *lupane* (3β -O-trans cinnamyl lupeol). Adicionalmente, se evaluaron las actividades antioxidantes y antiinflamatorias de los extractos de *M. bidentata*. En conclusión, la resina de *M. bidentata* es una fuente importante y promisoria para la producción de bioactivos de alto valor biológico, con potenciales aplicaciones en medicamentos antiinflamatorios y antienvjecimiento.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Descripción botánica

La quinilla es una especie nativa de la amazonia, ocurrencia natural en la región de Madre de Dios - Perú, su categoría taxonómica se puede encontrar en la web de (GBIF, 2024).

Tabla 2. Taxonomía de *Manilkara bidentata*

Reino: Plantae
Subreino: Tracheophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Ericales
Familia: Sapotaceae
Género: Manilkara Adans
Especie: <i>Manilkara bidentata</i> (A.D.C.) A.Chev
Nombre común: Quinilla y Balata

Fuente: (GBIF, 2024).

2.2.2. Usos de la quinilla

La quinilla se utiliza principalmente con fines maderables. Las propiedades físicas y mecánicas de la madera de quinilla posibilitan su uso en estado verde (López Varas, 2021). La resistencia natural de la madera de quinilla es superior a otras maderas de la amazonia (*Dipteryx odorata* y *Bagassa guianensis*), estas observaciones fueron realizadas en términos de cambios de densidad y masa de las maderas (Batista et al., 2022). Las maderas se pueden procesar empleando tecnología de radio frecuencia al vacío para reducir su contenido de humedad (Liu et al., 2019).

En la medicina tradicional, a la especie *M. bidentata* y a otras especies de su mismo género se le atribuyen propiedades biológicas relevantes, como actividad antiinflamatoria, antiulcerosa, antimicrobiana, citotóxica, anti-hipercolesterolémica, antioxidante e inmunomoduladora (Baky et al. 2022). Estudios recientes indican que la especie *M. bidentata* y otras del mismo género, presentan compuestos bioactivos capaces de combatir el cáncer y

microrganismos que producen infecciones. Recientemente, se ha evidenciado que los compuestos responsables del efecto antiinflamatoria y envejecimiento de los extractos de *M. bidentata* pertenecen al grupo de los triterpenos pentacíclicos (Rhourri-Frih et al., 2013). Los resultados de las potenciales aplicaciones en la farmacología abren una importante ventana a posibles aplicaciones y usos de estas especies, que en la actualidad solo se utiliza para la producción de madera en las regiones amazónicas del Perú.

2.2.3. Potencial fitoquímico de las semillas de quinilla

La quinilla es una especie con potencial interesante para ser fuente de compuestos bioactivos de alto valor biológico para aplicaciones farmacológicas y cosméticas. Aunque en la actualidad los estudios al respecto de la identificación y aplicación de compuestos bioactivos obtenidos a partir de esta especie son muy limitadas, los pocos estudios disponibles dan cuenta de una gama de metabolitos secundarios presentes en las semillas (Powder-George & Mohammed, 2018) y la resina (Rhourri-Frih et al., 2013) que tienen importantes principios activos. En las semillas de quinilla se ha encontrado 39 compuestos bioactivos, siendo los principales grupos de compuestos identificados ácidos grasos y ésteres de ácidos, de estos grupos destacaron los compuestos: 2,6,10,14,18-pentamethyl-2,6,10,14,18-eicosapentaene (74,9%); 9-octadecenoic acid, (Z)- 2,3-dihydroxypropyl ester (80,0%); (Z)-ethyl oleate (92,8%); Z,E-2-methyl-3,13-octadecadien-1-ol (80,5%) y 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxyaldehyde (50.32%), por su mayor contenido relativo (Powder-George & Mohammed, 2018).

La resina producida por especies del género *Manilkara* fueron reportados por contener compuestos del grupo triterpenos pentacíclicos que presentan propiedades biológicas importantes (Mogue et al., 2019; Rhourri-Frih et al., 2013). Los compuestos identificados pertenecientes a estos grupos son: 2α , 3α , 19α , 20β , 23-pentahydrox- yurs-12-en-28-oic acid y 1β , 2α , 3α , 5, 19α , 24-hexahydroxyurs-11(12), 20(30)-dien-28-oic acid (Mogue et al., 2019). Otros compuestos identificados son: ursolic acid; 1β - hydroxyeucahpic acid; β -Amyrin acetate; taraxerol; taraxerol acetate; 3α -spinasterol; y spinasterone (Mogue et al., 2019). Por otra parte, otros compuestos del mismo grupo (triterpenos

pentacíclicos) fueron identificados en extractos obtenidos por extracción con ultrasonido, estos compuestos son del tipo *urs-12-enes* (identificándose el *3 β -O-acetyl- α -amyrin* y *3 β -O-trans cinnamyl- α -amyrin*) y del tipo *lupane* (*3 β -O-trans cinnamyl lupeol*) (Rhourri-Frih et al., 2013).

2.2.4. Escualeno y sus aplicaciones

El escualeno es un compuesto de origen natural, perteneciente al grupo de los triterpenos hidrocarbonados (*triterpenic hydrocarbon*), su nombre químico es 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,6,10,14,18,20-tet- racosaheptane (Spanova & Daum, 2011). La fuente comercial de este compuesto es el aceite de hígado de tiburón, pero puede ser extraído de otras fuentes como, el aceite de oliva (Vázquez et al., 2007), aceite de palma, germen de trigo, amaranto (Rosales-García et al., 2017) y arroz (Lozano-Grande et al., 2018).

El escualeno es un compuesto que presenta propiedades antioxidantes, contribuye a la disminución del colesterol, debido a sus propiedades químicas puede utilizarse como aditivo para emulsificante de lípidos para servir como medio de transporte de drogas (Lozano-Grande et al., 2018).

Recientemente, en la literatura consultada, se ha encontrado reportes de aplicaciones de escualeno, en varias industrias, como la industria de fabricación de vacunas (Lozano-Grande et al. 2018; Mendes et al. 2022) y como un aditivo funcional en la elaboración de alimento para aves de corral (Y. P. Chen et al., 2021).

2.2.5. Proceso de extracción supercrítica

El proceso de extracción con fluidos supercríticos se ha implementado para la producción de diferentes compuestos bioactivos, como compuestos volátiles (Chañi-Paucar, Johner, Zobot, et al., 2022), aceites (Chañi-Paucar, Johner, Hatami, et al., 2022; Pessoa et al., 2015), pigmentos (Lefebvre et al., 2021) y compuestos fenólicos (Chañi-Paucar, Santana, Albarelli, et al., 2022b).

Un equipo convencional a escala de laboratorio se puede visualizar en la Figura 2, su funcionamiento consta de las siguientes etapas: 1) Acondicionamiento del lecho de extracción, 2) Acondicionamiento de las condiciones de extracción, por

lo general, se ajustan las variables termodinámicas del proceso (presión y temperatura), pero otras variables, como flujo masico y tamaño de partícula pueden ajustarse para evaluar el proceso de extracción, 3) Proceso de extracción dinámico, 4) Colecta del analito de interés de la línea de salida y 5) despresurización y limpieza del sistema.

Para el funcionamiento de un equipo de extracción supercrítico, requiere de equipos auxiliares, como, un compresor de aire para el accionamiento de la bomba de compresión del dióxido de carbono, un sistema de enfriamiento para mantener a la temperatura adecuada en el cabezal de la bomba de compresión, un medidor volumétrico de dióxido de carbono a la salida del proceso y un manómetro acoplado al reservorio de dióxido de carbono para monitorear su consumo a lo largo del proceso. Mayores detalles sobre la construcción y funcionamiento de un equipo de extracción supercrítico se pueden encontrar en el artículo publicado por (Johner & Meireles, 2016).



Figura 1. Equipo de extracción supercrítico escala laboratorio.

Fuente: Laboratorio de la UNAAT, (2024).

2.2.6. Extracción estática

En la extracción estática, el fluido supercrítico se pone en contacto con el material durante un período de tiempo determinado sin movimiento o circulación. El material se coloca en una celda de extracción y el fluido se introduce, donde se mantiene a presión y temperatura constantes. Durante este tiempo, el fluido disuelve los compuestos deseados (como aceites o principios activos), pero no se realiza una circulación activa del fluido a través del material. Después de un tiempo determinado, el fluido se separa del extracto y se extraen los compuestos disueltos. Este tipo de extracción es más simple, pero generalmente menos eficiente en comparación con la dinámica (Johner & Meireles, 2016).

2.2.7. Extracción dinámica

En la extracción dinámica, el fluido supercrítico circula constantemente a través del material a extraer, lo que mejora la transferencia de masa entre el fluido y el material. El fluido se pasa de manera continua o repetida a través del lecho de material, lo que permite una mayor interacción y extracción más eficiente de los compuestos. Esta circulación continua maximiza el contacto entre el fluido y el material, acelerando el proceso y aumentando el rendimiento de la extracción. La extracción dinámica tiende a ser más rápida y eficiente, especialmente cuando se busca obtener altos rendimientos (Johner & Meireles, 2016).

2.2.8. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) es una técnica analítica utilizada para separar y analizar compuestos volátiles presentes en una mezcla. En el análisis del escualeno, que es un triterpenoide hidrocarburo presente en aceites vegetales y que tiene aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética, la CG permite la identificación y cuantificación precisa de esta sustancia (Thamer et al. 2023; Cheng et al. 2024).

La cromatografía de gases se basa en la separación de compuestos químicos basándose en su distribución entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida o sólida en una columna. En el caso del escualeno, que es una molécula no polar, se emplea una fase estacionaria no polar y una fase móvil

generalmente compuesta de gases inertes como helio o nitrógeno (Cheng et al., 2024; Xu et al., 2023).

Procedimiento del Análisis

Preparación de la Muestra:

El escualeno se disuelve en un solvente no polar como el hexano.

La muestra se filtra para eliminar partículas sólidas que puedan obstruir el sistema, utilizando un filtro jeringa de 0,22 μm .

Inyección:

La muestra preparada se introduce en el cromatógrafo de gases mediante un inyector. Esta introducción suele ser en forma líquida, utilizando una micro jeringa para asegurar la cantidad exacta.

Separación:

Una vez inyectada, la muestra es transportada a través de la columna cromatográfica por el gas portador.

En la columna, el escualeno se separa de otros compuestos basándose en sus diferentes interacciones con la fase estacionaria.

Curva de calibración del estándar de escualeno:

Detección:

El escualeno, al salir de la columna, pasa por un detector. Los detectores comunes en CG incluyen el detector de ionización de llama (FID) o el detector de masas (MS).

El detector mide la cantidad de escualeno y genera un pico en un cromatograma, un gráfico que muestra la intensidad de la señal frente al tiempo de retención.

Análisis de Datos:

La identificación y cuantificación de los picos en el cromatograma se realizan mediante la comparación de sus tiempos de retención y áreas con patrones de referencia y estándares de concentración conocida.

Aplicaciones y Beneficios

Identificación y Cuantificación: La CG permite determinar la concentración de escualeno en muestras y productos, fundamental para garantizar la calidad en productos farmacéuticos y cosméticos.

Investigación: Facilita la investigación en la química del escualeno y sus aplicaciones industriales.

Control de Calidad: Es útil para el control de calidad en la producción de productos que contienen escualeno, asegurando la consistencia y efectividad.

El análisis de cromatografía de gases del escualeno es una herramienta crucial para su evaluación en diferentes contextos industriales y de investigación. Proporciona una separación precisa de compuestos volátiles y permite una cuantificación exacta del escualeno, lo que es esencial para aplicaciones científicas y comerciales (Thamer et al. 2023; Cheng et al. 2024).



Figura 2. Equipo de cromatografía de gases.

Fuente: Laboratorio de la UNAAT, (2024).

2.3. Definición de términos

2.3.1. Extracción por fluidos supercríticos

Las siglas SFE se refieren al proceso de extracción con fluidos supercríticos escrito en inglés (*Supercritical Fluids Extraction*). El proceso o método o técnica SFE emplea un fluido en estado supercrítico para la obtención de un determinado analito, diferentes fluidos pueden utilizarse como solvente, pero para alcanzar su estado supercrítico se debe colocar al fluido en condiciones de presión y temperatura crítica, estos dos parámetros termodinámicos son muy variables de solvente a solvente (Santana et al., 2023).

2.3.2. Solvente GRAS

Los GRAS son considerados seguros para ser utilizados en procesos que involucran transformación de alimentos. Su uso no implica peligro en proceso de producción de aditivos alimentarios, compuestos, extractos y otros analitos de materias primas de origen vegetal o animal. Por tanto, estos pueden ser utilizados sin ningún peligro o riesgo en la fabricación de productos alimenticios y no alimenticios (FDA, 2022).

2.3.3. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica analítica que separa compuestos volátiles en una muestra al pasarla a través de una columna con una fase estacionaria mientras un gas portador transporta los componentes. Cada compuesto interactúa de manera diferente con la fase estacionaria, resultando en picos distintos en el detector, lo que permite su identificación y cuantificación precisa (Thamer et al. 2023).

2.3.4. Escualeno

El escualeno es un compuesto producido por el organismo humano y otros organismos vivos. Se puede obtener comercialmente del aceite del hígado de tiburón, pero también de fuentes vegetales, como el aceite de oliva, salvado de arroz y amaranto (Cheng et al., 2024).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo de estudio

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar las condiciones del proceso de extracción supercrítica para la producción de extractos bioactivos a partir de las semillas de quinilla. Por tanto, el estudio es de tipo experimental básico, donde se manipularán las variables del proceso para evaluar el comportamiento del rendimiento de extracción global y determinar el rendimiento escualeno bajo condiciones optimizadas. La optimización del proceso se realizó utilizando la metodología de superficie de respuesta (Hernández-Sampieri & Mendoza, 2018).

3.2. Diseño del estudio

De acuerdo al objetivo del presente estudio y la naturaleza de las variables del proceso, se empleó el diseño Box-Behnken para el desarrollo de los experimentos, las variables estudiadas fueron la temperatura, presión y flujo masico de CO₂. En la Tabla 3, se muestran los niveles de cada variable independiente.

Tabla 3. Niveles de las variables independientes del proceso de extracción supercrítica

Variables	Niveles		
	-	0	+
Temperatura (°C)	40	55	70
Presión (bar)	100	250	400
Flujo masico de CO ₂ (mm)	50	80	110

En total se desarrollaron 15 tratamientos y el orden de ejecución de los ensayos experimentales se realizó aleatoriamente, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Diseño Box-Behnken para el proceso de extracción supercrítica de escualeno de las semillas de quinilla

Corrida	Variables codificadas			Variables decodificadas			Variable respuesta
	X1	X2	X3	X1	X2	X3	RG
				(°C)	(bar)	(mm)	(%, m/m)
1	-1	-1	0	40	100	80	0.80
2	-1	1	0	40	400	80	12.08
3	1	-1	0	70	100	80	0.84
4	1	1	0	70	400	80	11.78
5	-1	0	-1	40	250	50	8.37
6	-1	0	1	40	250	110	7.30
7	1	0	-1	70	250	50	4.28
8	1	0	1	70	250	110	5.12
9	0	-1	-1	55	100	50	0.49
10	0	-1	1	55	100	110	0.50
11	0	1	-1	55	400	50	9.49
12	0	1	1	55	400	110	6.69
13	0	0	0	55	250	80	3.71
14	0	0	0	55	250	80	7.89
15	0	0	0	55	250	80	4.49

X1= Temperatura; X2=Presión; X3= Flujo másico (para determinar el flujo másico utilice la Tabla del Anexo 2, con $\rho_{CO_2} = 1,257 \text{ kg/m}^3$); RG= Rendimiento global.

3.3. Población y muestra

La población de estudio estuvo constituida por 1 kilogramo de semillas de quinilla adquiridas del Vivero Forestal Pucallpa, ubicado en la ciudad de Ucayali. La muestra experimental correspondió a aproximadamente 5 gramos de semillas secas, molidas y sin cáscara, utilizados en cada ensayo desarrollado en un reactor de 100 mL. El tamaño de la muestra se determinó de acuerdo con

ensayos preliminares que establecieron dicha cantidad como representativa y adecuada para evaluar el proceso bajo las condiciones experimentales definidas.



Figura 3. Semillas de quinilla.

3.4. Métodos y técnicas

3.4.1. Acondicionamiento de las semillas de quinilla

El acondicionamiento de las semillas se efectuó siguiendo las operaciones descritas a continuación:

a). Selección

La operación se realizó manualmente, tiene por objetivo separar las semillas vacías y con signos de deterioro. Las semillas deterioradas serán consideradas cuando presentan decoloración de la cáscara, fisuras y agujeros causados ya sean por insectos o por daño mecánico.

b) Limpieza

Las semillas por lo general contienen fragmentos de ramas, residuos de hojas y partículas de tierra, estos se retiraron utilizando un tamiz.

c) Secado

El proceso de secado de las semillas de quinilla se realizó en 2 etapas. En la primera etapa, se colocaron las semillas con cáscara en una estufa a 40°C durante 24 horas, con el propósito de facilitar el descascarillado y obtener cotiledones íntegros. Posteriormente, las semillas de quinilla sin cáscara se liofilizaron (Figura 4), empleando una temperatura de -70°C y un vacío de 0.001 Pa, durante un período de 24 horas.



Figura 4. Secado de las semillas de quinilla por liofilizado

d) Descascarillado

La operación se realizó manualmente con la ayuda de un mortero y pistilo. Las semillas con cáscara fueron sometidas a golpes en el mortero con una intensidad apropiada para quebrar la cascará procurando conservar los cotiledones. En la Figura 5 se observan los cotiledones después del descascarillado.



Figura 5. Descascarillado de las semillas de quinilla

e) Empacado al vacío

Los cotiledones de quinilla se empacaron al vacío para asegurar su conservación hasta la realización de los ensayos de extracción. Se utilizaron bolsas de media densidad y capacidad de 1 kg.



Figura 6. Empacado al vacío de las semillas de quinilla

f) Almacenado

Los cotiledones o semillas descascarilladas empacadas al vacío fueron envueltos con papel aluminio para protegerlos de la luz. A seguir se almacenaron en un congelador de laboratorio a -20°C hasta los ensayos de extracción.

3.4.2. Proceso de extracción supercrítico

Las semillas previamente preparadas como se indica en la sección 3.4.1., se sometieron a extracción con dióxido de carbono supercrítico siguiendo las operaciones unitarias descritas a continuación:

a) Descongelamiento de la muestra

Las semillas descascarilladas empacadas al vacío congeladas se sometieron a descongelamiento a temperatura ambiente para evitar la degradación de compuestos bioactivos termosensibles.

b) Molienda

Las semillas se sometieron a molienda con la finalidad de facilitar la extracción de los compuestos bioactivos. La reducción de tamaño de partícula incrementa el área de transferencia de masa. Para la molienda se utilizó un molino tipo Wiley Will MA-360 NV.

c) Preparación del lecho de extracción

Las semillas molidas se introdujeron en la columna de extracción. El lecho de extracción se estructuro de la siguiente forma, en la base se colocó una capa de lana de vidrio, luego se introdujo las semillas de quinilla molidas, seguido se volvió a colocar otra capa de lana de vidrio en la parte superior de la muestra. El espacio excedente en la columna se llenó con perlas de vidrio con la finalidad de ahorrar el consumo de CO_2 .

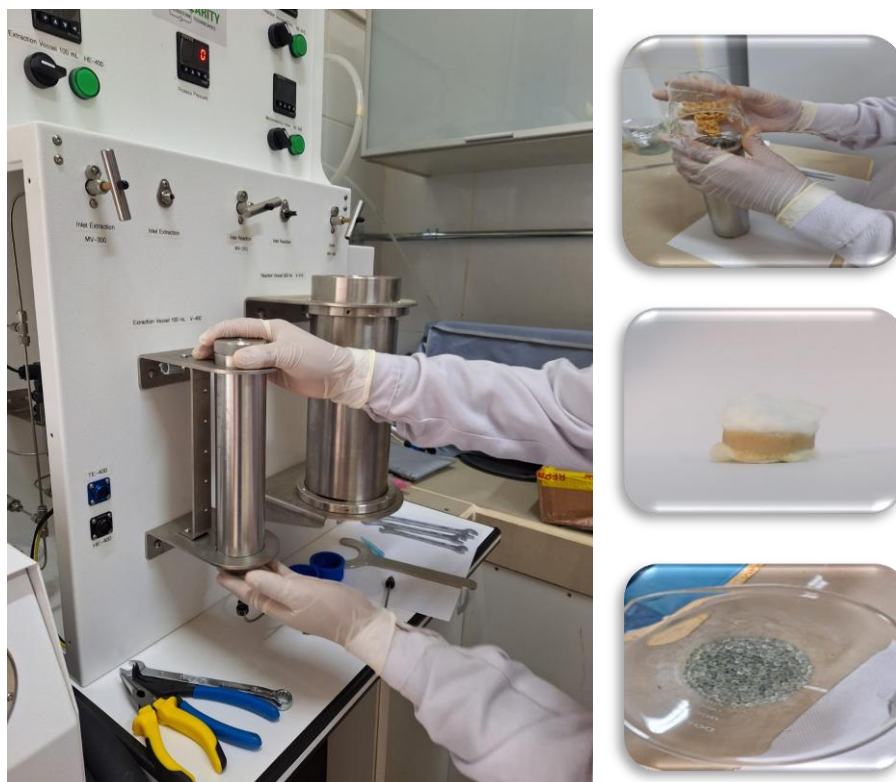


Figura 7. Acondicionamiento del lecho de extracción

d) Extracción estática

La extracción estática es un proceso que se da sin flujo de solvente (CO_2), tiene por objetivo asegurar que el solvente se difunda hacia el interior de las partículas. El tiempo que se consideró fue de 5 min.

e) Extracción dinámica

Después del tiempo de extracción estática, se permite el flujo del solvente de extracción, a esta etapa se considera como extracción dinámica. El tiempo de extracción dinámica se ajustó a través de ensayos previos. En esta etapa, las condiciones de operación se mantienen constante, que se fijaron de acuerdo con los tratamientos mostrados en la Tabla 4.

f) Despresurización

Una vez finalizada la extracción dinámica, se corta el flujo de CO_2 utilizando la válvula de bloqueo y micrométrica del equipo de extracción. A seguir se retira el

frasco de colecta de la línea de extracción. Y finalmente se inicia la despresurización del sistema abriendo la válvula de bloqueo y micrométrica.

g) Colecta de extracto

Una vez finalizado la extracción dinámica, el frasco de colecta es retirado de la línea de extracción, se retira la tapa y se deja en reposo para promover la separación del solvente del extracto.



Figura 8. Colecta del extracto de quinilla

h) Registro del peso del extracto

Se pesa el frasco con el extracto, luego esta información se resta con el peso del frasco vacío para calcular el peso neto del extracto obtenido bajo las condiciones de extracción.

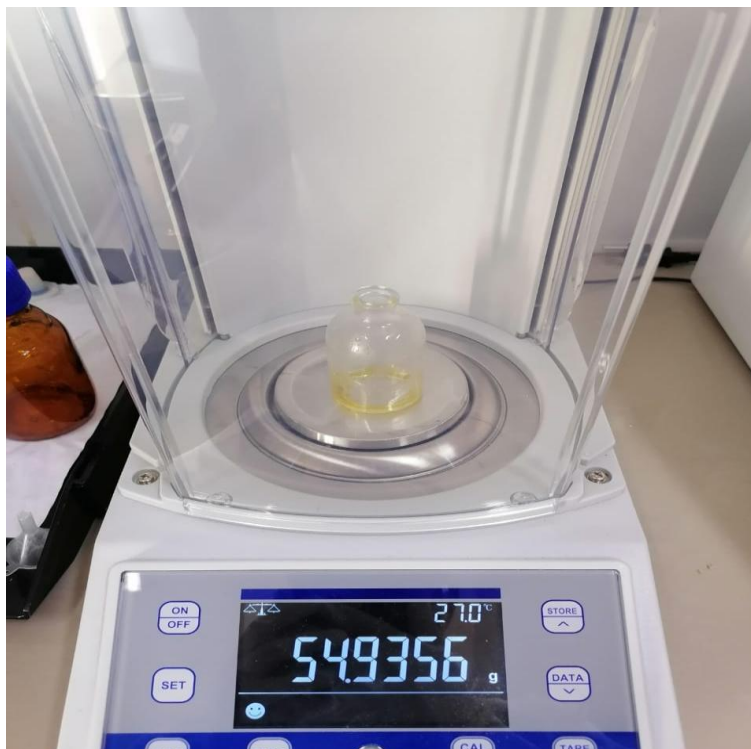


Figura 9. Pesado del extracto de quinilla

i) Almacenamiento del extracto

Una vez registrado el peso del extracto, el frasco se sella con lacre y tapa de goma. Antes del sellado se incorpora una cierta cantidad de nitrógeno para evitar la degradación de los compuestos. Finalmente se almacena los extractos obtenidos en un congelador de laboratorio a -20°C y protegidos de la luz.

En la Figura 10 se presenta el diagrama de operaciones para la obtención del extracto de quinilla por fluidos supercríticos. Este diagrama describe las distintas etapas del proceso, desde la preparación de la materia prima hasta la obtención del extracto final. Además, facilita la comprensión y optimización del proceso de extracción, permitiendo un control preciso y eficiente de los diferentes parámetros involucrados.

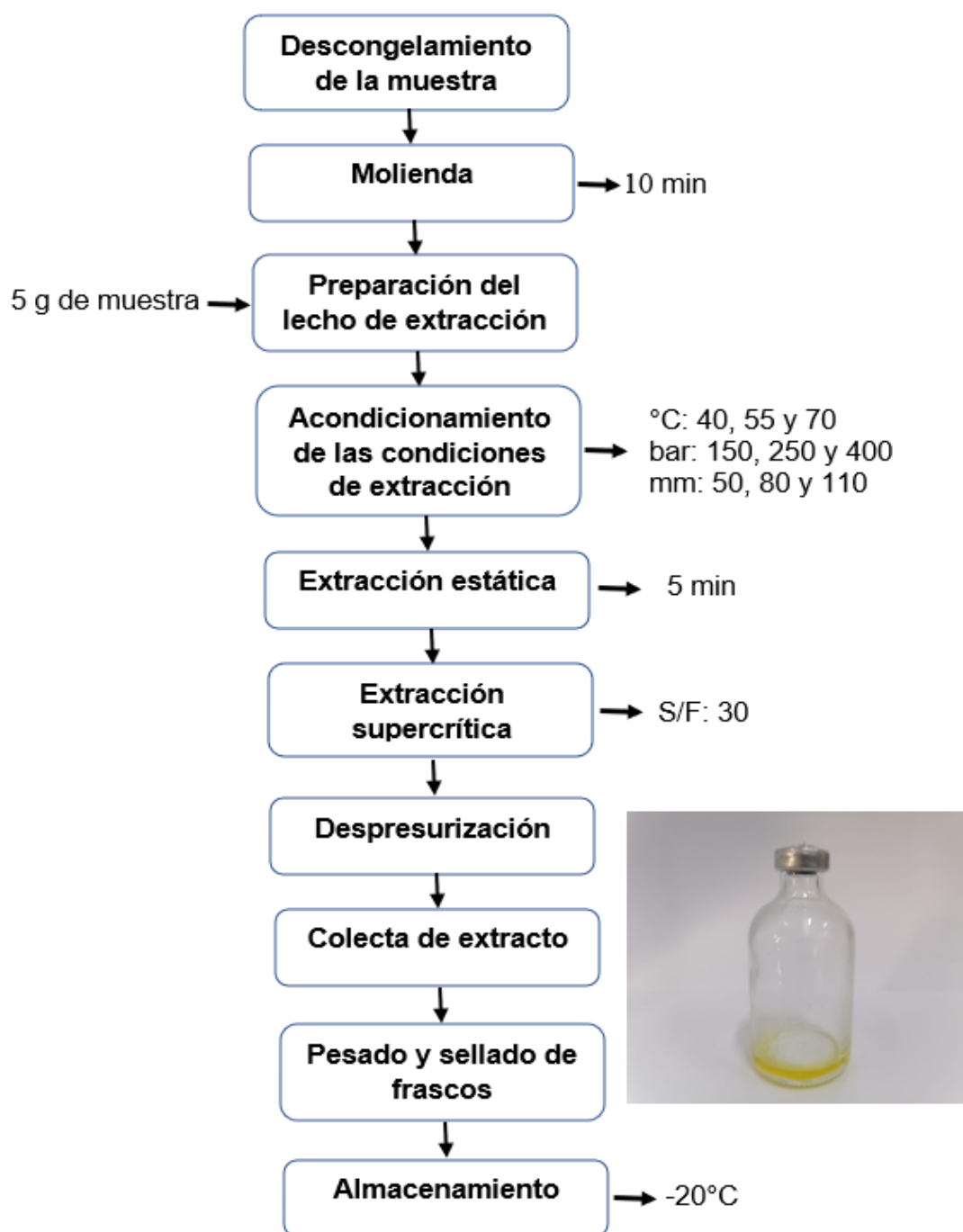


Figura 10. Diagrama de operaciones para la obtención del extracto de quinilla

3.4.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La composición fitoquímica del extracto de quinilla obtenido a condiciones supercríticas de 400 bar, 40 °C y 50 mm fue caracterizado por cromatografía de gases (SHIMADZU, GC-2010 Plus) en el Laboratorio de Investigación y Certificaciones (LABICER) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), la metodología fue ajustada a partir del método desarrollado por (Bendif et al., 2018).

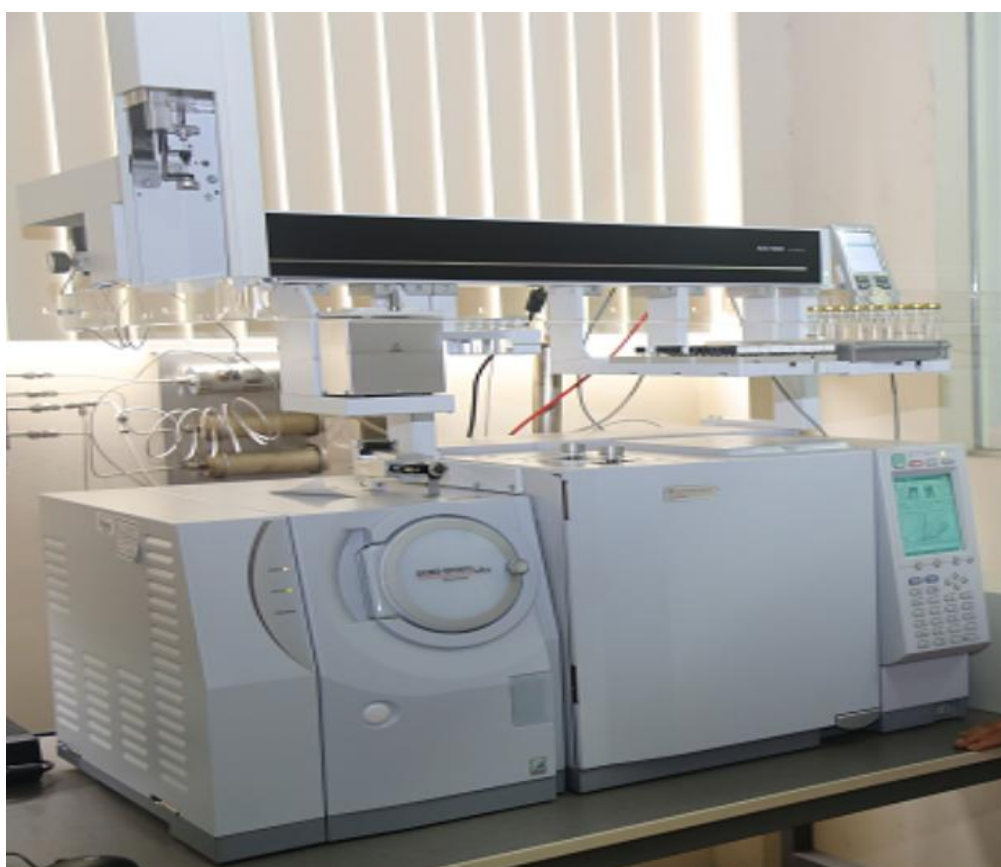


Figura 11. Cromatógrafo de gases (SHIMADZU, GC-2010 PLUS)

Fuente: LABICER, (2024).

Tabla 5. Condiciones de análisis CG-MS

Equipos utilizados		
Cromatógrafo de gases	SHIMADZU, GC-2010 Plus	
Auto muestreador	SHIMADZU, AOC-6000	
Detector de espectrometría de masas	SHIMADZU, GCMS-QP210 Ultra	
Inyección líquida (AOC-6000)		
Jeringa	LS1-10 µL	
Ciclo de pre-enjuague	3	
Ciclos de enjuague con muestra	1	
Razón de flujo de aspiración	1 µL/s	
Inyector	SPL1	
Razón de flujo de inyección	100 µL/min	
Ciclos post-enjuague	3	
Volumen de inyección	2.0 µL	
Puerto de inyección		
Tipo	Split	
Razón de Split	50	
Temperatura	280 °C	
Tipo	Helio	
Modo de control de flujo	Velocidad lineal (36.5 cm/sec)	
Flujo de columna	1 mL/min	
Flujo de purga	3 mL/min	
Rampa de temperatura de columna		
Razón	Temperatura	Hold time
-	60 °C	5 min
8 °C/min	220 °C	0 min
11 °C/min	280 °C	25 min
Tiempo total: 52.45 min		
Detector		
Tipo	Masas	
Temperatura de fuente de iones	250°C	
Temperatura de interface	290°C	
Tiempo de corte	2 min	
Tiempo de inicio MS	3 min	

Energía de ionización	70eV
Modo de adquisición	Scan
Rango SCAN	29-500 m/z
Columna cromatográfica	
Tipo	Rtx®-5 MS
Dimensiones	30 m x 0.25 mm x 0.25 µm

3.5. Tratamiento de datos

El rendimiento global determinado bajo diferentes condiciones experimentales se expresó en g de extracto/100 g de muestra. El contenido de escualeno determinado por CG-MS se expresó en contenido relativo, porcentaje (%) de área de pico cromatográfico. Los rendimientos de extracto de las semillas de quinilla se analizaron por la metodología de superficie de respuestas y se optimizó el proceso para determinar las mejores condiciones de operación para obtener el mayor rendimiento de extracto, y finalmente se determinó el contenido de escualeno. Para determinar la idoneidad del modelo matemático, se realizó análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de 0,05. Asimismo, se determinó el coeficiente de terminación ordinario (R^2), ajustado (R_{Adj}^2) y la falta de ajuste.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

4.1. Efecto de las variables independientes sobre el rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE

El rendimiento de los extractos de semillas de quinilla se muestra en la Figura 12, observándose que el tratamiento 2 es el de mayor rendimiento con 12,08 %, mientras que el tratamiento 9 es el de menor rendimiento con 0,49 %. La variable termodinámica más influyente fue la presión, donde 400 bar permitió alcanzar los tratamientos con mayor rendimiento (T2, T4 y T11). El incremento del rendimiento de extractos con el incremento de la presión de extracción se debe probablemente a la presencia de compuestos lipídicos como triacilglicéridos, que requieren condiciones supercríticas con una alta presión, como en el caso de aceite de la pulpa de *Euterpe oleracea* (De Cássia Rodrigues et al., 2015), aceite de las semillas de *Dipterix alata* (Chañi-Paucar et al., 2021), entre otros. Un parámetro que no fue evaluado, pero puede influenciar en el rendimiento es el tiempo estático (o también conocida como extracción estática), que en el presente estudio fue de 5 min, este parámetro es crucial porque facilita la difusión del CO₂ hacia el interior de las partículas (Hassim et al., 2020). En otra investigación desarrollada por Powder-George y Mohammed (2018), se empleó diversos solventes como hexano, cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol para obtener extractos crudos de semillas de quinilla, siendo los rendimientos alcanzados 4,34%, 8,63%, 10,23%, 17,77% y 22,37%, respectivamente.

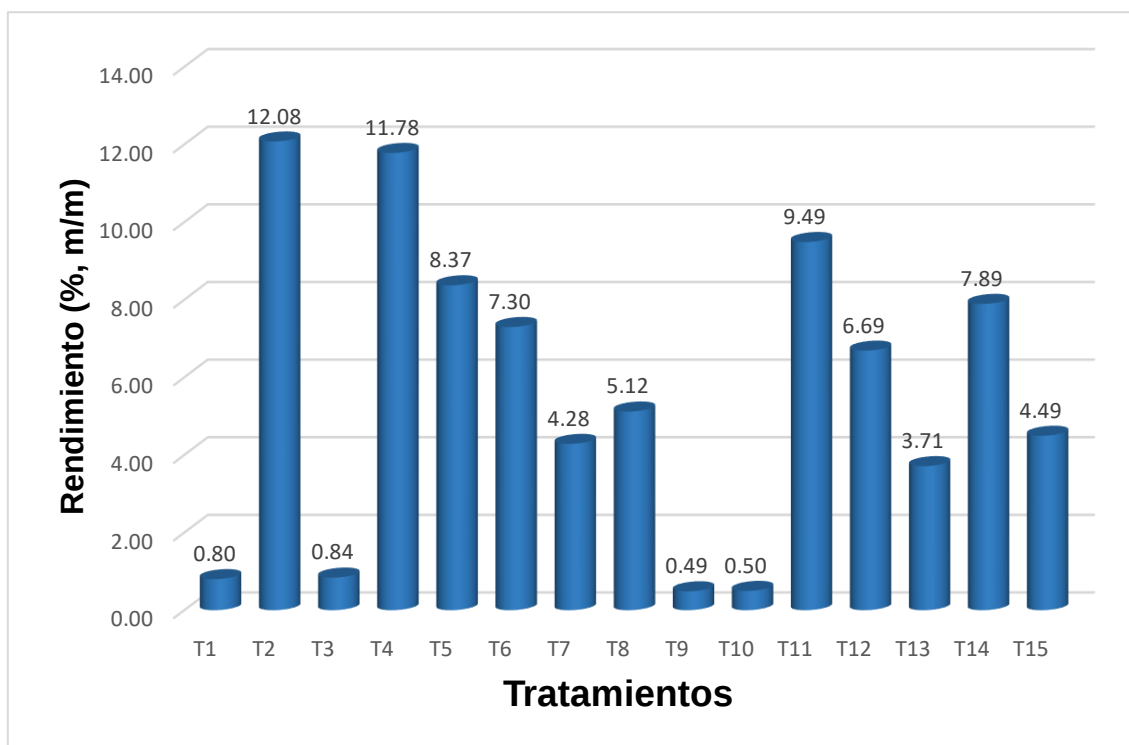


Figura 12. Rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE

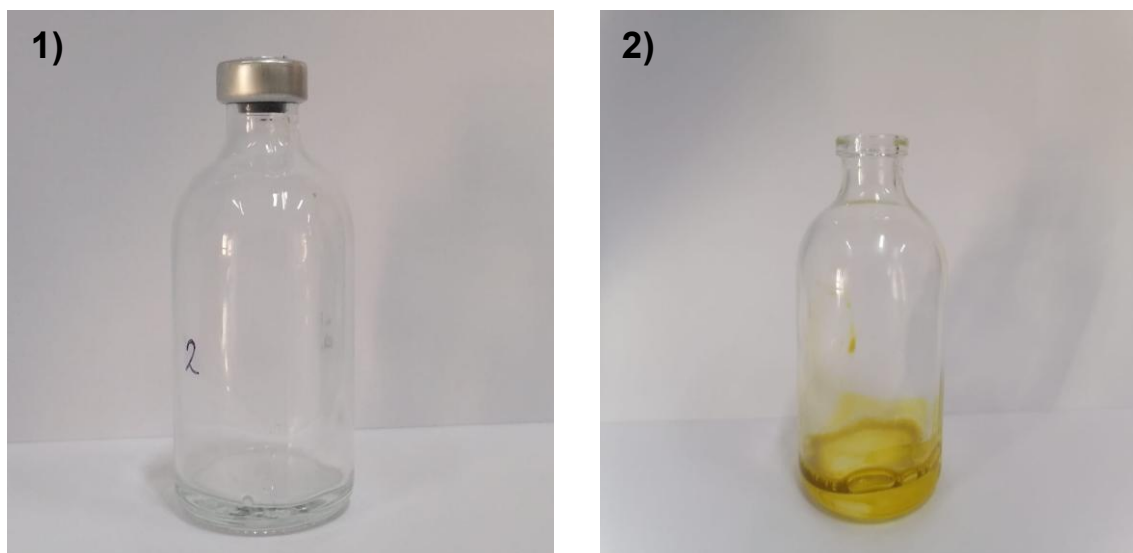


Figura 13. Extractos de semillas de quinilla obtenidos a 1) 100 bar, 55 °C, 50 mm y 2) 400 bar, 40 °C, 80 mm

En la Figura 13 se observan 2 extractos obtenidos a diferentes condiciones de extracción supercrítica, siendo notable las diferencias en cuanto al rendimiento global y características físicas como el color y la consistencia. El frasco 1 presenta una coloración blanca amarillenta y su consistencia es menos viscosa, en cuanto al frasco 2 se visualiza una coloración amarillo claro y una consistencia aceitosa al tacto. Estas características son influenciadas por los parámetros termodinámicos como la temperatura y presión, que afectan la densidad del CO₂ y le otorgan propiedades para extraer diversos compuestos apolares y de baja polaridad. En el estudio desarrollado por Powder-George y Mohammed (2018), se obtuvieron varios extractos de las semillas de quinilla empleando diferentes solventes como hexano, cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Cada solvente influencio en la coloración del extracto siendo los colores obtenidos amarillo pálido, marrón claro, amarillo oscuro, amarillo y naranja respectivamente.

4.2. Análisis de superficie respuesta

En la Tabla 6 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) el cual valida los términos de la ecuación polinómica en base al valor F en $p < 0.05$. Cabe mencionar que el coeficiente de regresión se utilizó para hacer cálculos estadísticos y R^2 confirmando la idoneidad de la ecuación (1).

El R^2 del rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE fue de 0,9014, ello indica que el modelo es significativo y tiene un buen ajuste para los datos experimentales. En cuanto a las variables independientes estudiadas se resalta la influencia de la presión (bar) sobre el rendimiento global (% , m/m) que fue altamente significativa con un P- valor (0.001).

La prueba de falta de ajuste es otro parámetro para apoyar la validez del modelo matemático. Esta prueba se utiliza para detectar la existencia de observaciones que tienen un ajuste deficiente al modelo, incluso si la tendencia general es altamente significativa (Bischoff & Miller, 2006). En el análisis ANOVA se observa que la falta de ajuste tiene un P-valor de 0.606 el cual es mayor a 0.05 (α), concluyendo que el modelo se ajusta a los datos obtenidos.

Tabla 6. Análisis de varianza para superficie de respuesta del rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE

Fuente	GL	Adj SS	Adj MS	F-Valor	P-Valor
Modelo	9	195.499	21.722	5.08	0.044
Lineal	3	181.369	60.456	14.14	0.007
Temperatura (°C)	1	5.313	5.313	1.24	0.316
Presión (bar)	1	174.909	174.909	40.91	0.001
Fluxómetro (mm)	1	1.147	1.147	0.27	0.627
Cuadrático	3	11.216	3.739	0.87	0.513
(Temperatura (°C)) ²	1	8.235	8.235	1.93	0.224
(Presión (bar)) ²	1	0.869	0.869	0.20	0.671
(Fluxómetro (mm)) ²	1	1.292	1.292	0.30	0.606
Interacción	3	2.914	0.971	0.23	0.874
Temperatura (°C)*Presión (bar)	1	0.028	0.028	0.01	0.938
Temperatura (°C)*Fluxómetro (mm)	1	0.910	0.910	0.21	0.664
Presión (bar)*Fluxómetro (mm)	1	1.975	1.975	0.46	0.527
Error	5	21.378	4.276		
Falta de ajuste	3	11.497	3.832	0.78	0.606
Error puro	2	9.881	4.940		
Total	14	216.877			

Tabla 7. Coeficientes codificados y no codificados del modelo.

Termino	Efecto	CC	CNC	SE Coef.	T-Valor	P-Valor	VIF
Constante		5.37	17.1	1.19	4.49	0.006	
Temperatura (°C) (T)	-1.630	-0.82	- 0.860	0.731	-1.11	0.316	1.00
Presión (bar) (P)	9.352	4.68	0.057	0.731	6.40	0.001	1.00
Fluxómetro (mm) (F)	-0.757	-0.38	0.073	0.731	-0.52	0.627	1.00
T ²	2.99	1.49	6.64×10 ⁻³	1.08	1.39	0.224	1.01
P ²	-0.97	-0.49	- 2.2×10 ⁻⁵	1.08	-0.45	0.671	1.01
F ²	-1.18	-0.59	- 6.6×10 ⁻⁴	1.08	-0.55	0.606	1.01
T×P	-0.17	-0.08	- 3.7×10 ⁻⁵	1.03	-0.08	0.938	1.00
T×F	0.95	0.48	1.06×10 ⁻³	1.03	0.46	0.664	1.00
P×F	-1.41	-0.70	- 1.56×10 ⁻⁴	1.03	-0.68	0.527	1.00

CC: Coeficiente codificado; CNC: Coeficiente no codificado

En la Figura 14 se comprueba el supuesto de que los residuos están distribuidos aleatoriamente y tienen una varianza constante. Debido a que los puntos están ubicados de manera aleatoria a ambos lados de 0, sin patrones reconocibles en los puntos.

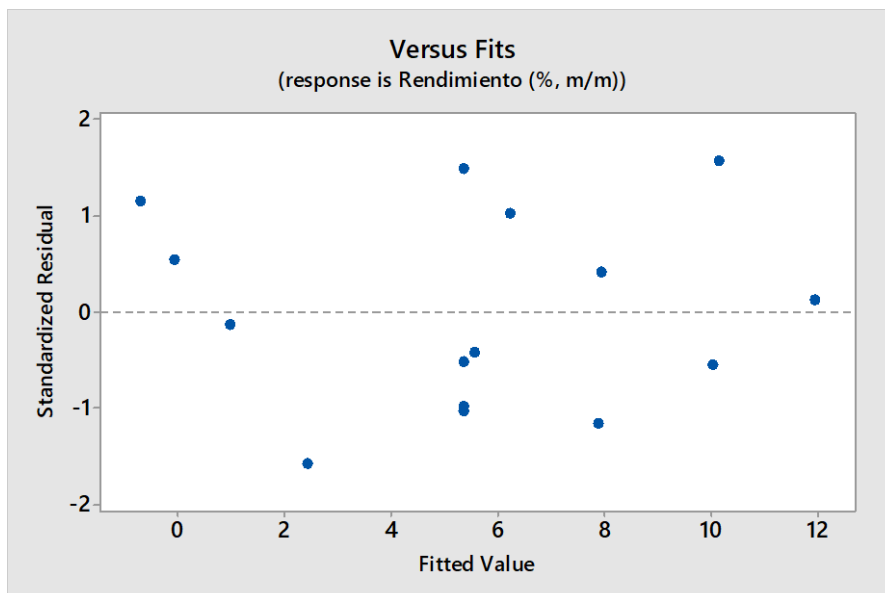


Figura 14. Residuos vs ajustes para rendimiento global de los extractos de quinilla obtenidos SFE (% m/m)

En la Figura 15 se visualiza que los residuos estandarizados siguen una distribución normal, puesto que los puntos de los datos obtenidos están muy próximos a la línea central.

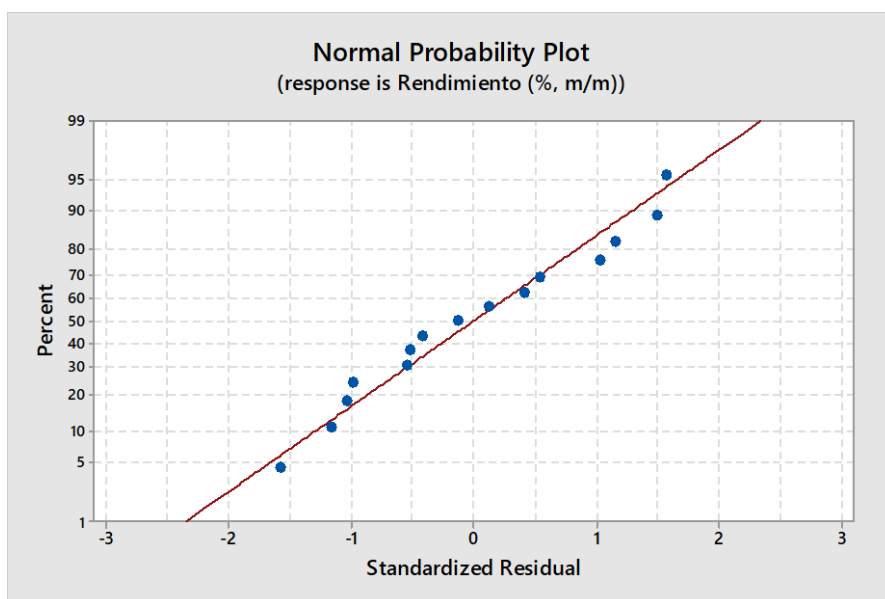


Figura 15. Distribución normal de residuos para rendimiento global de los extractos de quinilla obtenidos SFE (% m/m)

La aplicación del proceso de regresión de la superficie de respuesta se presenta en el polinomio predicho presentado en la ecuación:

$$R \% = 17.1 - 0.860 T + 0.0565 P + 0.073 Fm + 0.00664 T^2 - 0.000022 P^2 - 0.00066 Fm^2 - 0.000037 T * P + 0.00106 T * Fm - 0.000156 P * Fm$$

Donde:

R %: Es el rendimiento porcentual

T: Es la temperatura de extracción supercrítica.

P: Es la presión de extracción supercrítica.

Fm: Es el flujo másico del CO₂

La variable termodinámica más influyente en el rendimiento global de extracción es la presión. En la Figura 16 se visualiza que la interacción de presión y temperatura permiten alcanzar los máximos rendimientos si se emplea un rango de 350 – 400 bar y 40 – 55°C. La investigación desarrollada por (Kryževičiute et al. 2016) informaron que la presión exhibe una influencia positiva en la recuperación de la fracción lipídica del orujo de frambuesa en el rango de 100 a 450 bar. También se observó una tendencia similar de influencia de la presión en el caso del aislamiento SFE de aceites de alto valor a partir de diferentes materias primas, como semillas de melón (Maran & Priya, 2015), semillas de uva (Duba & Fiori, 2015) y soja (Jokić et al., 2012).

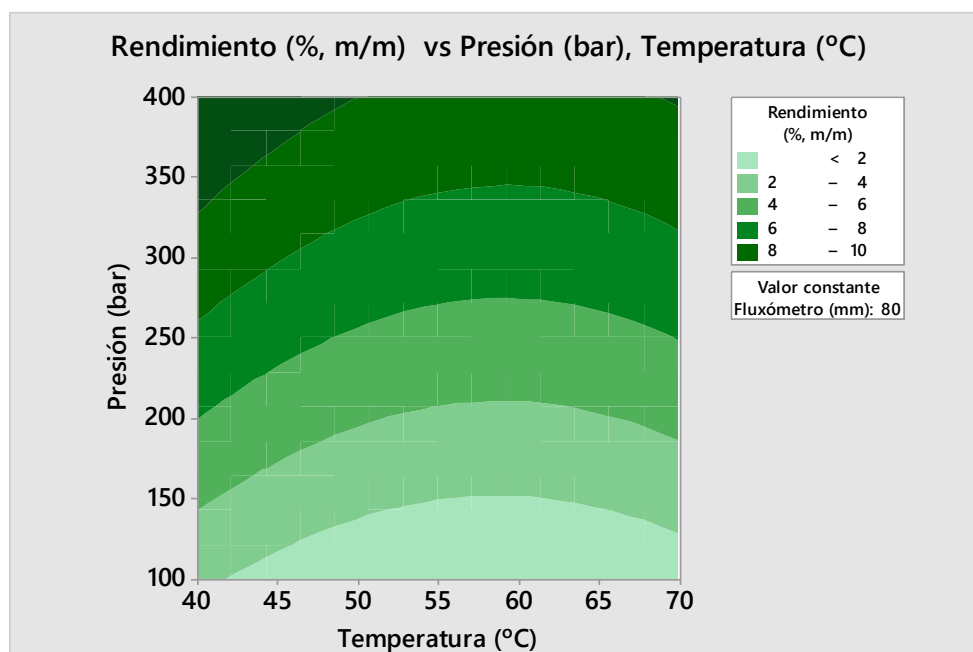


Figura 16. Rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción presión (bar) y temperatura (°C)

En la Figura 17 se visualiza un contorno de color verde oscuro que indica ser la zona de interacción de presión y flujo másico de CO₂ donde mayor efecto significativo tiene sobre el rendimiento global. Por otra parte, en la Figura 18 se aprecia que la aplicación de bajas temperaturas influye de manera significativa y son óptimas para poder recuperar el mayor porcentaje de extracto de quinilla. Cabe señalar que el aumento de temperatura a presión fija disminuye la densidad del CO₂ supercrítico, por lo tanto, su poder de solvatación (da Silva et al. 2016).

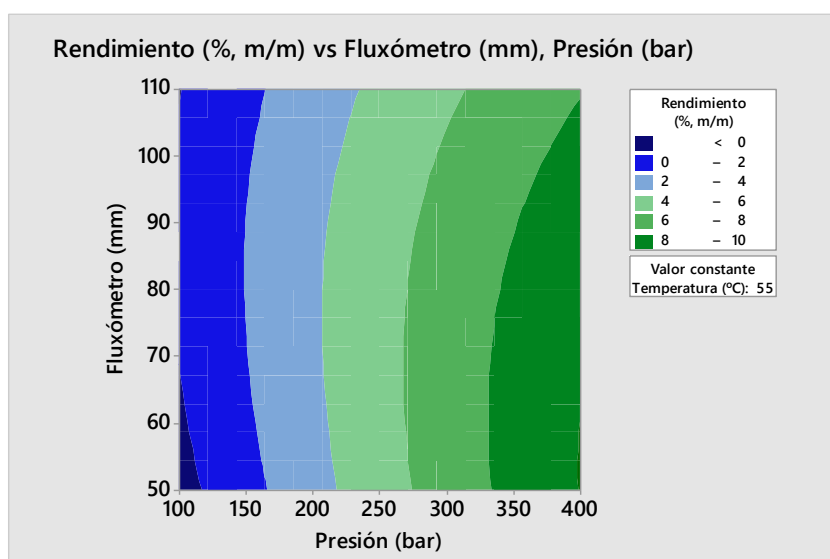


Figura 17. Rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción flujo másico de CO₂ (mm) y presión (bar)

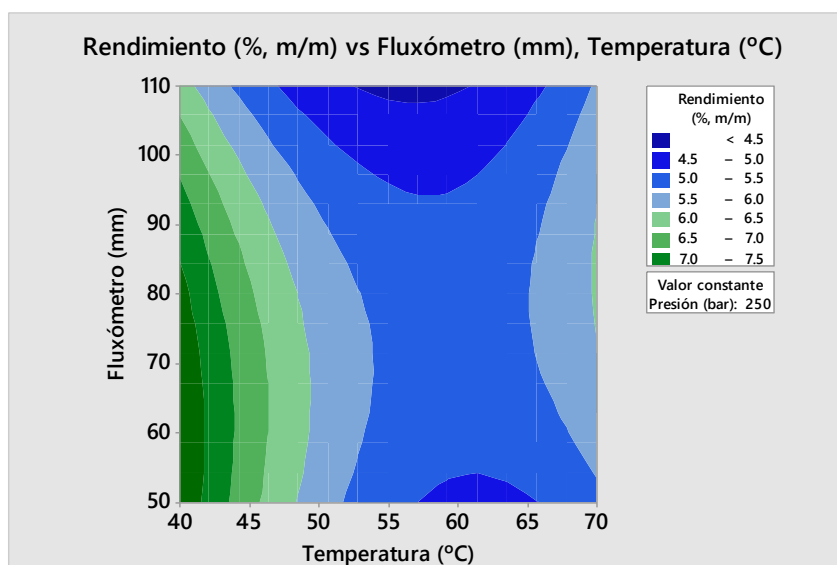


Figura 18. Rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción flujo másico de CO₂ (mm) y temperatura (°C)

En la Figura 19 se observa que la superficie de rendimiento más alto se alcanza en una condición baja de temperatura (40°C) y una alta presión (400 bar). En cuanto a la interacción del flujo másico de CO₂ y la temperatura, se visualiza en la Figura 20 que el rendimiento global esta significativamente influenciado por la aplicación de bajas temperaturas que oscilan entre 40 y 60 °C. Los resultados concordaron con el estudio que investigó la SFE del orujo de frambuesa en un rango de temperatura de 30 a 60 °C, indicando que la aplicación de bajas temperaturas son condiciones ideales para el proceso (Kryževičiute et al. 2016). También, se observó un efecto similar en el caso de las semillas de uva (Duba & Fiori, 2015).

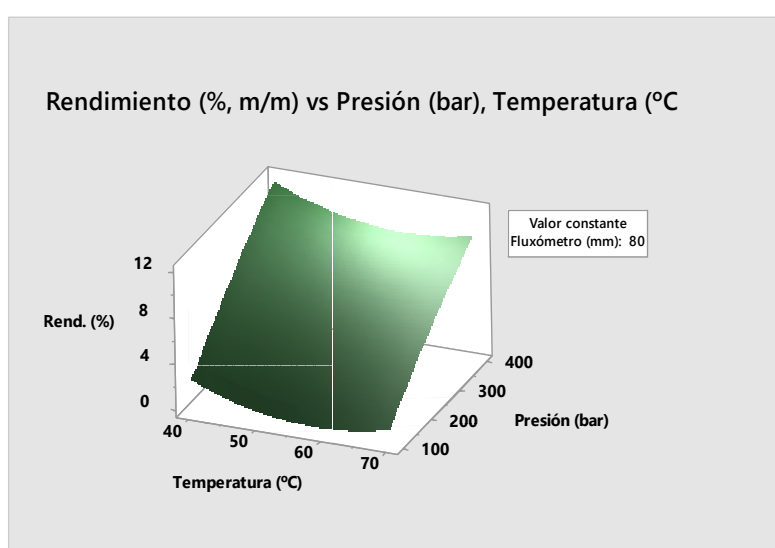


Figura 19. Superficie 3D del rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción presión (bar) y temperatura (°C)

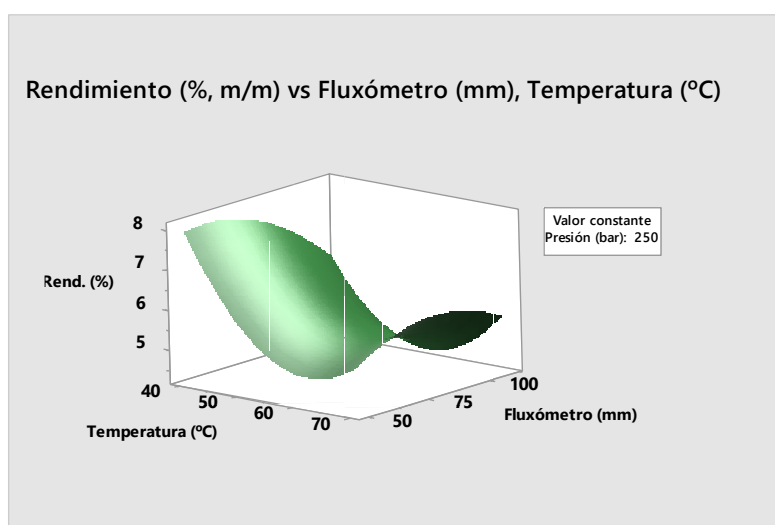


Figura 20. Superficie 3D del rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción temperatura (°C) y flujo másico de CO₂ (mm)

En la Figura 21 se visualiza que la superficie de mayor rendimiento global de extracto de quinilla se encuentra entre una presión de 300 y 400 bar, siendo el flujo másico de CO₂ una variable que aumenta la gradiente de concentración y mejora la tasa de extracción. Cabe destacar que un mayor caudal de disolvente exige un mayor coste operativo, el cual debe ser analizado desde un punto de vista industrial (Pereira & Meireles, 2009). Por lo tanto, el enfoque racional para el consumo de CO₂ en los procesos industriales estaría determinado por el período de tasa de extracción constante (CER).

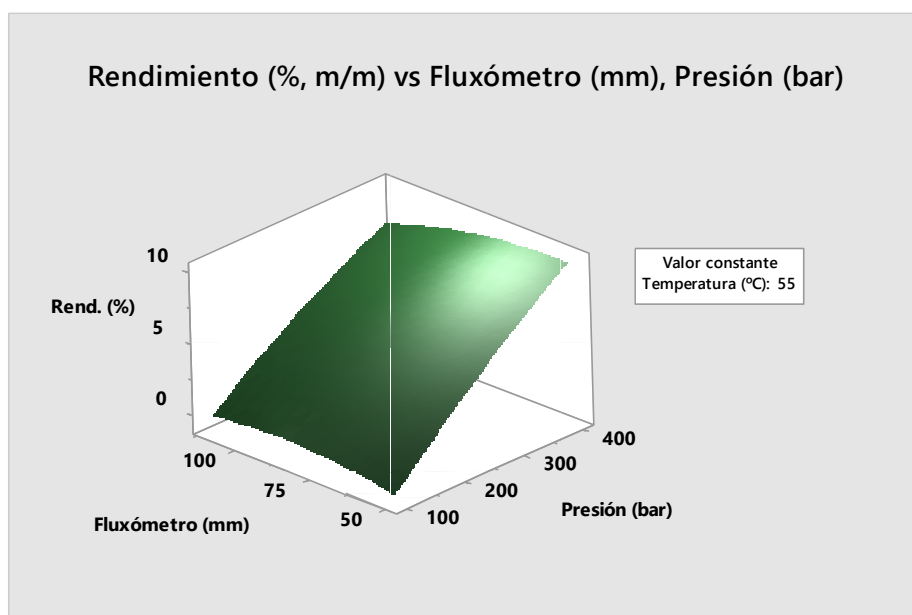


Figura 21. Superficie 3D del rendimiento de los extractos de quinilla obtenidos por SFE en función a la interacción flujo másico de CO₂ y presión (bar)

Para la optimización del proceso se empleó como variable respuesta el rendimiento global (% m/m) siendo el límite inferior y superior 0,4855 y 12,0756, respectivamente. La predicción de respuesta múltiple dio como condición óptima una temperatura de 40 °C, presión de 400 bar y fluxómetro de 50 mm.

Tabla 8. Soluciones de superficie respuesta

Soluciones	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Fluxómetro (mm)	Rendimiento ajustado (% m/m)	Deseabilidad compuesta
1	40	400	50	12.9152	1.00000
2	40	400	103.466	10.3675	0.85262
3	70	400	51.5347	10.1915	0.83744
4	70	400	103.668	9.3056	0.76100
5	40	308.613	98.9119	8.5119	0.69253
6	40	262.087	55.1919	8.4039	0.68321
7	70	354.410	106.000	8.2220	0.66751

En la Figura 22 se visualiza la interacción óptima de las 3 variables independientes para lograr el mayor rendimiento global de extracto de quinilla. Cabe señalar que las condiciones más bajas de temperatura (40°C) y el flujo másico de CO₂ (50 mm) son las que tienen mayor influencia significativa, mientras que la presión es influyente cuando se emplea a 400 bar.

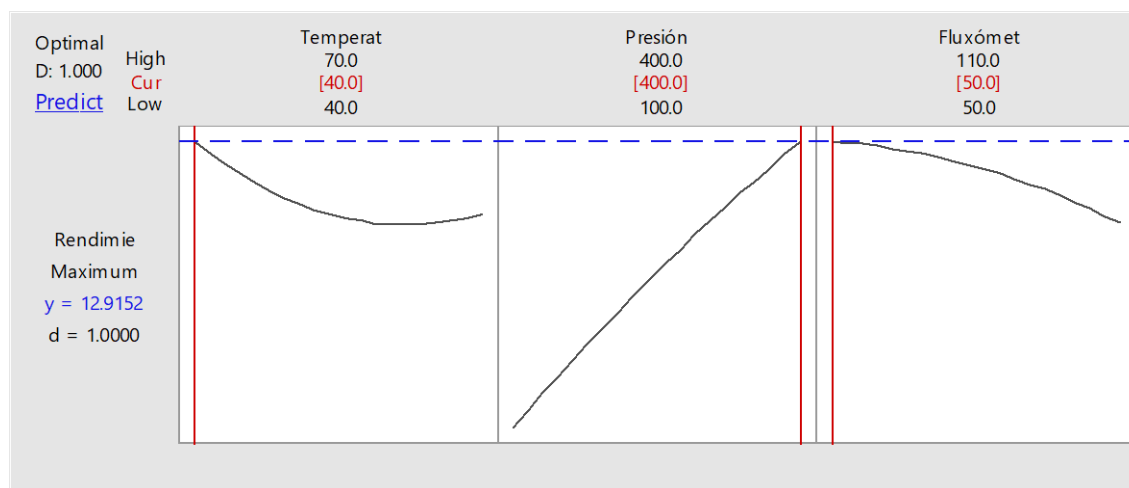


Figura 22. Condiciones óptimas del proceso SFE para la obtención de extracto de quinilla

4.3. Composición del extracto de quinilla obtenido por SFE

El contenido relativo de escualeno bajo las condiciones optimizadas (40 °C, 400 bar y 50 mm) fue de 17,9 % (Tabla 9). El contenido de escualeno observado en el presente trabajo no fue superior al observado en el hígado de tiburón (contenido de escualeno alrededor de 50 %), la principal fuente comercial de este compuesto (Rosales-García et al., 2017). Por otro lado, el contenido de escualeno observado en el extracto de quinilla es superior a otras fuentes vegetales, como aceite de arroz (11,75 %), nuez pecana (15,7 %), pistacho (9,14 %), entre otros (Rosales-García et al., 2017). El extracto de quinilla tiene otros compuestos con un alto contenido relativo, como: *trielaidin* (27.12 %); *glyceryl 1,3-distearate* (13.72 %); *1,2-Epoxyoctadecane* (7.61 %); *E,E,Z-1,3,12-Nonadecatriene-5,14-diol* (6.41 %); y *(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester* (5.47 %). Dentro de los metabolitos bioactivos identificados el trielaidin posee propiedades antibacterianas, anticancerígenas y antioxidantes que son de gran valor para la aplicación en la medicina (Chakraborty et al., 2022). De acuerdo al resultado observado en el presente trabajo, muestra que las semillas de quinilla son una fuente importante de escualeno para la industria de fármacos, cosméticos, y productos alimenticios nutricionales. Esto debido a que el escualeno es capaz de proteger a la piel de la radiación solar, prevenir enfermedades cardiovasculares, tiene efecto antitumoral y anticancerígeno, pudiéndose incluir en la dieta (Lozano-Grande et al., 2018), en la Tabla 10 se describen algunas aplicaciones del escualeno. En cuanto al valor comercial del escualeno (17.91 %) se destaca que este compuesto bioactivo mejora la función inmune, resiste la sensibilidad de la piel y ejerce efectos hipolipidémicos. También posee propiedades antioxidantes, antitumorales, antibacterianas y desintoxicantes (Cheng et al., 2024).

Tabla 9. Metabolitos bioactivos identificados en el extracto de semillas de quinilla extraído a 400 bar, 40 °C y 50 mm

Pi co	TR (min)	CAS	Nombre químico	Área (%)	IS
1	19.404	58594-45-9	13-Octadecenal, (Z)-	0.81	89
2	20.200	84-74-2	Dibutyl phthalate	0.32	96
3	20.519	628-97-7	Palmitic acid	3.06	95
4	22.454	N.I	trans,trans-9,12-Octadecadienoic acid, propyl ester	1.05	94
5	22.511	6114-18-7	(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester	5.47	96
6	22.780	111-61-5	Octadecanoic acid, ethyl ester	1.05	94
7	23.802	504-40-5	Glyceryl 1,3-distearate	7.98	85
8	23.896	7501-44-2	Glycidyl Palmitate	1.17	84
9	24.955	112-77-6	Oleoyl chloride	1.09	93
10	25.351	537-39-3	Trielaidin	27.12	89
11	25.441	5431-33-4	Glycidyl oleate	4.59	85
12	25.542	504-40-5	Glyceryl 1,3-distearate	5.74	85
13	25.649	7460-84-6	Glycidyl stearate	0.86	81
14	26.700	58594-45-9	(Z)-13-Octadecenal	0.22	89
15	27.486	693-83-4	Decyl sulfide	1.62	74
16	27.909	111-02-4	Squalene	17.91	97
17	28.931	58594-45-9	13-Octadecenal, (Z)-	3.33	75
18	33.623	481-17-4	Chondrillasterol	0.89	83
19	36.347	7390-81-0	1,2-Epoxyoctadecane	5.74	81
20	37.361	2671-68-3	Lanosteryl acetate	1.7	87
21	41.566	N.I	E,E,Z-1,3,12-Nonadecatriene-5,14-diol	6.41	86
22	42.284	7390-81-0	1,2-Epoxyoctadecane	1.87	76

TR: Tiempo de retención; **CAS:** Número de registro CAS; **IS:** Índice de similitud; **N.I:** No identificado

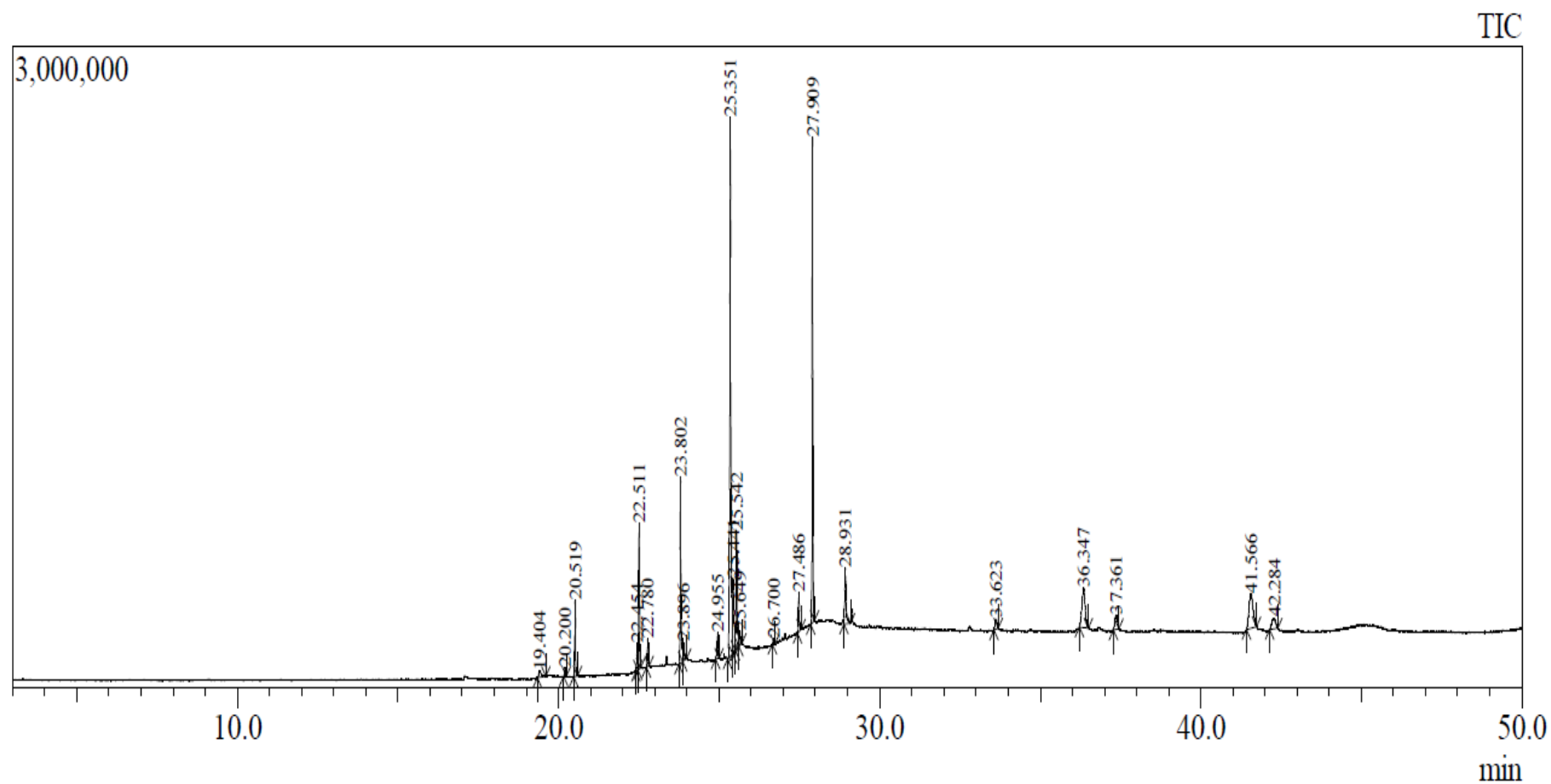


Figura 23. Perfil cromatográfico de los compuestos bioactivos del extracto de semillas de quinilla obtenido por SFE (400 bar, 40 °C, 50 mm).

Tabla 10. Actividades biológicas y mecanismos de acción del escualeno.

Actividad biológica	Efecto	Tratamiento	Referencias
Mejora de la inmunidad	Mejora de la respuesta inflamatoria de los monocitos	11.1 µg/mL de escualeno durante 2 h	(Navarro Chica et al., 2020)
	Modular la sobre activación de neutrófilos, monocitos y macrófagos	12.5, 25 y 50 µM de escualeno durante 18 h	(Cárdeno et al., 2015)
	Promover la absorción de antígenos por las células dendríticas	10% de escualeno durante 18 h	(Huang et al. 2018)
Senilidad de la piel	Promover el engrosamiento epidérmico	Vitamina C–SQ (30,1 mg, 0,054 mmol)	(Gref et al., 2020)
Efecto hipolipidémico	Promoción de la homeostasis del colesterol en células de macrófagos y hepatocitos	50 y 100 µM de escualeno durante 48 h	(Hien et al., 2017)
	Regulación del metabolismo lipídico en células HepG2	20, 50 y 100 µM de escualeno durante 72 h	(Hoang et al., 2016)
Actividad antioxidante	Protección contra el daño oxidativo del ADN en células epiteliales mamarias humanas MCF10A	0–800 µM de escualeno	(Warleta et al., 2010)
	Mejora de la capacidad antioxidante en pollos de engorde	0–2000 mg/kg de escualeno	(Y. Chen et al., 2020)

	Mejora de las propiedades antioxidantes en el pez cebra	0–1% de escualeno	(Zhang et al., 2023)
Actividad antitumoral	Tratamiento del carcinoma de células renales (CCR)	escualeno durante 12 h	(Rajamani et al., 2020)
	Atenuación del daño renal en ratones	100 mg/kg/día de escualeno	(Sakul et al., 2019)
Actividad antibacteriana	Inhibición de la virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	0,05–5,0 mM de escualeno	(Charan Bindu et al. 2015)
	Destrucción de la estructura del estafilococo áureo	200, 500, 700 mg de escualeno	(Fang et al., 2019)
Actividad de desintoxicación	Alivio del estrés oxidativo y el daño hepático inducidos por diquat	1,0 g/kg de escualeno	(Y. P. Chen et al., 2021)

CONCLUSIONES

Las variables estudiadas de presión, temperatura y flujo másico afectaron significativamente el rendimiento de extracto oleoso de las semillas de quinilla, siendo 12,08 % el mayor rendimiento y 0,49 % el menor rendimiento, estos extractos se obtuvieron a una condición supercrítica de (55 °C, 100 bar, 50 mm) y (40 °C, 400 bar, 80 mm); respectivamente.

La metodología de superficie de respuesta se utilizó para optimizar la obtención de extracto oleoso de las semillas de quinilla, identificando como las condiciones más óptimas una temperatura de 40 °C, una presión de 400 bar y un flujo másico 50 mm. Bajo estas condiciones, se logró un rendimiento de 12,92% y la identificación de 22 compuestos bioactivos en el extracto oleoso de las semillas de quinilla.

El análisis mediante cromatografía de gases permitió identificar que el extracto oleoso de las semillas de quinilla contiene un 17,91 % de escualeno. Además, se detectaron otros compuestos bioactivos, destacando entre ellos el *trielaidin* (27,12 %), el *glyceryl 1,3-distearate* (13,72 %), el *1,2-epoxyoctadecano* (7,61 %), el *E,E,Z-1,3,12-nonadecatrieno-5,14-diol* (6,41 %) y el *(E)-9-octadecenoic acid ethyl ester* (5,47 %). Estos compuestos presentan propiedades de gran relevancia para las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica en el desarrollo de nuevos productos.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de aumento de escala con mayores volúmenes de semillas de quinilla.

Ampliar el estudio para evaluar la rentabilidad de la implementación del proceso SFE de las semillas de quinilla a escalas mayores.

Estudiar la vida útil del extracto oleoso de las semillas de quinilla obtenido a través del proceso de extracción supercrítico, analizando los principales compuestos bioactivos, a diferentes condiciones de almacenamiento.

Realizar estudios de aplicación del extracto oleoso de quinilla para la elaboración de alimentos funcionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Báez, Q. S., Gárate, Q. J., Dueñas, L. H., & Zevallos, P. P. (2019). Árboles maderables de MADRE DE DIOS. *Centro de Investigaciones Herbario "Alwyn Gentry"*.

https://www.researchgate.net/publication/345728409_ARBOLES_Maderables_de_MADRE_DE_DIOS?channel=doi&linkId=5fabf07b92851cf7dd0e00e2&showFulltext=true

Baky, M. H., Elsaid, M. B., & Farag, M. A. (2022). Phytochemical and biological diversity of triterpenoid saponins from family Sapotaceae: A comprehensive review. *Phytochemistry*, 202, 113345. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2022.113345>

Batista, F. G., Melo, R. R. De, Medeiros, D. T. de, Lopes, P. J. G., Gatto, D. A., Batista, F. G., Melo, R. R. De, Medeiros, D. T. de, Lopes, P. J. G., & Gatto, D. A. (2022). Natural durability of five tropical wood species in field decay tests. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 24, 1-10. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2022000100451>

Bendif, H., Miara, M. D., Kalboussi, Z., Grauzdytė, D., Povilaitis, D., Venskutonis, P. R., & Maggi, F. (2018). Supercritical CO₂ extraction of *Rosmarinus eriocalyx* growing in Algeria: Chemical composition and antioxidant activity of extracts and their solid plant materials. *Industrial Crops and Products*, 111, 768-774. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.11.056>

Bischoff, W., & Miller, F. (2006). Optimal designs which are efficient for lack of fit tests. *Browse Project Euclid*, 34(4), 2015-2025. <https://doi.org/10.1214/0090536060000000597>

Cárdeno, A., Aparicio-Soto, M., Montserrat-de la Paz, S., Bermudez, B., Muriana, F. J. G., & Alarcón-de-la-Lastra, C. (2015). Squalene targets pro- and anti-inflammatory mediators and pathways to modulate over-activation of neutrophils, monocytes and macrophages. *Journal of Functional Foods*, 14, 779-790. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.03.009>

Chakraborty, B., Kumar, R. S., Almansour, A. I., Perumal, K., Nayaka, S., & Brindhadevi, K. (2022). *Streptomyces filamentosus* strain KS17 isolated from

microbiologically unexplored marine ecosystems exhibited a broad spectrum of antimicrobial activity against human pathogens. *Process Biochemistry*, 117, 42-52. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2022.03.010>

Chañi-Paucar, L. O., Johner, J. C. F., Hatami, T., & Meireles, M. A. A. (2022). Simultaneous integration of supercritical fluid extraction and mechanical cold pressing for the extraction from Baru seed. *The Journal of Supercritical Fluids*, 183, 105553. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2022.105553>

Chañi-Paucar, L. O., Johner, J. C. F., Zabet, G. L., & Meireles, M. A. A. (2022). Technical and economic evaluation of supercritical CO₂ extraction of oil from sucupira branca seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 181, 105494. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2021.105494>

Chañi-Paucar, L. O., Santana, Á. L., Albarelli, J. Q., & Meireles, M. A. A. (2022a). Extraction of polyphenols by sub/supercritical based technologies. *Technologies to Recover Polyphenols from AgroFood By-products and Wastes*, 137-168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85273-9.00006-5>

Chañi-Paucar, L. O., Santana, Á. L., Albarelli, J. Q., & Meireles, M. A. A. (2022b). Extraction of polyphenols by sub/supercritical based technologies. *Technologies to Recover Polyphenols from AgroFood By-products and Wastes*, 137-168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85273-9.00006-5>

Chen, Y., Gu, Y., Zhao, H., Zhang, H., & Zhou, Y. (2020). Effects of graded levels of dietary squalene supplementation on the growth performance, plasma biochemical parameters, antioxidant capacity, and meat quality in broiler chickens. *Poultry Science*, 99(11), 5915-5924. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2020.08.042>

Chen, Y. P., Gu, Y. F., Zhao, H. R., & Zhou, Y. M. (2021). Dietary squalene supplementation alleviates diquat-induced oxidative stress and liver damage of broiler chickens. *Poultry Science*, 100(3), 100919. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2020.12.017>

Cheng, L., Ji, T., Zhang, M., & Fang, B. (2024). Recent advances in squalene: Biological activities, sources, extraction, and delivery systems. *Trends in Food*

Science & Technology, 146, 104392.
<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2024.104392>

Cruz Aguilar, R. (2022). *Growth and survival of juvenile trees of primary forest species in enrichment plantings in novel forests of north-western Puerto Rico*.
<https://hdl.handle.net/20.500.11801/2977>

da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.11.013>

Duba, K. S., & Fiori, L. (2015). Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 98, 33-43. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2014.12.021>

Fang, J. Y., Lin, Y. K., Wang, P. W., Alalaiwe, A., Yang, Y. C., & Yang, S. C. (2019). <p>The Droplet-Size Effect Of Squalene@cetylpyridinium Chloride Nanoemulsions On Antimicrobial Potency Against Planktonic And Biofilm MRSA</p>. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 8133-8147. <https://doi.org/10.2147/IJN.S221663>

FDA. (2022). *Generally Recognized as Safe (GRAS) | FDA*.
<https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>

GBIF. (2024). *Manilkara bidentata* (A.DC.) A.Chev.
<https://www.gbif.org/es/species/2885366>

Gref, R., Deloménie, C., Maksimenko, A., Gouadon, E., Percoco, G., Lati, E., Desmaële, D., Zouhiri, F., & Couvreur, P. (2020). Vitamin C–squalene bioconjugate promotes epidermal thickening and collagen production in human skin. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72704-1>

Hassim, N., Markom, M., Rosli, M. I., & Harun, S. (2020). Effect of Static Extraction Time on Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from *Phyllanthus niruri*. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, 17(2), 918-924. <https://doi.org/10.1166/JCTN.2020.8742>

Hernández-Sampieri, R., & Mendoza, T. C. (2018). Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. *Mc Graw Hill Education*, 718.

http://www.biblioteca.cij.gob.mx/Archivos/Materiales_de_consulta/Drogas_de_Abuso/Articulos/SampieriLasRutas.pdf

Hien, H. T. M., Ha, N. C., Thom, L. T., & Hong, D. D. (2017). Squalene promotes cholesterol homeostasis in macrophage and hepatocyte cells via activation of liver X receptor (LXR) α and β . *Biotechnology Letters*, 39(8), 1101-1107. <https://doi.org/10.1007/S10529-017-2345-Y/METRICS>

Hoang, T. M. H., Nguyen, C. H., Le, T. T., Hoang, T. H. Q., Ngo, T. H. T., Hoang, T. L. A., & Dang, D. H. (2016). Squalene isolated from *Schizochytrium mangrovei* is a peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist that regulates lipid metabolism in HepG2 cells. *Biotechnology Letters*, 38(7), 1065-1071. <https://doi.org/10.1007/S10529-016-2071-X/METRICS>

Huang, C. H., Huang, C. Y., & Huang, M. H. (2018). Unsaturated Squalene Content in Emulsion Vaccine Adjuvants Plays a Crucial Role in ROS-Mediated Antigen Uptake and Cellular Immunity. *Molecular Pharmaceutics*, 15(2), 420-429. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.7B00800/SUPPL_FILE/MP7B00800_SI_001.PDF

Johner, J. C. F., & Meireles, M. A. de A. (2016). Construction of a supercritical fluid extraction (SFE) equipment: validation using annatto and fennel and extract analysis by thin layer chromatography coupled to image. *Food Science and Technology*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1678-457X.0027](https://doi.org/10.1590/1678-457X.0027)

Jokić, S., Nagy, B., Zeković, Z., Vidović, S., Bilić, M., Velić, D., & Simándi, B. (2012). Effects of supercritical CO₂ extraction parameters on soybean oil yield. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 693-699. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2012.03.003>

Kryževičiute, N., Kraujalis, P., & Venskutonis, P. R. (2016). Optimization of high pressure extraction processes for the separation of raspberry pomace into

lipophilic and hydrophilic fractions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 108, 61-68. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.10.025>

Lefebvre, T., Destandau, E., & Lesellier, E. (2021). Sequential extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and pigments (carotenoids and chlorophylls) from Rosemary by online supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1639, 461709. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2020.461709>

Liu, H., Zhang, J., Jiang, W., & Cai, Y. (2019). Characteristics of commercial-scale radio-frequency/Vacuum (RF/V) drying for hardwood lumber. *BioResources*, 14(3), 6923-6935. <https://doi.org/10.15376/BIORES.14.3.6923-6935>

López Varas, B. J. (2021). *Propiedades físicas y mecánicas de la madera “quinilla” manilkara bidentata como material de construcción en estado verde, Iquitos 2019*. <http://repositorio.ucp.edu.pe/handle/UCP/1269>

Lozano-Grande, M. A., Gorinstein, S., Espitia-Rangel, E., Dávila-Ortiz, G., & Martínez-Ayala, A. L. (2018). Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene. *International Journal of Agronomy*, 2018(1), 1829160. <https://doi.org/10.1155/2018/1829160>

Maran, J. P., & Priya, B. (2015). Supercritical fluid extraction of oil from muskmelon (*Cucumis melo*) seeds. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 47, 71-78. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2014.10.007>

Mendes, A., Azevedo-Silva, J., & Fernandes, J. C. (2022). From Sharks to Yeasts: Squalene in the Development of Vaccine Adjuvants. *Pharmaceuticals* 2022, Vol. 15, Page 265, 15(3), 265. <https://doi.org/10.3390/PH15030265>

Mogue, L. D. K., Ango, P. Y., Fotso, G. W., Mapitse, R., Kapche, D. W. F. G., Karaosmanoğlu, O., Kuete, V., Demirtas, I., Yeboah, S. O., Sivas, H., & Bonaventure, N. T. (2019). Two new polyhydroxylated pentacyclic triterpenes with cytotoxic activities from *Manilkara pellegriniana* (Sapotaceae). *Phytochemistry Letters*, 31, 161-165. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2019.04.002>

Navarro Chica, C. E., de Haan, B. J., Faas, M. M., Smink, A. M., Sierra, L., de Vos, P., & López, B. L. (2020). Design and characterization of Squalene-Gusperimus nanoparticles for modulation of innate immunity. *International Journal of Pharmaceutics*, 590, 119893. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2020.119893>

Patel, A., Bettiga, M., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2022). Microbial genetic engineering approach to replace shark livering for squalene. *Trends in Biotechnology*, 40(10), 1261-1273. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.03.008>

Pavan, N. S. N. S., Dileep Kumar, K., Thangaraj, K., Teja, B., & Ganeshan, P. (2021). WITHDRAWN: Performance optimization of mahua biodiesel using cetane number improver. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2021.01.201>

Pereira, C. G., & Meireles, M. A. A. (2009). Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food and Bioprocess Technology* 2009 3:3, 3(3), 340-372. <https://doi.org/10.1007/S11947-009-0263-2>

Pessoa, A. S., Podestá, R., Block, J. M., Franceschi, E., Dariva, C., & Lanza, M. (2015). Extraction of pequi (*Caryocar coriaceum*) pulp oil using subcritical propane: Determination of process yield and fatty acid profile. *The Journal of Supercritical Fluids*, 101, 95-103. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.03.006>

Powder-George, Y. L., & Mohammed, F. K. (2018). GC-MS analysis of the bioactive phytoconstituents of various organic crude extracts from the seed kernels of *Manilkara bidentata* (balata) collected in Trinidad, W.I. *Natural Product Research*, 32(3), 358-361. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1354192>

Rajamani, K., Thirugnanasambandan, S. S., Natesan, C., Subramaniam, S., Thangavel, B., & Aravindan, N. (2020). Squalene deters drivers of RCC disease progression beyond VHL status. *Cell Biology and Toxicology*, 37(4), 611-631. <https://doi.org/10.1007/S10565-020-09566-W/METRICS>

Rhourri-Frih, B., Renimel, I., Chaimbault, P., André, P., Herbette, G., & Lafosse, M. (2013). Pentacyclic triterpenes from *Manilkara bidentata* resin. Isolation, identification and biological properties. *Fitoterapia*, 88, 101-108. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2013.05.001>

Rosales-García, T., Jiménez-Martínez, C., Cardador-Martínez, A., Martín-Del Campo, S. T., Galicia-Luna, L. A., Téllez-Medina, D. I., & Dávila-Ortiz, G. (2017). Squalene Extraction by Supercritical Fluids from Traditionally Puffed *Amaranthus hypochondriacus* Seeds. *Journal of Food Quality*, 2017(1), 6879712. <https://doi.org/10.1155/2017/6879712>

Sahu, S., Ghosh, M., & Bhattacharyya, D. K. (2018). Isolation of the unsaponifiable matter (squalene, phytosterols, tocopherols, γ -oryzanol and fatty alcohols) from a fatty acid distillate of rice bran oil. *Grasas y Aceites*, 69(3), e262-e262. <https://doi.org/10.3989/GYA.1112172>

Sakul, A., Ozansoy, M., Elıbol, B., Ayla, Ş., Günal, M. Y., Yozgat, Y., Başağa, H., Şahin, K., Kazancioğlu, R., & Kiliç, Ü. (2019). Squalene attenuates the oxidative stress and activates AKT/mTOR pathway against cisplatin-induced kidney damage in mice. *Turkish Journal of Biology*, 43(3), 179-188. <https://doi.org/10.3906/biy-1902-77>

Santana, Á. L., Chañi-Paucar, L. O., Veggi, P. C., Viganó, J., & Meireles, M. A. A. (2023). Supercritical Fluid Extraction. En *Bentham Science* (pp. 280-323). <https://doi.org/10.2174/9789815049459123030009>

Spanova, M., & Daum, G. (2011). Squalene – biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(11), 1299-1320. <https://doi.org/10.1002/EJLT.201100203>

Sri Charan Bindu, B., Mishra, D. P., & Narayan, B. (2015). Inhibition of virulence of *Staphylococcus aureus* – a food borne pathogen – by squalene, a functional lipid. *Journal of Functional Foods*, 18, 224-234. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.07.008>

Tarhan, İ. (2021). A new and rapid analysis method for the most important herbal squalene source: Comparison of UV–visible, fluorescence, and FTIR techniques

for the quantification of squalene in amaranth seed oil. *Microchemical Journal*, 168, 106446. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.106446>

Teixeira, N., Melo, J. C. S., Batista, L. F., Paula-Souza, J., Fronza, P., & Brandão, M. G. L. (2019). Edible fruits from Brazilian biodiversity: A review on their sensorial characteristics versus bioactivity as tool to select research. *Food Research International*, 119, 325-348. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.01.058>

Thamer, F. H., & Thamer, N. (2023). Gas chromatography – Mass spectrometry (GC-MS) profiling reveals newly described bioactive compounds in *Citrullus colocynthis* (L.) seeds oil extracts. *Heliyon*, 9(6), e16861. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E16861>

Vázquez, L., Torres, C. F., Fornari, T., Señoráns, F. J., & Reglero, G. (2007). Recovery of squalene from vegetable oil sources using countercurrent supercritical carbon dioxide extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 40(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2006.04.012>

Warleta, F., Campos, M., Allouche, Y., Sánchez-Quesada, C., Ruiz-Mora, J., Beltrán, G., & Gaforio, J. J. (2010). Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48(4), 1092-1100. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.01.031>

Xu, Y., Bi, S., Xiong, C., Dai, Y., Zhou, Q., & Liu, Y. (2023). Identification of aroma active compounds in walnut oil by monolithic material adsorption extraction of RSC18 combined with gas chromatography-olfactory-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 402, 134303. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.134303>

Zhang, Y., Zhu, T., Xu, S., Gu, P., Cai, G., Peng, S., Liu, Z., Yang, Y., Hu, Y., Liu, J., & Wang, D. (2023). Cationic Nanoparticle-Stabilized Vaccine Delivery System for the H9N2 Vaccine to Promote Immune Response in Chickens. *Molecular Pharmaceutics*, 20(3), 1613-1623. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.2C00805/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MP2C00805_0008.GIF

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de operacionalización

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ITEMS
Condiciones de extracción (Variable independiente)	Conjunto de parámetros físico-operativos que controlan la solubilidad, selectividad y transferencia de masa del CO ₂ supercrítico para extraer escualeno de semillas de quinilla. Chañi Paucar et al, (2022)	Se manipula mediante la variación programada de presión, temperatura y flujo másico de CO ₂ en el sistema de extracción supercrítica.	Presión	100 - 40	Registrar la presión estable del extractor durante la fase dinámica (bar).
			Temperatura	40 - 70	Registrar la temperatura real medida por el termopar durante la extracción (°C).
			Flujo másico del solvente	50 - 110	Registrar el flujo másico promedio durante la fase dinámica (m/m).
Rendimiento del proceso (Variable dependiente)	Proporción de escualeno extraído respecto al contenido inicial del material, expresado como eficiencia de recuperación. Chañi Paucar et al, (2022)	Se cuantifica mediante el porcentaje de escualeno presente en el extracto recuperado respecto al peso seco inicial de la muestra.	Rendimiento del proceso	g	Registrar la masa inicial de semillas secas utilizadas (g).
					Registrar la masa total del extracto obtenido (g).
					Registrar la concentración de escualeno en el extracto (g).
					Calcular el rendimiento en g masa de escualeno / masa seca de semillas.
					Calcular el rendimiento porcentual: $(g \text{ escualeno} / \text{masa semilla seca}) \times 100$.

Anexo 2: Matriz de consistencia

“Optimización del proceso de extracción supercrítica de escualeno de las semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*)”

Problema	Objetivo	Hipótesis	Variables	Medición
Problema General ¿Cuáles son las condiciones óptimas para la obtención de extractos ricos en escualeno a partir de las semillas de quinilla empleando tecnología supercrítica? Problemas secundarios ❖ ¿Cómo influyen la presión, la temperatura y el flujo másico del solvente en el rendimiento del extracto oleoso de las semillas de quinilla cuando se aplica la tecnología de fluidos supercríticos? ❖ ¿Cuáles son las condiciones óptimas de presión, temperatura y flujo másico del solvente para obtener extractos de las semillas de quinilla ricos en compuestos bioactivos? ❖ ¿Cuál será la composición fitoquímica del extracto oleoso obtenido de las semillas de quinilla mediante la tecnología de fluidos supercríticos?	Objetivo General Determinar las condiciones óptimas para la obtención de extractos ricos en escualeno a partir de las semillas de quinilla (<i>Manilkara bidentata</i>) con dióxido de carbono supercrítico. Objetivos Específicos ❖ Evaluar el rendimiento de los extractos oleosos de las semillas de quinilla bajo diferentes condiciones de presión, temperatura y caudal másico de dióxido de carbono en estado supercrítico. ❖ Optimizar y evaluar el proceso de extracción supercrítica de las semillas de quinilla utilizando la metodología de superficie de respuesta. ❖ Determinar la composición de los metabolitos bioactivos presentes en el extracto oleoso de las semillas de quinilla obtenido mediante tecnología supercrítica.	Hipótesis general H_{nula}: La presión, temperatura y flujo masico del dióxido de carbono supercrítico no influyen en el rendimiento de extracto rico en escualeno de las semillas de quinilla. H_{alterna}: La presión, temperatura y flujo masico del dióxido de carbono supercrítico influyen en el rendimiento de extracto rico en escualeno de las semillas de quinilla.	Variables independientes ❖ Presión ❖ Temperatura ❖ Flujo masico del solvente Variables dependientes ❖ Rendimiento global ❖ Rendimiento de escualeno	Variables independientes ❖ 100 - 400 bar ❖ 40 - 70 °C ❖ 50 – 110 mm Variables dependientes ❖ % m/m ❖ %

Anexo 2. Datos de calibración del caudalímetro



Telephone: 847.549.7600
800.323.4340
Fax: 847.247.2929
E-mail: techinfo@coleparmer.com
Web: www.coleparmer.com

034-39-GL

FLOWMETER CALIBRATION DATA

034/25

CUSTOMER	CUST. P.O. No	REF. CURVE NUMBER
		0396-AM-02

Max. Flow	Min. Flow	Units	Metering Fluid	Date
7485	402	std. ml/min	carbon dioxide	30-Nov-1999

Model Number		Metering Temperature	70.0 °F
Tube Number	034-39-GL	Metering Pressure	14.70 psia
Serial Number		Metering density	0.001835 g/ml
Float Material	glass	Metering Viscosity	0.01470 cp
Float Density	2.53 g/ml	Density at STD.Cond	0.001835 g/ml
STD. Conditions	STP: 1 atm @ 70 °	Accuracy	Standard
Room Temperature	70.0 °F	Barometric Pressure	14.70 psia

SCALE READINGS AT CENTER OF FLOAT	
Scale Reading (mm)	Flow
150	7485
140	7008
130	6586
120	6094
110	5567
100	5117
90	4625
80	4120
70	3633
60	3099
50	2582
40	2065
30	1529
20	991
10	402

Anexo 3. Resolución de SEFOR N.º 1349



GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS GERENCIA REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

"MADRE DE DIOS CAPITAL DE LA BIODIVERSIDAD DEL PERÚ"

Trabajo con excelencia



RESOLUCIÓN GERENCIAL REGIONAL N° 1349 - 2023-GOREMAD-GRFFS

Puerto Maldonado, 28 DIC. 2023

VISTO:

La Carta s/n con número de expediente N°15950, de fecha 09 de noviembre del 2023, el Sr. Bruno Mendoza Mamani identificado con DNI N°44733192, solicita autorización con fines de investigación científica de flora del proyecto "Optimización del proceso de extracción supercrítica de escualeno de las semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*)" que se realizara en el laboratorio de la carrera profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMAD y en el laboratorio de cereales, raíces y tubérculos del Instituto de investigación y Tecnologías Altoandinas de la UNAAT, ubicados fuera de Áreas Naturales Protegidas en el departamento de Madre de Dios y Junín.



La CARTA s/n con expediente N°17228, de fecha 01 de diciembre 2023 con ingreso al Área de Fauna Silvestre el 05 de diciembre de 2023 el Sr Bruno Mendoza Mamani identificado con DNI N°44733192. documento de 02 páginas, la cual adjunta la Carta N°076-2023-UNAMAD-R/DPL con fecha 24 de noviembre 2023 en la cual comunica la ampliación de plazo de la presentación del informe de tesis de 10 meses para ser presentado por el bachiller Bruno Mendoza Mamani de la carrera profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, para realizar la actividad de Investigación de manera legal de acuerdo a la Ley y por haber cumplido los requisitos, condiciones y;

El INFORME LEGAL N° 196-2023-GOREMAD-GRFFS-OAJ de fecha 19 de diciembre del 2023, mediante el cual la oficina de asesoría jurídica de la GRFFS, concluye que en virtud del informe técnico favorable emitido por el área de concesiones forestales con fines de ecoturismo, conservación y fauna silvestre de la GRFFS y de acuerdo a la normativa vigente, corresponde aprobar la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre del proyecto "Optimización del proceso de extracción supercrítica de escualeno de las semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*)", a favor del administrado BRUNO MENDOZA MAMANI identificado con DNI N°44733192, solicitado a través del expediente N°15950 de fecha 09 de noviembre del 2023.

CONSIDERANDO:

Que, El artículo 66° de la Constitución Política del Perú, precisa: "*Los recursos naturales, renovables y no renovables, son patrimonio de la Nación. El Estado es soberano en su aprovechamiento.*" Asimismo, respecto a política Ambiental, el artículo 67 del mismo cuerpo legal indica "*El Estado determina la política nacional del ambiente. Promueve el uso sostenible de sus recursos naturales.*"

Que, La Ley N° 26821, Ley Orgánica para el aprovechamiento sostenible de los Recursos Naturales, en concordancia con el artículo 85° de la Ley N° 28611, Ley



GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
GERENCIA REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

"MADRE DE DIOS CAPITAL DE LA BIODIVERSIDAD DEL PERÚ"

Trabajo con excelencia



General del Ambiente, dispone que los recursos naturales renovables o no renovables mantenidos en su fuente son Patrimonio de la Nación y el Estado es Soberano en su aprovechamiento y; que los derechos para el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales se otorgan a los particulares mediante las modalidades que establezcan las leyes especiales para cada recurso natural; es decir, el aprovechamiento de los recursos naturales se realiza únicamente a través de las modalidades y los procedimientos establecidos para cada caso;

Que, La Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre, que tiene por objeto establecer el marco legal para regular, promover y supervisar la actividad forestal y de fauna silvestre para lograr su finalidad, la cual es promover la conservación, la protección, el incremento y el uso sostenible del patrimonio forestal y de fauna silvestre dentro del territorio nacional, integrando su manejo con el mantenimiento y mejora de los servicios de los ecosistemas forestales y otros ecosistemas de vegetación silvestre, en armonía con el interés social, económico y ambiental de la Nación; así mismo impulsar el desarrollo forestal, mejorar su competitividad, generar y acrecentar los recursos forestales y de fauna silvestre y su valor para la sociedad.

Que, la ley N° 27867, Ley Orgánica de Gobiernos Regionales, en su Artículo 2° Legitimidad y naturaleza jurídica establece que "Los Gobiernos Regionales emanan de la voluntad popular. Son personas jurídicas de derecho público, con autonomía política, económica y administrativa en asuntos de su competencia, constituyendo, para su administración económica y financiera, un Pliego Presupuestal".

Que, el Artículo 1° de la Ley Forestal y Fauna Silvestre N° 29763, refiere que "toda persona tiene el derecho de acceder al uso aprovechamiento y disfrute del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación de acuerdo a los procedimientos establecidos por la autoridad nacional y regional y a los instrumentos de planificación y gestión del territorio; además de participar en su gestión. Toda persona tiene el deber de contribuir con la conservación de este patrimonio y de sus componentes respetando la legislación aplicable".

Que, en el Artículo 137° de la precitada ley, declara de interés nacional la investigación, el desarrollo tecnológico, la mejora del conocimiento y el monitoreo del estado de conservación del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la nación.

Que, Asimismo, el artículo 140° del mismo cuerpo legal, señala que la autoridad regional forestal y de fauna silvestre, otorga autorizaciones para extracción de los recursos forestales y de fauna silvestre con fines de investigación científica, salvo cuando se trate de especies categorizadas como amenazadas, especies consideradas en los apéndices de la Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre –CITES o cuando la investigación científica involucre el acceso de los recursos genéticos, en cuyo caso las autorizaciones otorgadas por el SERFOR.

Que el Decreto Supremo N°018-2015-MINAGRI que aprueba el Reglamento para la Gestión Forestal y el Decreto Supremo N°019-2015-MINAGRI que aprueba el Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, han regulado el procedimiento de





GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
GERENCIA REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

"MADRE DE DIOS CAPITAL DE LA BIODIVERSIDAD DEL PERÚ"

Trabajo con excelencia



otorgamiento de autorizaciones con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre, estableciendo para tal efecto los requisitos y consideraciones para su otorgamiento, de acuerdo a los lineamientos aprobados por el SERFOR, así como las obligaciones materia de cumplimiento por parte del titular de la autorización.

Que el artículo 99° del Decreto Supremo N°021-2015-MINAGRI, que aprueba el reglamento para la gestión forestal y de fauna silvestre en comunidades nativas y comunidades campesinas, refiere que los estudios con fines científicos que involucren acceder al conocimiento colectivo, sobre las propiedades, usos y características de la flora y fauna silvestre debe contar con el consentimiento informado previo y escrito de la comunidad, respaldado en acta que contenga el acuerdo de asamblea comunal según sus estatutos. Así mismo precisa, que el acceso a los conocimientos colectivos con fines de aplicación comercial, deben contar con el consentimiento informado previo y por escrito por la comunidad y cumplir además con lo establecido en la ley N°27811, ley que establece el régimen de protección de los conocimientos colectivos de los pueblos indígenas vinculados a los recursos biológicos, y otras normas vinculantes.

Que mediante la Resolución de Dirección Ejecutiva N°060-2016-SERFOR /DE, de fecha 01 de abril del 2016, se aprueba los lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre.

Que, de acuerdo con el artículo IV. Principios del Procedimiento Administrativo del D.S. N° 004-2019-JUS de la Ley del Procedimiento Administrativo General N° 27444, señala en el numeral 1.2. **Principio de debido Procedimiento.**

"Los administrados gozan de los derechos y garantías implícitos al debido procedimiento administrativo (...)" De la misma manera el numeral 1.1. **Principio de Legalidad** "Las autoridades administrativas deben actuar con respeto a la Constitución, la ley y al derecho, dentro de las facultades que le estén atribuidas y de acuerdo con los fines para los que les fueron conferidas". y finalmente conforme al numeral 1.7. **Principio de Presunción de Veracidad** "en la tramitación del procedimiento administrativo, se presume que los documentos y declaraciones formulados por los administrados en la forma prescrita por esta Ley, responden a la verdad de los hechos que ellos afirman. Esta presunción admite prueba en contrario."

Que, en atención al expediente N°15959 de fecha 09 de noviembre de 2023, el y el expediente N°17228 del 01 de diciembre 2023 el Sr. Bruno Mendoza Mamani identificado con DNI N°44733192 solicita, autorización con fines de investigación científica de flora del proyecto "Optimización del proceso de extracción supercrítica de escualeno de las semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*)".

Posteriormente, el mencionado expediente de solicitud procede a ser evaluado por el área de Fauna Silvestre, teniéndose como ello el **INFORME TÉCNICO N°369-2023-GOREMAD-GRFYFS/AFS/VL**, de fecha 05 de diciembre del 2023, en el cual recomienda aprobar la solicitud de autorización con fines de investigación científica de flora del proyecto "Optimización del proceso de extracción supercrítica de escualeno de las semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*)" del Sr. Bruno Mendoza Mamani., por haber cumplido los requisitos y condiciones, concluye que:



GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
GERENCIA REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

"MADRE DE DIOS CAPITAL DE LA BIODIVERSIDAD DEL PERÚ"

Trabajo con excelencia



- (...) tiene como objetivo general, la determinación de las condiciones óptimas para la extracción de escualeno a partir de las semillas de quinilla. Así como también obtener extractos de las semillas de quinilla a diferentes condiciones de presión, temperatura y caudal masico del dióxido de carbono en estado supercrítico, y optimizar procesos de extracción supercrítico de escualeno utilizando la metodología de superficie de respuestas.
- Esta investigación o estudio es experimental, no aplicara colecta de especies, el estudio que no afectara a los recursos de flora ni fauna silvestre. Se realizará la compra de 1kg de semillas de quinilla del vivero Forestal Pucallpa con RUC N°10457505731.
- Se concluye que, el tesista Bruno Mendoza Mamani, cumplió todos los requisitos dados por el texto único de Procedimiento Administrativos – TUPA de la GRFFS-MDD en el ítem N°63 y los lineamientos para el otorgamiento de autorización de Investigación de manera por lo que prosigue emitir la resolución gerencial regional.



Asimismo, mediante el **INFORME LEGAL N° 196-2023-GOREMAD-GRFFS-OAJ** de fecha 19 de diciembre del 2023, la oficina de asesoría jurídica de la GRFFS, concluye que en virtud del informe técnico favorable emitido por el área de concesiones forestales con fines de ecoturismo, conservación y fauna silvestre de la GRFFS y de acuerdo a la normativa vigente, corresponde aprobar la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre del proyecto "Optimización del proceso de extracción supercrítica de escualeno de las semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*)", a favor del administrado BRUNO MENDOZA MAMANI identificado con DNI N°44733192, solicitado a través del expediente N°15950 de fecha 09 de noviembre del 2023.

El investigador principal deberá cumplir con las obligaciones y compromisos consignadas EN LA PRESENTE RESOLUCION.

De las Obligaciones y Compromisos.

- El investigador principal, deberá cumplir con las obligaciones siguientes:
 - No extraer especímenes ni muestras biológicas de flora silvestre no autorizadas.
 - No ceder el mismo a terceras personas, ni utilizarlos para fines distintos a lo autorizado.
 - Entregar a la Gerencia Regional Forestal y Fauna Silvestre del Gobierno Regional de Madre de Dios, una copia del informe final incluyendo versión en digital como resultado de la autorización otorgada, copias del material fotográfico u otros.
- El investigador principal de la Investigación tesista Bruno Mendoza Mamani se compromete a:
 - No contactar ni ingresar a los territorios comunales sin contar con la autorización de las autoridades comunales correspondientes.



GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
GERENCIA REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

"MADRE DE DIOS CAPITAL DE LA BIODIVERSIDAD DEL PERÚ"

Trabajo con excelencia



- Retirar todo el material empleado para la ejecución del presente estudio una vez concluido el trabajo de campo y el levantamiento de información.
- Comunicar a la Gerencia Forestal y Fauna Silvestre el inicio de las investigaciones en campo con la debida anticipación.

Que, con Ordenanza Regional N°008-2019-RMDD/CR, publicado el 03 de Diciembre del 2019 en su Artículo Primero.- APROBAR, la Modificación Parcial del Reglamento de Organización y Funciones (ROF) del Gobierno Regional de Madre de Dios, aprobado mediante Ordenanza Regional N°007-2012-GRMDD/CR, aprobado mediante Ordenanza Regional N° 007-2012-GRMDD/CR y modificado con la Ordenanza Regional N°026-2012-GRMDD/CR, por **CREACIÓN de la GERENCIA REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE**; en los siguientes extremos: a) Incorporar la denominación: GERENCIA REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

Que, mediante Resolución Ejecutiva Regional N°171-2023-GOREMAD/GR, del 07 de junio del 2023, resolvió designar a la Ingeniera Ambiental CAROLA ANTUANET GALARRETA AGUILAR, en el puesto y funciones de la Gerencia Regional Forestal y Fauna Silvestre, del Gobierno Regional de Madre de Dios.

SE RESUELVE:

Artículo 1°. -APROBAR la solicitud de autorización con fines de investigación científica de flora del proyecto "Optimización del proceso de extracción supercrítica de escualeno de las semillas de quinilla (*Manilkara bidentata*)" desde la fecha de aprobación de la presente hasta el mes de octubre de 2024, al cual se le asigna el código de autorización N°17-MAD-TAM/AUT-IFL-2023-003 a favor de Bruno Mendoza Mamani identificado con DNI N°44733192, Investigación que se realiza en el laboratorio de la carrera profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMAD y en el laboratorio de cereales, raíces y tubérculos del Instituto de investigación y Tecnologías Altoandinas de la UNAAT del departamento de Madre de Dios y Junín respectivamente.

Cuadro 01.-Del investigador principal y colaboradores

NOMBRES Y APELLIDOS	FUNCION	NACIONALIDAD	DOC	NUMERO
Pedro Saul Montalvan Apolaya	Asesor UNAMAD	Perú	DNI	23954111
Larry Oscar Chañi Paucar	Co asesor UNAAT	Perú	DNI	43118124
Bruno Mendoza Mamani	Tesista UNAMAD	Perú	DNI	44733192

Cuadro N°02 De los especímenes solicitados para colecta

FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD	COLECTA	FINALIDAD DE LA COLECTA
Sapotaceae	<i>Manilkara bidentata</i>	Quinilla roja	Semillas	1 kg	Flora	Extracción de compuestos bioactivos. Análisis de composición de bioactivos



GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
GERENCIA REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

"MADRE DE DIOS CAPITAL DE LA BIODIVERSIDAD DEL PERÚ"

Trabajo con excelencia



Artículo 2°.- Notificar la presente resolución al Sr. Bruno Mendoza Mamani identificado con DNI N°44733192 con correo electrónico: bmendoza.iag@gmail.com.

Artículo 3°.- Remitir copia de la presente Resolución al Organismo de Supervisión de los Recursos Forestales y de Fauna Silvestre-OSINFOR, y al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR para su registro, conocimiento y difusión.

Artículo 4°.- TENER EN CUENTA que las muestras o especímenes no figuran en el libro rojo de categorización ni en la lista CITES. La clasificación identificación y trazabilidad de semillas de *Manikara bidentata* compradas por el investigador Sr. Bruno Mendoza Mamani se hará en el laboratorio de la carrera profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMAD.

Las semillas de quinilla (*Manikara bidentata*) serán compradas del vivero Forestal Pucallpa con RUC N°10457505731 por lo tanto esta **EXENTO** de portar con la guía de transporte forestal según la Ley N°29763, Ley Forestal y Fauna Silvestre.

La obtención de extractos de las semillas de quinilla a diferentes condiciones de presión, temperatura y caudal masico del dióxido de carbono en estado supercrítico, y optimizar procesos de extracción supercrítico de escualeno utilizando la metodología de superficie de respuestas se realizara en el laboratorio de cereales, raíces y tubérculos del Instituto de investigación y Tecnologías Altoandinas de la UNAAT por reunir las condiciones óptimas para ello y por pertenecer el co asesor de tesis a dicha universidad, departamento de Junín.

Artículo 5°.- El investigador deberá derivar una copia impresa y digital del informe final de la Investigación Científica denominada "Optimización del proceso de extracción supercrítica de escualeno de las semillas de quinilla (*Manikara bidentata*)" para incluir al acervo documentario de Investigaciones Científicas del área de fauna silvestre de la GERENCIA REGIONAL FORESTAL Y FAUNA SILVESTRE - GOREMAD.

COMUNIQUESE, REGÍSTRESE Y CÚMPLASE

GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
GERENCIA REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

Ing. Carola Aylwanet Galarreta Aguirre
GERENTE REGIONAL

Anexo 4. Recibo de adquisición de las semillas de quinilla

VIVERO FORESTAL PUCALLPA
ROJAS HUAMANCAJA DREIFUS ALVINO

JR. JAUJA 16 05 A.H. VICTOR MALDONADO .
BEGAZO A ESPALDAS DEL

CAMPOVERDE - CORONEL PORTILLO - UCAYALI

Fecha de Emisión : 23/11/2023
Señor (es) : MENDOZA MAMANI, BRUNO

DNI : 44733192

Tipo de Moneda : SOLES

BOLETA ELECTRÓNICA

RUC : 10457505731

EB01 - 18

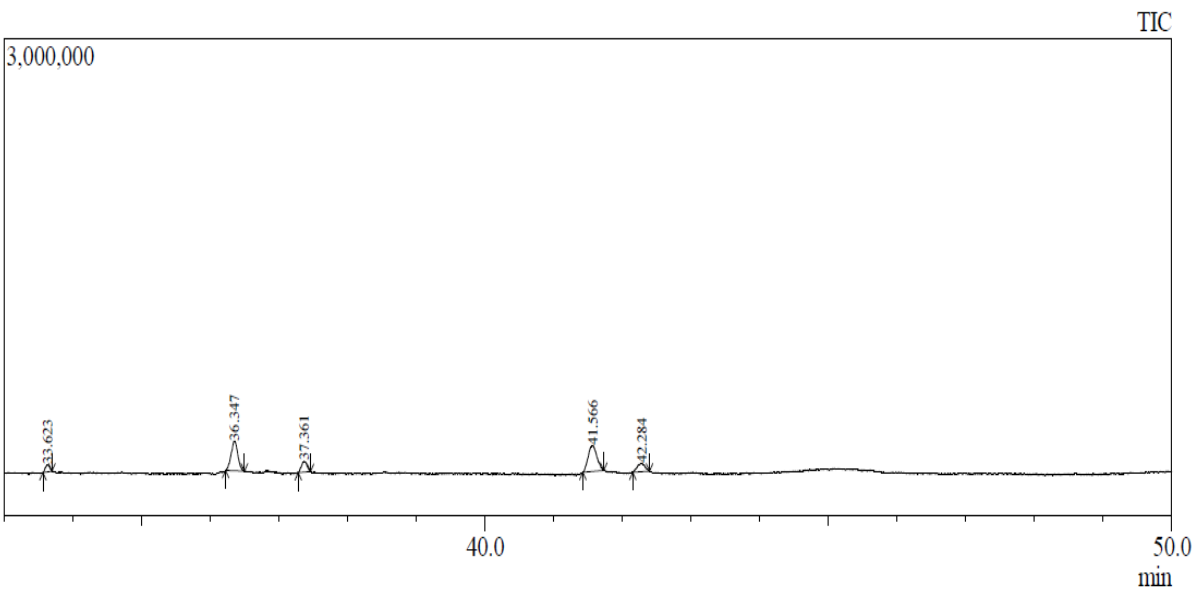
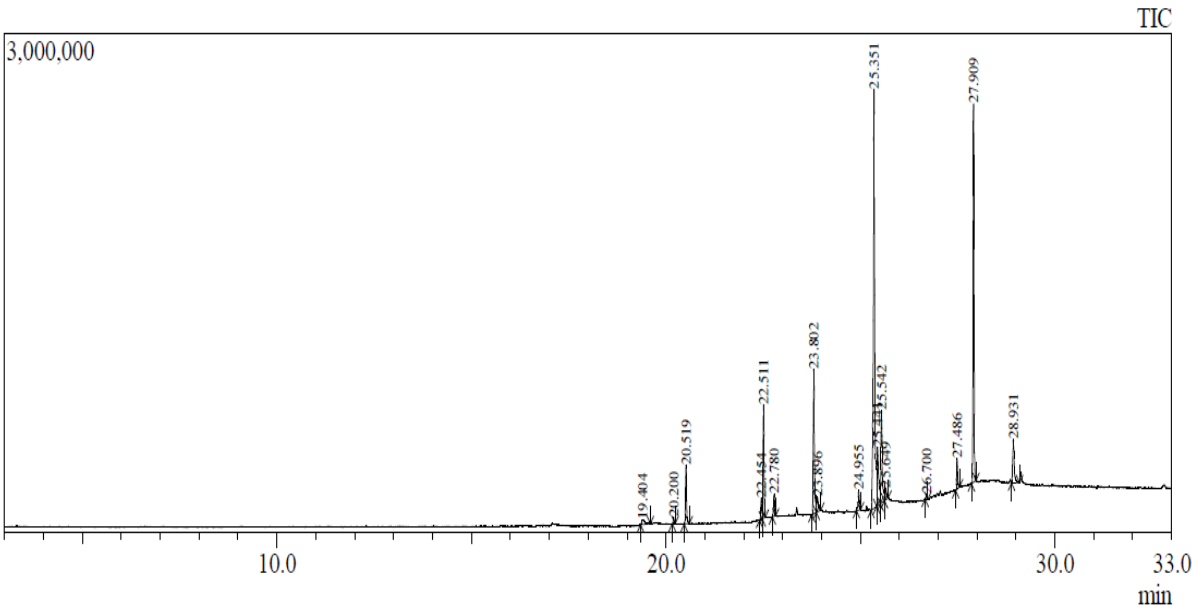
Cantidad	Unidad Medida	Código	Descripción	Valor Unitario
1.00	KILOGRAMO	0001	SEMILLAS FORESTALES DE LA ESPECIE QUINILLA	350.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y 00/100 SOLES

Sub Total Ventas : 350.00
Descuentos: 0.00
Valor Venta: 350.00
IGV: 0.00
Importe Total: 350.00

*Esta es una representación impresa de la factura electrónica **EB01 - 18**,
generada en el Sistema de SUNAT. Puede verificarla utilizando su clave SOL.*

Anexo 5. Cromatogramas



Anexo 6. Trabajo desarrollado en el laboratorio de la UNAAT

