

Estabilidad oxidativa y caracterización de antioxidantes en aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) extraído mediante CO₂ supercrítico

Oxidative stability. Characterization of antioxidants in chía (*Salvia hispanica* L.) oil extracted by supercritical CO₂

Ixtaina V^(1,2), Spotorno V⁽³⁾, Cardarelli D⁽⁴⁾, Mattea M⁽⁴⁾, Mateo C⁽²⁾, Nolasco S⁽²⁾, Tomás M⁽¹⁾

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) (CONICET La Plata, UNLP), 47 Y 116 (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina

² Facultad de Ingeniería, Dto. de Ing. Química (TECSE), UNCPBA, Olavarría, Argentina

³ Instituto Tecnología de Alimentos, CIA (INTA), Hurlingham, Argentina

⁴ Facultad de Ingeniería, UNRC, Río Cuarto, Argentina

vanesaix@hotmail.com

RESUMEN

Las semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) contienen cantidades de aceite que varían entre 32 y 39%, el cual presenta el mayor tenor natural de ácido α -linolénico conocido hasta el momento (61 – 70%). Es reconocida la importancia nutricional de los ácidos grasos ω -3, pero su elevada susceptibilidad a la oxidación limita su utilización en la industria alimenticia. Las semillas oleaginosas, principalmente aquellas que contienen elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), poseen antioxidantes naturales que ejercen un marcado efecto protector contra la oxidación lipídica. La extracción mediante fluidos supercríticos (EFSC) utilizando CO₂ resulta una alternativa interesante para la extracción de aceites vegetales ya que no presenta los inconvenientes de las metodologías convencionales (prensa y extracción con solventes orgánicos) y mejora la calidad del producto obtenido. El objetivo del presente trabajo fue determinar la estabilidad oxidativa e identificar antioxidantes naturales presentes en el aceite de chía obtenido mediante CO₂ supercrítico a distintas condiciones de presión y temperatura. Se utilizó semilla de chía proveniente de la provincia de Salta (Argentina), la cual fue secada a 50°C por 2 h inmediatamente antes del proceso de extracción. La obtención de aceite fue llevada a cabo a presiones operativas de 250 y 450 bar, temperaturas 40 y 60 °C, con una velocidad de flujo de fluido supercrítico de 8 kg h⁻¹. La estabilidad oxidativa se evaluó mediante un ensayo acelerado (Rancimat 98°C, flujo de aire 20 L h⁻¹). La determinación de antioxidantes fenólicos (ácidos clorogénico y cafeico, quercetina, miricetina y kaempferol) y de tocoferoles se realizó mediante HPLC – fluorescencia con columnas C₁₈ y fase – normal, respectivamente. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante ANOVA y test de Tukey para la comparación de medias, realizándose el análisis de correlación entre las variables. Los resultados indican tiempos de inducción $\leq 1,3$ h, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las diversas condiciones operativas citadas. Los principales antioxidantes fenólicos fueron: ácido cafeico ($3,37 \times 10^{-5} \pm 1,7 \times 10^{-5}$ mol kg⁻¹) > miricetina ($1,66 \times 10^{-5} \pm 6,7 \times 10^{-6}$ mol kg⁻¹) \approx ácido clorogénico ($1,47 \times 10^{-5} \pm 7,5 \times 10^{-6}$ mol kg⁻¹) \approx quercetina ($1,37 \times 10^{-5} \pm 6,5 \times 10^{-6}$ mol kg⁻¹) > kaempferol ($4,04 \times 10^{-6} \pm 2,1 \times 10^{-6}$ mol kg⁻¹), no detectándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las condiciones ensayadas. Por otra parte, se encontró gamma tocoferol en todas los aceites extraídos, mientras que sólo se detectó delta tocoferol en el aceite extraído a 250 bar - 40° C. El contenido total de tocoferoles varió en el rango 36 – 95 μ g g⁻¹. Se encontró una correlación positiva altamente significativa ($p \leq 0,01$) entre todos los antioxidantes fenólicos. No obstante, si bien el aceite de chía extraído mediante fluidos supercríticos presenta antioxidantes naturales tales como compuestos fenólicos y tocoferoles, su estabilidad oxidativa es muy baja, debido a su elevado contenido de PUFAs.

ABSTRACT

Chia (*Salvia hispanica* L.) seeds have about 32 % to 39 % oil by weight, which contains the highest proportion of α -linolenic acid (61 – 70%) of any known natural source. It is recognized the nutritional

importance of ω -3 fatty acids, but its high susceptibility to the oxidation limits its use in food industry. The oilseeds, mainly those with high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), possess natural antioxidants which have a protective effect against the lipid oxidation. The extraction with supercritical fluids (EFSC) using CO₂ results an interesting alternative to the vegetable oil extraction because this process does not present the disadvantages of the conventional methodologies (pressing and extraction with organic solvents) and improves the quality of the final product. The objective of this work was to determine the oxidative stability and to identify natural antioxidants present in chia seed oil obtained by EFSC under different conditions of pressure and temperature. Chia seeds were obtained from commercial sources in Salta (Argentina), which was dried up to 50 °C for 2 h immediately before of the extraction process. The extraction experiments were carried out at 40 and 60 °C at 250 and 450 bar, with a flow rate of 8 kg CO₂ h⁻¹. The oxidative stability was evaluated by an accelerated test (Rancimat 98°C, air flow: 20 L h⁻¹). The determination of phenolic antioxidants (chlorogenic and caffeic acids, quercetin, myricetin and kaempferol) and tocopherols was made by HPLC – fluorescence with C₁₈ columns and normal phase, respectively. The statistical analysis was made with ANOVA and multiple comparisons of the means were performed by a Tukey test. Also a correlation analysis between the variables was made. The results obtained show an induction time \leq 1.3 h, without significant differences ($p > 0,05$) between the operative conditions assayed. The main Phenolic antioxidants were: caffeic acid ($3,37 \times 10^{-5} \pm 1,7 \times 10^{-5}$ mol kg⁻¹) > myricetin ($1,66 \times 10^{-5} \pm 6,7 \times 10^{-6}$ mol kg⁻¹) \approx chlorogenic acid ($1,47 \times 10^{-5} \pm 7,5 \times 10^{-6}$ mol kg⁻¹) \approx quercetin ($1,37 \times 10^{-5} \pm 6,5 \times 10^{-6}$ mol kg⁻¹) > kaempferol ($4,04 \times 10^{-6} \pm 2,1 \times 10^{-6}$ mol kg⁻¹), without statistically significant differences ($p > 0,05$) between the extraction conditions. By other hand, gamma tocopherol was found in all samples extracted, whereas delta tocopherol only was detected in 250 bar - 40° C extracted oil. The total tocopherol content varied in the range 36 – 95 μ g g⁻¹. A highly significant positive correlation ($p \leq 0,01$) between all phenolic antioxidants was found. However, while the oil extracted by supercritical fluids presents natural antioxidants such as phenolic compounds and tocopherols, its oxidative stability is very low, due to the high PUFAs content.

PALABRAS CLAVE: *tocoferoles, compuestos fenólicos, antioxidantes, chía, extracción supercrítica.*

KEYWORDS: *tocopherols, phenolic compounds, antioxidants chia, supercritical extraction.*

INTRODUCCIÓN

Las semillas de chía (*Salvia hispanica* L.), planta herbácea anual estival perteneciente a la familia *Lamiaceae*, contienen cantidades de aceite que varían entre 32 y 39%. Dicho aceite presenta el mayor tenor natural de ácido α -linolénico conocido hasta el momento (61 – 70%) (Ayerza 1995). Es reconocida la importancia nutricional de los ácidos grasos ω -3, pero su elevada susceptibilidad a la oxidación limita su utilización en la industria alimentaria.

Las semillas oleaginosas, principalmente aquellas que contienen un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), poseen antioxidantes naturales que ejercen efecto protector contra la oxidación lipídica. En el aceite de chía se ha encontrado la presencia de antioxidantes naturales, tales como flavonoles y polifenoles (ácidos clorogénico y cafeico), pero en menor proporción que en sus semillas (Taga *et al.* 1984). También se han detectado fracciones de δ y γ - tocoferol en el aceite de chía extraído por solvente y prensado (Ixtaina *et al.* 2007a, 2007b).

Estos componentes presentes en la semilla de chía pueden intervenir como ingredientes multifuncionales de excelentes propiedades para la formulación de alimentos, brindar un aporte interesante desde el punto de vista fisiológico (especialmente a nivel cardiovascular, hepático y de metabolismo cerebral) y ejercer actividad antioxidante frente a su acción ante diversas sustancias reactivas al oxígeno (ROS).

La obtención de aceite de semillas oleaginosas a nivel industrial habitualmente se realiza mediante prensado o extracción por solventes, principalmente hexano. En general, el método de prensado está asociado a bajos rendimientos en aceite, mientras que la extracción con hexano está cuestionada por sus posibles daños al medio ambiente y a la salud humana, lo que ha impulsado la búsqueda de métodos de procesamiento alternativos tales como la extracción mediante fluidos supercríticos (EFSC) (Reverchon y Osseo 1996). El dióxido de carbono (CO₂) es el fluido más utilizado en condiciones

supercríticas, debido a que presenta la ventaja de no ser tóxico, corrosivo o inflamable, tener una alta disponibilidad con elevado grado de pureza y bajo costo (Taniguchi *et al* 1985). Asimismo, el CO₂ posee una temperatura crítica de 31,1°C, lo que lo convierte en un solvente ideal para la extracción de productos naturales, ya que los mismos no sufren degradación térmica durante el proceso (Molero Gómez *et al.* 1996).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la estabilidad oxidativa e identificar los antioxidantes naturales presentes en el aceite de chía obtenido mediante CO₂ supercrítico a distintas condiciones de proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) provenientes de la provincia de Salta, Argentina, como materia prima para el proceso de extracción. Luego de su limpieza manual para eliminar material extraño y semillas dañadas, las mismas fueron deshidratadas hasta peso constante en estufa a 40°C. Posteriormente, fueron molidas con un molino de cuchillas ajustando su granulometría mediante el pasaje por un tamiz de 1 mm de abertura (ASTM # 18).

Extracción por fluidos supercríticos (EFSC)

Las experiencias de extracción supercrítica con CO₂ se realizaron en una planta de extracción a escala piloto funcionando en ciclo cerrado, con una única etapa de separación por descompresión (**Figura 1**). La cantidad de material utilizado para cada condición de trabajo, fue de aproximadamente 500 – 550 g de sólido. El proceso de extracción fue llevado a cabo con un flujo de CO₂ de 8 Kg/h, bajo dos condiciones de presión (250 y 450bar) y de temperatura (40 y 60°C). El aceite obtenido para cada una de las condiciones operativas fue almacenado bajo atmósfera de nitrógeno a 4°C, para evitar la ocurrencia de posibles procesos de deterioro.

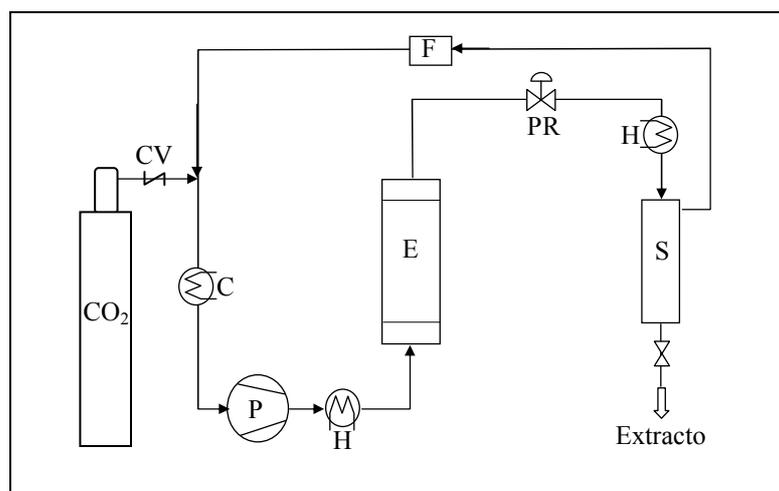


Figura 1. Diagrama del equipamiento utilizado. E: Extractor (2.5 litros); PR: válvula reguladora de presión, S: Separador; F: caudalímetro; P: bomba de diafragma; H,C: intercambiador de calor; CV: válvula de retención; CO₂: cilindro de CO₂.

Ensayo acelerado de estabilidad oxidativa

Las muestras de aceite se sometieron a un ensayo de oxidación acelerada en un equipo Rancimat (679 Metrohm) (AOCS Cd 12b-92, 1993). Las condiciones empleadas fueron las siguientes: 5 g de aceite, 98°C, flujo de aire (20 L/h).

Flavonoides y ácidos fenólicos

Se diluyeron 2 g de aceite en 5 ml de n-hexano y se extrajeron 3 veces con 2 ml de acetonitrilo:ácido acético 10% (50:50 v/v). El extracto fue concentrado bajo atmósfera de nitrógeno y analizado por HPLC-UV. Se utilizó una columna C18, 5µm (Vydac, 25 x 0,45 m), y un gradiente de acetonitrilo:ácido acético 10% según: (90:10 v/v) 0 a 5 min; gradiente lineal hasta (60:40 v/v) a 15 min; y (80:20 v/v) de 16 a 18 min. Este gradiente de polaridad de la fase móvil, permitió la elución en primer lugar de los

ácidos fenólicos y luego de los flavonoles. La detección se realizó por absorbancia a 255nm hasta los 5 minutos y luego a 375nm.

Tocoferoles

El contenido de tocoferoles en el aceite de chía fue determinado mediante una técnica cromatográfica basada en las normas IUPAC 2.432 (1992) y AOCS Ce 8-89 (1998). Las muestras de aceite fueron disueltas en hexano para su posterior cuantificación por HPLC con detector de fluorescencia (λ exc.: 290 nm, λ emis.: 330 nm). Se utilizó un cromatógrafo HPLC Hewlett Packard Serie 1050, columna fase normal Lichrosob Si-60 (25 x 0,4 cm; 5 μ m de tamaño de partícula), fase móvil isopropanol:hexano (0,5:99,5 v/v, filtrado y desgasificado) a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min y 20 μ l de volumen de inyección.

Análisis estadístico

Se aplicó ANOVA y test de Tukey para realizar el correspondiente análisis estadístico, realizándose además el análisis de correlación entre las variables estudiadas. Se utilizó el programa informático Statgraphic Plus 4.0. Manugistics Inc., USA (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 1** muestra los tiempos de inducción resultantes del ensayo acelerado de estabilidad oxidativa de aceites de chía extraídos a diferentes condiciones de temperatura y presión estudiadas. Los resultados evidenciaron tiempos de inducción $\leq 1,3$ h, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las diversas condiciones operativas citadas. La estabilidad oxidativa de los aceites obtenidos mediante EFSC resultaron menores que las informadas para el aceite extraído con hexano (2,4 h) (Ixtaina *et al.* 2007a) y prensa (2,5 h) (Ixtaina *et al.* 2007b). Resultados similares fueron encontrados en aceite de girasol, asociando la menor estabilidad oxidativa de los aceites extraídos por EFSC a la presencia de trazas de oxígeno en el solvente de extracción, CO₂, aún siendo este fluido de elevada calidad (Calvo *et al.* 1994).

Tabla 1. Ensayo acelerado de estabilidad oxidativa de aceites de chía (*S. hispanica* L.) extraídos mediante CO₂ supercrítico a diferentes condiciones operativas.

Temperatura (°C)	Presión (bar)	Tiempo de inducción (h)
40	250	0,97 \pm 0,07 ^a
	450	0,67 \pm 0,10 ^a
60	250	0,93 \pm 0,33 ^a
	450	1,30 \pm 0,42 ^a

Se indica el valor medio correspondiente a 2 repeticiones \pm desvío standard.
Letras iguales en la misma columna indica que no existen diferencia significativas ($p \leq 0,05$)

Los principales antioxidantes polifenólicos presentes en el aceite de semilla de chía fueron: ácido cafeico > miricetina \approx ácido clorogénico \approx quercetina > kaempferol, no detectándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las distintas condiciones ensayadas (**Tabla 2**). Esta información es similar a la proporcionada por Taga *et al.* (1984) en semillas de chía, donde se registró la presencia de estos antioxidantes con mayores niveles de concentración (≈ 2 órdenes de magnitud superior al contenido en aceite). Este hecho puede atribuirse a la naturaleza hidrofílica de estos compuestos, la cual no favorece su solubilidad en el aceite. Asimismo, el contenido total de estos antioxidantes fue similar al encontrado en los aceites de chía extraídos por solvente ($2,04 \times 10^{-5}$ mol kg⁻¹) y prensa ($1,4 \times 10^{-5}$ mol kg⁻¹) (Ixtaina *et al.* 2007a, 2007b).

El contenido total de tocoferoles varió en el rango 36 – 95 μ g g⁻¹, presentando este parámetro diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre las condiciones operativas ensayadas. La contribución principal al tenor de los tocoferoles totales en chía es la del gama tocoferol, el cual presenta la misma tendencia de concentración en el aceite que los tocoferoles totales en función de las distintas condiciones operativas. Así, el mayor contenido de tocoferoles se observó en el aceite extraído a 450 bar – 40°C, mientras que los menores valores se presentaron en el aceite obtenido a 250 bar- 60°C (**Figura 2**). Ahora bien, para una determinada presión, la obtención de una menor

concentración de tocoferoles en el aceite a la temperatura más elevada de proceso puede ser explicada debido a una mayor extracción de aceite (Ixtaina *et al.*, 2007a), lo cual puede traducirse en una dilución de dichos compuestos. No obstante, otros factores también podrían afectar la concentración de tocoferoles, tales como el efecto co-solvente del aceite (Jachmanián *et al.*, 2006), degradación térmica (Bostyn *et al.*, 2008), siendo necesario realizar mayores investigaciones al respecto. Si bien se encontró gamma tocoferol en todos los aceites obtenidos por EFSC (**Figura 2**), el delta tocoferol solamente se detectó en muy bajas concentraciones (4,17 mg/kg aceite) a 250 bar y 40°C condiciones donde se obtuvo el menor rendimiento del aceite (Ixtaina *et al.*, 2007a), por ende pudo haber una menor dilución y así detectarse el delta tocoferol. No obstante, el contenido de tocoferoles de los aceites obtenidos mediante EFSC fue menor que el informado para el aceite de chía obtenido por solvente (295 mg/kg aceite) y por prensado (230 mg/kg aceite) a partir de la misma materia prima (Ixtaina *et al.* 2007b, 2007c). Este hecho se relaciona con la menor estabilidad oxidativa registrada para aceites de chía obtenidos por EFSC en comparación con la informada en el caso de las metodologías tradicionales.

Tabla 2. Composición de antioxidantes polifenólicos en aceite de semilla de chía (*S. hispanica* L., obtenido mediante EFSC a diferentes condiciones operativas.

T (°C)	P (bar)	Antioxidante (mol kg ⁻¹)					
		Ác. clorogénico	Ác. cafeico	Miricetina	Quercetina	Kaempferol	Total
40	250	1,31x10 ⁻⁵ ± 2,17x10 ^{-6a}	3,01x10 ⁻⁵ ± 4,61x10 ^{-6a}	1,35x10 ⁻⁵ ± 6,33x10 ^{-7a}	1,23x10 ⁻⁵ ± 1,76x10 ^{-6a}	3,48x10 ⁻⁶ ± 5,35x10 ^{-7a}	7,25x10 ⁻⁵ ± 1,94x10 ^{-6a}
	450	9,55x10 ⁻⁶ ± 1,42x10 ^{-9a}	2,15x10 ⁻⁵ ± 4,47x10 ^{-7a}	1,00x10 ⁻⁵ ± 6,97x10 ^{-8a}	9,38x10 ⁻⁶ ± 2,02x10 ^{-7a}	2,63x10 ⁻⁶ ± 1,56x10 ^{-8a}	5,30x10 ⁻⁵ ± 1,47x10 ^{-7a}
60	250	1,05x10 ⁻⁵ ± 5,95x10 ^{-8a}	2,44x10 ⁻⁵ ± 2,57x10 ^{-7a}	1,75x10 ⁻⁵ ± 2,31x10 ^{-6a}	9,73x10 ⁻⁶ ± 3,48x10 ^{-7a}	2,89x10 ⁻⁶ ± 1,85x10 ^{-8a}	6,50x10 ⁻⁵ ± 5,99x10 ^{-7a}
	450	2,58x10 ⁻⁵ ± 2,00x10 ^{-5a}	5,92x10 ⁻⁵ ± 4,59x10 ^{-5a}	2,57x10 ⁻⁵ ± 2,32x10 ^{-6a}	2,34x10 ⁻⁵ ± 1,83x10 ^{-5a}	7,16x10 ⁻⁶ ± 5,77x10 ^{-6a}	1,41x10 ⁻⁴ ± 1,85x10 ^{-5a}

Se indica media y desvío standard de tres determinaciones.

Letras iguales en la misma columna indica que no existen diferencias significativas (p ≤ 0,05)

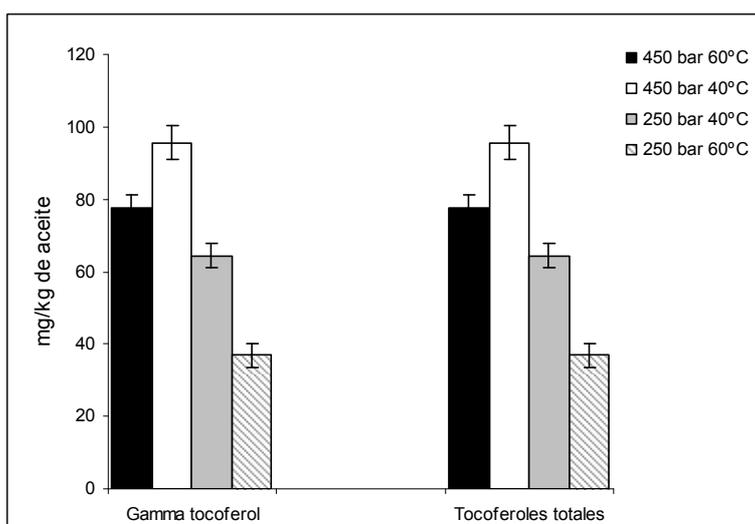


Figura 2. Tocopheroles presentes en aceites de semillas de chía (*S. hispanica* L.) obtenido mediante EFSC a diferentes condiciones operativas.

En síntesis, si bien el aceite de chía extraído mediante fluidos supercríticos contiene antioxidantes naturales tales como compuestos fenólicos y tocoferoles, su estabilidad oxidativa es muy baja, debido a su elevado contenido de PUFAs (85,3 %) (Ixtaina *et al.*, 2007b).

CONCLUSIONES

El proceso de EFSC llevado a cabo bajo distintas condiciones operativas permitió la obtención de aceites de chía de similar estabilidad oxidativa y contenido de antioxidantes fenólicos aunque de distinto tenor en el contenido de tocoferoles totales. Si bien se han detectado compuestos con actividad antioxidante en el aceite de chía, el elevado contenido de PUFAs prevalece sobre los mismos, contribuyendo de esta manera a una alta susceptibilidad de deterioro oxidativo de este aceite.

AGRADECIMIENTOS

La extracción de aceite mediante fluidos supercríticos fue realizada en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Río Cuarto, en conjunto con los Dres. Miguel Mattea y Damián Cardarelli, víctimas del accidente ocurrido en diciembre pasado en la mencionada Universidad. A ellos, excelentes personas y reconocidos profesionales, nuestro más profundo agradecimiento y sincero homenaje.

Los autores agradecen a:

- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). PICT 2002-0910768 y UNLP (11/X390).
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOCS (1998). Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society, 15th Edition, AOCS Press, Champaign, Illinois.

Ayerza R. 1995. Oil Content and Fatty Acid Composition of Chia (*Salvia hispanica*) from Five Northwestern Locations in Argentina. Journal of the American Oil Chemists' Society, 72: 1079-1081.

Bostyn S., Duval-Onen F., Porte C., Coïc J.P., Fauduet H. 2008. Kinetic modelling of the degradation of the α -tocopherol in biodiesel-rape methyl ester, Bioresource Technology, 99: 6439-6445.

Calvo L, Cocero MJ, Díez JM. 1994. Oxidative Stability of Sunflower Oil Extracted with Supercritical Carbon Dioxide. Journal of the American Oil Chemists' Society, 71: 1251-1254.

IUPAC. 1992. International Union of Pure and Applied Chemistry- Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivates. 7th ed. Paquot, C. y Hautffene, A., Blackwell Scientific Publications, Inc., Oxford

Ixtaina V.Y., Cardarelli, D.A., Mattea M.A., Nolasco S., Tomás M.C. 2007a. Extracción de aceite de Chía (*Salvia hispanica* L.) mediante CO₂. XII Congreso Latino-americano de Oleos e Gorduras – Sección Latinoamericana de la American Oil Chemist's Society, Florianópolis, Brasil.

Ixtaina VY, Martínez M, Maestri D, Spotorno V, Mateo C, Nolasco SM, Tomás MC. 2007b. Antioxidantes en aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) obtenido mediante prensado. Proceeding VI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, Ambato (Ecuador).

Ixtaina VY, Martínez M, Mateo C, Nolasco SM, Tomás MC. 2007c. Oxidative stability and characterization of antioxidants in chia seed oils. 98th AOCS Annual Meeting & Expo, Quebec, Canadá.

Jachmanián I, Margenat L., Torres A., Grompone M.A. 2006. Estabilidad oxidativa y contenido de tocoferoles en el aceite de canola extraído con CO₂ supercrítico. Grasas y Aceites, 57: 155 - 159.

Molero Gómez A, Pereyra López C, Martínez de la Ossa E. 1996. Recovery of grape seed oil by liquid supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with convention solvent extraction. *Chemical Engineering Journal*, 61: 227-231.

Reverchon E, Osseo LS. 1996. Process alternatives for soybean oil supercritical extraction: Comparison of processes of supercritical CO₂ extraction from soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71: 1007.

Statgraphics Plus 4.0. 1999. Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville, USA.

Taga MS, Miller EE, Pratt DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61: 928- 931.

Taniguchi M, Kamihira M, Tsuji T, Kobayashi T. 1985. Extraction of oils from wheat germ with supercritical carbon dioxide. *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 2367-2372.