



**Universidad de San Carlos de Guatemala**  
**Facultad de Ingeniería**  
**Escuela de Ingeniería Química**

**EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA  
OLEORRESINA DE CARDAMOMO (*Elletteria cardamomum*, L.  
Matton) OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO UTILIZANDO DOS  
MÉTODOS DE LIXIVIACIÓN A TRES DIFERENTES  
TEMPERATURAS.**

**Adrian Antonio Soberanis Ibáñez**

Asesorado por la Inga. Telma Maricela Cano Morales

Guatemala, julio de 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA



**EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA  
OLEORRESINA DE CARDAMOMO (*Elletteria cardamomum*, L.  
Matton) OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO UTILIZANDO DOS  
MÉTODOS DE LIXIVIACIÓN A TRES DIFERENTES  
TEMPERATURAS.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN  
PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR:

**ADRIAN ANTONIO SOBERANIS IBAÑEZ**

ASESORADO POR LA INGA. QCA. TELMA MARICELA CANO MORALES

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

**INGENIERO QUÍMICO**

GUATEMALA, JULIO DE 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA



**NÓMINA DE LA JUNTA DIRECTIVA**

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Inga. Glenda Patricia García Soria
VOCAL II	Inga. Alba Maritza Guerrero de López
VOCAL III	Ing. Miguel Ángel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. Milton De León Bran
VOCAL V	Br. Isaac Sultán Mejía
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

**TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO**

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía
EXAMINADOR	Dr. Adolfo Narciso Gramajo Antonio
EXAMINADORA	Inga. Rosa María Girón Ruiz
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

## HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

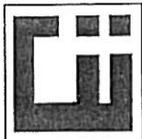
Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

### **EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA OLEORRESINA DE CARDAMOMO (*Elletteria cardamomum*, L. Matton) OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO UTILIZANDO DOS MÉTODOS DE LIXIVIACIÓN A TRES DIFERENTES TEMPERATURAS,**

tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, el 14 de agosto de 2008.



**Adrian Antonio Soberanis Ibáñez**



CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA  
FACULTAD DE INGENIERIA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



Guatemala, 22 de Abril de 2009.

Ingeniero  
Williams Guillermo Álvarez Mejía  
Director  
Escuela de Ingeniería Química

Respetable Ingeniero Álvarez:

Con un cordial saludo me dirijo a usted para informarle que he asesorado y aprobado el Informe Final de trabajo de graduación titulado: **"EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA OLEORRESINA DE CARDAMOMO (*Elletteria cardamomum*, L. Matton) OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO UTILIZANDO DOS METODOS DE LIXIVIACIÓN A TRES DIFERENTES TEMPERATURAS"**. Elaborado por el estudiante de Ingeniería Química Adrián Antonio Soberanis Ibáñez con número de carné 20010898. Considero que el Informe Final de trabajo de graduación desarrollado por el estudiante Soberanis Ibañez, satisface los requisitos exigidos; por lo que solicito se sirva remitirlo para su respectiva revisión.

Agradezco a usted la atención a la presente.

Atentamente,

  
Inga. Telma Marcela Cano Morales  
Colegiado 433  
ASESORA  
DIRECTORA

Centro de Investigaciones de Ingeniería/CII





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

---

Guatemala, 08 de Junio de 2009  
Ref. EI.Q.346.2009

Ingeniero  
**Williams Guillermo Álvarez Mejía**  
DIRECTOR  
Escuela de Ingeniería Química  
Facultad de Ingeniería  
Presente.

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el Acta TG-042-09-B-IF le informo que reunidos los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del informe final del trabajo de graduación, para optar al título de INGENIERO QUÍMICO al estudiante universitario **ADRIAN ANTONIO SOBERANIS IBAÑEZ**, identificado con carné No. **2000-10898**, titulado: "EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA OLEORRESINA DE CARDAMOMO (*Elleteria Cardamomum*, L. Matton) OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO UTILIZANDO DOS MÉTODOS DE LIXIVIACIÓN A TRES DIFERENTES TEMPERATURAS" el cual ha sido asesorado por el Ingeniera Química Telma Maricela Cano Morales, como consta en el Acta.

Habiendo encontrado el referido informe final **satisfactorio**, se procede a recomendarle autorice al estudiante **Soberanis Ibañez** proceder con los trámites requeridos de acuerdo a normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Inga. Tereza Lisely de León Arana, M.Sc.

COORDINADORA  
Tribunal que revisó el informe final  
Del trabajo de graduación



ESCUELA DE  
INGENIERIA QUIMICA

C.c.: archivo

---



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA.

---

El Director de la Escuela de Ingeniería Química Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía, M.Sc. Después de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el trabajo de graduación del estudiante **ADRIAN ANTONIO SOBERANIS IBÁÑEZ** titulado: **“EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA OLEORRESINA DE CARDAMOMO (*Elletteria cardamomum*, L. Matton) OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO UTILIZANDO DOS MÉTODOS DE LIXIVIACIÓN A TRES DIFERENTES TEMPERATURAS”**, procede a la autorización del mismo, ya que reúne rigor, coherencia y calidad requeridos.

  
Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía M.Sc.  
DIRECTOR ESCUELA INGENIERÍA QUÍMICA



Guatemala, julio de 2,009



El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA OLEORRESINA DE CARDAMOMO (Elletteria Cardamomum, L. Matton) OBTENIDA A NIVEL LABORATORIO UTILIZANDO DOS MÉTODOS DE LIXIVIACIÓN A TRES DIFERENTES TEMPERATURAS**, presentado por el estudiante universitario **Adrian Antonio Soberanis Ibañez**, procede a la autorización para la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.

Ing. Murphy Olympo Paiz  
DECANO



Guatemala, junio de 2009

/cc

## **ACTO QUE DEDICO A:**

<b>Dios</b>	Ser todopoderoso que me ha guiado a lo largo de este camino.
<b>Mis padres</b>	Marco Antonio y Clara Ofelia por ser modelos de perseverancia, responsabilidad y amor. Este logro es de ustedes.
<b>Mis hermanos</b>	Ingrid Johana y Luis Fernando. Por compartir los buenos y malos momentos. Su cariño y apoyo es invaluable. Gracias.
<b>Mi sobrino y mi ahijada</b>	Que este logro sirva de ejemplo en el desarrollo de sus vidas. Los quiero mucho.
<b>Mis abuelos</b>	Clara Fabián, tu amistad y amor es el mejor regalo que me has dado. Gracias. Gilberto Soberanis, por enseñarme a ser fuerte ante la adversidad. Piedad Gatica (Q.D.E.P.)
<b>Mis tíos maternos</b>	Adrián, Alicia, Ingrid, Leslie, Ricardo. Gracias por el apoyo invaluable.
<b>Mis tíos paternos</b>	Silvia (Q.D.E.P.), René, Hernán, Piedad, Dora. Gracias por los consejos, jamás los olvidaré.
<b>Mis primos y primas</b>	A cada uno por los recuerdos compartidos
<b>Mis amigos y amigas</b>	Gracias por la amistad incondicional.
<b>Los Ingenieros</b>	César García, Telma Cano, Jorge Godínez, Pablo de León, Otto Raúl de León. Mil gracias por sus enseñanzas.

## **AGRADECIMIENTOS A:**

<b>Dios</b>	Por ser el guía de mi vida.
<b>Mis padres</b>	Marco Antonio y Clara Ofelia, por su amor y apoyo incondicional.
<b>Mis hermanos</b>	Ingrid y Luis. Por todo su amor.
<b>Mis abuelos</b>	Clara, Gilberto y Piedad, por ser un gran ejemplo a seguir.
<b>Mis tíos</b>	Por ser cada uno especial conmigo.
<b>Mis primos y primas</b>	En especial a Elvis, Karina, Jeremías, Josué, Hernán, fue una infancia memorable.
<b>Mis amigas</b>	Letty, Lesbia, Shirley, Gaby, Alejandra, Tannia, Adela, Mercedes, Cinthya, Rosario, Karen, Heidi, Arelis, Romy.
<b>Mis amigos</b>	Julio, Joze, Víctor, José E., Paulo, Francisco, Christian, Nelson, Byron, Francisco P., Nino, Carlos A., José L., César, Carlos E., Luis F., Mario R., Aníbal, Luis T., Mario, Fernando, Javier, Marco Antonio, Augusto, Hugo, Antonio, Álvaro, Darío, Jorge, Genaro, Keny, Rubén, Diego. En especial Alan (Q.D.E.P.) y José Pablo (Q.D.E.P.) sé que están compartiendo esta alegría.
<b>A la familia</b>	Melgar Chavarría, por el apoyo y la amistad.

<b>La Licda. Ingrid Benítez</b>	Gracias por todo, pero especialmente por el cariño y apoyo hacia mi persona, la quiero mucho.
<b>El Ing. César García</b>	Gracias por ser un gran maestro y amigo. Su apoyo y consejos son invaluableles.
<b>El Ing. Jorge Godínez</b>	Gracias por los consejos, las enseñanzas y la amistad.
<b>La Inga. Telma Cano</b>	Gracias por todo su apoyo, cariño y amistad.
<b>Los Ingenieros</b>	Julio Luna, Otto Raúl De León, Pablo de León, Marino Barrientos, Ericka Cano. Mi admiración, cariño y respeto para cada uno de ustedes.
<b>La Asociación de Monitoreo Ambiental Comunitario (AMAC)</b>	Gracias por la amistad y las enseñanzas aprendidas. El trabajar con ustedes ha sido la mejor escuela que he podido tener. De nuevo mil gracias
<b>La Sección de Química Industrial, CII/ Área de Química, EIQ, USAC</b>	Gracias a cada una de las personas que compartieron conmigo en mis lugares de desempeño laboral. Ha sido un honor trabajar con cada uno de ustedes.
<b>La Facultad de Ingeniería</b>	Gracias por formarme en mi carrera profesional.
<b>La Universidad de San Carlos de Guatemala</b>	El sentimiento es único. Seré SANCARLISTA hasta la MUERTE.

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE ILUSTRACIONES</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	<b>XI</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XIX</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>XXI</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>XXIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>XXV</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>7</b>
2.1 Cardamomo	7
2.1.1 Familia de las Zingiberáceas	12
2.1.1.1 Clasificación científica	14
2.2 Oleorresinas y aceites esenciales	14
2.2.1 Composición química de las oleorresinas	17
2.2.2 Función de los metabolitos secundarios en las plantas	20
2.2.3 Metabolitos secundarios presentes en el cardamomo	21
2.2.3.1 1,8 Cineol	21
2.2.3.2 Geraniol	22
2.2.3.3 Acetato de $\alpha$ – terpinilo	23
2.2.3.4 $\alpha$ terpineol	24
2.2.3.5 Linalool	25
2.2.3.6 Acetato de linalilo	26
2.2.3.7 $\beta$ -Pinoeno	27

2.2.3.8 $\alpha$ -Pino	28
2.2.3.9 Limoneno	29
2.3 Proceso de extracci3n s3lido-l3quido	30
2.3.1 Proceso de lixiviaci3n	30
2.3.1.1 Defini3n	30
2.3.1.2 Aplicaciones	33
2.3.2 Preparaci3n de los s3lidos para la lixiviaci3n	35
2.3.2.1 Materiales org3nicos e inorg3nicos	35
2.3.2.2 Velocidad de lixiviaci3n	37
2.3.3 M3todos de extracci3n de oleorresinas	39
2.4 Defini3n de variables	40
2.4.1 Variables del proceso extractivo	40
2.4.1.1 Estado de divisi3n de la materia	43
2.4.1.2 Agitaci3n	43
2.4.1.3 Temperatura	44
2.4.1.4 pH	44
2.4.1.5 Naturaleza del solvente	45
2.4.1.6 Tiempo de extracci3n	45
2.4.2 Procesos de extracci3n	46
2.4.2.1 Maceraci3n	47
2.4.2.2 Percolaci3n	52
2.4.2.3 Lixiviaci3n con unidad de extracci3n tipo Soxhlet	53
2.4.3 Solventes	54

2.5 Preliminares para un estudio de obtención de oleorresinas	56
2.5.1 Naturaleza de la materia vegetal	56
2.5.2 Tamaño de la partícula	57
2.5.3 Técnicas de la recolección, secado y conservación de las plantas	59
2.5.4 Deterioro a que están expuestas las oleorresinas	61
2.6 Industrialización de las plantas aromáticas	62
2.7 Materia prima	63
2.7.1 Cultivo de plantas medicinales	63
2.7.2 Recolección	64
2.7.3 Procesamiento post-cosecha	65
2.7.4 Almacenamiento	68
2.7.5 Molienda	69
2.8 Factores que afectan el rendimiento de obtención de oleorresinas	70
2.9 Caracterización de oleorresinas	71
2.9.1 Cromatografía	72
2.9.2 Cromatografía en capa fina	73
2.9.2.1 Análisis cuantitativo en cromatografía en capa fina	77
2.9.3 Cromatografía en fase gaseosa	81
2.9.4 Cromatografía gas-líquido	83
2.9.5 Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC	85
2.9.5.1 Tipos de HPLC	87

2.9.5.1.1 Cromatografía de fase normal	87
2.9.5.1.2 Cromatografía de fase reversa	88
2.9.5.1.3 Cromatografía de exclusión molecular	90
2.9.5.1.4 Cromatografía de intercambio iónico.	91
2.9.5.1.5 Cromatografía basada en bioafinidad	92
2.9.5.2 Parámetros	93
2.9.5.1 Diámetro interno	93
2.9.5.2 Medida de las partículas	93
2.9.5.3 Tamaño de poro	94
2.9.5.4 Presión de la bomba	94
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>97</b>
3.1 Metodología de la Investigación	97
3.1.1 Recurso humano	97
3.1.2 Recurso físico	97
3.2 Metodología experimental	99
3.2.1 Diseño de tratamientos	99
3.2.2 Manejo Experimental	99
3.2.2.1 Preparación de la muestra	100
3.2.2.2 Lixiviación utilizando equipo de percolación Soxhlet	100
3.2.2.3 Extracción mediante maceración dinámica con reflujo con variaciones de temperatura. (25 °C, 50 °C y 78 °C)	102
3.2.2.4 Extracción mediante maceración	

estática con reflujo con variación de temperatura. (25 °C, 50 °C y 78 °C)	103
3.2.2.5 Manejo de productos y residuos	105
3.3 Diseño experimental	105
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>107</b>
<b>5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>121</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>127</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>129</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>133</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>135</b>
<b>Apéndice A. Análisis preliminares</b>	<b>135</b>
<b>Apéndice B. Densidades</b>	<b>139</b>
<b>Apéndice C. Muestra de cálculo</b>	<b>141</b>
<b>Apéndice D. Datos calculados</b>	<b>143</b>
<b>Apéndice E. Fotografías del proceso</b>	<b>147</b>
<b>Apéndice F. Cromatogramas</b>	<b>151</b>
<b>Apéndice G. Diagramas de procesos y cursos</b>	<b>165</b>



## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

### FIGURAS

1.	Estructura molecular 1,8 Cineol.	21
2.	Estructura molecular del Geraniol	22
3.	Estructura molecular del Acetato de $\alpha$ – terpinilo.	23
4.	Estructura molecular del $\alpha$ –Terpineol	24
5.	Estructura molecular del Linalool.	25
6.	Estructura molecular del Acetato de Linalilo.	26
7.	Estructura molecular del $\beta$ – Pineno.	27
8.	Estructura molecular del $\alpha$ – Pineno	28
9.	Estructura molecular del Limoneno.	29
10.	Equipo de extracción Soxhlet	102
11.	Equipo de extracción con maceración dinámica con reflujo.	104
12.	Distribución de los resultados experimentales del porcentaje de oleoresina cardamomo en función del método de extracción.	113
13.	Distribución de los resultados experimentales del porcentaje de oleoresina cardamomo en función de la temperatura.	115
14.	Medias del porcentaje de rendimiento de oleoresina de cardamomo de acuerdo al método en función de la temperatura.	117
15.	Diagrama de Schewart para el equipo de extracción Soxhlet con una confianza de 68%	117
16.	Diagrama de Shewart para la maceración estática a 25 °C con una confianza de 68%.	118
17.	Diagrama de Schewart para la maceración dinámica	

	a 25 °C con una confianza de 68%.	118
18.	Diagrama de Schewart para la maceración estática a 50 °C con una confianza de 68%.	119
19.	Diagrama de Schewart para la maceración dinámica a 50 °C con una confianza de 68%.	119
20.	Diagrama de Schewart para la maceración estática a 78 °C con una confianza de 68%.	120
21.	Diagrama de Schewart para la maceración dinámica a 78 °C con una confianza de 68%.	120
22.	Curva de calibración del equipo calentador agitador.	135
23.	Evaluación de la densidad en función del número de ciclos.	136
24.	Vaina y semilla de cardamomo ( <i>Elleteria Cardamomum</i> , L. Matton)	147
25.	Planta y flor característica del cardamomo ( <i>Elleteria Cardamomum</i> , L. Matton)	147
26.	Extracción de oleorresina de cardamomo.	148
27.	Cromatoplasmas resultado de la cromatografía en capa fina.	149
28.	Cromatograma para la maceración estática a 25 °C.	151
29.	Cromatograma para la maceración dinámica a 25 °C.	154
30.	Cromatograma para la maceración estática a 50 °C.	156
31.	Cromatograma para la maceración dinámica a 50 °C.	158
32.	Cromatograma para la maceración estática a 78 °C.	160
33.	Cromatograma para la maceración dinámica a 78 °C .	162
34.	Diagrama de causa y efecto de un proceso de extracción sólido-líquido .	165
35.	Diagrama de cursos	166

## TABLAS

I.	Tipos de cromatografía.	72
II.	Fases estacionarias líquidas y temperaturas máximas de utilización.	85
III.	Datos requeridos para un experimento en una dirección, con <i>a</i> tratamientos y <i>n</i> repeticiones.	105
IV.	Porcentaje de rendimiento de la oleoresina de cardamomo obtenida utilizando maceración estática a temperatura ambiente.	107
V.	Porcentaje de rendimiento de la oleoresina de cardamomo obtenida utilizando maceración dinámica a temperatura ambiente.	107
VI.	Porcentaje de rendimiento de la oleoresina de cardamomo obtenida utilizando maceración estática a 50°C.	108
VII.	Porcentaje de rendimiento de la oleoresina de cardamomo obtenida utilizando maceración dinámica a 50°C.	108
VIII.	Porcentaje de rendimiento de la oleoresina de cardamomo obtenida utilizando maceración estática a ebullición (T=78.5 °C).	109
IX.	Porcentaje de rendimiento de la oleoresina de cardamomo obtenida utilizando maceración dinámica a ebullición (T=78.5 °C).	109
X.	Porcentaje de rendimiento de la oleoresina de cardamomo obtenida utilizando el equipo de extracción Soxhlet	110
XI.	Presencia de metabolitos secundarios cromatografía en capa fina.	110
XII.	Metabolitos secundarios detectados en la	

	oleorresina de cardamomo utilizando cromatografía en capa gaseosa acoplado a espectrofotometría de masas.	111
XIII.	Análisis de varianza para el porcentaje de rendimiento de oleorresina de cardamomo.	114
XIV.	Prueba de Duncan para las medias del porcentaje de rendimiento de oleorresina de cardamomo.	114
XV.	Análisis de varianza para el porcentaje de rendimiento de oleorresina de cardamomo.	116
XVI.	Comparación de Duncan para las medias del porcentaje de rendimiento de oleorresina de cardamomo.	116
XVII.	Calibración de equipo calentador-agitador utilizando lámpara estroboscópica.	135
XVIII.	Densidades obtenidas en las pruebas preliminares con el equipo de Extracción Soxhlet.	136
XIX.	Mediciones de humedad en la materia prima.	137
XX.	Densidad de aparente de la semilla molida de cardamomo.	139
XXI.	Densidad de los extractos etanólicos obtenidos para cada uno de los métodos.	139
XXII.	Densidad de aparente de la semilla molida de cardamomo.	143
XXIII.	Densidad aparente de la materia prima exhausta.	143
XXIV.	Densidad del extracto etanólico.	144
XXV.	Porcentaje de rendimiento de oleorresina de cardamomo.	145

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>F</b>	Significancia
<b>G</b>	Gramos
<b>H<sub>i</sub></b>	Hipótesis alternativa
<b>H<sub>o</sub></b>	Hipótesis nula
<b>H<sub>p</sub></b>	Potencia en horse-power
<b>Hz</b>	Hertz
<b>m</b>	Metros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mL</b>	Mililitros
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>T</b>	Temperatura
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>%</b>	Porcentaje
<b><math>\rho</math></b>	Densidad en g/mL o g/cm <sup>3</sup>
<b><math>\sigma</math></b>	Desviación estándar
<b><math>\mu</math></b>	Promedio general de % de rendimiento de oleoresina.
<b><math>\epsilon_{ijk}</math></b>	Error experimental
<b><math>\epsilon</math></b>	Constante dielectrica
<b>R<sub>f</sub></b>	Recorrido de frente
<b>R<sub>t</sub></b>	Factor de retención



## **GLOSARIO**

### **Aceite esencial**

Es la fracción líquida volátil generalmente destilable por arrastre con vapor de agua, que contiene las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica.

### **Bio diversidad**

Es el término por el que se hace referencia a la amplia variedad de seres vivos sobre la Tierra y los patrones naturales que conforma, resultado de miles de millones de años de evolución, según procesos naturales y también, de la influencia creciente de las actividades del ser humano.

### **Calidad de oleoresina**

Parámetro de control del producto final obtenido, oleoresina. Entre las propiedades que determinan la calidad de esta se encuentran: propiedades fisicoquímicas como la densidad, viscosidad, índice de refracción, etc. Así como también la composición fitoquímica, presencia de metabolitos secundarios, que se encuentran presentes en la oleoresina.

## **Cromatografía**

Es una técnica de separación extraordinariamente versátil que presenta distintas variantes. En toda separación cromatográfica hay dos fases (sólida, líquida o gas) una móvil y otra estacionaria, que se mueven una con respecto de la otra manteniendo un contacto íntimo. La muestra se introduce en la fase estacionaria y la móvil. Los componentes de la mezcla a separar invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, con lo que se produce la separación. Si un componente está la mayor parte del tiempo en la fase móvil, el producto se mueve rápidamente, mientras que si se encuentra la mayor parte en la fase estacionaria, el producto queda retenido y su salida es mucho más lenta.

## **Lixiviación**

Es la eliminación de una fracción soluble, en forma de solución, a partir de una fase sólida permeable e insoluble a la cual está asociada. La separación implica, normalmente, la disolución selectiva, con difusión o sin ella, pero en el caso extremo del lavado simple, consiste sólo en el

desplazamiento (con alguna mezcla) de un líquido intersticial por otro, con el que es miscible. El constituyente soluble puede ser sólido o líquido y estar incorporado, combinado químicamente o adsorbido, o bien mantenido mecánicamente, en la estructura porosa del material insoluble. El sólido insoluble puede ser másico y poroso; con mayor frecuencia es de partículas y estas últimas pueden ser poros abiertos, de celdas, con paredes celulares selectivamente permeables o con superficies activadas.

### **Maceración**

El proceso de maceración consiste en poner en contacto la materia prima y el solvente, durante cierto tiempo.

### **Metabolitos secundarios**

Compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas. Los metabolitos secundarios de las plantas intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

## **Oleorresina**

Las oleorresinas son líquidos naturales extraídos de especias o extractos herbales que contienen compuestos volátiles y no volátiles, los cuales caracterizan el sabor, color y aroma de materias primas naturales. Las oleorresinas son exudados compuestos principalmente por constituyentes volátiles y resinosos. Los bálsamos son oleorresinas caracterizadas por su alto contenido en compuestos benzoicos o cinámicos. Las oleorresinas son extractos de naturaleza oleosa, obtenidos de especias o diferentes plantas que proporcionan a los productos color, sabor, según las necesidades del cliente. Son productos líquidos, o casi líquidos, formado por resinas disueltas en aceites, y procedente de diversas plantas.

## **Percolación**

Consiste en hacer pasar el solvente a través de la materia prima, hasta su extracción exhaustiva completa. La percolación simple, comprende la extracción exhaustiva de la materia prima con el solvente siempre renovado. En pequeña escala, la percolación se realiza en aparatos,

denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo del solvente.

### **Solvente**

Es una sustancia que permite la dispersión de otra en su seno. Es el medio dispersante de la disolución. Normalmente, el disolvente establece el estado físico de la disolución, por lo que se dice que el disolvente es el componente de una disolución que está en el mismo estado físico que la disolución. También es el componente de la mezcla que se encuentra en mayor proporción.



## RESUMEN

El objetivo principal del presente estudio es caracterizar dos métodos diferentes de extracción sólido-líquido para la obtención de oleorresina de Cardamomo (*Elleteria cardamomum*, L. Matton), tomando como parámetros de comparación los rendimientos obtenidos así como las propiedades fisicoquímicas y fitoquímicas de los extractos obtenidos.

Se utilizó dos métodos de extracción, maceración dinámica y maceración estática, utilizando como solvente etanol al 95 % v/v y cardamomo con un tamaño entre 840 y 1,190 micrones y una humedad menor a 15% w/w. Se analizó dos métodos: estático y dinámico (800 rpm), cada extracción se llevó a cabo a tres diferentes temperaturas, 25 °C, a 50 °C y 78 °C, esto para poder determinar el efecto de la temperatura en el rendimiento y propiedades de las oleorresinas obtenidas.

Al realizar el análisis estadístico se logró determinar que existe diferencia significativa entre cada uno de los métodos. El método con mayor rendimiento fue la maceración dinámica a 25°C con un rendimiento de  $20.968 \pm 1.073$  %. Además, se determinó cuáles son los metabolitos secundarios de mayor presencia en la oleorresina de cardamomo, siendo estos: acetato de  $\alpha$ -terpinilo, limoneno,  $\alpha$ -terpineol, linalool y nerolidol. La presencia de estos fue determinada a través de cromatografía en capa fina y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.



# OBJETIVOS

## **General:**

Caracterizar dos diferentes métodos de extracción sólido-líquido para la obtención de oleorresina de cardamomo, utilizando como parámetros de comparación el rendimiento, propiedades fisicoquímicas y fitoquímicas de las mismas.

## **Específicos:**

1. Evaluar y comparar el efecto de la temperatura en el proceso de extracción sólido-líquido (lixiviación) utilizando maceración estática y dinámica con etanol al 95 % v/v a nivel laboratorio, utilizando como parámetros de comparación el porcentaje de rendimiento, propiedades fisicoquímicas y fitoquímicas de las oleorresinas.
2. Evaluar y comparar el efecto de la agitación en el proceso de extracción sólido-líquido (lixiviación) utilizando maceración dinámica y estática a tres diferentes temperaturas con etanol al 95 % v/v a nivel laboratorio, utilizando como parámetros de comparación el porcentaje de rendimiento, propiedades fisicoquímicas y fitoquímicas de las oleorresinas.
3. Evaluar y comparar el rendimiento de oleorresina de cardamomo para cada uno de los dos procedimientos de lixiviación a utilizar: maceración estática a tres diferentes temperaturas y maceración dinámica a tres diferentes temperaturas.

4. Realizar la caracterización fisicoquímica de la oleorresina de cardamomo obtenida por dos procedimientos de lixiviación, utilizando cromatografía en capa fina y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

# HIPÓTESIS

Es posible realizar un estudio de la lixiviación de las fracciones solubles del cardamomo utilizando maceración dinámica y estática utilizando etanol al 95 % v/v.

## Hipótesis Estadística

**Ho:** no existe diferencia significativa en el rendimiento y las propiedades fisicoquímicas y fitoquímicas de la oleorresina obtenida en cada uno de los métodos de extracción de oleorresina.

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = 0$$

**Hi:** existe diferencia significativa en el rendimiento y las propiedades de la oleorresina obtenida en cada uno de los métodos de extracción de oleorresina.

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq 0$$



## INTRODUCCIÓN

La importancia de la agricultura en el crecimiento de los países como Guatemala es alta, es por esto que la necesidad de investigar qué usos puede llegar a tener cada una de las especies vegetales que se encuentran en la amplia biodiversidad con la que cuenta nuestro país, es de suma importancia.

El alto nivel de pobreza, en un alto porcentaje extrema, dificulta el acceso a alimentos y a medicamentos, los cuales son importados en su mayoría. Esto ha hecho que las poblaciones guatemaltecas hayan encontrado sustitutos a estos alimentos y medicamentos. Algunos de estos productos han llegado a tener una gran aceptación en cada una de las poblaciones.

La utilización de plantas aromáticas en campos tan diversos como la perfumería, la cocina y la medicina, se remonta varios siglos atrás. Debido a la alta utilización de algunas de estas especies vegetales se han desarrollado productos que optimizan la utilización de estos, algunos de estos productos son los aceites esenciales, oleorresinas, tinturas, etc.

En la actualidad, uno de los productos de exportación que cuentan con alto prestigio, es el cardamomo. El objetivo principal de este estudio fue evaluar dos métodos de lixiviación para la obtención de oleorresina: lixiviación con maceración estática y maceración dinámica a tres diferentes temperaturas (25 °C, 50 °C y temperatura de ebullición), con el fin de analizar los rendimientos y calidad de cada una de las oleorresinas obtenidas.



# 1. ANTECEDENTES

En el Centro de Investigaciones de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala se han realizado varios proyectos de investigación en extracción de aceites esenciales y oleorresinas de ajo, jengibre, eucalipto, cardamomo, romero y varios cítricos.

Sin embargo, en cuanto a oleorresinas han sido pocos los estudios.

En 1998, Cano Telma, Benítez Ingrid, Chávez Blanca y Aguilar Byron ejecutaron el proyecto 28-97 CONCYT denominado: “Obtención y caracterización de capsaicina, ingrediente activo de productos fitofarmacéuticos y agro industriales de tres especies de *Capsicum* (*Capsicum chinense*, *Capsicum annuum L. V.* y *Capsicum anuum*)”.

Para tal efecto se realizó un experimento bifactorial en el que se utilizaron dos concentraciones de alcohol etílico al 70% y al 95% y dos niveles de deshidratación, en fresco y en seco, utilizando tres especies de capsicum, se concluyó que de las tres especies de *Capsicum* estudiadas: chile habanero (*Capsicum chinense*), chile jalapeño (*Capsicum anuum*) y chile verde o chocolate (*Capsicum anuum L. V.*) de manera que se obtuvo el mayor porcentaje de capsaicina en la oleorresina fue con el *Capsicum Chinense*, cuyo valor fue de 10.28%, que está dentro del rango del valor teórico esperado que es entre 10-12%.

El más alto porcentaje de rendimiento de oleorresina fue de 14,6221%, se obtiene para la especie chile habanero seco y utilizando alcohol etílico al 70%. El más alto porcentaje de rendimiento de capsaicina, en función del solvente utilizado fue de 0,002% para la especie chile habanero seco, utilizando alcohol etílico al 95%. El nivel de deshidratación del Capsicum (fresco y seco con humedad al 10%) y la concentración del solvente no influye en el porcentaje de rendimiento de la oleorresina. Para obtener el más alto porcentaje de capsaicina en la oleorresina, la variable que produce un efecto más marcado es nivel de deshidratación, seguido de la especie y concentración del solvente.

En 2002 Cano Telma, Chávez Blanca, Godínez Jorge y Monzón David ejecutaron el proyecto 6-25, PUIDI-DIGI, denominado “Obtención y caracterización del aceite esencial y oleorresina de la pimienta negra (*Piper nigrum* L.) cultivada en Guatemala, Evaluando tres distintos tamaños de lote para la extracción del aceite esencial basado en el rango de operación de la planta piloto de extracción del Centro de Investigaciones de Ingeniería (CII/USAC)”. La extracción de aceite esencial, se realizó en triplicado con un tiempo de extracción de 4 horas, un tamaño de partícula entre 1190 y 841 micrones y 15% de humedad.

Para la extracción de oleorresina se evaluaron dos factores: 3 tamaños de lote (15, 10, 9 libras) y dos concentraciones de solvente (etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) la 95% y 70%). Se realizaron extracciones sucesivas a diferentes tiempos de maceración de la materia prima (36, 48 y 72 horas), hasta llegar a agotamiento de la materia prima. En el estudio también se evaluó las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial y oleorresina. Se concluyó que el valor más alto de porcentaje de rendimiento de aceite esencial de la pimienta negra

cultivada en Guatemala fue de 0,96% para un lote de 15 libras, valor cercano al límite inferior que reporta la literatura que está en el rango entre 1-2,3%. El valor más alto de porcentaje de rendimiento total de oleorresina, efectuando la sumatoria de los rendimientos de las diferentes maceraciones para un tamaño fijo de lote fue de 6,3249%, para un lote de 10 libras, utilizando como solvente alcohol etílico al 70%. Este valor obtenido es mayor que el reportado en la literatura que es de 6%.

Además, se obtuvo que los valores de porcentaje de rendimiento total de oleorresina obtenidos utilizando alcohol etílico al 95% son menores que los obtenidos utilizando alcohol etílico al 70%. El valor medio de porcentaje de rendimiento total de oleorresina utilizando alcohol etílico al 95% fue de 4,122.

El valor medio de porcentaje de rendimiento total de oleorresina utilizando alcohol etílico al 70% fue de 7,0204%, valor mayor al reportado en la literatura que es de 6%.

Los valores promedio obtenidos del principio activo, piperina, en la oleorresina de pimienta negra son de 54,29% utilizando alcohol etílico al 95% y 58,65% utilizando alcohol etílico al 70%, valores cercanos al reportado en la literatura que está en el rango de 53-57%.

Finalmente, se concluyó que no existe diferencia significativa en los valores obtenidos de porcentaje de piperina en la oleorresina en función del tamaño de lote, tiempo de maceración y solvente utilizado.

En el 2002 García César, Chávez Blanca, Benítez Ingrid y Cerezo Otto ejecutaron el proyecto DIGI: “Alternativa de desarrollo tecnológico para la recuperación de las fracciones extractables y caracterización de los componentes claves curcumina y cariofileno contenidos en el rizoma de la cúrcuma (*Curcuma longa*) para su agroindustrialización en Guatemala”

Concluyeron que el rendimiento general promedio extraído de aceite esencial de rizoma de cúrcuma fresca (*Curcuma longa* L.) a nivel de laboratorio fue de 0,39%, mientras que a nivel de planta piloto fue de 0,29%, lo que refleja una eficiencia de extracción de 0,74% para propósito de un escalamiento preliminar.

Además, el rendimiento general promedio de oleorresina extraída de rizoma de cúrcuma fresca a nivel de planta piloto con tiempos de extracción de 48 horas para la primera maceración estática fue de 11,63% y para la segunda maceración fue de 10,10%.

Se concluyó que no es recomendable la utilización del cariofileno como método de trazabilidad para monitorear la extracción de aceite esencial a nivel de planta piloto, debido a que no se detectó este metabolito secundario por el análisis de cromatografía de gases (GC).

También se establece que es recomendable la utilización de curcuminoides como método de trazabilidad para monitorear la extracción de oleorresina a nivel de planta piloto debido a que se detectó las variaciones en la concentración de estos metabolitos secundarios tanto por métodos

espectrofotométricos, como para detectar la presencia de la mezcla por cromatografía de capa fina (TLC).

Encontraron que las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial extraído a nivel de planta piloto coinciden en sus magnitudes a las referidas en la bibliografía consultada.

Las propiedades fisicoquímicas de la oleorresina extraída a nivel de planta piloto constituyen una referencia preliminar en sus magnitudes en vista de que la bibliografía consultada refiere solo para aceite esencial.

Y, finalmente que es interesante para propósitos de extracción de oleorresina con dos solventes el efecto sinérgico de la mezcla de solventes glicerol/etanol de los resultados obtenidos a nivel de laboratorio, y que refleja una mejor capacidad extractiva que etanol únicamente.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Cardamomo

El cardamomo es una herbácea perenne alta, con raíz subterránea ramificada, perteneciente a la familia de las zingiberáceas.

Es nativo del sur de la India y Ceylan, donde crece en bosques perennes húmedos a altitudes entre 2500 y 5000 pies. La planta tiene tiros con hojas de alturas entre 6 y 8 pies, que soportan en la base uno ó más sistemas flores propios. Las flores son pequeñas, entre 1 y 1 ½ pulgadas, son blancas ó verde pálido y color violeta en el centro. El fruto, es una pequeña cápsula ovoidal de color verde de ½ a ¾ de pulgada de largo, contiene entre 15 y 20 semillas duras angulares de color café-oscuro que son caracterizadas por su fuerte olor aromático y su sabor. El aroma puede provenir de todo el fruto o de las semillas descascaradas.

Los primeros reportes de la medicina Aryuvedica en la India, datan del cuarto siglo antes de Cristo, se menciona al cardamomo como una especie medicinal aromática prescrita para curar complicaciones urinarias y remover grasa. El cardamomo era un artículo de trueque griego durante el cuarto de siglo antes de Cristo. Las clases inferiores eran conocidas como amómon; las superiores, más aromáticas, como Kardamómon.

Para el primer siglo después de Cristo, Roma importó cantidades sustanciales de cardamomo desde la India. Era recomendado por Apicus como un digestivo para quienes caían en exceso gastronómicos era una de las especies que pagan impuesto en Alejandría en el año 176 después de Cristo.

El cardamomo es una planta de cosecha estrictamente tropical, requiere un clima moderadamente caliente con un promedio anual de temperatura entre 72 °F y entre 100 a 160 pulgadas de lluvia.

Un terreno húmedo y rico con una buena proporción de humus y un buen riego y drenaje es recomendado. Hasta 1800, el cardamomo no se daba en plantaciones pero era obtenido de plantas silvestres en el sur de la India y Ceylan. El sistema usual de producción era cortar árboles y maleza en áreas boscosas seleccionadas y permitir que la plántula brotara de nuevo. Cuando las plantas se terminaban, luego de varios años de producción, estas parcelas de tierra eran abandonadas y se buscaban nuevos claros. La propagación hoy en día es por plantación de semilla o secciones de plantaciones de rizomas maduros. Es recomendado para las plantaciones culturales un espaciamiento entre 9 y 12 pies de sombra a la luz.

Las plantas comienzan a producir al cuarto año y continúan produciendo entre 10 y 15 años antes de que requieran reemplazo. Una plantación está en producción durante ocho o nueve meses al año.

Las cápsulas son cosechas cuando están a  $\frac{3}{4}$  de madurez, pero todavía están verdes y firmes. Para evitar recolectar vainas que están muy inmaduras o muy maduras, la misma área se cosecha 5 ó 6 veces al año. Bajo buenas condiciones, la recolección anual por acre sería de 100 y 200 libras de cápsulas secas. Las cápsulas deben ser lavadas para remover la tierra y luego deben ser secadas, ya sea al sol por tres o cuatro días o artificialmente en cuartos calientes durante 18 a 20 horas. Diez libras de cápsulas de cardamomo secas producen cerca de 6 libras de semillas descascaradas luego de que las vainas son removidas. Hay cerca de 50000 semillas descascaradas de cardamomo en una libra.

Cerca del 80% de la producción mundial de cardamomo es producido en la India, la mayoría de los estados de kerala, Mysore y Madras. En años normales, India embarca cerca de 2500 toneladas de cardamomo y consume internamente como mínimo lo mismo que exporta.

Desde hace varios años Guatemala se ha convertido en un importante productor y exportador de cardamomo, además esta especie es poco usada en Centro América. Ceylan, Tanzania, Malasia y Camboya también exportan cardamomo. Sustitutos baratos o “cardamomo falso”, conocido como Nepal, Bengal o Bastardo de importancia local, es producido en Nepal, Sikkim y Tailandia por varias especies de Amomun.

Dos variedades principales de “Elettaria cardamomun” proporcionan el verdadero cardamomo comercial: el Malabar, cultivado

principalmente en India en los estados de Coorg y Mysore, que ha traído racemas que crecen horizontalmente en el terreno; y el Mysore, distinguida por tallo erecto floraciones arqueadas y frutos más largos que los de Malabar. La mayoría de cultivadores en Mandras y Travancore. Cochin en India prefieren el tipo Mysore, debido a que los frutos son menos propensos a daños que la otra especie, además en el mercado de exportación son más deseables las vainas largas.

Alrededor de 1920, semillas de cardamomo del tipo Mysore fueron introducidos en el departamento de Alta Verapaz en el centro de Guatemala; plantaciones subsecuentes han sido desarrolladas en el sureste guatemalteco, en los departamentos de Suchitepéquez, Sololá y Quetzaltenango.

Hoy en día los tipos más importantes de cardamomo en el mercado son:

- Verdes o Greens: Vainas verdes, secadas artificialmente.
- Vainas secadas al sol o Sun dried pods: levemente coloreadas, secadas al sol.
- Semillas o Decorticated: Semillas sin vaina.
- Blanqueado o Bleached: vainas que han sido blanqueadas químicamente con peróxido de hidrógeno.

Los dos primeros tipos representan cerca del 85% del mercado de exportación, las semillas cerca del 10% y el resto las del tipo Bleached.

Actualmente en el mercado ya no se utilizan clasificaciones antiguas de cardamomo, como “largos” o “cortos” o “cortos-largos” o

“redondos”. A granel cardamomo verde es llamada “F.A.Q.” (Fair Average Quality).

Estas clasificaciones son importadas en su mayoría por Suecia, Pakistán, Finlandia, Noruega, Dinamarca, Alemania, Estados Unidos e Inglaterra. Cantidades sustanciales de F.A.Q. eran exportadas a la Unión Soviética por India como un trueque. El mejor limpiado, vainas verdes intactas, libres de tierra y sin daño de insectos y pesando como mínimo 420 gramos por litro, conocido como “Guatemalan Best Quality Greens” o “Indian Bold Mota Greens”, son demandadas en el medio este.

Las semillas de mejor calidad son conocidas como “prime seeds”; las clasificaciones del blanqueado son: “Bleached”, el mangalor “Half Bleached A” y “Half Bleached B”.

En los Estados Unidos la especie es conocida como cardamom y algunas veces como cardamon. En Inglaterra, el medio este y en el lejano este el plural cardamoms es generalmente usado.

El cardamomo es la tercera especie más cara solo superada por el azafrán y la vainilla. Sin embargo en los países Árabes, particularmente en Arabia Saudita, el cardamomo es por mucho el más popular. Café con cardamomo, conocido comúnmente como gahwa, es el símbolo de la hospitalidad Árabe, así como una bebida habitual.

El servir este café con cardamomo es un acto ceremonial. El anfitrión se mueve sirviéndole a cada huésped, de acuerdo a su rango,

desde un cántaro de latón. Es un buen gesto aceptar tres tazas y hacer un gesto audible de aceptación, esto le dice al anfitrión cuanto esta gozando de el y del café. Es dicho que una persona pobre en Arabia venderá antes el arroz que el cardamomo.

### **2.1.1 Familia de las Zingiberáceas:**

Familia de plantas que engloba unos 50 géneros y 1300 especies de distribución tropical, sobre todo en los países de Extremo Oriente. Las flores, complicadas e irregulares, tienen un estambre fértil y un labelo vistoso por lo general, formado por dos o tres estaminoides estériles. Las plantas de esta familia se cultivan mucho en los trópicos por sus flores vistosas y los útiles productos que se extraen de ellas, sobre todo del rizoma; destacan entre tales productos el jengibre, usado como especia culinaria, el arrurruz de la India, un almidón comestible y la cúrcuma, importante ingrediente del curry en polvo.

El orden del que forma parte la familia de las Zingiberáceas contiene 8 familias y más de 1800 especies, abundantes en las regiones tropicales húmedas. Es característico que las plantas de este orden formen rizomas (tallos subterráneos parecidos a raíces); con frecuencia éstos son carnosos y contienen grandes cantidades de almidón u otras sustancias útiles. Las hojas presentan un limbo amplio con nervios paralelos que se extienden en perpendicular a una gruesa costilla central; esta se prolonga en un pecíolo o tallo foliar y en una base abrazadera.

Estas bases o vainas foliares están imbricadas y forman un pseudotallo rígido. Así, el tronco del banano no es un tallo, sino el resultado del solapamiento de la bases de numerosas hojas. En las plantas de este orden, los verdaderos tallos no suelen estar a la vista, pues son subterráneos o están envueltos por las vainas foliares.

Las flores del orden suelen ser vistosas, aunque a veces las brácteas (hojas especializadas) que se abren por debajo de las flores o las inflorescencias son más llamativas que las propias flores. En casi la mitad de las familias del orden, los tres sépalos y los tres pétalos constituyen las piezas florales conspicuas. Hay cinco o, en raras ocasiones seis estambres (o piezas masculinas) fértiles y entre dos y cinco estaminoides petaloideos estériles, en muchos casos vistosos; los sépalos y los pétalos son menos conspicuos.

La familia del banano, con dos géneros y unas 40 especies, suele ocupar los hábitats alterados de los trópicos del Viejo Mundo. Las plantas tienen flores unisexuales, polinizadas en muchos casos por murciélagos. El banano es originario del Sureste asiático, pero se ha convertido en un cultivo importante en todas las regiones tropicales húmedas, donde se usa como fuente de alimento local y como producto de exportación. El banano tiene flores estériles y el fruto se desarrolla sin necesidad de fertilización, y por eso los plátanos carecen de semillas. Las plantas nuevas se obtienen de forma vegetativa, a partir de los chupones que brotan de la base de las plantas viejas.

La familia a la que pertenece el ave del paraíso tiene 3 géneros y 7 especies, propias de la América tropical, el sur de África y Madagascar. A ella pertenece el árbol de los viajeros, una de las pocas especies leñosas del orden. Las plantas llamadas ave del paraíso y papagayos se cultivan por sus inflorescencias, a menudo duraderas, envueltas en grandes brácteas vistosas de forma de barca.

#### **2.1.1.1 Clasificación científica**

La familia de las Zingiberáceas (Zingiberaceae) pertenece al orden Zingiberales. El jengibre usado en la cocina es *Zingiber officinale*; el arrurruz de la India es *Curcuma agustifolia*; y la cúrcuma, *Curcuma longa*. El banano forma parte de la familia de las Musáceas (Musaceae), especie *Musa paradisíaca*. El árbol de los viajeros es la especie *Ravenala madagascariensis*; el ave del paraíso es la especie *Strelitzia reginae*, ambas pertenecientes a la familia Heliconiáceas (Heliconiaceae), al igual que los papagayos, especies del género *Heliconia*. Según ciertos autores estos tres géneros se incluirían también dentro de la familia Musáceas.

### **2.2 Oleorresinas y Aceites esenciales:**

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes).

El aceite esencial dentro de la planta se encuentra confinado en un tejido al cual se le denomina micela.

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos).
- Monoterpenos
- Sesquiterpenos
- Fenilpropanos

En su mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los de ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo a su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- Esencias fluidas: son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- Bálsamos: son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.

- Oleorresinas: son extractos de especias, que se obtienen por tratamiento de la materia prima seca con solventes. Los solventes empleados son eliminados casi completamente por procesos de destilación al vacío, destilación azeotrópica, o ambas. Tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas. Tienen uso en las industrias de alimentos y de medicamentos, sustituyendo las plantas secas o las tinturas. Las oleorresinas contienen aceites esenciales, aceites fijos, colorante y principios activos de las plantas.

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como:

- Naturales: se obtienen directamente de la planta y no sufre modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas.
- Artificiales: se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecida con linalool, o la esencia de anís enriquecida con acetol.
- Sintéticos: como su nombre lo indica son los productos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidas por procesos de síntesis química. Estos son los más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.)

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales se denominan:

- Aceites esenciales monoterpenoides: ricos en monoterpenos como la hierbabuena, albahaca, salvia, etc.
- Aceites esenciales sesquiterpenoides: ricos en sesquiterpenos como la copaiba, pino, junípero, etc.
- Aceites esenciales fenilpropanoides: ricos en fenilpropanos como el clavo, canela, anís, etc.

Aunque esta clasificación es muy general resultará útil para propósitos de estudiar algunos aspectos fitoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos.

### **2.2.1 Composición química de las oleorresinas:**

Las oleorresinas son líquidos naturales extraídos de especias o extractos herbales que contienen compuestos volátiles y no volátiles los cuales caracterizan el sabor, color y aroma de materias primas naturales. Las oleorresinas son exudados compuestos principalmente por constituyentes volátiles y resinosos. Los bálsamos son oleorresinas caracterizadas por su alto contenido en compuestos benzoicos o cinámicos. Las oleorresinas son extractos de naturaleza oleosa, obtenidos de especias o diferentes plantas que proporcionan a los productos color, sabor, según las necesidades del cliente. Son

productos líquido, o casi líquido, formado por resinas disueltas en aceites, y procedente de diversas plantas.

Las oleorresinas se obtienen de especies por medio de una extracción con disolventes orgánicos que después se eliminan por destilación, el producto resultante es un líquido que contiene una mezcla de los compuestos volátiles y no volátiles de la materia prima, aun cuando no se extraen todos los responsables del aroma. Las oleorresinas son muy viscosas y coloreadas y se usan en concentraciones muy bajas, normalmente de 5 a 10 % con respecto a la especie de donde se extraen.

Una de las ventajas de obtener oleorresinas es evitar los inconvenientes de las pérdidas de color del fruto seco, aumentando su poder colorante. Además las oleorresinas muestran una gran estabilidad a altas temperaturas y tienen características de sabor más semejantes a la especia seca natural que el correspondiente aceite esencial.

Se componen principalmente de aceite esencial, resinas orgánicas solubles y otros materiales relacionados con la especie original como ácidos grasos no volátiles.

La cantidad de aceite graso presente depende de la materia prima así como del tipo de solvente utilizado. Las semillas de especies producen más aceite graso que las demás partes de la planta. Los compuestos no volátiles, como los que contribuyen al olor fuerte y

picante de la pimienta negra, son iguales de importantes que los aceites esenciales volátiles, si lo que se desea es un sabor completo a pimienta negra. Los compuestos deben de estar en la misma proporción en la que están en la especie original.

Las resinas y los aceites grasos actúan como conectores naturales de los compuestos más volátiles del aceite esencial.

Las oleorresinas están formadas por los siguientes compuestos:

- 1) Esteres: principalmente de ácido benzoico, acético, salicílico y cinámico.
- 2) Alcoholes: linalol, geraniol, citronelol, terpinol mentol, borneol.
- 3) Aldehídos: citral, citronela, bezaldehído, cinamaldehído, aldehído cumínico, vainilla.
- 4) Ácidos: benzoico, cinámico, mirístico, isovalérico todos en estado libre.
- 5) Fenoles: eugenol, timol, carvacrol.
- 6) Cetonas: carvona, mentona, pulegona, irona, fenchona, tujona, alcanfor, metilnonil cetona, metil heptenona.
- 7) Éteres: cíñelo, éter interno (eucaliptol), acetol, safrol.
- 8) Lactosas: cumarina.
- 9) Terpenos: canfeno, pineno, limoneno, felandreno, cedreno.
- 10) Hidrocarburos: cimeno, estireno (feniletileno).

### **2.2.2 Función de los metabolitos secundarios en las plantas:**

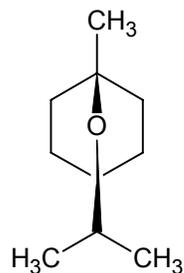
Hasta la presente fecha, no hay una teoría universalmente aceptada con respecto a la formación de los aceites esenciales y el papel que juegan en la vida de las plantas solo se cuenta con numerosas hipótesis que se describen a continuación:

- a) Los aceites esenciales penetran en los espacios intercelulares disminuyendo la transpiración de la planta.
- b) Incrementan la velocidad de circulación de sustancias nutritivas en la planta, la cual regula su metabolismo.
- c) Son compuestos aromáticos que sirven para proteger contra los insectos y el crecimiento de hongos a las plantas.
- d) El aroma de las flores atrae a los insectos, promoviendo de esta manera su reproducción.
- e) Los aceites esenciales degradan a los glucósidos, en otras palabras actúan como agentes enzimáticos.
- f) Pueden proporcionar un medio de preservación a las plantas.

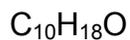
## 2.2.3 Metabolitos secundarios presentes en el cardamomo

### 2.2.3.1 1,8 Cineol

Figura 1. Estructura molecular 1,8 Cineol.



Fórmula química:



Nombre IUPAC:

1, 3, 3 - trimetil – 2 - oxabicyclo [2.2.2] octano

Propiedades químicas:

Peso fórmula = 154.24932 g / mol

Composición= C (77.87%) H (11.76%) O (10.37%)

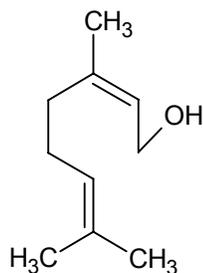
Índice de refracción= 1.461 ± 0.02

Tensión superficial = 32.4 ± 3.0 dinas/cm

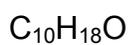
Densidad = 0.922 ± 0.06 g/cm<sup>3</sup>

### 2.2.3.2 Geraniol

Figura 2. Estructura molecular del Geraniol



Fórmula química:



Nombre IUPAC:

(2Z) – 3, 7- dimetilocta – 2, 6- dien – 1 – ol

Propiedades químicas:

Peso fórmula = 154.24932 g/mol

Composición = C (77.87%) H (11.76%) O (10.37%)

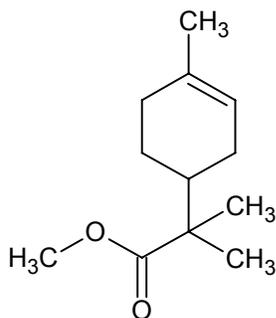
Índice de refracción= 1.470 ± 0.02

Tensión superficial = 29.1 ± 3.0 dinas/cm

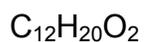
Densidad = 0.866 ± 0.06 g/cm<sup>3</sup>

### 2.2.3.3 Acetato de $\alpha$ – terpinilo

Figura 3. Estructura molecular del Acetato de  $\alpha$  – terpinilo.



Fórmula molecular:



Nombre IUPAC:

2,2 dimetil (4-metilciclohex-3-en-1-il) propanoato

Propiedades químicas:

Peso fórmula = 196.286 g/mol

Composición = C (73.43%) H (10.27%) O (16.30%)

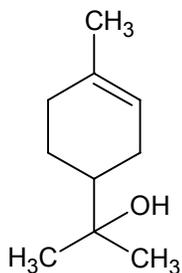
Índice de refracción=  $1.466 \pm 0.02$

Tensión superficial =  $31.8 \pm 3.0$  dinas/cm

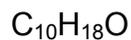
Densidad =  $0.962 \pm 0.06$  g/cm<sup>3</sup>

### 2.2.3.4 $\alpha$ - Terpeneol

Figura 4. Estructura molecular del  $\alpha$ -Terpeneol



Fórmula química:



Nombre IUPAC:

2 - (4 - metilciclohex-3-en-1-il) 2 propanol

Propiedades químicas:

Peso fórmula = 154.24932 g/mol

Composición = C (77.87%) H (11.76%) O (10.37%)

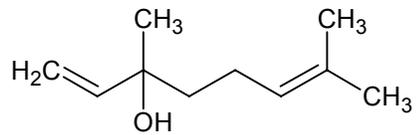
Índice de refracción =  $1.482 \pm 0.02$

Tensión superficial =  $33.2 \pm 3.0$  dinas/cm

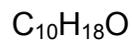
Densidad =  $0.934 \pm 0.06$  g/cm<sup>3</sup>

### 2.2.3.5 Linalool

Figura 5. Estructura molecular del Linalool.



Fórmula química:



Nombre IUPAC:

3, 7 dimetil 1, 6 dieno 3 octanol

Propiedades químicas:

Peso fórmula = 154.24932 g/mol

Composición = C (77.87%) H (11.76%) O (10.37%)

Índice de refracción =  $1.463 \pm 0.02$

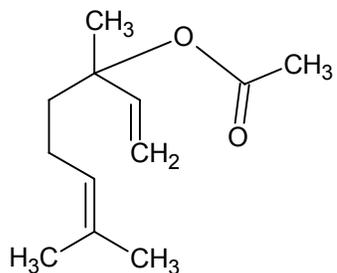
Tensión superficial =  $28.2 \pm 3.0$  dinas/cm

Densidad =  $0.858 \pm 0.06$  g/cm<sup>3</sup>

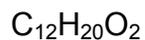
Punto de ebullición = 198.6 °C

### 2.2.3.6 Acetato de Linalilo

Figura 6. Estructura molecular del Acetato de Linalilo.



Fórmula química:



Nombre IUPAC:

1,5-dimetil-1-vinilhex-4-en-1-il acetato

Propiedades químicas:

Peso fórmula = 196.286 g/mol

Composición = C (73.43%) H (10.27%) O (16.30%)

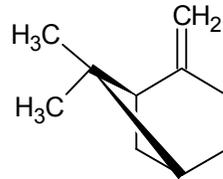
Índice de refracción =  $1.452 \pm 0.02$

Tensión superficial =  $27.7 \pm 3.0$  dina/cm

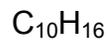
Densidad =  $0.897 \pm 0.06$  g/cm<sup>3</sup>

### 2.2.3.7 $\beta$ – Pineno

Figura 7. Estructura molecular del  $\beta$  – Pineno.



Fórmula química:



Nombre IUPAC:

6,6 – dimetil – 2 – metilenebicyclo [3.1.1] heptano

Propiedades químicas:

Peso fórmula = 136.23404 g/mol

Composición = C (88.16%) H (11.84%)

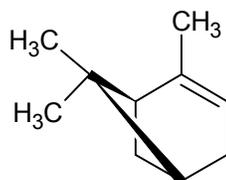
Índice de refracción = 1.483  $\pm$  0.03

Tensión superficial = 27.0  $\pm$  5.0 dinas/cm

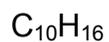
Densidad = 0.88  $\pm$  0.1 g/cm<sup>3</sup>

### 2.2.3.8 $\alpha$ – Pineno

Figura 8. Estructura molecular del  $\alpha$  – Pineno



Fórmula química:



Nombre IUPAC:

2, 6, 6 – trimetilbicyclo [3.1.1] hept – 2 – en

Propiedades químicas:

Peso fórmula = 136.23404

Composición = C (88.16%) H (11.84%)

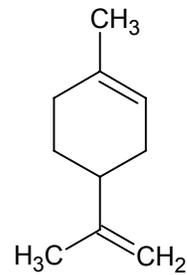
Índice de refracción =  $1.479 \pm 0.02$

Tensión superficial =  $25.3 \pm 3.0$  dina/cm

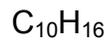
Densidad =  $0.879 \pm 0.06$  g/cm<sup>3</sup>

### 2.2.3.9 Limoneno

Figura 9. Estructura molecular del Limoneno.



Fórmula química:



Nombre IUPAC:

4-isopropenil-1-metilciclohexeno

Propiedades químicas:

Peso fórmula = 136.23404 g/mol

Composición = C (88.16%) H (11.84%)

Índice de refracción =  $1.467 \pm 0.02$

Tensión superficial =  $25.8 \pm 3.0$  dinas/cm

Densidad =  $0.834 \pm 0.06$  g/cm<sup>3</sup>

## **2.3 Procesos de extracción sólido-líquido**

### **2.3.1 Proceso de lixiviación**

#### **2.3.1.1 Definición**

Lixiviación es la eliminación de una fracción soluble, en forma de solución, a partir de una fase sólida permeable e insoluble a la cual está asociada. La separación implica, normalmente, la disolución selectiva, con difusión o sin ella, pero en el caso extremo del lavado simple, consiste sólo en el desplazamiento (con alguna mezcla) de un líquido intersticial por otro, con el que es miscible. El constituyente soluble puede ser sólido o líquido y estar incorporado, combinado químicamente o adsorbido, o bien mantenido mecánicamente, en la estructura porosa del material insoluble. El sólido insoluble puede ser másico y poroso; con mayor frecuencia es de partículas y estas últimas pueden ser poros abiertos, de celdas, con paredes celulares selectivamente permeables o con superficies activadas.

Es habitual el excluir del estudio de la lixiviación la elusión de solutos adsorbidos superficialmente. Este proceso será tratado, en lugar de ello, como un caso especial de la operación inversa, la adsorción. Asimismo, se excluye el lavado de tortas de filtros, ya sea *in situ* o mediante la formación de una nueva suspensión y la refiltración. Debido a su gran variedad de aplicaciones y su importancia para diferentes industrias antiguas, la lixiviación tiene otros nombres. Entre los que se encuentran en la ingeniería química están la extracción, la extracción de

sólido-líquido, la percolación, la infusión, el lavado y la decantación por sedimentación. La corriente de sólidos lixiviados y el líquido que la acompaña se denominan lodos; en hidrometalurgia también se conoce como pulpa. El contenido en sólidos de las corrientes es denominado, en algunas ocasiones, como *marc* (en particular en los procesos de separación de aceites). La corriente de líquido contenido en la solución lixiviada es el clarificado. Como abandonada el proceso de lixiviación, tiene otros nombre opcionales: extracto, solución, lixiviado o miscelado.

El mecanismo de la lixiviación puede incluir una solución física simple o la disolución facilitada por una reacción química. La velocidad de transporte de disolvente en la masa que se va a lixiviar o de la fracción soluble en el disolvente o de la solución de extracto del material insoluble, o alguna combinación de esas velocidades, pueden ser importantes. Es posible que exista una resistencia externa. Como el que una posible que exista una resistencia externa. Como el que una reacción química puede afectar a la velocidad de la lixiviación.

Ya que las corrientes de lodo y clarificado no son fases inmiscibles, sino corrientes basadas en el mismo disolvente, el concepto de equilibrio en lixiviación no es el mismo que el que se aplica en otras separaciones de transferencia de materia. Si el soluto no se adsorbe en el sólido inerte sólo se logra el equilibrio verdadero cuando todo el soluto se disuelve y se distribuye de forma uniforme en todo el disolvente, tanto en la corriente de lodos como la de clarificación (o cuando el disolvente se satura uniformemente con el soluto, situación que nunca se presenta en un equipo de extracción diseñado de forma adecuada). La

interpretación práctica del equilibrio de lixiviación es el estado en que las corrientes de lodos y clarificado tienen la misma composición. En un diagrama x-y, la línea de equilibrio es una recta que pasa a través del origen con una pendiente de valor unidad. Es costumbre calcular el número de etapas ideales (de equilibrio) requeridas para una lixiviación determinada y ajustar dicho número por medio de la aplicación de un factor de eficacia de etapa, aunque si se conocen, pueden aplicarse eficacias locales etapa a etapa.

Sin embargo, y por lo general, no resulta sencillo establecer una eficiencia de etapa o un valor de eficacia global ni un índice de la velocidad de lixiviación (es decir, un coeficiente general) sin probar los modelos a pequeña escala de los aparatos. De hecho, los resultados de dichas pruebas tienen que escalarse en forma empírica, sin una evaluación explícita de los índices de velocidad o de cuasi-equilibrio.

Los equipos de lixiviación se distinguen por el ciclo de operación (intermitente, continuo o intermitente de cargas múltiples), por la dirección de las diferentes corrientes (concurrente, a contracorriente o flujo híbrido), por el número de etapas (una única etapa, etapas múltiples o etapa diferencial) y por el método de contacto (percolación por pulverización, percolación por inmersión o dispersión de sólidos). En general, los anteriores descriptores catalogan cuatro categorías y deben consignarse para el establecimiento completo de un sistema de lixiviación (por ejemplo, el extractor tipo Bollman es un percolador continuo, con etapas múltiples con pulverización y flujo híbrido).

Sea cual sea el mecanismo y el método de operación, resulta evidente que el proceso de la lixiviación estará favorecido por el aumento de la superficie por unidad de volumen de sólidos que se deben lixiviar y por la disminución de las distancias, en sentido radial, que se deben atravesar al interior de los sólidos, y la disminución del tamaño de las partículas contribuye a ambas cosas. Por otra parte, los sólidos finos provocan una velocidad lenta de percolación, dificultan la separación de sólidos y producen un sólido de mala calidad. Estas características establecen las bases para un tamaño óptimo de partículas.

Es a través de la clasificación mediante el tipo de contacto la que proporciona las dos categorías principales en las que se divide el equipo de lixiviación:

1. Los que realizan la lixiviación por percolación
2. Aquellos en que las partículas sólidas se dispersan en un líquido y, posteriormente, se separan de él.

En cada una de esas clases existen unidades continuas y por cargas. Los materiales que se desintegran durante la lixiviación se tratan en los equipos de la segunda clase.

### **2.3.1.2 Aplicaciones**

Muchas sustancias biológicas, así como compuestos inorgánicos y orgánicos, se encuentran como mezclas de diferentes componentes en un sólido. Para separar el soluto deseado o eliminar un soluto indeseable de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase

líquida. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos se difunden desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes originales del sólido. Este proceso se llama lixiviación líquido-sólido o simplemente, lixiviación. La operación unitaria se puede considerar como una extracción, aunque el término también se refiere a la extracción líquido-líquido. Cuando la lixiviación tiene por objeto eliminar con agua un componente indeseable de un sólido, el proceso recibe el nombre de lavado.

En la industria de procesos biológicos y alimenticios, muchos productos se separan de su estructura natural original por medio de una lixiviación líquido-sólido. Un proceso importante es la lixiviación de azúcar de las remolachas con agua caliente. En la producción de aceites vegetales, se emplean disolventes orgánicos como hexano, acetona y éter, para extraer aceite de cacahuete, soya, semillas de lino, semillas de ricino, semillas de girasol, semillas de algodón, harina, pasta de palo e hígado de hipogloso. En la industria farmacéutica se obtiene una gran diversidad de productos por lixiviación de raíces, hojas y tallos de plantas. En la producción de café “instantáneo” soluble, el café tostado y molido se somete a una lixiviación con agua pura. El té soluble se fabrica por lixiviación de hojas de té con agua. El tanino se extrae de las cortezas de árboles por lixiviación con agua.

Los procesos de lixiviación son de uso común en la industria metalúrgica. Los metales útiles suelen encontrarse en mezclas con grandes cantidades de constituyentes indeseables, y la lixiviación permite extraerlos en forma de sales solubles. Las sales de cobre se disuelven o

se lixivian de los minerales molidos que contienen otras sustancias por medio de soluciones de ácido sulfúrico o amoniacaes. Las sales de cobalto y níquel se lixivian de sus minerales con mezclas de ácido sulfúrico-amoniaco-oxígeno. La lixiviación de oro a partir de sus minerales, se basa en el uso de una solución acuosa de cianuro de sodio. El hidróxido de sodio se lixivia de una suspensión de carbonato de calcio e hidróxido de sodio, que se prepara haciendo reaccionar carbonato de sodio con hidróxido de calcio.

### **2.3.2 Preparación de los sólidos para la lixiviación**

#### **2.3.2.1 Materiales inorgánicos y orgánicos:**

El método de preparación del sólido depende en alto grado de la proporción del constituyente soluble presente, de su distribución en el material sólido original, de la naturaleza del sólido, que puede estar constituido por células vegetales o el material soluble estar totalmente rodeado por una matriz de materia insoluble, y del tamaño de partícula original.

Si la materia soluble está rodeada de una matriz de materia insoluble, el disolvente se debe difundir hacia el interior para ponerse en contacto y disolver el material soluble, y después difundirse hacia afuera. Esto ocurre en muchos procesos hidrometalúrgicos, en los que se lixivian sales metálicas de minerales metálicos. En estos casos se procede a una trituración y molienda previa de los materiales para aumentar la velocidad de lixiviación, pues de esta manera las porciones

solubles quedan más accesibles a la acción del disolvente. Si la sustancia soluble está en solución sólida o ampliamente distribuida en la totalidad del sólido, la acción de lixiviación del disolvente forma canales pequeños. Esto hace que el paso de disolvente adicional resulte más fácil, por lo cual se puede prescindir de la molienda a tamaños muy pequeños. La molienda de las partículas es innecesaria cuando el material soluble está disuelto en una solución adherida al sólido. Entonces se puede emplear un simple lavado similar al de precipitados químicos.

Los materiales biológicos tienen estructura celular y los constituyentes solubles suelen estar dentro de las células. En ocasiones, la velocidad de lixiviación es bastante baja, debido a que las paredes celulares constituyen una resistencia adicional a la difusión. No obstante, es poco práctico moler los materiales biológicos a tamaño suficientemente pequeño para exponer el contenido de las células individuales. Las remolachas azúcar se cortan en rebanadas delgadas cuneiformes para que durante la lixiviación sea más pequeña la distancia necesaria para que el disolvente acuoso se difunda y llegue a las células individuales. Las células de las paredes celulares semipermeables, mientras los componentes albuminosos y coloidales indeseables no pueden pasar a través de ellas.

Para lixiviar productos farmacéuticos de hojas, tallos y raíces, el secado del material antes de la extracción ayuda a romper las paredes celulares. De esta manera, el disolvente ataca directamente al soluto. Las paredes celulares de las semillas de soya y de otros vegetales sufren

bastantes rupturas cuando la materia se reduce a un tamaño de aproximadamente 0,1 mm a 0,5, por medio de un proceso de laminación para formar pequeñas escamas. Las células son de tamaño más pequeño, pero sus paredes se rompen y el aceite vegetal queda más accesible a la acción del disolvente.

### **2.3.2.2 Velocidad de lixiviación:**

En la lixiviación de materiales solubles del interior de una partícula por acción de un disolvente, el proceso general consiste en los siguientes pasos: el disolvente se transfiere del volumen de solución a la superficie del sólido. Después, dicho disolvente penetra o se difunde en el sólido. El soluto se disuelve en el disolvente. Entonces, el soluto se difunde a través de la mezcla de sólido y disolvente hasta la superficie de la partícula. Finalmente, el soluto se transfiere a la solución general. Los numerosos fenómenos que se presentan en este proceso hacen poco práctico y casi imposible aplicar una teoría definida a la acción de lixiviación.

En general, la velocidad de transferencia del disolvente de la solución general hasta la superficie del sólido es bastante rápida, y la velocidad hacia el interior del sólido puede ser rápida o lenta. Sin embargo, en la mayoría de los casos éstas no son las etapas que limitan la velocidad del proceso total en contacto con el disolvente; aun así, la disolución del soluto en el disolvente en el interior del sólido puede ser un simple proceso físico de disolución o una verdadera reacción química que libera al soluto para la disolución. El conocimiento del proceso de

disolución es bastante limitado y el mecanismo puede ser diferente en cada caso (K1).

La velocidad de difusión del soluto a través del sólido, y la del disolvente hasta la superficie del sólido suelen ser la resistencia que controla el proceso global de lixiviación y dependen de diversos factores. Si el sólido está constituido por una estructura inerte porosa, con el soluto y el disolvente localizados en los poros del sólido, la difusión a través del sólido poroso se puede describir como una difusividad efectiva. Se requieren entonces, la fracción de espacios huecos y la sinuosidad, según se estudió en la sección 6.5C para la difusión en sólidos porosos.

En sustancias biológicas o naturales hay complejidades adicionales debido a la presencia de células. En la lixiviación de rebanadas delgadas de remolacha de azúcar el proceso mecánico previo rompe, más o menos, una quinta parte de las células. Entonces la lixiviación del azúcar es similar a un proceso de lavado (Y1). En las células restantes, el azúcar se difunde al exterior a través de las paredes celulares. El resultado neto de ambos procesos de transferencia no sigue una ley de difusión simple con difusividad efectiva constante.

En el caso de la soya, los granos enteros no se pueden lixiviar con eficacia. La trituración con rodillos para obtener escamas pequeñas de los granos rompe las paredes celulares, por lo que el disolvente penetra con mayor facilidad por acción capilar. La velocidad de difusión del soluto de aceite de soya desde las escamas de soya, impide una

interpretación simple. Cierta método ( $O_2$ ) para diseñar extractores a gran escala se basa en experimentos de laboratorio con escamas.

La resistencia a la transferencia de masa del soluto desde la superficie sólida hasta el disolvente general, suele ser bastante pequeña en comparación con la resistencia a la difusión dentro del propol externo no produce efectos apreciables sobre la velocidad de extracción ( $O_3$ , Y1).

### **2.3.3 Métodos de extracción de oleorresinas:**

Antes de empezar un proceso extractivo en una escala piloto o industrial, se debe definir la selectividad del solvente a ser usado en el proceso. Dependiendo del propósito al que se destine, se puede obtener un extracto cuya composición químicos de la planta, o un extracto que contiene solamente constituyentes químicos con una determinada característica. En el primer caso, normalmente se usa un solvente de naturaleza general, de alta polaridad, como el alcohol etílico o el metanol. En el segundo caso se emplea un solvente selectivo, de menor polaridad, como el hexano que sólo extrae de la planta las grasas vegetales y otros componentes apolares. La selección del solvente de extracción, así como la permanencia en la composición química de la materia vegetal, representan dos aspectos de suma importancia en cualquier proceso de fabricación, bien sea de productos fitoterapéuticos o bien sea de sustancias naturales aisladas.

La materia prima vegetal en la industria de fitofármacos está representada, en la mayoría de las ocasiones, por la materia prima seca.

De esta manera, cuando la materia prima se pone en contacto con el solvente se inicia un proceso opuesto al proceso de secado que tiende a reconstituir el estado original de la célula. Inicialmente el solvente penetra en la célula vegetal y expulsa el aire contenido en el citoplasma, dándose inicio de esta forma el proceso extractivo. La penetración del solvente en la célula induce un momento bipolar en las moléculas de los compuestos que van a ser extraídos. Es de esta manera como las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del solvente. La capacidad de asociación puede expresarse en términos de la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ). Cuanto más polar sea un solvente mayor será su respectiva constante dieléctrica. Compuestos ionizables y/o altamente polares se disuelven en solventes de elevada constante dieléctrica; al igual que compuestos apolares se disolverán en solventes de baja constante dieléctrica.

La salida del complejo “materia prima-solvente”, en el caso de células enteras, depende del equilibrio entre la concentración de este complejo en el interior y en el exterior de la célula. Los procesos extractivos interfieren en la constante de equilibrio desplazándola hacia el exterior de la célula.

## **2.4 Definición de Variables**

### **2.4.1 Variables del proceso extractivo:**

Las variables que interfieren en el proceso de extracción, independiente de la escala de producción o del tipo de producto final,

son: el estado de división de la materia prima, la agitación, la temperatura, el pH, la naturaleza del solvente y el tiempo de extracción.

La capacidad de una mezcla de solventes de inducir un momento bipolar puede ser calculada. La constante dieléctrica del sistema depende de la constante de cada uno de ellos y de su respectivo porcentaje en la mezcla. Siendo así se puede calcular la constante dieléctrica del sistema a través de la fórmula:

$$\epsilon_{\text{del sistema}} = \frac{\epsilon_{Ax\%A} + \epsilon_{Bx\%B} + \dots + \epsilon_{mx\%n}}{100} \quad \text{[Ec. No. 1]}$$

Los solventes más usados en las industrias de productos fitoterapéuticos son el agua, el alcohol etílico, la glicerina, el propilenglicol y mezclas de estos líquidos.

En la industria de aislamiento de productos naturales puros, los solventes más utilizados son los hidrocarburos, los hidrocarburos clorados, los alcoholes, los ésteres, los éteres, las cetonas y los aceites.

En el proceso de escogencia de un solvente determinado es necesario considerar aspectos relacionados con la seguridad y los riesgos en cuanto a una posible contaminación ambiental. Sin embargo, el aspecto más importante a ser considerado es el grado de toxicidad del solvente. En el supuesto caso en que parte del solvente permanezca en el producto acabado, el solvente debe ser aprobado por el órgano nacional responsable del registro del producto fitoterapéutico. Por esta

razón, los productos fitoterapéuticos son elaborados, principalmente, con mezclas hidro-alcohólicas.

En el caso de aislamiento de productos naturales puros, pueden usarse otros solventes orgánicos, incluso mezclas azeotrópicas. Estas mezclas mantienen la misma concentración relativa de sus componentes cuando alcanzan su punto de ebullición y el punto de ebullición de la mezcla es inferior al del componente cuyo punto de ebullición es más alto, por lo cual pueden ser usados en procesos extractivos, incluso del tipo Soxhlet, ya que no se presenta la separación de los componentes de la mezcla.

El agua utilizada en los proceso extractivos no necesita ser desmineralizada o destilada, puesto que la materia prima vegetal contiene sustancias minerales en diferentes concentraciones. Por consiguiente, es suficiente que el agua pase por las pruebas que la clasifican apta para el consumo humano, es decir que sea potable, y será utilizada siempre y cuando no posea dureza excesiva y tenga pureza microbiológica compatible.

Durante el proceso de extracción ocurren dos fenómenos paralelos: la lixiviación de las sustancias solubles de células rotas y la disolución y difusión de las sustancias solubles de células intactas. Mientras la lixiviación de las sustancias de las células rotas es rápida, la difusión de las sustancias a través de la membrana de células intactas es lenta y requiere etapas de humedecimiento y ablandamiento para aumentar la permeabilidad de la membrana. Este proceso comprende

tres etapas: la penetración del solvente en la célula, la disolución de las sustancias extraíbles y la difusión de la solución fuera de la célula vegetal.

#### **2.4.1.1 Estado de división de la materia prima**

Teóricamente, la eficiencia del proceso extractivo sería mayor cuanto menor sea el tamaño de las partículas, ya que así se obtiene una mayor área de contacto con el solvente. En la práctica, la presencia de partículas muy finas dificulta los procesos de percolación, pues se presenta compactación y formación de falsas vías, y los procesos de maceración, en donde las partículas pasan al extracto, haciendo necesaria la realización de la etapa adicional de filtración, la cual no siempre es de fácil ejecución.

Por otro lado, la penetración del solvente en fragmentos mayores de la materia prima es lenta y la salida de las sustancias extraíbles es difícil. Por esta razón, se recomienda la utilización de polvos moderadamente gruesos para la gran mayoría de las materias primas.

#### **2.4.1.2 Agitación**

La eficiencia del proceso extractivo es función del equilibrio de saturación del solvente. La agitación hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en las sustancias extraíbles, entren en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado. El movimiento del líquido, con ayuda de bombas para la recirculación del

solvente o agitadores mecánicos, desplaza el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente, aumentando la eficiencia del proceso.

#### **2.4.1.3 Temperatura**

La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de la temperatura; de la misma manera que la agitación, la temperatura contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo, muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos, total o parcialmente, a temperaturas elevadas. El aumento de la temperatura también puede causar la pérdida de sustancias volátiles, como por ejemplo, los componentes de aceites esenciales.

#### **2.4.1.4 pH**

El pH influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales. La obtención de alcaloides constituye un ejemplo clásico de la influencia del pH en el proceso de extracción. La extracción de alcaloides con solventes orgánicos de baja polaridad exige un pre-tratamiento con soluciones alcalinas, buscando con esto liberar los alcaloides de sus sales y, así, volverlos solubles en el solvente orgánico. En el caso de extracción de alcaloides con soluciones acuosas es necesario un pH ácido, buscando con esto la conversión de los alcaloides en sus respectivas sales, solubles en agua.

#### **2.4.1.5 Naturaleza del solvente**

Dependiendo de la finalidad deseada, el solvente utilizado extrae, selectivamente o no, cierta clase de compuestos. Entre los solventes generales, los más utilizados son los alcoholes alifáticos de hasta 3 carbonos o mezclas de éstos con el agua. Estos solventes logran extraer la gran mayoría de las sustancias naturales de interés como los alcaloides, los flavonoides, los glicósidos cardiotónicos y los terpenos. Debido a su poder extractivo, estos solventes son los indicados para los casos en que los constituyentes activos de las plantas no son bien conocidos, siendo necesario agotar completamente la materia prima. El alcohol etílico y sus mezclas con agua es el solvente por excelencia para la obtención de extractos y tinturas. Cuando no existen estudios específicos, se recomienda utilizar la mezcla de alcohol: agua 7:3 ó 8:2 para la extracción de las partes leñosas de la planta, raíces y semillas, mientras la proporción de 1:1 es recomendada para extraer las hojas o las partes aéreas verdes, ya que en esta concentración se evita la extracción de la clorofila y de las sustancias polimerizadas o resinoides que, generalmente, no presentan actividad terapéutica, pero complican las etapas siguientes de purificación, por el hecho de presentar precipitados viscosos.

#### **2.4.1.6 Tiempo de Extracción**

El tiempo de extracción se determina experimentalmente en función del solvente y del equipo seleccionado. Esta variable es resultante de todos los factores mencionados previamente. El tiempo de

extracción debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés, aunque se debe prestar cuidado para que no sea excesivo. Prolongar el tiempo de extracción más allá del estrictamente necesario, no influye en el proceso negativamente, pero sí influye en los costos del consumo de energía y de mano de obra no necesaria, lo que acarrea un encarecimiento del proceso industrial.

#### **2.4.2 Procesos de extracción**

Los procesos de extracción varían en función de la escala de producción, de la naturaleza y calidad de la materia prima y de la naturaleza del solvente. Los procesos de extracción pueden ser divididos en dos grupos:

- Procesos que dan como resultado un equilibrio de la concentración entre el soluto y el residuo.
- Procesos que agotan completamente la materia prima.

Los procesos que dan como resultado un equilibrio de la concentración son la maceración y la maceración dinámica. Los procesos que agotan completamente la materia prima son: la percolación, la repercolación y la extracción en contra corriente.

Los procesos de maceración y de percolación están descritos en la mayoría de las farmacopeas. La primera edición de la Farmacopea Brasileña describe cuatro procesos generales de preparación de extractos. Todas las farmacopeas especifican el solvente, la relación

entre la materia prima y el solvente, y la técnica a ser utilizada. Las descripciones precisas de la técnica eran la garantía de la calidad del extracto en una época en que pocos constituyentes activos de las materias primas eran conocidos y las técnicas analíticas eran menos sofisticadas. Modernamente, los extractos se caracterizan por el contenido de sus constituyentes activos, determinación del residuo seco y del contenido alcohólico, no detallándose el proceso de su obtención.

#### **2.4.2.1 Maceración**

El proceso de maceración consiste en poner en contacto la materia prima y el solvente, durante cierto tiempo. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la materia prima y el solvente, y depende de factores que están unidos a la materia prima, como por ejemplo, su naturaleza, el tamaño de partícula, su contenido de humedad y cantidad y factores que están relacionados con el solvente, como por ejemplo, la selectividad y la cantidad. El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación materia prima/solvente aumenta. El hinchamiento de la materia prima es factor importante, porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del solvente. La velocidad con que se obtiene el equilibrio está en función del tamaño de partícula de la materia prima molida, así como, del grado de hinchamiento de las células y de las propiedades del solvente, como por ejemplo, su viscosidad y polaridad.

El proceso clásico de maceración consiste en dejar la materia prima en contacto con el solvente durante varios días, con agitación

ocasional. Este proceso, también conocido como maceración simple o estática, es sumamente lento. Para abreviar el tiempo de operación, la materia prima y el solvente deben mantenerse en movimiento constante. Este procedimiento es conocido como maceración dinámica. Tanto la maceración simple como la maceración dinámica pueden ser ejecutadas a una temperatura ambiente o a temperaturas más elevadas. En este último caso el procedimiento es conocido como digestión.

Las grandes desventajas del proceso de maceración son la lentitud del proceso y el hecho de no ser posible alcanzar la extracción completa de la materia prima. Para disminuir las pérdidas del extracto en el residuo de la extracción, la operación de maceración (estática o dinámica) puede repetirse dos o tres veces. Después de haber escurrido el solvente de la extracción anterior. Este procedimiento disminuye la cantidad de extracto retenido en el residuo, pero aumenta la cantidad de solvente a ser recuperado. Este inconveniente puede superarse, adoptándose el esquema de procesamiento en serie, conforme es descrito para la percolación.

La presencia o ausencia de turbulencia en un recipiente agitado mediante un impulsor se puede correlacionar con un número de Reynolds del impulsor, que se define como sigue:

$$N_{Re} = \frac{D_a^2 N \rho}{\mu} \quad \text{[Ec. No. 2]}$$

Donde  $N$  = velocidad de rotación, r/s;  $D_a$  = diámetro del agitador, m (ft);  $\rho$  = densidad del fluido,  $\text{kg/m}^3$  ( $\text{lb/ft}^3$ ); y  $\mu$  = viscosidad, Pa·s [ $\text{lb}/(\text{ft}\cdot\text{s})$ ]. El flujo en el tanque es turbulento cuando  $N_{Re}$  es mayor de 10000. Así pues, la viscosidad, por sí sola, no constituye una indicación válida del tipo de flujo que se puede esperar. Entre números de Reynolds de 10000 y, aproximadamente, 10, en el agitador y laminar en las partes más alejadas del recipiente cuando el número de Reynolds es menor a 10, el flujo sólo es laminar.

No sólo se relaciona con el número de Reynolds del impulsor este tipo de flujo, sino también algunas características de rendimiento del proceso, como el tiempo de mezclado, la capacidad de bombeo del agitador, el consumo de energía del impulsor y los coeficientes de transferencia de calor y masa, que se pueden correlacionar con ese grupo adimensional.

Durante el movimiento del fluido en un recipiente se producen varios fenómenos que pueden ser utilizados para mejorar el rendimiento global del proceso.

1. Se desarrollan esfuerzos cortantes en un fluido cuando una capa de fluido se desplaza con mayor o menor rapidez que otra capa adyacente o una superficie sólida. En flujo laminar, el esfuerzo (la tensión) es igual al producto de la viscosidad del fluido y el gradiente de velocidad o esfuerzo cortante. En condiciones de flujo laminar. Las fuerzas cortantes son mayores que las de inercia en el fluido. Con flujo turbulento,

el esfuerzo cortante también se produce como consecuencia de la formación de turbulencias (de remolinos) aleatorias y transitorias, incluyendo los remolinos de gran tamaño, que se descomponen en pequeñas turbulencias o fluctuaciones. El tamaño de los grandes remolinos depende del tamaño del recipiente. Por otra parte, los pequeños remolinos, que disipan energía principalmente a través del rozamiento viscoso, son casi independientes del tamaño del agitador y del tanque. El esfuerzo cortante en el fluido es mucho mayor cerca del impulsor que junto a la pared del tanque. La diferencia es más acentuada en los tanques de mayor tamaño que en los pequeños.

2. Se desarrollan fuerzas de inercia cuando un fluido cambia de dirección o de velocidad. Con flujo turbulento, las fuerzas de inercia son mayores que las de viscosidad. El fluido en movimiento tiende a seguir desplazándose, hasta que se encuentra con una superficie sólida u otro fluido que se mueva en una dirección diferente. Se desarrollan tensiones durante la transferencia de cantidad de movimiento que tiene lugar. Las fuerzas que actúan sobre las palas de los impulsores fluctúan de una manera aleatoria, en relación con la escala y la intensidad de la turbulencia en el impulsor.
3. El área interfacial entre gases y líquidos, líquidos inmiscibles y sólidos y líquidos, se pueden ampliar o reducir mediante esas

fuerzas de viscosidad y de inercia cuando interactúan con fuerzas interfaciales, como la tensión superficial.

4. Las diferencias de concentración y de temperatura se reducen mediante un flujo másico o circulación volumétrica dentro del recipiente. Las regiones de fluido de diferente composición o temperatura se reducen en espesor mediante un movimiento másico, en el que existen gradientes de velocidad. Este proceso se denomina difusión másica o de Taylor. La difusión turbulenta y molecular reducen la diferencia entre estas regiones. Con flujo laminar, la difusión de Taylor y la molecular son los mecanismos de reducción de las diferencias de concentración y de temperatura.
  
5. Las concentraciones de equilibrio, que tienden a desarrollarse en la interfase sólido-líquido, gas-líquido o líquido-líquido, se desplazan o modifican debido a la difusión molecular y turbulenta entre la masa de fluido y el fluido adyacente a la interfase. El movimiento masivo (difusión de Taylor) contribuye también a este mecanismo de transferencia de masa.

Este proceso es bastante utilizado para las preparaciones en pequeña escala; el uso industrial de la maceración se limita a la fabricación de extractos a partir de materias primas vegetales ricas en mucílagos. Las materias primas que contienen mucílagos se hinchan, de manera tal que pueden aumentar hasta en 4 veces su volumen original y dificultan el paso del solvente, lo que contraindica el uso de procesos de

percolación o extracción en contracorriente. La etapa final del proceso es el prensado o la centrifugación del residuo para la recuperación de la parte del extracto retenido en él.

#### **2.4.2.2 Percolación**

La percolación consiste en hacer pasar el solvente a través de la materia prima, hasta su extracción exhaustiva completa. La percolación simple, comprende la extracción exhaustiva de la materia prima con el solvente siempre renovado. En pequeña escala, la percolación se realiza en aparatos, denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo del solvente. Según la Farmacopea Alemana, la capa de materia prima debe ser igual a 5 veces el diámetro medio del equipo.

La percolación, en pequeña escala o en escala industrial, comprende una etapa preliminar de humedecimiento de la materia prima, fuera del cuerpo del percolador. Este procedimiento tiene como objetivo aumentar el contacto, facilitando el paso del solvente y no permitiendo la formación de falsas vías, que perjudican la eficiencia del proceso. El humedecimiento de la materia prima aumenta la porosidad de la pared celular y facilita la difusión de las sustancias extraíbles hacia el exterior de las células. El humedecimiento debe ser realizado fuera del percolador, ya que la materia prima puede hincharse excesivamente, principalmente cuando el solvente es acuoso, y comprimirse contra las paredes del percolador, no permitiendo el paso del solvente.

La percolación simple presenta, como desventaja, el alto consumo de solvente. Por esta razón, en condiciones industriales, es preferible usar la técnica de la reperlación. La reperlación consiste en hacer recircular el mismo solvente a través de la materia prima, por medio de bombas. Este procedimiento aumenta el tiempo de contacto de la materia prima con el solvente y aumenta la eficiencia del proceso. En la reperlación se utiliza una batería de percoladores y los extractos menos ricos en sustancias extraíbles son utilizados para extraer nuevas porciones de la materia prima.

#### **2.4.2.3 Lixiviación con unidad de extracción tipo Soxhlet**

Este es un método de extracción sólido-líquido que hace uso del extractor Soxhlet. Este extractor consta de cuatro partes o unidades principales, siendo estas: condensador, unidad de extracción, matraz y dedal; adicionalmente se necesitan mangueras y plancha de calentamiento.

Para realizar una extracción Soxhlet se coloca una cantidad de materia prima seca en el dedal de celulosa, seguidamente se deposita en la unidad de extracción y se adapta al matraz que contiene el solvente que separará las fracciones solubles, cuando este solvente llegue a su punto de ebullición, formará vapor que ascenderá por la pared interna del extractor.

En la parte superior de la unidad de extracción, se conecta el condensador, con su respectiva entrada y salida de agua, cuyo flujo será

en contracorriente. Esta parte del extractor Soxhlet permitirá que el vapor que sube por la pared de la unidad de extracción cambie de fase logrando con esto que caiga a la muestra de cardamomo en forma de gota. El dedal deberá llenarse con el solvente que ha sido condensado hasta que alcance la altura del sifón en el extractor, luego será devuelto al matraz para empezar nuevamente el ciclo de extracción.

El procedimiento correcto para realizar extracciones con el aparato soxhlet es el siguiente:

1. Se lava y seca cada una de las partes del equipo.
2. Se coloca el dedal con la muestra en el aparato soxhlet.
3. Se arma el equipo.
4. Se deja al equipo extraer durante 2 horas.

### **2.4.3 Solventes**

Debido a que la naturaleza de la oleorresina es determinada por el solvente utilizado para su extracción, es de necesario realizar una revisión de los solventes utilizados para este fin. Estos pueden ser divididos en tres categorías:

**2.4.3.1 Solventes polares:** contiene grupos hidroxilo o carboxilo- Estos son relativamente reactivos químicamente, una alta constante dieléctrica y es miscible con agua. Por ejemplo alcoholes y acetona.

**2.4.3.2 Solventes no polares:** son químicamente inertes, tienen constantes dieléctricas bajas y son generalmente inmiscibles con agua.

**2.4.3.3 Hidrocarburos clorados:** Que son solventes con bajos puntos de ebullición e inmiscibles en agua.

En el manejo de volúmenes altos de solventes, que es inherente con la producción comercial de oleorresinas, la toxicidad e inflamabilidad son de mayor importancia, particularmente si hay algún riesgo de una acumulación de vapores en las áreas de proceso. Los solventes clorados no inflamables tienen muchas ventajas en este aspecto, sin embargo son, generalmente, más tóxicos. Los operarios deben de estar al tanto de este riesgo a la salud en caso de una fuga de vapor en el sistema de extracción.

En los vegetales y las especies, el sabor es compuesto por componentes volátiles y no volátiles. Muchos de estos constituyentes son hidrofóbicos y son extraídos de mejor manera con solventes no polares como hidrocarburos; pero otros son hidrofílicos, estos son extraídos de mejor manera con solventes polares como la acetona. Tomando en cuenta la naturaleza de los metabolitos de la especie, se puede determinar cual es el solvente que dará el mejor rendimiento de los metabolitos secundarios. Los solventes polares disuelven una mayor variedad de sustancias que los solventes no polares. Los solventes utilizados comúnmente son acetona y etanol, ya que extraen una mayor cantidad de metabolitos; pero debido a que son altamente inflamables y deben de

trabajarse en plantas especialmente diseñadas a prueba de chispas. El hexano es un solvente muy eficiente para la extracción de aceites esenciales y otros componentes que no sean de naturaleza hidrofílica, sin embargo es altamente inflamable y representa un gran riesgo de incendio.

En la actualidad las oleorresinas son extraídas por hidrocarburos clorados, tales como el bicloruro de metileno. Algunas de las mayores ventajas de este solvente es el bajo riesgo de incendio debido a la poca inflamabilidad del solvente, debido al bajo punto de ebullición es más sencilla la remoción de este en el extracto.

## **2.5 Preliminares para un estudio de obtención de oleorresinas.**

### **2.5.1 Naturaleza del material vegetal:**

La materia prima empleada en la extracción de los aceites esenciales se clasifica de la siguiente manera:

1. Semillas y frutos
2. Hierbas y hojas
3. Flores y pétalos
4. Racimos y Rizomas

Generalmente, las semillas, frutos, racimos y rizomas no se degradan pasado el almacenamiento.

Las hierbas, hojas y flores para el corte no prevenido entre el almacenamiento y conservación se degradan y es necesario un periodo

corto en la recolección y el proceso de obtención del aceite sea de diez a treinta horas. Ciertas materias vegetales se les debe reducir el tamaño y así favorecer la obtención del aceite siendo necesario la existencia de molinos y cortadoras.

### **2.5.2 Tamaño de la partícula:**

La materia prima que se emplea con más frecuencia en la extracción del aceite se presenta bajo la forma de sólidos.

Para aumentar la superficie de contacto y obtener la forma más apta de reacción, la operación preliminar a la extracción es generalmente la trituración.

Se debe emplear el seccionamiento que consiste en la división de los sólidos por medio de cortadoras y luego empleando una banda de cuchillas.

También se debe emplear el proceso de percusión cuyo efecto de rompimiento se realiza por golpes bruscos de martillos.

Luego se debe de realizar un proceso de cribado o tamizado, que es la separación de una mezcla compuesta por sólidos de diversos tamaños de grano en dos o más porciones mediante una superficie tamiz que actúa como separador de tipo “aceptación y rechazo”, de tal manera que las porciones finales originadas en la separación estén constituidas por granos de tamaño más uniforme que en la mezcla original.

El material que permanece sobre la superficie de un tamiz determinado se denomina material superior; el material que atraviesa la superficie de tamiz se denomina material inferior; y el material que pasa por una superficie tamizadora pero queda retenido por la de siguiente tamaño se denomina material intermedio.

La superficie de tamiz puede ser de tela de alambre, seda o plástico, placas horadadas o perforadas, rejillas de barras o secciones de alambre de cuña.

Las telas de alambre se especifican, en general, mediante la "malla", que es el número de aberturas por pulgada lineal, a contar a partir del centro de cualquier alambre hasta un punto situado exactamente a 25,4 mm (1 pulgada) de distancia; también mediante la abertura especificada en pulgadas o milímetros, que es el espacio libre entre los alambres. La malla se emplea en general para las telas de malla 2 y más finas y la abertura libre para las telas espaciadas con aberturas de 12,7 mm (1/2 pulgada) o mayores. El paso, o tamaño de abertura de la malla, es el espacio libre mínimo entre los bordes de la abertura en la superficie del tamiz y se expresa, por lo general, en pulgadas o milímetros. El área abierta de una malla es el porcentaje de aberturas reales respecto del área superficial total.

### **2.5.3 Técnicas de la recolección, secado y conservación de las plantas:**

El hecho de separar, cortando o partiendo, una sección del cuerpo vegetal, a ser posible por medio de una navaja bien afilada o, en el caso de un vegetal leñoso, con unas tijeras de jardinero, produce cierto número de transformaciones biológicas en la parte separada. Las células vegetales empiezan a marchitarse. Al separar la parte aérea de su raíz se provoca ante todo la interrupción del flujo alimenticio y de transpiración: ascensión del agua hasta las células, transportando los nutrientes que lleva disueltos. Si la planta no es inmediatamente extendida al aire en finas capas, corre el peligro de estropearse. Las enzimas que contiene, y que antes favorecían la formación de materias activas. Empiezan ahora a descomponerla. En el organismo vegetal las anteriores reacciones de degradación, y el producto se transforma desde el punto de vista químico. Una incorrecta forma de secado aumenta aún más la cantidad de productos de degradación sin valor terapéutico perdiendo así el principio activo su calidad.

Las materias primas vegetales, en función de su naturaleza y de su aplicación terapéutica, deben sufrir ciertos tratamientos químicos o mecánicos. Estos tratamientos comprenden: la forma de recolección o de recogida, el secado, el descortezado, el picado, la eliminación de algunas partes, la molienda, el tamizado, la trituración, el tueste y hasta la fermentación. Cada uno de dichos procedimientos busca la obtención de una cierta estabilización de las sustancias activas contenidas en la planta.

El secado de las plantas en general como las medicinales, las especies y las plantas de uso técnico-industrial, debe ser realizado por el productor o por el propio recolector. Se determina la época de la recolección, tanto de las plantas silvestres como de las cultivadas, en función del contenido de materias activas a lo largo de su ciclo vegetativo. En general deberán ponerse a secar las plantas lo más rápidamente posible tras su recogida, para evitar así que se requemen al marchitarse. Normalmente, no se aconseja el secado a pleno sol, pues los rayos solares producen una pérdida de materias activas, un amarilleo con un rápido oscurecimiento de los vegetales y una alteración de su valor medicinal o aromático. Las plantas recogidas por sus aceites esenciales pierden así hasta un teórico de sus materias activas. Sin embargo se recomienda, en algunos casos excepcionales, practicar un corto secado previo al sol, para a continuación situar la cosecha en el interior, con una buena corriente de aire, incluso en ocasiones poniendo las plantas ante un ventilador.

En realidad secar una planta no es más que retirarle progresivamente su humedad. A menudo será necesario, antes de practicar el secado, regar la cosecha con agua, para eliminar de esa forma el polvo y las impurezas, las partículas de tierra, etc. También puede efectuarse la última fase en un secadero, junto a una fuente de calor artificial.

El secado debe durar hasta la obtención de una consistencia perfectamente fiable: hasta las partes relativamente duras deben ser fáciles de partir al curvarlas. Una excesiva desecación provoca sin

embargo la pulverización de las plantas y acarrea la pérdida de sus materias activas. Por el contrario, si su humedad residual permanece alta, se corre siempre el peligro de verlas pudrirse o enmohecerse durante su conservación. En verano, en lugares cerrados, con el calor natura, las flores se secan en 3-8 días, las hojas en 4-6 días por término medio; en otoño y primavera hay que prever bastante más tiempo. No es recomendable secar las plantas colocándolas encima de un radiador; es preferible valerse de un pequeño secador eléctrico con termostato.

No es aceptable extender los productos directamente sobre el suelo para su secado; no se utilizará nunca papel de periódico como soporte, sino papel blanco de envolver que esté bien limpio.

#### **2.5.4 Deterioro a que están expuestas las oleorresinas:**

Generalmente el deterioro es atribuido a reacciones generales como: oxidación, resinificación, polimerización, hidrólisis de esteres y a la interacción de grupos funcionales. Estos procesos parecen estar activados por calor, aire, humedad, luz y en algunos casos posiblemente por metales.

Como regla general, cualquier oleorresina será tratada antes de almacenarlo, removiéndole impurezas metálicas, humedad y materia suspendida. Los envases deben quedar completamente llenos, colocándose en un lugar fresco y protegido de la luz. Antes de sellar los recipientes es conveniente burbujear nitrógeno o anhídrido carbónico

para desalojar del envase la cámara de aire que pudiera haber quedado dentro de la oleorresina.

## **2.6 Industrialización de las plantas aromáticas:**

Las plantas aromáticas han sido utilizadas, durante siglos, en culinaria, perfumería, como medicamentos. Las plantas aromáticas son usadas:

- Directamente en culinaria, en su forma de plantas secas, especias y condimentos.
- En los productos de higiene y tocador, como componentes de formulaciones, o como materia prima para el aislamiento de compuestos aromáticos de interés.
- En la industria de alimentos, como agentes saborizantes.
- En medicina humana y veterinaria, como componentes de formulaciones farmacéuticas.
- En agricultura, como pesticidas y repelentes de insectos, y
- Como agentes antibacterianos y anti fúngicos.

Los principales productos obtenidos de plantas aromáticas son aceites esenciales, oleorresinas (obtenidas principalmente de especias), concretos, absolutos, extractos y tinturas.

## **2.7 Materia prima**

### **2.7.1 Cultivo de plantas medicinales**

El establecimiento de un cultivo de plantas medicinales se recomienda cuando:

- Existen pocas plantas nativas.
- Las plantas nativas tienen una distribución muy dispersa.
- Las plantas nativas son inaccesibles (recolección de plantas en áreas montañosas y geográficamente muy accidentadas o recolección de hojas de árboles muy altos).
- Hay necesidad de mejorar el contenido de los principios activos.
- Solamente una especie presenta alto contenido de constituyentes de interés.
- El cultivo produce una mayor productividad y mayor contenido de los constituyentes de la planta debido a las buenas prácticas de agricultura, mejores condiciones del suelo y mejores condiciones del suelo y mejor control de plagas y las enfermedades.
- El cultivo permite un mejor y más rápido procesamiento de la planta recolectada, como el secado y el empaque, o cuando las primeras etapas de la extracción deben hacerse en el lugar de recolección.
- Existe una gran demanda en el mercado.

El establecimiento de un cultivo de plantas medicinales puede involucrar la domesticación de las especies nativas de la región que tienen uso en la medicina popular y que poseen una acción farmacológica confirmada en estudios científicos, puede involucrar también, la introducción y la aclimatación de plantas exóticas, con acción otros continentes. En ambos casos, la experimentación agronómica debe acompañarse de un estudio fotoquímico. El seguimiento fotoquímico tiene como base el análisis cualitativo y cuantitativo de los principios activos de la planta y la detección de sustancias indeseables.

Las plantas medicinales se diferencian de los demás productos agrícolas. Mientras en un cultivo tradicional de plantas alimenticias la productividad es medida por la cantidad producida en una determinada área, en un cultivo de plantas medicinales lo más importante es la cantidad de principios activos presentes en la planta, o sea que la productividad es medida multiplicando la cantidad de materia vegetal producido por el contenido de los principios activos y expresando el resultado en cantidad de principios activos producidos por unidad de área.

### **2.7.2 Recolección**

Para cada planta medicinal existe un momento adecuado para realizar su recolección. La determinación de los principios activos permite establecer con exactitud el tiempo correcto de la recolección. Sin embargo, para las plantas cuyos principios activos todavía no se conocen, pueden aplicarse algunas reglas generales.

Las plantas herbáceas y las hojas deben recolectarse cuando se inicia la floración. Algunas plantas permiten más de un corte. A veces cuando hay períodos secos y lluviosos muy definidos, la recolección de hojas se hace durante el período seco, lo que permite que la planta se regenere durante el periodo seco, lo que permite que la planta se regenere durante el período de lluvias.

Los períodos de sequía y de lluvia influyen en el contenido de los principios activos. Por ejemplo, el contenido de los alcaloides disminuye después de las lluvias y el de los aceites esenciales aumenta. El contenido de los aceites esenciales disminuye después de la época seca. El contenido de los principios activos varía según el período del día. En general, los glucósidos alcanzan su mayor concentración en la tarde, mientras los aceites esenciales alcanzan su máxima concentración alrededor el mediodía, a excepción de la manzanilla (*Matricaria recutita*), que alcanza durante la noche la máxima concentración y una calidad mejor de su aceite esencial.

### **2.7.3 Procesamiento post-cosecha**

El procesamiento post-cosecha tiene como objetivo la conservación de las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas de la materia prima vegetal. Un procesamiento post-cosecha inadecuado da como resultado una materia prima de baja calidad, con pérdida de principios activos, así como un aumento de la

carga microbiana y una pésima presentación comercial. Las pérdidas de principios activos involucran:

- Degradación por procesos metabólicos
- Hidrólisis de los compuestos
- Descomposición por la luz
- Descomposición enzimática
- Degradación de las sustancias termolábiles debido al calor
- Volatilización de los aceites esenciales y
- Contaminación por hongos y bacterias

La etapa más importante del procesamiento post-cosecha es, sin duda, el secado. La industria utiliza plantas secas, lo cual facilita su conservación por períodos de tiempo prolongados.

El contenido de humedad de las plantas frescas varía de 60% a 80%. El proceso de secado reduce este contenido de 5-12%. Según el órgano de la planta, las pérdidas de peso durante el secado son:

- Hojas: 20-75%
- Corteza: 40-65%
- Tallo: 30-70%
- Raíces: 25-80%
- Flores: 15-80%

El secado interrumpe los procesos de degradación causados por enzimas o fermentos, impide el desarrollo de microorganismos y las

reacciones de oxidación de hidrólisis. Sin embargo, como este proceso involucra calor, pueden presentarse pérdidas de aceites esenciales y de sustancias volátiles, así como el riesgo de degradación de las sustancias termolábiles. La mayoría de las plantas medicinales pueden ser secadas a temperaturas que varían entre 30 y 60 °C. Las plantas que contienen aceites esenciales o sustancias volátiles deben ser secadas a temperaturas inferiores a 40°C. Debe garantizarse una buena circulación de aire para facilitar el proceso de secado.

La manera como va a ser realizado el secado debe determinarse experimentalmente para cada caso. Un secado lento puede causar alteraciones perjudiciales antes de que el proceso se haya terminado, debido a la acción de enzimas, los hongos y las bacterias. Un proceso de secado muy rápido endurece la capa superficial de las células e impide la evaporación del agua que está dentro del órgano lo que propicia la acción de enzimas en su interior, causa la volatilización de los aceites esenciales originando productos con una pésima presentación comercial.

El proceso de secado puede ser realizado al sol o a la sombra, extendiendo la planta en capas finas, en una superficie limpia. Sin embargo, este proceso no permite tener un control de la temperatura y debe interrumpirse cuando comienza a anochecer, recogiendo las plantas y guardándolas en un local cubierto, para impedir la absorción de la humedad durante la noche. Los mejores resultados se obtienen utilizando secadores solares o secadores que operan con aire caliente.

#### **2.7.4 Almacenamiento**

Por grandes que hayan sido los cuidados durante la recolección y el proceso de secado, las plantas pierden principios activos por degradación durante el almacenamiento. La conservación de la materia prima vegetal por períodos prolongados de tiempo depende de las condiciones de almacenamiento; las condiciones apropiadas impiden que el producto tenga contacto con el sol, el polvo, los roedores y los insectos y otros factores de degradación impidiendo la pérdida de principios volátiles.

El material puede ser guardado en sacos de fique o en fardos prensados. El uso de sacos de plástico debe evitarse porque estos no permiten una ventilación apropiada. Los sacos deben etiquetarse y debe constar en la etiqueta el nombre científico de la planta y la parte usada, la fecha de ingreso, el nombre del proveedor, el origen y la aprobación dada por el control de calidad.

El lugar en donde se va a realizar el almacenamiento debe ser limpio, sin incidencia de la luz solar directa. Los empaques que contienen las materias primas no deben colocarse directamente en el suelo, deben ser colocadas en estantes. El recinto debe tener cortinas o mallas en las ventanas para impedir la entrada de insectos y el lugar debe poseer buena ventilación y baja humedad. Se debe impedir la entrada de aves y se debe eliminar sus nidos y tener precaución para no permitir la presencia de roedores.

### **2.7.5 Molienda**

La molienda tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la materia prima vegetal para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción. La extracción de una materia prima entera o dividida en fragmentos gruesos sería incompleta, debido a la pobre penetración del solvente en el tejido vegetal, y sería igualmente muy lenta, una vez que las membranas celulares actúan como verdaderas barreras que dificultan el proceso de extracción. En el caso de la materia prima previamente dividida, tales membranas se encuentran parcialmente destruidas, lo que facilita la disolución de los constituyentes celulares en el líquido externo. Sin embargo, la división excesiva, con formación de polvos muy finos, puede causar problemas en el transcurso de la extracción.

Para aumentar la superficie de contacto y obtener la forma más apta de extracción, la operación preliminar a la misma es generalmente la trituración. La trituración expone más glándulas de aceite esencial crudo y reduce el grueso del material; esto permite una extracción más rápida, mayor rendimiento y mejor calidad del aceite esencial crudo, al mismo tiempo que menor consumo de solvente.

El grado de trituración para cada planta se debe aprender por experiencia. Es claro que el material desmenuzado debe ser extraído lo más pronto posible para reducir al mínimo la pérdida de aceite esencial crudo por evaporación.

Se debe emplear el seccionamiento que consiste en la división de los sólidos por medio de cortadoras y luego empleando una banda de cuchillas. También se puede emplear el proceso de percusión cuyo efecto de rompimiento se realiza por golpes bruscos de martillos.

La mayor parte del aceite esencial crudo fácilmente extraíble proviene de las células que se rompen durante los procesos de trituración, cocción, presión y laminado, el cual es obtenido por disolución; la fracción más difícil de extraer proviene de las células enteras o parcialmente rotas y es el obtenido por difusión.

## **2.8 Factores que afectan el rendimiento de obtención de las oleorresinas**

Entre los factores que intervienen directamente en el rendimiento de la producción de aceites esenciales crudos se pueden enumerar los siguientes:

1. Tipo de materia prima: se refiere a las características genéticas de la planta, ya que existe diferencia aún dentro de las diferentes familias; además la materia prima también está influida por el lugar y la época de producción, por la maduración o edad de la planta, de las hojas y por la limpieza en el corte, enfermedades de la planta, etc.

2. Tiempo de secado: dependiendo de este tiempo de secado, la planta tendrá más o menos cantidad de agua por lo que el rendimiento se ve influido.
3. Tamaño de partícula: el área de transferencia y la cantidad de compartimientos abiertos depende de ese factor, así como el flujo de vapor en los métodos de arrastre con vapor.
4. Tiempo de extracción: se refiere al tiempo del proceso de extracción, en el cual el aceite de la planta es extraído gradualmente.
5. Método de extracción: se refiere al tipo de método utilizado.
6. Características del equipo de extracción: tamaño del equipo, material de construcción.
7. Características de los flujos: se refiere a la cantidad de materia prima utilizada, el volumen y la pureza del solvente utilizado, la cantidad de agua o vapor utilizado, su temperatura y presión.

## **2.9 Caracterización de las oleorresinas**

El análisis químico de los extractos de plantas es muy importante en el control de la calidad. Después de que la identidad del material ha sido establecida, la investigación cuantitativa y cualitativa puede empezarse.

Este análisis debe envolver preferiblemente alguna clase de método cromatográfico. La calidad del extracto de la planta puede ser dada como una huella digital en el cromatograma (aceites esenciales crudos) en el caso de que los componentes principales no sean conocidos o demasiados complejos.

Entre las propiedades físicas que se analizan para los aceites esenciales están la gravedad específica, el índice de refracción, solubilidad entre otros.

### **2.9.1 Cromatografía**

La cromatografía es una técnica de separación extraordinariamente versátil que presenta distintas variantes. En toda separación cromatográfica hay dos fases (sólida, líquida o gas) una móvil y otra estacionaria, que se mueven una con respecto de la otra manteniendo un contacto íntimo. La muestra se introduce en la fase estacionaria y la móvil. Los componentes de la mezcla a separar invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, con lo que se produce la separación. Si un componente está la mayor parte del tiempo en la fase móvil el producto se mueve rápidamente, mientras que si se encuentra la mayor parte en la fase estacionaria, el producto queda retenido y su salida es más lenta.

Tabla I. Tipos de cromatografía.

<b>TIPO</b>	<b>FASE ESTACIONARIA</b>	<b>FASE MÓVIL</b>
<b><i>Líquido-sólido</i></b>	Sólido inerte como gel de sílice o alúmina	Disolventes
<b><i>Intercambio iónico</i></b>	Resina cambiadora	Soluciones acuosas
<b><i>Líquido-líquido</i></b>	Líquido absorbido en un soporte sólido	Líquido
<b><i>Gas-líquido</i></b>	Película de líquido absorbida sobre un soporte sólido	Gas

La más utilizada en química orgánica es cromatografía líquido-sólido en sus dos variantes: cromatografía en columna (CC) y cromatografía de capa fina (TLC).

### **2.9.2 Cromatografía en capa fina**

La idea y los fundamentos de la utilización de un adsorbente cromatográfico dispuesto como una delgada capa sobre un soporte inerte rígido, son atribuidos a Izmailov y a Shaiber (1938). Estos investigadores analizaron tinturas farmacéuticas por cromatografía en capa fina utilizando albúmina como adsorbente en una placa de vidrio, con el objetivo de obtener cromatogramas circulares. En el año de 1949, Meinhard y Hall utilizaron una goma para unir una mezcla de celita y albúmina en láminas de microscopio, obteniendo una capa homogénea y más fina. Kirchner y sus colaboradores usaron por primera vez un

desarrollo ascendente, como ya era usando en la cromatografía en papel. Sin embargo, fueron el trabajo de Stahl y el consecuente desarrollo de adsorbentes estandarizados comercialmente, los responsables por el auge vertiginoso del uso de la cromatografía en capa fina. Stahl publicó un excelente libro sobre este tema. Desde entonces, la cromatografía en capa fina fue aceptada como una técnica analítica reproducible. Wagner y sus colaboradores elaboraron un libro en el cual describen el análisis de materias primas vegetales.

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc.) distribuido uniformemente sobre una placa de vidrio o de aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente va a migrar por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Después de que ha ocurrido, se evapora el eluyente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada.

El gran desarrollo de esta técnica se debe a las múltiples ventajas que ella ofrece, entre las cuales podemos citar: su fácil comprensión y

rápida ejecución, la versatilidad, su reproducibilidad y el bajo costo. El proceso de separación está fundamentado principalmente en una serie de etapas o equilibrios de adsorción-desorción. Otros tipos de cromatografía, como la de reparto o la de intercambio iónico, pueden tener lugar cuando se utilizan fases estacionarias apropiadas. En el mercado se pueden encontrar diferentes tipos de adsorbentes entre los cuales se pueden citar: la síicagel ( $\text{SiO}_2$ ), la celita (tierra de diatomeas), la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), la celulosa (para cromatografía de reparto) y la poliamida. También ha sido bastante utilizada la incorporación de reactivos a los adsorbentes, con lo cual se busca la separación de las sustancias muy relacionadas.

En el mercado podemos encontrar las placas cromatográficas prefabricadas a un precio relativamente elevado, las cuales no necesitan de la fase preparatoria y son más homogéneas y uniformes, facilitando de esta manera una mejor separación y haciendo más reproducibles los valores de  $R_f$  (factor de retención). El factor de retención es la medida de la migración de una sustancia determinada en un solvente dado.

$$R_f = \frac{\text{Dis tan cia recorrida por la sus tan cia}}{\text{Dis tan cia recorrida por el solvente}} \quad [\text{Ec. 4}]$$

Los siguientes factores causan variaciones en el valor del  $R_f$  no permitiendo que sea un valor absoluto: las variaciones de temperatura del medio ambiente, el grado de pureza de los solventes utilizados y las variaciones de homogeneidad de las diferentes placas de capa fina. Debido a estos factores, el uso de una sustancia de referencia para

garantizar la identificación, es muy importante, principalmente cuando se trata de extractos de plantas.

Las placas cromatográficas pueden ser preparadas en el propio laboratorio de análisis para disminuir los costos. F.J. de Abreu Matos describe con lujo de detalles la forma de preparar estas placas, así como la técnica de aplicación de la muestra, la elusión, el revelado y la observación de los resultados. Escoger el eluyente apropiado es de gran importancia para la buena separación de las sustancias. Éste debe ser seleccionado en función de la fase estacionaria empleada y en función de la naturaleza de las sustancias que va a ser separadas.

Las ventajas del uso de la cromatografía en capa fina pueden ser resumidas de la siguiente manera:

- Se necesita equipo simple y de bajo costo.
- Es fácil su comprensión y ejecución.
- Rapidez, reproducibilidad y versatilidad en el análisis
- Utilización de una pequeña cantidad de solvente y de la muestra a ser analizada.
- Posibilidad de revelar las placas con reactivos cromogénicos, lo cual hace posible detectar sustancias que no absorben en la región UV/visible.
- Posibilidad de efectuar separaciones en escala semi-preparativa.

### **2.9.2.1 Análisis cuantitativo en cromatografía en capa fina**

Hasta 1987, la principal utilización de la cromatografía en capa fina era básicamente cualitativa o semi-preparativa. El desarrollo de los densitómetros modernos permitió la utilización de esta técnica para los análisis cuantitativos.

El densitómetro mide el área y la intensidad de las manchas de un cromatograma en capa fina presentando registros en forma de picos. La lectura de una placa puede ser llevada a cabo por transmitancia o reflectancia en la región ultravioleta y visible o por fluorescencia. Para cuantificar una sustancia utilizando esta técnica es necesario primero construir una curva de calibración con concentraciones conocidas de un patrón de la sustancia que va a ser analizada.

Sustancias incoloras pueden ser cuantificadas, siempre y cuando se utilicen reactivos cromogénicos, los cuales van a permitir la lectura del densitómetro. En este caso deben tenerse precauciones pues puede presentarse una distribución desigual de la coloración, dependiendo de la cantidad y de la forma de aplicación del revelador utilizado, de la temperatura utilizada durante el calentamiento que puede volatilizar la muestra y del tiempo empleado entre el revelado y la lectura de la placa. La presencia de manchas difusas e irregulares puede presentarse cuando se aplican sustancias en baja concentración que necesitan de la aplicación de un volumen mayor de la solución que va a ser analizada. Estos factores pueden afectar la eficiencia de esta técnica.

Existen otros factores que pueden ocasionar errores en la lectura y están relacionados con la falta de reproducibilidad de la aplicación de la muestra y con variaciones de las condiciones cromatográficas. Entre estos factores podemos citar: la homogeneidad del adsorbente empleado o la migración del solvente de forma irregular. Petrovic y sus colaboradores en un intento por reducir los posibles errores en el análisis de los resultados introdujeron un proceso de cuantificación basado en la utilización de un instrumento de alta precisión, llamado analizador de colores, bastante utilizado en la industria textil el cual muestra mayor precisión, comparado con los densitómetros usuales.

Para obtener un producto fitoterapéutico estandarizado y de calidad debe asegurarse la uniformidad de todos los lotes de su producción. Para lograr este objetivo es indispensable que cada etapa del proceso de producción sea rígidamente realizada. Factores como el origen del material vegetal, la época en que fue realizada la recolección, el proceso de secado y almacenamiento son de calidad. La cromatografía en capa fina es una técnica importante en todo el proceso ya que permite proporcionar informaciones sobre la homogeneidad de los componentes químicos del producto y así garantizar que las sustancias responsables de la actividad farmacológica estén presentes en los niveles adecuados.

El primer paso a seguir en el control de calidad de un producto fitoterapéutico es definir cuáles grupos de sustancias pueden estar presentes, para de esta manera lograr la identificación de la planta

(marcadores) y de aquellas sustancias capaces de ejercer las actividades farmacológicas (principios activos).

Un principio activo es una sustancia o grupo de sustancias químicamente caracterizadas, cuya acción farmacológica es conocida, siendo la responsable total o parcialmente de los efectos terapéuticos de los productos fitoterapéuticos. Los marcadores son constituyentes químicos definidos que están presentes en la materia prima vegetal, de preferencia los propios principios activos, destinados al control de calidad de la materia prima vegetal, de las preparaciones fitoterapéuticas intermedias y de los productos fitoterapéuticos.

Siendo así, el primer paso para realizar el análisis de un determinado producto fitoterapéutico, es definir las sustancias químicas que van a ser investigadas, lo que permitirá identificar cuál será el mejor solvente para extraer estas sustancias, así como, determinar el mejor sistema de eluentes para la migración en la cromatoplaca e incluso identificar los reveladores más adecuados que serán utilizados para detectar las sustancias presentes. Estas sustancias son las llamadas marcadores y los marcadores ideales son los propios principios activos. No siempre en el análisis se hace posible la utilización de los principios activos debido a los siguientes factores:

- Desconocimiento de las sustancias responsables de la actividad de la planta.
- Los principios activos son difíciles de detectar o están presentes en pequeñas cantidades en la planta.

En estos casos es imposible utilizar los principios activos como marcadores, siendo necesario seleccionar otras sustancias que caracterizan sin duda alguna a la materia prima. El análisis será llevado a cabo comparando determinado producto fitoterapéutico con una sustancia estandarizada definida de antemano como marcadora. En algunos casos la sola comparación con el patrón no es suficiente, por esta razón es necesario que además de ser comparada con la sustancia marcadora sea comparada también con el producto auténtico revela no solamente la presencia de los principios activos sino también la proporción entre estos y otras sustancias presentes en el extracto.

No siempre se conoce la constitución química de la planta; cuando esto sucede es indispensable realizar su perfil cromatográfico; el extracto, en condiciones definidas de análisis, formará un diseño característico debido a la migración diferencial de sus constituyentes, llamado huella digital (finger print) de la planta.

Por consiguiente las plantas de las cuales no se posea ninguna información sobre su constitución química, pueden ser controladas, realizando simplemente cromatografías de un extracto patrón, botánicamente identificado y obtenido de la misma manera que el extracto que va a ser analizado. La migración de las manchas presentes en la muestra y en el patrón aunque no estén identificadas, pueden ser comparadas a partir del Rf, del tamaño y coloración.

Los análisis cuantitativos del material de origen vegetal pueden ser realizados a través de la lectura de las placas en capa fina en densitómetros. Pepeljnjak y colaboradores, por ejemplo, utilizaron la cromatografía en capa fina con posterior lectura en un densitómetro para cuantificar la pinocebrina, una isoflavanona a la cual se le atribuyen, en gran parte, las actividades antibacterianas del propóleo. Houston y sus colaboradores cuantificaron igualmente la pinocebrina a través de la cromatografía en capa fina seguida por la lectura con un densitómetro, utilizando como patrón interno la 1, 4 dihidroxiantraquinona, obteniendo resultados comparables a los análisis realizados con la ayuda de un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia, comprobando así, la eficiencia de esta técnica.

### **2.9.3 Cromatografía en fase gaseosa**

La cromatografía en fase gaseosa es una técnica que permite la separación de sustancias volatilizables. La separación tiene como base la distribución diferencial de las sustancias entre una fase estacionaria, sólida o líquida, y una fase móvil (gaseosa).

La muestra es introducida en una columna que contiene la fase estacionaria, a través del sistema de inyección. Temperaturas apropiadas en el sitio de la inyección y en la columna, posibilitan la volatilización de los componentes de la muestra los cuales, de acuerdo con sus propiedades y las de la fase estacionaria, son retenidos por tiempos variables y llegan al final de la columna en tiempos diferentes.

Un detector adecuado, a la salida de la columna, permite la detección y la cuantificación de las sustancias.

La cromatografía en fase gaseosa es una técnica de análisis que ofrece resoluciones excelentes, con sensibilidad del orden de miligramos a picogramos. Los resultados son cuantitativos y se obtienen en un espacio de tiempo relativamente corto. Las desventajas son: los componentes de las muestras deben ser estables a la temperatura de operación, las muestras tienen que ser volátiles; es necesario hacer un tratamiento preliminar de las muestras, lo que convierte el proceso en difícil y complejo, además que su eficacia no es muy alta, como técnica para las identificaciones cualitativas.

La salida de las sustancias de la columna es registrada bajo la forma de picos que deben ser simétricos y sin superposición. La asimetría y la sobreposición indican una separación defectuosa. Los picos asimétricos pueden indicar fallas en la inyección, un exceso de la muestra, o pérdida de la eficiencia de la fase estacionaria.

La eficiencia del proceso se mide en términos de platos teóricos (un plato teórico equivale a una etapa del equilibrio de la sustancia entre las fases). La mayor eficiencia se traduce en la obtención de picos estrechos.

#### **2.9.4 Cromatografía gas-líquido**

En la cromatografía gas-líquido, se prepara una columna que contiene un soporte inerte (tubo largo) recubierto con una fase líquida estacionaria. La fase en movimiento es un gas inerte, normalmente helio, aunque a veces se usa el argón y el nitrógeno. La mezcla de muestra se introduce en la corriente de gas y, por tanto, dentro de la columna. El inyector, la columna y los detectores normalmente se calientan. El proceso de migración diferencial está gobernado por la partición del soluto entre la fase gaseosa en movimiento y la fase líquida estacionaria. Por tanto la velocidad de transporte para un soluto a través de una columna depende de la velocidad del flujo del gas transportador, de la temperatura y de la fase líquida estacionaria. Hay un gran número de choques entre la fase en movimiento y la fase estacionaria para cada molécula de soluto, con el resultado de que aún los compuestos que son casi idénticos pueden ser separados.

La fase móvil debe tener bajo costo, ser compatible con el detector y tener alta pureza. Para dar mayor reproducibilidad al análisis, la saturación del gas debe ser constante y debe ser controlada a través de válvulas de gas. La inyección se realiza generalmente con micro jeringas que contienen la muestra.

El volumen inyectado no debe superar la capacidad de la columna, y entre más pequeño sea el volumen usado de la muestra mayor será la eficiencia y la reproducibilidad del análisis. La temperatura aplicada debe ser suficiente para la volatilización de la muestra.

La eficiencia de una columna para separar especies casi idénticas, se expresa en función de su AEPT (altura equivalente a un plato teórico). La AEPT para una columna en particular es la región de la columna, expresada en unidades de longitud, en la cual ocurre un equilibrio entre la fase en movimiento o gaseosa y la fase estacionaria. Mientras más pequeña sea la AEPT, la columna es más eficiente.

Los materiales más usados en una columna son el cobre, el acero, el aluminio, el vidrio y el teflón. Las columnas se clasifican en empacadas y capilares, y generalmente tienen formas espiraladas, de acuerdo con el equipo. Las columnas capilares son de menor diámetro y más larga y deben poseer estabilidad de la fase estacionaria sobre la pared o soporte de la columna, además de la estabilidad físico-química. Las columnas capilares son las más utilizadas porque presentan mejor eficiencia en la separación ya que proporcionan un número mayor de platos teóricos. Estas columnas permiten la aplicación de una menor presión en el sistema. Una mayor longitud da como resultado mayor rapidez en los análisis y mejor resolución de los picos, con un menor volumen de la muestra inyectada.

Una gran variedad de detectores diferentes se usan en la cromatografía gas – líquido, aunque el más común es el detector de conductividad térmica. Los dos lados del detector, una referencia y una muestra, forman los dos brazos del puente de Wheatstone. Como sólo gas transportador está pasando a través de los dos lados, el puente se encuentra balanceado. Con el paso adicional de algún otro gas, además

del gas transportador por un lado del detector, la conductividad térmica de ese lado cambia y el puente queda fuera de balance. La señal de desbalance se amplifica y se alimenta a un registrador gráfico.

Tabla II. Fases estacionarias líquidas y temperaturas máximas de utilización.

<b>Fases estacionarias líquidas</b>	<b>Temperatura máxima (°C)</b>
Polietilenoglicol (PEG)	175
Metilsilicona	300
Esqualeno	150
Aceite mineral (Nujol)	100
Fenil-metilsilicona 50%	225

### **2.9.5 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

La cromatografía líquida de alta eficacia o High performance liquid chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se la denomina a veces Cromatografía líquida de alta presión o High pressure liquid chromatography (HPLC), aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la HPLC isocrática el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil.

El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. Un gradiente normal en una

cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas por tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

### **2.9.5.1 Tipos de HPLC**

#### **2.9.5.1.1 Cromatografía de fase normal**

La cromatografía de fase normal o "Normal phase HPLC" (NP-HPLC) fue el primer tipo de sistema HPLC utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

La fuerza de interacción no sólo depende de los grupos funcionales del compuesto de interés, sino también en factores estéricos de forma que los isómeros estructurales a menudo se pueden diferenciar el uno del otro. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención.

La NP-HPLC cayó en desuso a los años setenta con el desarrollo del HPLC de fase reversa o Reversed-phase HPLC debido a la falta de reproductibilidad de los tiempos de retención puesto que los disolventes próticos cambiaban el estado de hidratación de la silica o alúmina de la cromatografía.

#### **2.9.5.1.2 Cromatografía de fase reversa**

La HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste en una fase inmóvil apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la silica tratada con  $RMe_2SiCl$ , donde la R es una cadena alquil tal como  $C_{18}H_{37}$  ó  $C_8H_{17}$ . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más

hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Aparte de la hidrofobicidad de la fase móvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por

ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como que la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio por controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquiera resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

Las columnas de fase reversa se echan a perder con menor facilidad que las columnas de silica normales. Aun así, muchas columnas de fase reversa están formadas por silica modificada con cadenas alquil y no se deben utilizar nunca con bases en medio acuoso puesto que éstas podrían dañar el esqueleto de silica subyacente. Las columnas se pueden utilizar en ácidos en medio acuoso pero no deberían estar expuestas demasiado tiempo al ácido porque puede corroer las partes metálicas del aparato de HPLC.

### **2. 9.5.1.3 Cromatografía de exclusión molecular**

La cromatografía de exclusión molecular, también conocida como cromatografía por filtración en gel, separa las partículas de la muestra

en función de su tamaño. Generalmente se trata de una cromatografía de baja resolución de forma que se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación. También es muy útil para la determinación de la estructura terciaria y la estructura cuaternaria de las proteínas purificadas.

La cromatografía de filtración molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular, o más precisamente, según su radio de Stokes.

En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. A los fines prácticos, la columna se empaqueta con pequeñas partículas esféricas formadas por esos polímeros entrecruzados. En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta.

#### **2.9.5.1.4 Cromatografía de intercambio iónico**

En la cromatografía de intercambio iónico, la retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria. Los iones de la misma carga son

excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna. Algunos tipos de intercambiadores iónicos son: i) Resinas de poliestireno, ii) intercambiadores iónicos de celulosa y dextranos (geles) y iii) Silica porosa o vidrio de tamaño de poro controlado. En general los intercambiadores iónicos favorecen la unión de iones elevada carga y radio pequeño. Un incremento en la concentración del contraión (respecto a los grupos funcionales de la resina) reduce el tiempo de retención. Un incremento en el pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio catiónico mientras que una disminución del pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio aniónico. Este tipo de cromatografía es ampliamente utilizado en las siguientes aplicaciones: purificación de agua, concentración de componentes traza.

#### **2.9.5.1.5 Cromatografía basada en bioafinidad**

Este tipo de cromatografía se basa en la capacidad de las sustancias biológicamente activas de formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de estos complejos implica la participación de fuerzas moleculares como las interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre las partículas de la muestra y la fase estacionaria.

## **2.9.5.2 Parámetros**

### **2.9.5.2.1 Diámetro interno**

El diámetro interno de una columna de HPLC es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad. Las columnas de diámetro interno más grande (>10 mm) se utilizan normalmente en la purificación de compuestos para su utilización posterior. En cambio, las columnas de diámetro interno menor (4-5 mm) se utilizan en el análisis cuantitativo de las muestras, y se caracterizan por el aumento la sensibilidad y la minimización del consumo de disolventes que conllevan. Estas columnas se suelen denominar columnas de rango analítico y normalmente están asociadas a un detector UV-VIS. Aparte, existen otros tipos de columnas, como las de tipo capilar, con un diámetro inferior a 0.3 mm, utilizadas principalmente en espectrometría de masas.

### **2.9.5.2.2 Medida de las partículas**

La mayoría de HPLC tradicionales se realizan con una fase estacionaria unida al exterior de partículas esféricas de silica. Estas partículas pueden tener diferentes medidas, siendo las de 5 μm de diámetro las más utilizadas. Partículas más pequeñas ofrecen una mayor superficie y una mejor separación, pero la presión que se requiere por obtener una velocidad lineal óptima aumenta de forma inversamente proporcional al cubo del diámetro de la partícula. Esto

significa que disminuir la medida de las partículas a la mitad, aumentaría la resolución de la columna, pero a la vez, aumentaría la presión necesaria en un factor de ocho.

#### **2.9.5.2.3 Tamaño de poro**

Muchas fases estacionarias son porosas para proporcionar una mayor superficie. Los poros pequeños proporcionan una mayor superficie mientras que los poros de mayor medida proporcionan una cinética mejor, especialmente para los compuestos de tamaño más grande; por ejemplo, una proteína que sea ligeramente más pequeña que el tamaño de los poros puede entrar, pero difícilmente saldrá con facilidad.

#### **2.9.5.2.4 Presión de la bomba**

La presión de las bombas es variable según el modelo y fabricante, pero su rendimiento se mide en su habilidad para generar un flujo constante y reproducible. La presión puede lograr valores de hasta 40 MPa (o unas 400 atmósferas). Los aparatos más modernos de HPLC incorporan mejoras para poder trabajar a presiones más altas y, por lo tanto, poder utilizar partículas de tamaño más pequeño en las columnas (< 2 micrometros). Estos nuevos aparatos, denominados Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) pueden trabajar con valores de hasta 100 MPa de presión (unas 1000 atmósferas). (Hay que tener en cuenta que las siglas UPLC son una marca registrada de

Waters Corporation aunque a veces se utilizan de forma general para designar este tipo de aparatos.)



## 3. METODOLOGÍA

### 3.1 metodología de la investigación:

#### 3.1.1 Recurso humano:

- Investigador: Br. Adrian Antonio Soberanis Ibáñez
- Asesor: Inga. Telma Maricela Cano Morales

#### 3.1.2 Recurso físico:

- Laboratorio de la sección Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniería, Facultad de Ingeniería USAC.
- Laboratorio del Área de Química de la escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería USAC.
- Laboratorio del LIPRONAT, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio del Departamento de Toxicología, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

#### Reactivos:

- Agua desmineralizada, marca Salvavidas
- Alcohol Etílico al 95 % v/v. Peso molecular 46.022 g/mol.

## Equipo:

- Molino de discos escala laboratorio.
- Balanza analizador de humedad, Marca Sartorius, modelo MA 150, 150 g máximos, rango de temperatura de 40 °C a 220 °C.
- Calentador-agitador, marca Corning, modelo PC-620, 120V/100V, frecuencia 60Hz, Potencia 1113w, rango 0 – 480°C, 0 – 1100 rpm.
- Bomba de vacío, marca –gast, vacío hasta 30 in Hg, manómetros analíticos, modelo 100-115v, frecuencia 50Hz potencia 1/4Hp, revoluciones 1725/1425rpm.
- Balanza Marca: Adventur serie: G1231202040133 Voltaje 8-14.5V frecuencia 50/60 Hz. Máxima Capacidad 150g, Lectura mínima 0.001g Hecha en U.S.A.
- Campana de extracción de 110 V y 900 Watts, marca Serproma de motor con capacidad de ¾ Hp.
- Lámpara Estroboscópica, Marca AMETEK Mansfield & Green Division, corriente AC 110V; rango de flash por minuto 2 a 60 (X 100) (200rpm-6000rpm); rango de trabajo intermitente (½ time ON, ½ time OFF) 10 minutes for ambient up to 30°C (80°F) 5 minutes for ambient up to 50°C (120°F).
- Cronómetro digital, con marcador de segundos, minutos y hora, marca CASIO.

## **3.2 Metodología experimental:**

### **3.2.1 Diseño de tratamientos**

La materia prima fue proporcionada por la empresa Café Internacional de Cobán. El material se encontró inicialmente en vainas secas, y se trasladó a bolsas tipo Ziploc para evitar que la humedad del material cambiara y perdiera fracciones volátiles presentes en la materia prima. Se plantearon 2 metodologías, estática y dinámica, a tres temperaturas diferentes (25 °C, 50 °C y 78 °C), se realizó cinco tratamientos para cada metodología, obteniendo un total de 30 tratamientos.

### **3.2.2 Manejo experimental**

Debido a que es necesario comparar la eficiencia de cada uno de los métodos, se utilizaron los mismos parámetros de control. Se realizaron las primeras lixiviaciones utilizando como una metodología testigo la extracción sólido-líquido con equipo de extracción Soxhlet, se utilizó este equipo ya que este equipo teóricamente es el más eficiente para la extracción sólido-líquido. Este equipo definió variables como el tiempo de extracción y la relación soluto-solvente.

A partir de la experimentación con el equipo Soxhlet, se realizaron procesos extractivos con un equipo de maceración a reflujo utilizando como solvente extractor, alcohol etílico ( $\text{CH}_2\text{CH}_3\text{OH}$ ) al 95%, en el que se realizaron extracciones a tres temperaturas; temperatura ambiente, 50

°C y a temperatura de ebullición del solvente. Se definió el tamaño de partícula entre 841 y 1190 micrones (Partículas que pasen el tamiz No. 16 y las retenga el tamiz No. 20) y con una humedad menor a 15%, que es la humedad a la cual se comercializa el producto.

### **3.2.2.1 Preparación de la muestra**

1. Se secó la materia prima recolectada, hasta una humedad menor al 15 %.
2. Se realizó la molienda de la materia prima, esto con el fin de tener una mayor área de transferencia de masa.
3. Se tamizó la materia prima, con el objetivo de tener un tamaño de partícula entre 841 y 1190 micrones.

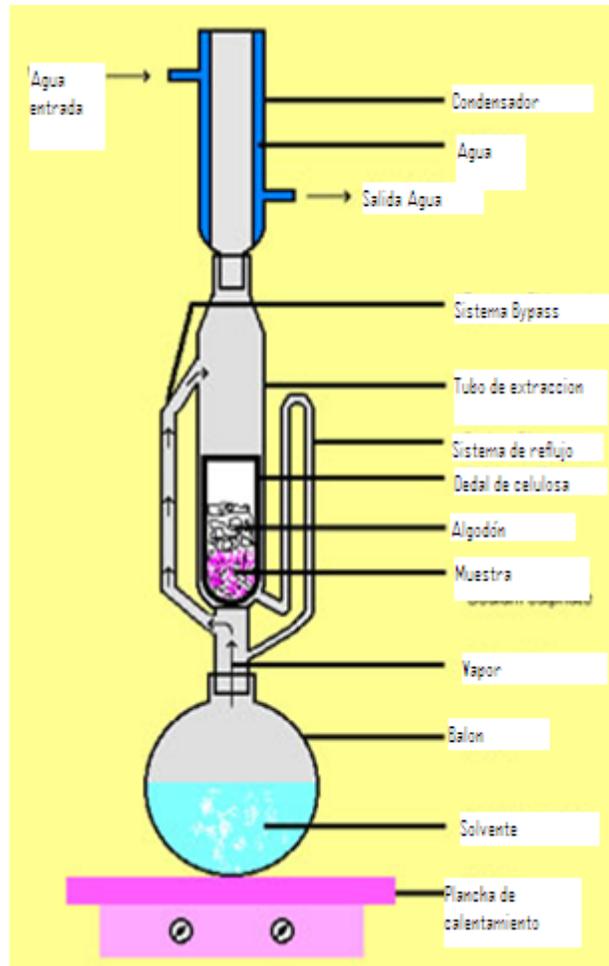
### **3.2.2.2 Lixiviación utilizando equipo de percolación Soxhlet:**

Este es un proceso de lixiviación que se lleva a cabo entre dos fases, una fase sólida y una fase líquida, una fase estática (sólido) y la fase líquida es móvil. Como se puede ver en la Figura 10, el solvente se encuentra en un matraz, de fondo plano o redondo, el cual es agitado con un agitador magnético, se eleva la temperatura al punto de ebullición del solvente, esto con el objetivo de que el solvente evaporado se desplace en el bypass ubicado en el equipo de extracción soxhlet para luego condensarse en el refrigerante Allihn o de bolas y depositarse en el tubo extractor, donde se encuentra la materia prima dentro de un dedal de celulosa. Una vez el nivel del soluto alcanza la altura del tubo de reflujo se produce el efecto de sifón que regresa el solvente al matraz de

fondo plano, donde se repite el proceso. El tiempo de contacto entre el soluto y el solvente es variable, ya que cada uno de los ciclos es variable y depende muchas veces de las pérdidas de calor que se puedan presentar en el sistema. En este método extractivo es necesario tomar como parámetro de control del proceso la temperatura a la cual el solvente alcanza el punto de ebullición.

Durante este proceso se llevará a cabo un proceso de monitoreo para determinar el final de la extracción, se tomarán alícuotas del solvente que se encuentre dentro del equipo Soxhlet para poder determinar valores de densidad. El punto final será cuando la densidad del solvente presente dentro del equipo Soxhlet sea bastante similar a la que el solvente presentaba al inicio de la extracción.

Figura 10. Equipo de extracción Soxhlet



### 3.2.2.3 Extracción mediante maceración dinámica con reflujo con variaciones de temperatura. (25 °C, 50 °C y 78 °C)

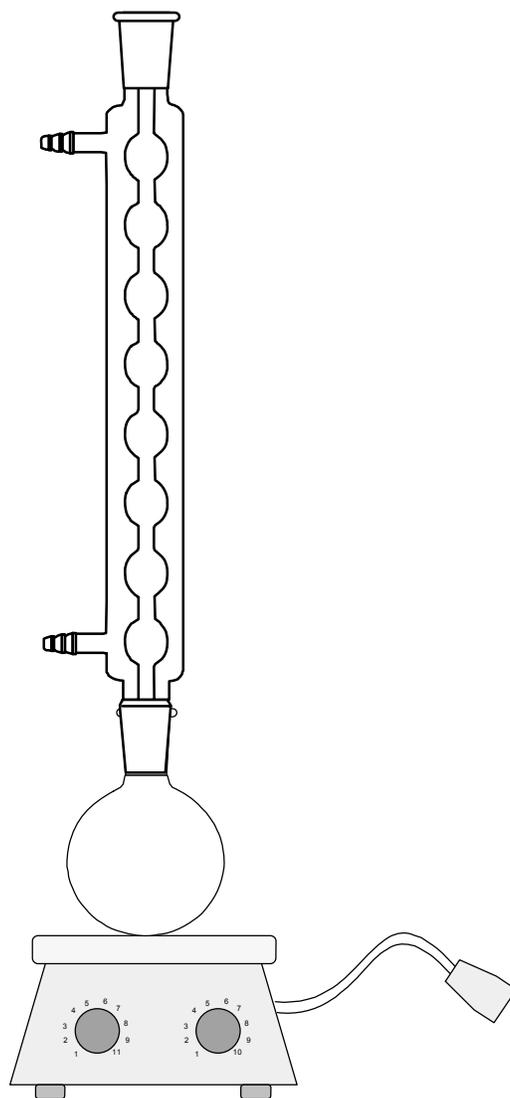
En este método de extracción las dos fases son móviles. Se colocó la muestra en un matraz y se puso en contacto directo con el solvente, debido a que la temperatura de ebullición del solvente es baja y su presión de vapor es alta, al sistema se acopló un condensador de Allihn, al llevar la temperatura del sistema a 50 °C y a la temperatura de

ebullición del solvente la presión de vapor aumenta, por lo que el uso de un condensador de Allihn se hace mas necesario. Ambas fases se someten a un proceso de agitación durante todo el tiempo extractivo.

#### **3.2.2.4 Extracción mediante maceración estática con reflujo con variación de temperatura. (25 °C, 50 °C y 78 °C)**

Estos procesos se realizó de la misma manera que los descritos anteriormente, la única diferencia que hay con respecto a estos, es que el proceso se llevó a cabo sin ningún tipo de agitación más que la que se pueda producir por las corrientes convectivas que se presentan debido al aumento en la temperatura del sistema.

Figura 11. Equipo de extracción con maceración dinámica con reflujo.



### 3.2.2.5 Manejo de Productos y residuos

Al finalizar el proceso extractivo, se realizó mediciones de densidad a cada uno de los extractos etanólicos obtenidos así como de la materia prima exhausta. Se recolectó el alcohol en el proceso de rotaevaporación para su uso posterior.

### 3.3 Diseño experimental

Se realizó un análisis de varianza en una sola dirección, debido a que solo se analizó un factor con dos tratamientos con cinco corridas cada uno, para tener un arreglo matricial de treinta observaciones.

Tabla III. Datos requeridos para un experimento en una dirección, con a tratamientos y n repeticiones.

Procedimiento	Variaciones de temperatura			Convección
	T1	T2	T3	
Maceración dinámica	MD1 [MD1.1....MD1.5]	MD2 [MD2.1....MD2.5]	MD3 [MD3.1....MD3.5]	Forzada
Maceración estática	ME1 [ME2.1....ME2.5]	ME2 [ME2.1....ME2.5]	ME3 [ME3.1....ME3.5]	Natural
Maceración Soxhlet	Técnica de referencia			

Donde

$Y_i$  = es el total de las observaciones bajo i-ésimo tratamiento

$\mu_i$  = es el promedio de las observaciones bajo i-ésimo tratamiento, similarmente sea  $Y$  la suma de todas las observaciones y  $\bar{Y}$  la media general de las observaciones.



## 4. RESULTADOS

Tabla IV. Porcentaje de rendimiento de la oleorresina de cardamomo obtenida utilizando maceración estática a temperatura ambiente.

Metodología	Código	Corrida	%Rendimiento
Maceración estática en frío (T = 25°C)	<b>MEF 1</b>	1	14.213
	<b>MEF 2</b>	2	12.087
	<b>MEF 3</b>	3	11.481
	<b>MEF 4</b>	4	16.206
	<b>MEF 5</b>	5	17.813
	Promedio		14.360
	Desviación estándar.		2.684

Fuente: sección datos calculados

Tabla V. Porcentaje de rendimiento de la oleorresina de cardamomo obtenida utilizando maceración dinámica a temperatura ambiente.

Metodología	Código	Corrida	%Rendimiento
Maceración dinámica en frío (T = 25°C)	<b>MDF 1</b>	1	22.023
	<b>MDF 2</b>	2	21.453
	<b>MDF 3</b>	3	19.189
	<b>MDF 4</b>	4	21.268
	<b>MDF 5</b>	5	20.910
	Promedio		20.968
	Desviación estándar		1.073

Fuente: sección datos calculados

Tabla VI. Porcentaje de rendimiento de la oleorresina de cardamomo obtenida utilizando maceración estática a 50°C.

<b>Metodología</b>	<b>Código</b>	<b>Corrida</b>	<b>%Rendimiento</b>
Maceración estática en caliente (T = 50°C)	<b>MEC 1</b>	1	6.612
	<b>MEC 2</b>	2	5.550
	<b>MEC 3</b>	3	5.429
	<b>MEC 4</b>	4	5.126
	<b>MEC 5</b>	5	5.643
		Promedio	5.672
		Desviación estándar	0.560

Fuente: sección catos calculados

Tabla VII. Porcentaje de rendimiento de la oleorresina de cardamomo obtenida utilizando maceración dinámica a 50°C.

<b>Metodología</b>	<b>Código</b>	<b>Corrida</b>	<b>%Rendimiento</b>
Maceración dinámica en caliente (T = 50°C)	<b>MDC 1</b>	1	14.311
	<b>MDC 2</b>	2	12.526
	<b>MDC 3</b>	3	12.706
	<b>MDC 4</b>	4	13.129
	<b>MDC 5</b>	5	11.515
		Promedio	12.837
		Desviación estándar	1.015

Fuente: sección datos calculados

Tabla VIII. Porcentaje de rendimiento de la oleorresina de cardamomo obtenida utilizando maceración estática a ebullición (T=78.5 °C).

<b>Metodología</b>	<b>Código</b>	<b>Corrida</b>	<b>%Rendimiento</b>
Maceración estática en caliente (T = 78.5°C)	<b>MEE 1</b>	1	12.755
	<b>MEE 2</b>	2	11.839
	<b>MEE 3</b>	3	11.613
	<b>MEE 4</b>	4	10.153
	<b>MEE 5</b>	5	11.309
		Promedio	11.534
		Desviación estándar	0.942

Fuente: datos calculados

Tabla IX. Porcentaje de rendimiento de la oleorresina de cardamomo obtenida utilizando maceración dinámica a ebullición (T=78.5 °C).

<b>Metodología</b>	<b>Código</b>	<b>Corrida</b>	<b>%Rendimiento</b>
Maceración dinámica en caliente (T = 78.5°C)	<b>MDE 1</b>	1	8.508
	<b>MDE 2</b>	2	7.149
	<b>MDE 3</b>	3	7.175
	<b>MDE 4</b>	4	7.186
	<b>MDE 5</b>	5	7.478
		Promedio	7.499
		Desviación estándar	0.580

Fuente: datos calculados

Tabla X. Porcentaje de rendimiento de la oleoresina de cardamomo obtenida utilizando el equipo de extracción Soxhlet

Metodología	Código	Corrida	%Rendimiento
Equipo de extracción Soxhlet	SOX 1	1	21.439
	SOX 2	2	21.095
	SOX 3	3	22.490
	SOX 4	4	21.091
	SOX 5	5	22.519
		Promedio	21.727
		Desviación estándar	0.724

Fuente: datos calculados

Tabla XI. Presencia de metabolitos secundarios cromatografía en capa fina.

	Maceración estática a 25°C	Maceración dinámica a 25°C	Maceración estática a 50°C	Maceración dinámica a 50°C	Maceración estática a 78°C	Maceración dinámica a 78°C	Extracción Soxhlet
Geraniol			X	X	X	X	X
1,8 Cineol		X	X	X	X	X	
Linalool		X	X	X	X	X	
Limoneno		X	X		X	X	X
Terpineol		X	X	X	X	X	X
γ-Terpineno							

\* X: indica presencia del metabolito secundario para el método indicado.

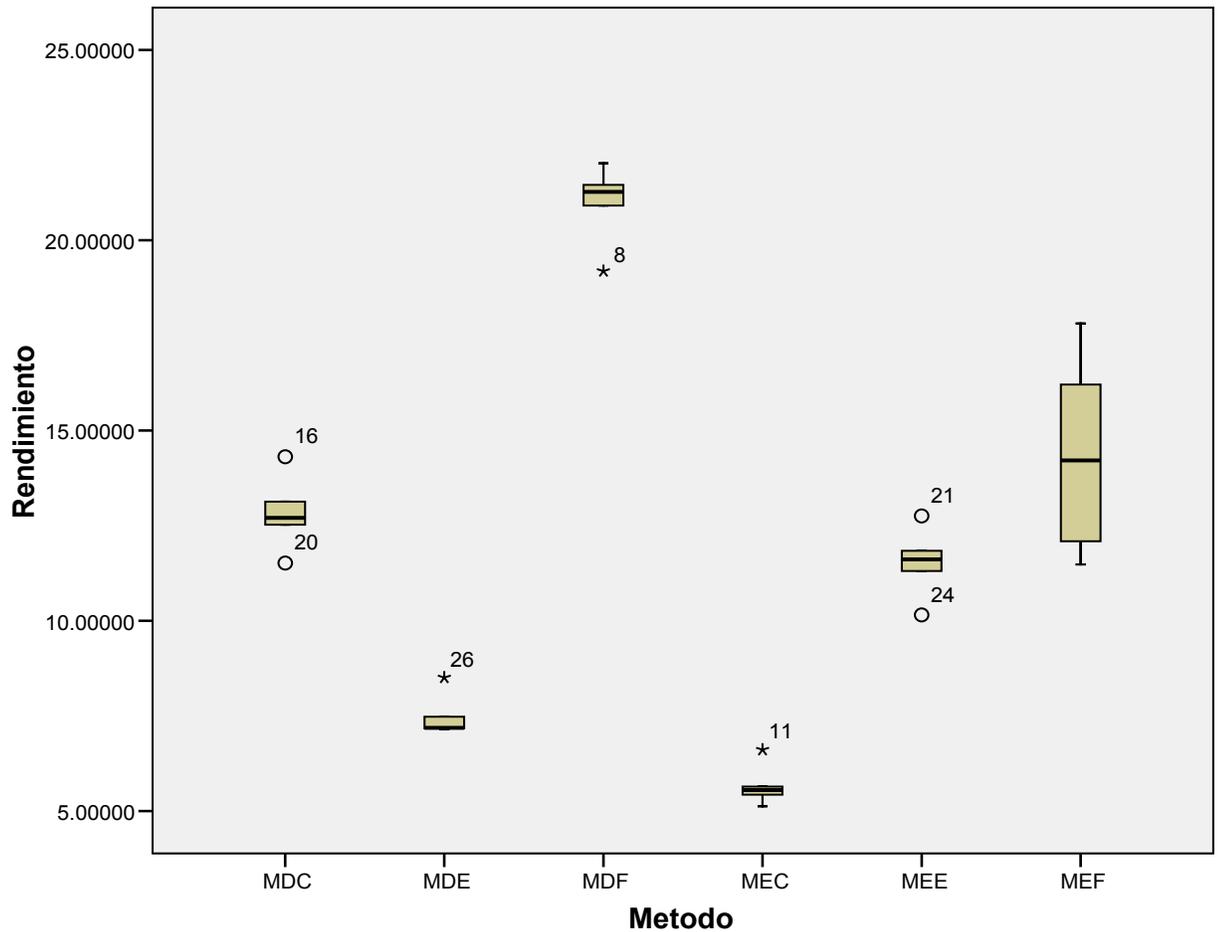
Tabla XII. Metabolitos secundarios detectados en la oleorresina de cardamomo utilizando cromatografía en capa gaseosa acoplada a espectrofotometría de masas.

Método	Metabolito secundario	Tiempo de retención	Área (%)
<b>Maceración estática a 25°C</b>	Nerolidol	12.57	19.11
	4 metil fenil ester	12.68	15.41
	8-Hidroxicarvotanacetona	11.72	7.77
	Etanona	12.39	7.77
	Canfeno	11.06	7.15
	Glicol Limoneno	11.02	5.72
	Endo isocamfenona	13.12	4.38
	Piridinona	11.35	3.96
	5 metil 2-(1-metiletil)	10.54	3.81
	Etil 9-octadecanoato	16.2	3.27
	Carveol	10.02	2.78
	Acido Hexadecanoico	15.09	2.56
	Mentatrieno	12.23	2.33
	$\alpha$ terpinoleno	12.77	2.27
	Eudesmol	13.42	2.16
	$\alpha$ -trans-sequiciclogeraniol	13.6	2.14
	Tetrametil benceno	10.87	1.99
<b>Maceración dinámica a 25°C</b>	Acetato de $\alpha$ terpinilo	11.07	33.82
	Nerolidol	12.57	21.36
	Limoneno	8.2	16.03
	2 Cliclohexen-1-nona, 2 metil	12.68	14.5
	Carvacrol	10.54	8.26
	1(7), 5, 8 -0- Menthatrieno	11.71	6.03
<b>Maceración estática a 50°C</b>	Acetato de $\alpha$ terpinilo	11.08	56.81
	Limoneno	8.21	24.99
	$\beta$ .3- Careno	8.83	6.5
	$\alpha$ terpineol	9.8	5.49
	Acetato de linalilo	10.22	4.25
	Nerolidol	12.58	1.96
<b>Maceración dinámica a 50°C</b>	Acetato de $\alpha$ terpinilo	11.08	53.9
	Limoneno	8.21	18.94
	Nerolidol	12.58	11.46
	Acetamida	12.69	5.91
	Fenol, 2-metil-5-(1-metietil)	10.55	5.11
	$\alpha$ - Terpineol	9.8	4.68
<b>Maceración estática a 78°C</b>	Acetato de $\alpha$ terpinilo	11.09	58.39

	Limoneno	8.21	24.05
	Linalool	8.84	6.57
	$\alpha$ terpineol	9.8	5.45
	Acetato de linalilo	10.22	3.49
	Nerolidol	12.58	2.05
<b>Maceración dinámica a 78°C</b>	Acetato de $\alpha$ terpinilo	11.07	55.76
	Limoneno	8.19	25.83
	$\beta$ - Pineno	8.83	7.29
	$\alpha$ - Terpineol	9.78	5.88
	Acetato de linalilo	10.22	3.33
	Nerolidol	12.57	1.89
<b>Equipo de extracción Soxhlet</b>	Limoneno	8.91	21.97
	Linalool	8.84	6.21
	$\alpha$ -terpineol	9.79	5
	Acetato de linalilo	10.22	3.3
	Acetato de $\alpha$ - terpinelil	11:08	61.78
	Nerolidol	12.57	1.73

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Figura 12. Distribución de los resultados experimentales del porcentaje de oleorresina cardamomo en función del método de extracción.



Fuente: análisis estadístico

Tabla XIII. Análisis de varianza para el porcentaje de rendimiento de oleoresina de cardamomo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significancia
Modelo corregido	222.483(a)	5	44.497	80.754	.000
Intercepto	1339.153	1	1339.153	2430.343	.000
Método	222.483	5	44.497	80.754	.000
Error	13.224	24	.551		
Total	1574.860	30			
Corrección total	235.707	29			

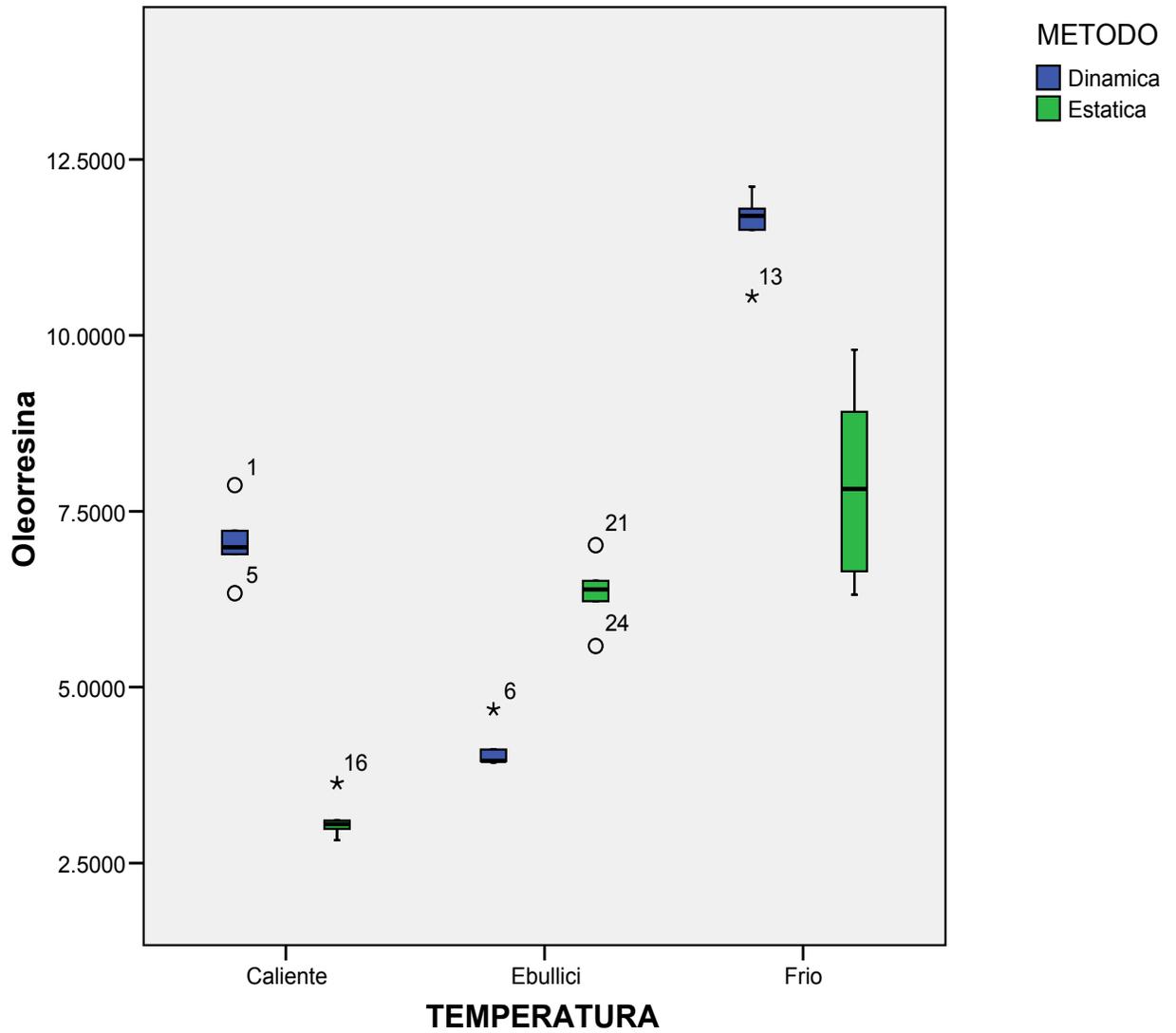
Fuente: análisis estadístico bifactorial

Tabla XIV. Prueba de Duncan para las medias del porcentaje de rendimiento de oleoresina de cardamomo.

Método	N	Grupo				
		1	2	3	4	5
MEC	5	3.120800				
MDE	5		4.126400			
MEE	5			6.345400		
MDC	5			7.061600	7.061600	
MEF	5				7.898600	
MDF	5					11.534400
Significancia		1.000	1.000	.140	.087	1.000

Fuente: análisis estadístico de Duncan.

Figura 13. Distribución de los resultados experimentales del porcentaje de oleorresina cardamomo en función de la temperatura.



Fuente: análisis estadístico.

Tabla XV. Análisis de varianza para el porcentaje de rendimiento de oleorresina de cardamomo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significancia
Metodo	79.042	1	79.042	43.426	.000
Temperatura	457.234	2	228.617	125.604	.000
Metodo * temperatura	199.195	2	99.597	54.720	.000
Error	43.683	24	1.820		
Corrección Total	779.154	29			

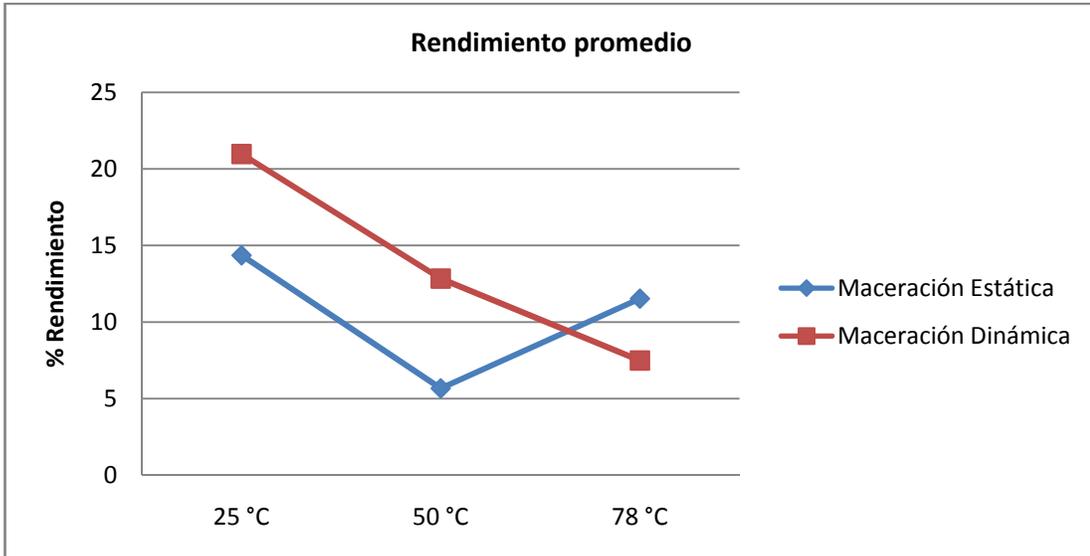
Fuente: análisis estadístico de Duncan.

Tabla XVI. Comparación de Duncan para las medias del porcentaje de rendimiento de oleorresina de cardamomo.

TEMPERATURA	N	Grupos	
		1	1
Caliente	10	9.2547625	
Ebullición	10	9.5165468	
Frio	10		17.6641609
Sig.		.668	1.000

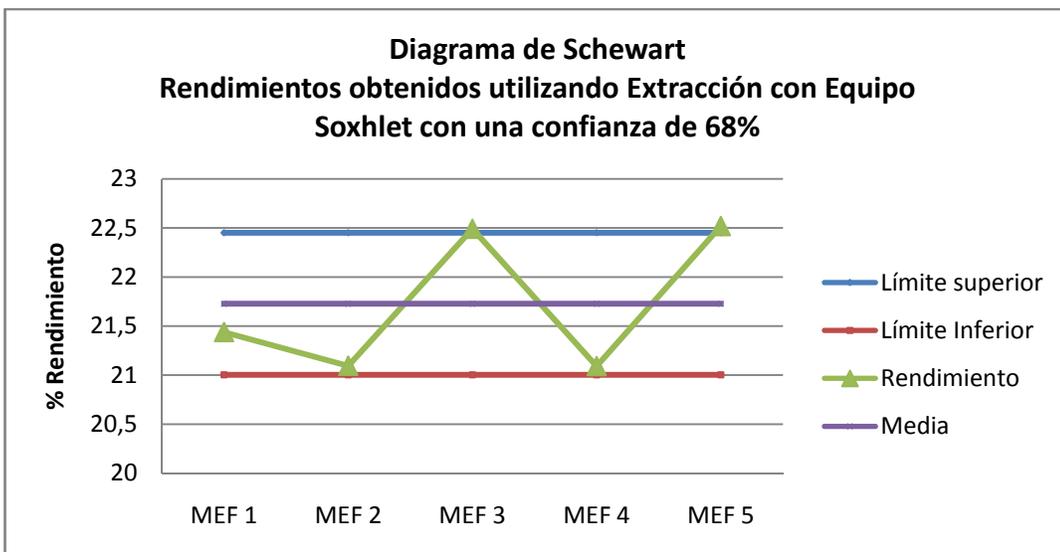
Fuente: análisis estadístico de Duncan.

Figura 14. Medias del porcentaje de rendimiento de oleorresina de cardamomo de acuerdo al método en función de la temperatura.



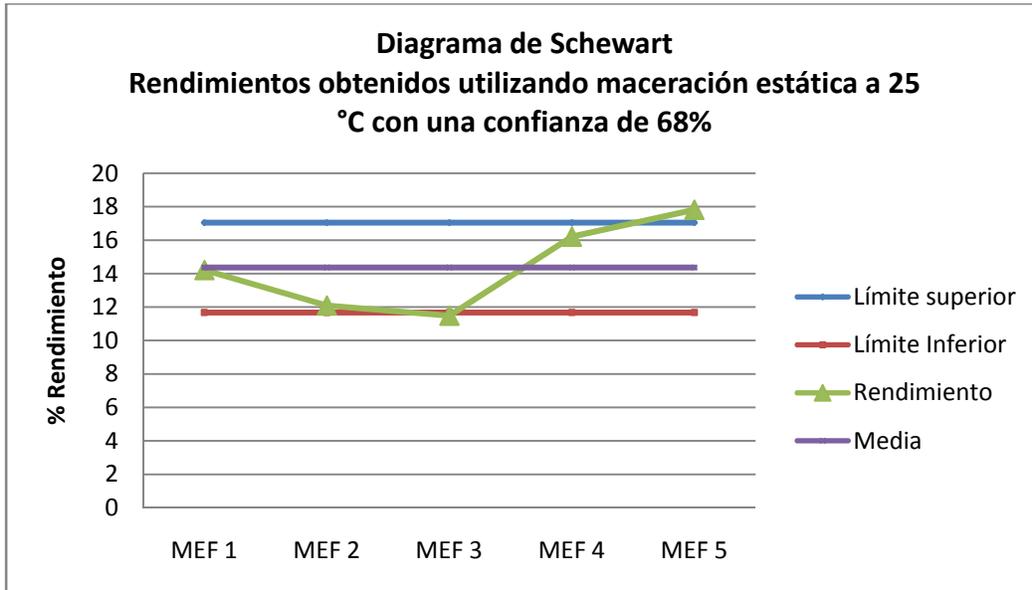
Fuente: análisis estadístico.

Figura 15. Diagrama de Schewart para el equipo de extracción Soxhlet con una confianza de 68%



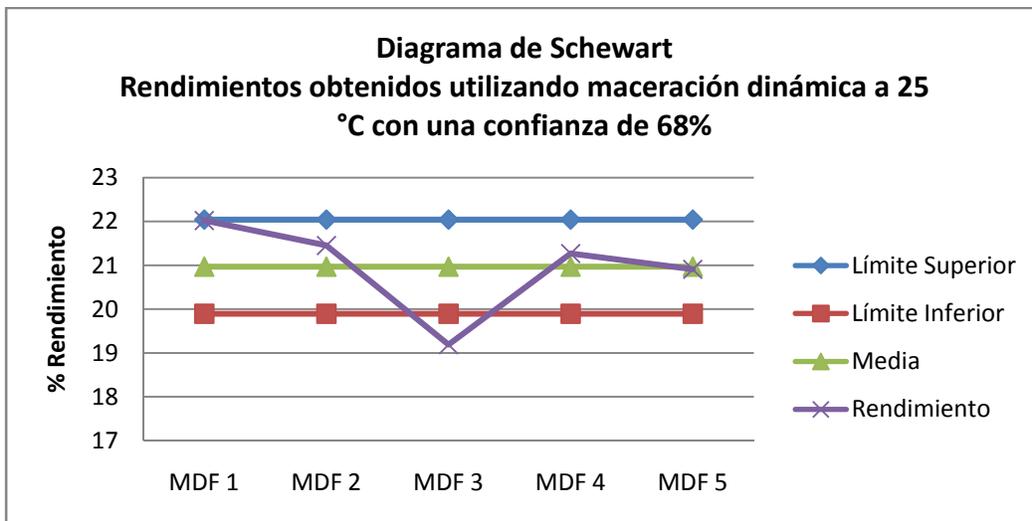
Fuente: análisis estadístico.

Figura 16. Diagrama de Schewart para la maceración estática a 25 °C con una confianza de 68%.



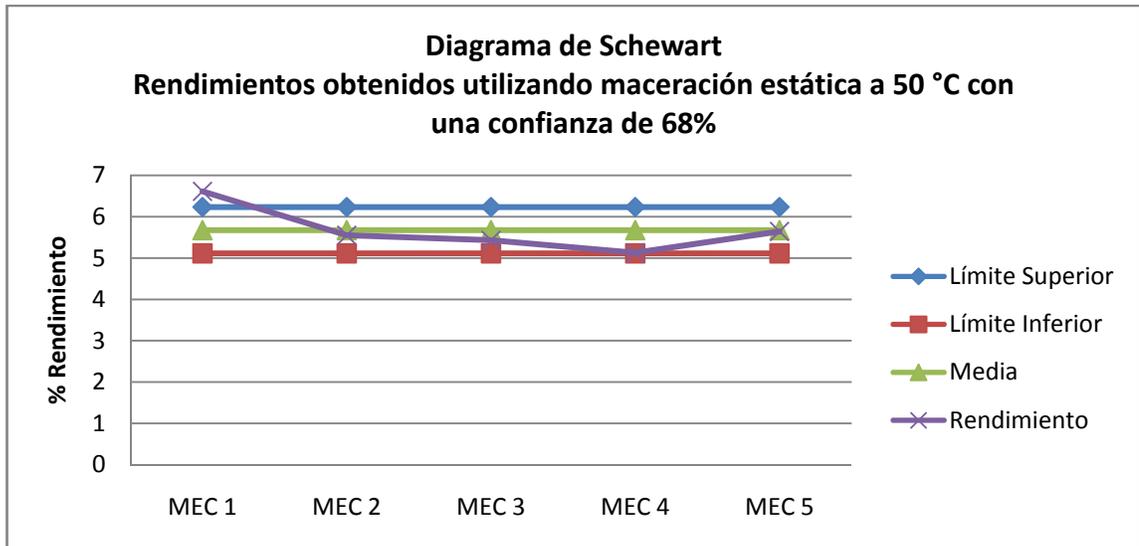
Fuente: análisis estadístico

Figura 17. Diagrama de Schewart para la maceración dinámica a 25 °C con una confianza de 68%.



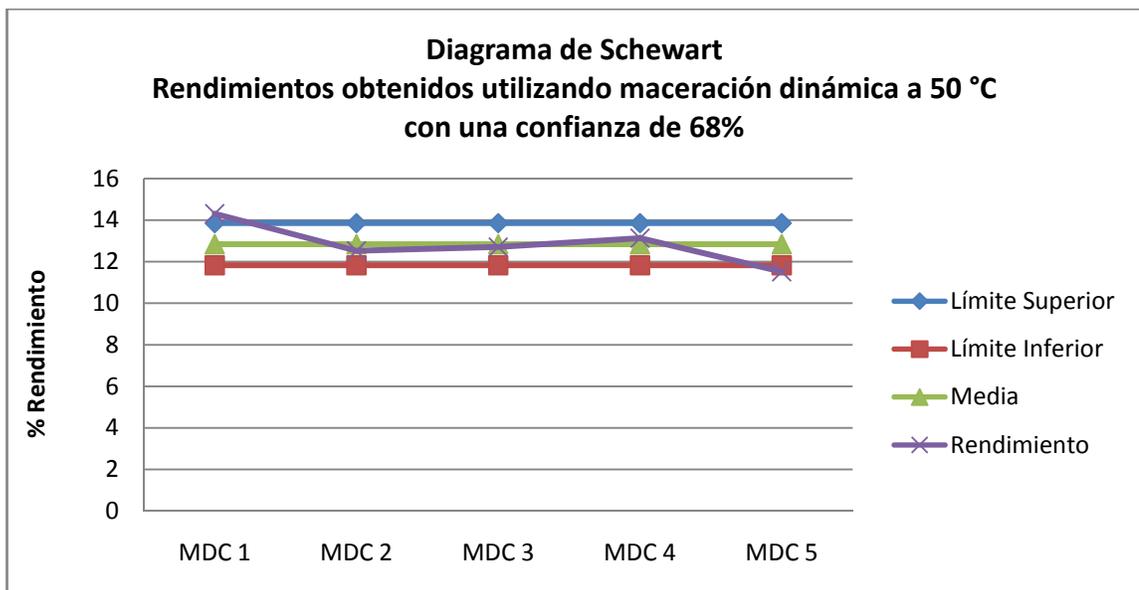
Fuente: análisis estadístico.

Figura 18. Diagrama de Schewart para la maceración estática a 50 °C con una confianza de 68%.



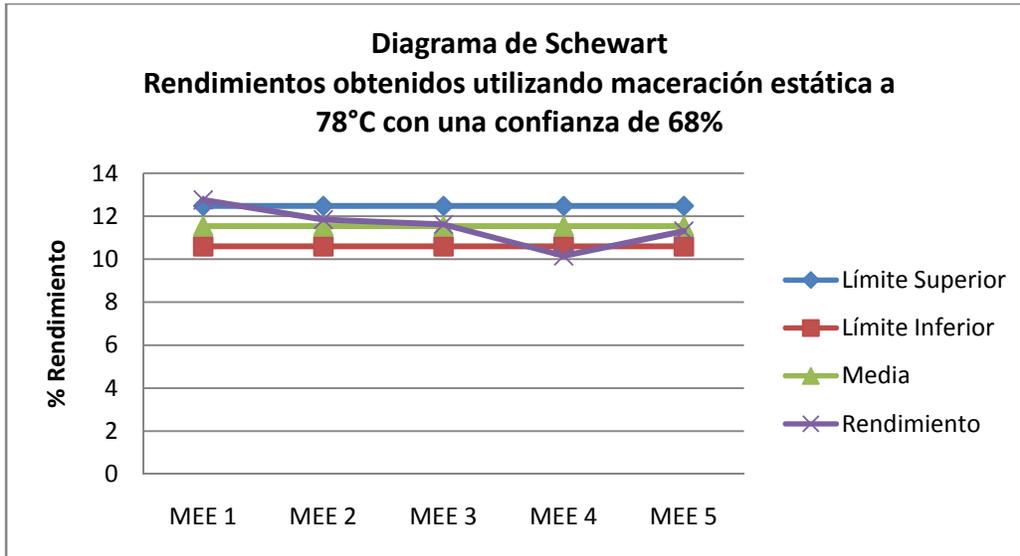
Fuente: análisis estadístico

Figura 19. Diagrama de Schewart para la maceración dinámica a 50 °C con una confianza de 68%.



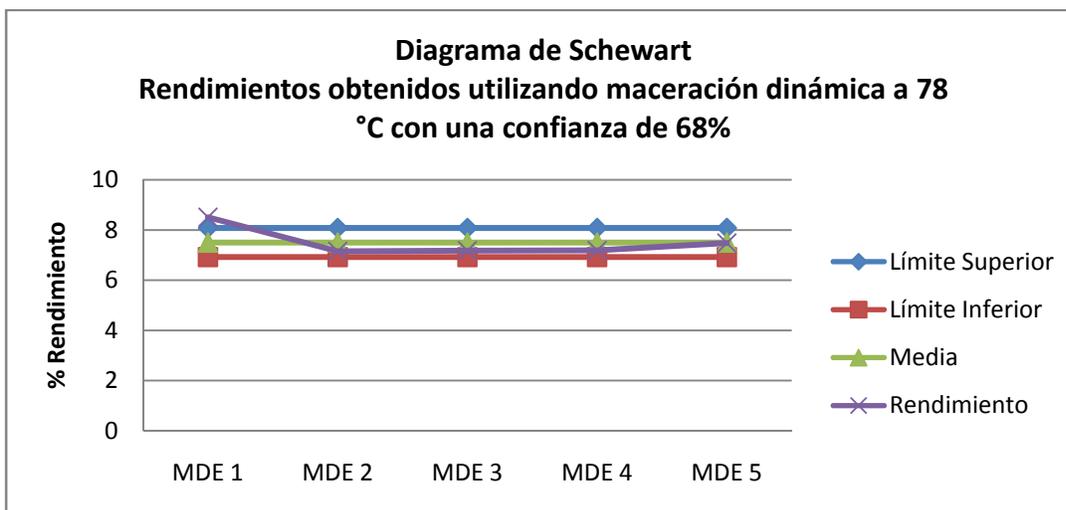
Fuente: análisis estadístico

Figura 20. Diagrama de Schewart para la maceración estática a 78 °C con una confianza de 68%.



Fuente: análisis estadístico

Figura 21. Diagrama de Schewart para la maceración dinámica a 78 °C con una confianza de 68%.



Fuente: análisis estadístico

## 5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo de graduación se llevó a cabo una separación sólido-líquido con la finalidad de obtener un extracto oleoso de la semilla de cardamomo evaluando los posibles efectos de la temperatura y la agitación en la obtención de la misma.

Se analizaron tres diferentes temperaturas de extracción (25°C, 50°C y 78 °C) combinadas con dos diferentes estados de movimiento, estático y dinámico utilizando un mismo solvente, Alcohol Etilico al 95%.

La materia prima fue donada por la empresa Café Internacional de Cobán. Se obtuvieron bayas de cardamomo, secadas previamente, de las que se extrajeron las semillas contenedoras de metabolitos presentes en la oleorresina del mismo.

Una vez se obtuvieron las semillas, se procedió a comprobar que la humedad de la misma se encontrara en el rango especificado (menor al 15%) , se realizó un primer proceso de separación, se obtuvo partículas entre 841 y 1190 micrones, las partículas que se encontraron por debajo de este rango se desecharon y las que se encontraron por arriba de 1190 micrones fueron sometidos a un proceso de molienda utilizando un molino de tornillo escala laboratorio hasta alcanzar el rango de tamaño de partícula planteado.

Previo a la maceración dinámica o lixiviación se realizaron pruebas preliminares para determinar las variables de proceso. Primero se realizaron calibraciones de los equipos de calentamiento y agitación, esto para normalizar

los procedimientos a evaluar, de estos procesos de calibración se determinó que la agitación se realizaría a 800 rpm.

A continuación se realizaron extracciones piloto utilizando como parámetro la extracción con equipo Soxhlet. Aquí se definieron parámetros de control importantes en todo el proceso investigativo, se determinó el tiempo de extracción y la relación soluto-solvente, ya que esta técnica es teóricamente la más adecuada para este proceso. Al analizar el comportamiento de la densidad del extracto dentro de la unidad de extracción Soxhlet, como se puede observar en la Figura 22, alrededor de los 15 ciclos la densidad del solvente dentro de la unidad extractora es de la misma magnitud que el solvente puro, tomando en cuenta que cada ciclo se efectúa en un promedio de 10 minutos, el tiempo máximo de cada extracción se definió de 150 minutos o 2.5 horas. También se obtuvieron extractos patrón para determinar la presencia de metabolitos secundarios con este método y también para definir el rendimiento máximo promedio que fue de 21.762 % con una desviación de 0.724 %.

La relación soluto-solvente se define de la misma forma que el tiempo de extracción. Para esto se realizó el aforo de la unidad extractora Soxhlet y se midió la cantidad de materia en el dedal, de aquí se obtuvo que la relación soluto-solvente es de 1g: 5.45mL.

Previo al inicio de las extracciones se tomó la densidad relativa de la materia prima fresca, de esta manera se corroborará la extracción de los metabolitos secundarios de la misma. Al finalizar la extracción se llevó a cabo la medición de la densidad de la materia agotada, comprobando de esta manera que la magnitud de este parámetro fue correspondiente al porcentaje de

rendimiento obtenido en cada uno de los métodos evaluados. Mostrando para los rendimientos más altos, densidades relativas mas bajas, tal y como se puede observar en las Tablas XIII y XIV.

Se realizó cinco extracciones para cada una de las variaciones propuestas, lo que nos da 30 extracciones diferentes. Se determinó la validez estadística de los datos obtenidos utilizando diagramas de Schewart y diagramas de tambor y alambre, que se pueden observar en las figuras de 12 a la 20, que demostraron la confiabilidad estadística de los datos. Se evaluó si existe diferencia significativa en el rendimiento de cada uno de los métodos, para esto se recurrió a un análisis de varianza, con el que se determinó que sí existe una diferencia significativa entre todos los métodos, demostrando de esta forma que cada una de las variaciones realizadas tiene un efecto considerable en el rendimiento de oleoresina obtenido. De los valores obtenidos se puede observar que la maceración dinámica a 25 °C es la que presenta el rendimiento más alto (20.97 +/- 1.07 %).

Luego se determinó la presencia de grupos que no presenten diferencia significativa entre ellos. Para esto se realizó una prueba de Duncan, de esta manera se puede determinar que los grupos que no presentan una diferencia significativa entre ellos son: la maceración estática a 78 °C, maceración dinámica a 50 °C y la maceración estática a 25 °C. También se puede observar que los otros tres métodos presentan una diferencia significativa entre ellos y para con este grupo anteriormente mencionado.

La última prueba estadística que se realizó fue un análisis de tendencia, en primero lugar tomando como base la temperatura de trabajo y luego la

presencia de agitación o no, esto se ve reflejado en las Figuras 12 a la 14. En ambos casos se observó una tendencia lineal para los métodos estáticos, no así en los métodos que contaron con agitación, específicamente el método que se realizó a condiciones de agitación a 800 rpm y 78 °C es el que crea la no linealidad en la tendencia. Es necesario que se realice un estudio exclusivamente para evaluar los efectos de la agitación y temperatura en la obtención de extractos oleosos tomando diferentes niveles de agitación y diferentes temperaturas de análisis.

A la par del análisis estadístico de los rendimientos obtenidos se llevó a realizó el estudio fitoquímico de los extractos obtenidos, esto con el objetivo de determinar cuales son los metabolitos presentes y si estos varían en alguna de las metodologías estudiadas. Primero se realizó una prueba de cromatografía en capa fina para determinar la presencia de ciertos metabolitos que según la bibliografía consultada se encuentran presentes en el aceite esencial de cardamomo, Geraniol, 1,8 Cineol, Linalool, Limoneno, Terpineol y  $\gamma$ -Terpineno. Se tomaron muestras al azar que fueron analizadas por este método y cuyos resultados se encuentran en la tabla X. Al observar detenidamente esta tabla se puede observar que en ninguno de los extractos analizados se encontró presencia de  $\gamma$ -Terpineno, así como el hecho de que la extracción obtenida en el equipo de extracción Soxhlet no muestre presencia de 1, 8 Cineol ni Linalool. Sin embargo lo que mas llama la atención es que para la Maceración estática a 25 °C (MEF) no se encontró presencia de ninguno de los metabolitos anteriormente analizados. En análisis cromatográfico realizado se encuentra retratado en la figura 26.

Esta prueba es puramente presuntiva, a continuación se realizó una prueba confirmativa, Espectrofotometría de masas acoplado a cromatografía gaseosa. De esta prueba se obtuvieron cromatogramas para cada una de las muestras, seleccionadas de nuevo al azar, confirmando los resultados obtenidos en la cromatografía en capa fina. Los resultados de este ensayo se pueden observar en la tabla XI, se puede observar que en el caso de la maceración estática a 25 °C (MEF) no se encontraron los mismos metabolitos que en los otros extractos, esto quiere decir que la metodología no es adecuada para la obtención de oleorresina de cardamomo. Sin embargo en las muestras presentadas de los otros métodos se puede observar la presencia mayoritaria del acetato de  $\alpha$ -terpinilo en porcentajes mayores al 55% seguido de Limoneno en porcentajes entre 18 y 25 %, así como la presencia en menor escala de Linalool (entre 6 y 7%), Acetato de linalilo (entre 3 y 5 %), Nerolidol (entre 1 y 2 %). Estos se encuentran presentes también las oleorresinas obtenidas con el equipo de extracción Soxhlet.

La presencia de otros metabolitos en las oleorresinas obtenidas con métodos a temperatura ambiente es el reflejo de la degradación orgánica que se da de manera natural. Otra causa es que los compuestos terpenoides se encuentran en el material vegetal ligados a azúcares formando las llamadas agliconas, procesos que se ve favorecido con el aumento de la temperatura.



## CONCLUSIONES

1. Existe diferencia significativa en el rendimiento porcentual de la oleorresina de cardamomo obtenida en cada uno de los métodos de extracción en función de la temperatura.
2. El método con mayor rendimiento de oleorresina de cardamomo es la maceración dinámica a 25 °C.
3. El rendimiento de extracción es inversamente proporcional a la temperatura.
4. La agitación en el proceso extractivo favorece la extracción de la oleorresina de cardamomo.
5. Los metabolitos secundarios que se encuentran tanto en las oleorresinas extraídas como en la metodología de referencia, son el acetato de  $\alpha$ -terpinilo, Limoneno, Linalool y Nerolidol.
6. El metabolito secundario que se encuentra en mayor presencia en la oleorresina de cardamomo es el acetato de  $\alpha$ -terpinilo.
7. El tamizaje fitoquímico confirmó la presencia de Nerolidol en todas las extracciones.
8. El tamizaje fitoquímico mostró ausencia de los metabolitos secundarios referidos en la literatura, 1,8 Cineol, Geraniol,  $\beta$ -Pino, Linalool.



## RECOMENDACIONES

1. Socializar los resultados obtenidos en el presente estudio en las áreas de siembra de cardamomo, dando un uso alternativo como oleorresina a esta especie vegetal.
2. Realizar una evaluación del sistema de enfriamiento del proceso de extractivo en función del rendimiento de metabolitos secundarios.
3. Evaluar la eficiencia de las metodologías tratadas en este estudio con diferentes solventes extractores.
4. Realizar un estudio de vida de anaquel de las oleorresinas obtenidas por los métodos con mayor rendimiento para determinar si se dan procesos de descomposición.
5. Evaluar el efecto de la agitación con respecto a la temperatura para definir tendencias en el procedimiento.
6. Continuar con los estudios de extracción de metabolitos secundarios de la oleorresina de cardamomo, ya que estos son materia prima en la industria aromática y fitofarmacéutica.
7. Evaluar los metabolitos que la literatura refiere para el cardamomo mediante extracciones con hexano.
8. Realizar un estudio de aprovechamiento del acetato de  $\alpha$ -terpinilo, ya que es bastante abundante en la oleorresina de cardamomo.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bluncher. H. **Enciclopedia de Química Industrial.** Versión española de la 18ava. Edición Alemana. Corregida por A. Ernest y Dr. L. Neumann. Editorial Tecnos. Valverde 3°. Madrid. España. 1958. 1210pp – 1214pp.
2. Cáceres, Armando. **Plantas de uso medicinal en Guatemala.** Editorial Universitaria. Guatemala, 1999. Págs. 117-119.
3. Farell, Kenneth T. **Spices, condiments, and seasonings.** Editorial Avi Publishing Company, inc. Reino Unido, 1985. Págs. 60-65; 259-287.
4. Heath, Henry B. **Flavor Technology: Profiles, Products, applications.** Editorial Avi Publishing Company, inc. Reino Unido, 1978. Págs.111-115; 233-250; 266; 520.
5. Heath, Henry B. & Gary Reineccius. **Flavor Chemistry and Technology.** Editorial Avi Publishing Company, inc. Reino Unido, 1985. Págs. 162; 185-198; 409.
6. List, P. H. & P. C. Schmidt. **Phytopharmaceutical Technology.** Editorial Norh American Edition. Estados Unidos, 1989. Págs. 91-142.

7. Perry, Robert H. **Manual del Ingeniero Químico.** Editorial McGraw Hill. Séptima edición, 2001. Págs. 18-1 – 18-165; 19-1 – 19-79.
8. Sharapin, Nikolai. **Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos.** Editorial CYTED, Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Colombia, marzo del 2000. Págs. 17-25, 28-29, 101-104, 150-151, 179-183, 247.

## **REFERENCIAS ELECTRÓNICAS**

9. Wikipedia: <http://es.wikipedia.org/wiki/taninos>. Junio 2008.
10. AGEXPORT: [www.export.com.gt](http://www.export.com.gt). Junio 2008.
11. MAGA:  
[www.portal.maga.gob.gt/portal/page/portal/uc\\_upie/documentos/cardamomo\\_agronegocios.pdf](http://www.portal.maga.gob.gt/portal/page/portal/uc_upie/documentos/cardamomo_agronegocios.pdf) -. Junio 2008.
12. Acerca del Jardín: [www.about-garden.com](http://www.about-garden.com). Junio 2008.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bluncher. H. **Enciclopedia de química industrial.** Versión española de la 18 va. Edición Alemana. Corregida por A. Ernest y Dr. L. Neumann. Editorial Tecnos. Valverde 3°. Madrid. España. 1958. Págs. 1210 – 1214.
2. Heath, Henry B. **Flavor technology: profiles, products, applications.** Editorial Avi Publishing Company, inc. Reino Unido, 1978. Págs.111-115; 233-250; 266; 520.
3. Heath, Henry B. & Gary Reineccius. **Flavor chemistry and technology.** Editorial Avi Publishing Company, inc. Reino Unido, 1985. Págs. 162; 185-198; 409.
4. Molinari, Hector. **Química general y aplicada a la industria química orgánica II compuestos cíclicos.** Segunda edición española. Versión por el Dr. José Estalella. España. Tomo II.
5. Perry, Robert H. **Manual del Ingeniero Químico.** Editorial McGraw Hill. Séptima edición, 2001. Págs. 18-1 – 18-165; 19-1 – 19-79.



# APÉNDICE

## APÉNDICE A

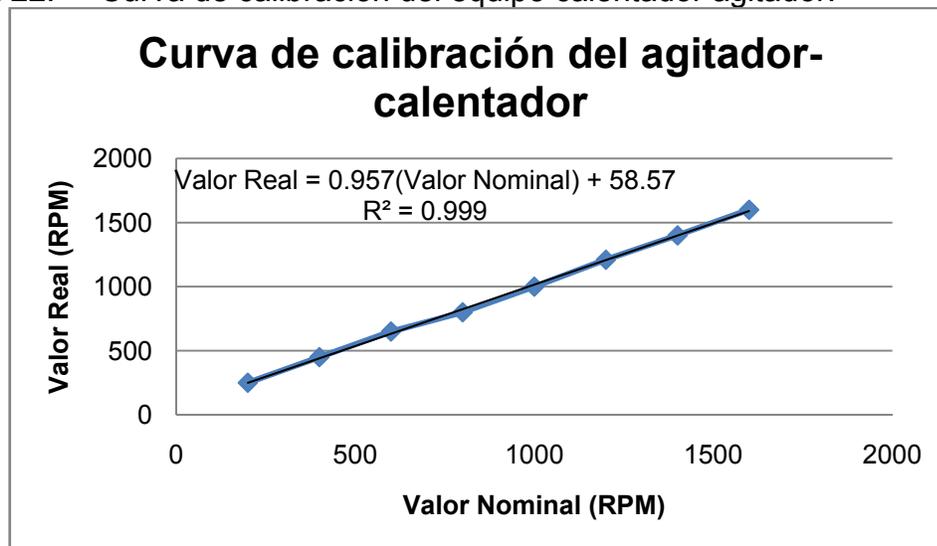
### Datos preliminares

Tabla XVII Calibración de equipo calentador-agitador utilizando lámpara estroboscópica.

Valor Nominal Plancha de Calentamiento (RPM)	Valor real Lámpara Estroboscópica (RPM)
200	250
400	450
600	650
800	800
1000	1000
1200	1210
1400	1400
1600	1600

Fuente: rangos de lámpara Estroboscópica, Marca AMETEK; rango de flash por minuto 2 a 60 (X 100) (200rpm-6000rpm); y Rangos del equipo calentador-agitador; Calentador-agitador, marca Corning, modelo PC-620, 120V/100V, rango 0 – 480°C, 0 – 1600 rpm.

Figura 22. Curva de calibración del equipo calentador agitador.



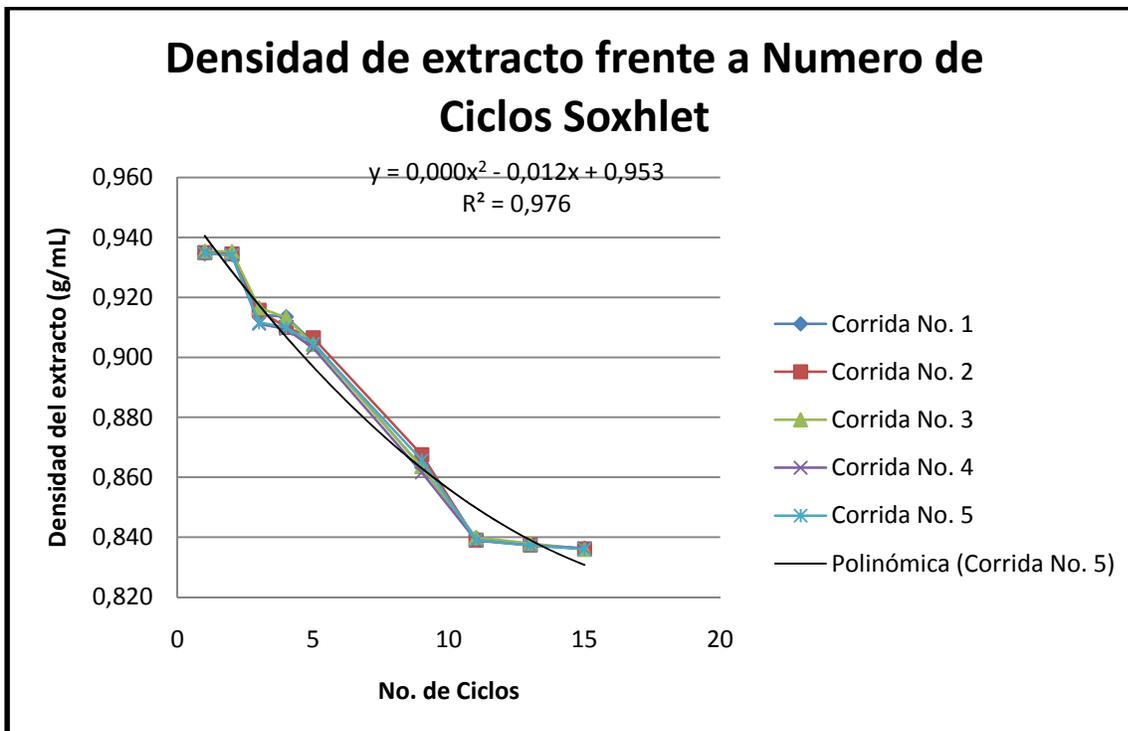
\*FUENTE: Tabla XVII. Apéndice A

Tabla XVIII. Densidades obtenidas en las pruebas preliminares con el equipo de extracción Soxhlet.

Corrida	No. De Ciclo									
	0	1	2	3	4	5	9	11	13	15
1	0.836	0.935	0.934	0.914	0.914	0.905	0.863	0.840	0.838	0.836
2	0.836	0.935	0.935	0.916	0.910	0.907	0.868	0.839	0.837	0.836
3	0.836	0.935	0.935	0.917	0.913	0.904	0.864	0.840	0.838	0.836
4	0.836	0.935	0.934	0.911	0.910	0.903	0.862	0.839	0.837	0.836
5	0.836	0.935	0.934	0.912	0.910	0.905	0.866	0.839	0.837	0.836

\*Fuente: ciclos medidos en un equipo de extracción Soxhlet 24/40, marca Pyrex, 250 mL de capacidad.

Figura 23. Evaluación de la densidad en función del número de ciclos.



\*Fuente: Tabla XVIII. Apéndice A.

Tabla XIX. Mediciones de humedad en la materia prima.

<b>No.</b>	<b>% Humedad</b>
1	14.41
2	14.35
3	13.32
4	13.84
5	12.9

\*Fuente: balanza analizador de humedad, marca Sartorius, modelo MA 150, 150 g máximos, rango de temperatura de 40 °C a 220 °C.



## APÉNDICE B Densidades

Tabla XX. Densidad de aparente de la semilla molida de cardamomo.

No.	Densidad materia fresca (g/cm <sup>3</sup> )
<b>1</b>	1.137
<b>2</b>	1.145
<b>3</b>	1.136
<b>4</b>	1.153
<b>5</b>	1.140

\*Fuente: densidad obtenida utilizando Matraz de Le Chatellier.

Tabla XXI. Densidad de los extractos etanólicos obtenidos para cada uno de los métodos.

Código	Temperatura de trabajo (°C)	Densidad materia exhausta (g/cm <sup>3</sup> )
<b>MEF 1</b>	25	0.986
<b>MEF 2</b>	25	0.976
<b>MEF 3</b>	25	0.975
<b>MEF 4</b>	25	0.987
<b>MEF 5</b>	25	0.965
<b>MDF 1</b>	25	0.979
<b>MDF 2</b>	25	0.961
<b>MDF 3</b>	25	0.982
<b>MDF 4</b>	25	0.999
<b>MDF 5</b>	25	0.968
<b>MEC 1</b>	50	1.109
<b>MEC 2</b>	50	1.113
<b>MEC 3</b>	50	1.099
<b>MEC 4</b>	50	1.109
<b>MEC 5</b>	50	1.098
<b>MDC 1</b>	50	1.078
<b>MDC 2</b>	50	1.088
<b>MDC 3</b>	50	1.088
<b>MDC 4</b>	50	1.075

<b>MDC 5</b>	50	1.090
<b>MEE 1</b>	78	1.089
<b>MEE 2</b>	78	1.103
<b>MEE 3</b>	78	1.100
<b>MEE 4</b>	78	1.099
<b>MEE 5</b>	78	1.088
<b>MDE 1</b>	78	1.032
<b>MDE 2</b>	78	1.072
<b>MDE 3</b>	78	1.054
<b>MDE 4</b>	78	1.029
<b>MDE 5</b>	78	1.043

\*Fuente: densidad obtenida utilizando matraz de Le Chatellier.

## APÉNDICE C

### Muestra de cálculo.

Cálculo de la densidad del extracto etanólico:

Para determinar la densidad del extracto etanólico es necesario tomar medición de masa y volumen utilizando un picnómetro. Se utiliza la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{\text{Masa total}(g) - \text{Tara}(g)}{\text{Volumen}(mL)} \quad [\text{Ecuación 5}]$$

Ejemplo:

Datos obtenidos para la medición de la densidad del extracto etanólico obtenido en un proceso de extracción utilizando el equipo extracto Soxhlet.

Masa total = 18.0642 g

Tara = 15.8906 g

Volumen = 2.60 mL

Utilizando la ecuación 4:

$$\rho = \frac{18.0642 - 15.8906}{2.60} = \frac{2.1736 \text{ g}}{2.60 \text{ mL}} = 0.836 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$$

Cálculo del porcentaje de rendimiento de oleorresina de cardamomo:

Para determinar la densidad se requieren dos datos específicos, el primero es la masa de materia prima utilizada en el proceso extractivo y el segundo es la masa de la oleorresina recuperada, luego se aplica la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Masa de oleorresina}}{\text{Masa de materia prima}} \times 100 \quad [\text{Ecuación 6}]$$

Ejemplo:

Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de rendimiento de obtenido de la maceración dinámica a 25 °C.

Masa de materia prima = 55.0065 g

Masa de oleorresina = 12.1114 g

Utilizando la ecuación 5:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{12.1114}{55.0065} \times 100 = 22.0181 \%$$

## APÉNDICE D

### Datos calculados

Tabla XXII. Densidad de aparente de la semilla molida de cardamomo.

No.	Densidad materia fresca (g/cm <sup>3</sup> )
1	1.137
2	1.145
3	1.136
4	1.153
5	1.140

\*Fuente: tabla XIX. Apéndice B

Tabla XXIII. Densidad aparente de la materia prima exhausta.

Código	Materia prima fresca (g)	Materia seca (g)	Densidad materia exhausta (g/cm <sup>3</sup> )	Media (g/cm <sup>3</sup> )	Desviación Estándar (g/cm <sup>3</sup> )
<b>MEF 1</b>	55.0000	42.9832	0.986	0.97804916	0.008855141
<b>MEF 2</b>	55.0000	42.9774	0.976		
<b>MEF 3</b>	55.0060	42.8474	0.975		
<b>MEF 4</b>	55.0108	42.7632	0.987		
<b>MEF 5</b>	55.0046	42.7583	0.966		
<b>MDF 1</b>	55.0065	43.9764	0.979	0.97774257	0.014461919
<b>MDF 2</b>	55.0180	43.9283	0.961		
<b>MDF 3</b>	55.0060	43.8273	0.982		
<b>MDF 4</b>	55.0080	43.9866	0.999		
<b>MDF 5</b>	55.0034	43.6726	0.967		
<b>MEC 1</b>	55.0062	51.9869	1.109	1.10573505	0.006632419
<b>MEC 2</b>	55.0223	51.0975	1.113		
<b>MEC 3</b>	55.0042	50.9986	1.100		
<b>MEC 4</b>	55.0505	50.9865	1.109		
<b>MEC 5</b>	55.0239	50.9875	1.098		
<b>MDC 1</b>	55.0007	45.5789	1.079	1.0838826	0.006283131
<b>MDC 2</b>	55.0055	44.0770	1.088		
<b>MDC 3</b>	55.0046	44.3875	1.088		
<b>MDC 4</b>	55.0138	44.7650	1.075		
<b>MDC 5</b>	55.0157	44.7640	1.090		

<b>MEE 1</b>	55.0215	50.8654	1.089	1.0955805	0.007028666
<b>MEE 2</b>	55.0021	50.3467	1.103		
<b>MEE 3</b>	55.0237	50.3219	1.100		
<b>MEE 4</b>	55.0080	50.3719	1.099		
<b>MEE 5</b>	55.0187	51.5032	1.088		
<b>MDE 1</b>	55.0660	49.9875	1.032	1.04615078	0.017550348
<b>MDE 2</b>	55.0025	49.8754	1.072		
<b>MDE 3</b>	55.0398	50.1232	1.054		
<b>MDE 4</b>	55.0078	49.9753	1.029		
<b>MDE 5</b>	55.0015	49.6754	1.043		

\*Fuente: Muestra de cálculo. Apéndice C

Tabla XXIV. Densidad del extracto etanólico.

<b>Código</b>	<b>Masa Extracto (g)</b>	<b>vol. Pic (mL)</b>	<b>Densidad extracto (g/mL)</b>	<b>Media (g/mL)</b>	<b>Desviación estándar (g/mL)</b>
<b>MEF 1</b>	0.9328	1.027	0.908	0.901	0.004
<b>MEF 2</b>	0.924	1.027	0.900		
<b>MEF 3</b>	0.9233	1.027	0.899		
<b>MEF 4</b>	0.9255	1.027	0.901		
<b>MEF 5</b>	0.921	1.027	0.897		
<b>MDF 1</b>	0.9333	1.027	0.909	0.905	0.005
<b>MDF 2</b>	0.9335	1.027	0.909		
<b>MDF 3</b>	0.9215	1.027	0.897		
<b>MDF 4</b>	0.926	1.027	0.902		
<b>MDF 5</b>	0.9325	1.027	0.908		
<b>MEC 1</b>	0.8275	1.027	0.806	0.805	0.001
<b>MEC 2</b>	0.8285	1.027	0.807		
<b>MEC 3</b>	0.8267	1.027	0.805		
<b>MEC 4</b>	0.8267	1.027	0.805		
<b>MEC 5</b>	0.825	1.027	0.803		
<b>MDC 1</b>	0.9256	1.027	0.901	0.900	0.004
<b>MDC 2</b>	0.92	1.027	0.896		
<b>MDC 3</b>	0.9305	1.027	0.906		
<b>MDC 4</b>	0.9218	1.027	0.898		
<b>MDC 5</b>	0.9243	1.027	0.900		
<b>MEE 1</b>	0.9151	1.027	0.891	0.892	0.002
<b>MEE 2</b>	0.9175	1.027	0.893		
<b>MEE 3</b>	0.9182	1.027	0.894		
<b>MEE 4</b>	0.9173	1.027	0.893		
<b>MEE 5</b>	0.9135	1.027	0.889		

<b>MDE 1</b>	0.8326	1.027	0.811	0.809	0.001
<b>MDE 2</b>	0.8312	1.027	0.809		
<b>MDE 3</b>	0.8314	1.027	0.810		
<b>MDE 4</b>	0.8311	1.027	0.809		
<b>MDE 5</b>	0.8294	1.027	0.808		

\*Fuente: Muestra de cálculo. Apéndice C.

Tabla XXV. Porcentaje de rendimiento de oleorresina de cardamomo.

<b>Código</b>	<b>Materia prima (g)</b>	<b>Materia seca(g)</b>	<b>Oleorresina (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Media (%)</b>	<b>Desviación estándar (%)</b>
<b>MEF 1</b>	55.0000	42.9832	7.8170	14.2127	14.3599	2.6837
<b>MEF 2</b>	55.0000	42.9774	6.6480	12.0873		
<b>MEF 3</b>	55.0060	42.8474	6.3150	11.4806		
<b>MEF 4</b>	55.0108	42.7632	8.9150	16.2059		
<b>MEF 5</b>	55.0046	42.7583	9.7980	17.8131		
<b>MDF 1</b>	55.0065	43.9764	12.1140	22.0229	20.9684	1.0732
<b>MDF 2</b>	55.0180	43.9283	11.8030	21.4530		
<b>MDF 3</b>	55.0060	43.8273	10.5550	19.1888		
<b>MDF 4</b>	55.0080	43.9866	11.6990	21.2678		
<b>MDF 5</b>	55.0034	43.6726	11.5010	20.9096		
<b>MEC 1</b>	55.0062	51.9869	3.6370	6.6120	5.6721	0.5604
<b>MEC 2</b>	55.0223	51.0975	3.0540	5.5505		
<b>MEC 3</b>	55.0042	50.9986	2.9860	5.4287		
<b>MEC 4</b>	55.0505	50.9865	2.8220	5.1262		
<b>MEC 5</b>	55.0239	50.9875	3.1050	5.6430		
<b>MDC 1</b>	55.0007	45.5789	7.8710	14.3107	12.8375	1.0148
<b>MDC 2</b>	55.0055	44.077	6.8900	12.5260		
<b>MDC 3</b>	55.0046	44.3875	6.9890	12.7062		
<b>MDC 4</b>	55.0138	44.765	7.2230	13.1294		
<b>MDC 5</b>	55.0157	44.764	6.3350	11.5149		
<b>MEE 1</b>	55.0215	50.8654	7.0180	12.7550	11.5339	0.9418
<b>MEE 2</b>	55.0021	50.3467	6.5120	11.8395		
<b>MEE 3</b>	55.0237	50.3219	6.3900	11.6132		
<b>MEE 4</b>	55.0080	50.3719	5.5850	10.1531		
<b>MEE 5</b>	55.0187	51.5032	6.2220	11.3089		
<b>MDE 1</b>	55.0660	49.98754	4.6850	8.5080	7.4992	0.5797
<b>MDE 2</b>	55.0025	49.8754	3.9320	7.1488		
<b>MDE 3</b>	55.0398	50.1232	3.9490	7.1748		

<b>MDE 4</b>	55.0078	49.97532	3.9530	7.1863		
<b>MDE 5</b>	55.0015	49.67543	4.1130	7.4780		

\*Fuente: muestra de cálculo. Apéndice C.

## APÉNDICE E

Figura 24. Vaina y semilla de cardamomo (*Elleteria Cardamomum*, L. Matton).



\*Fuente: [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

Figura 25. Planta y flor característica del cardamomo (*Elleteria Cardamomum*, L. Matton)



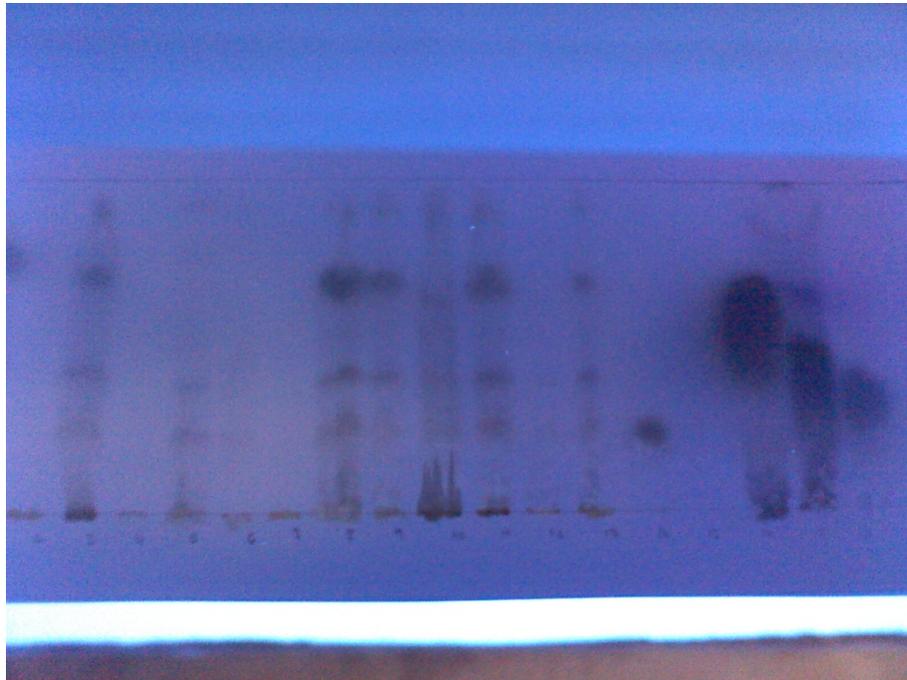
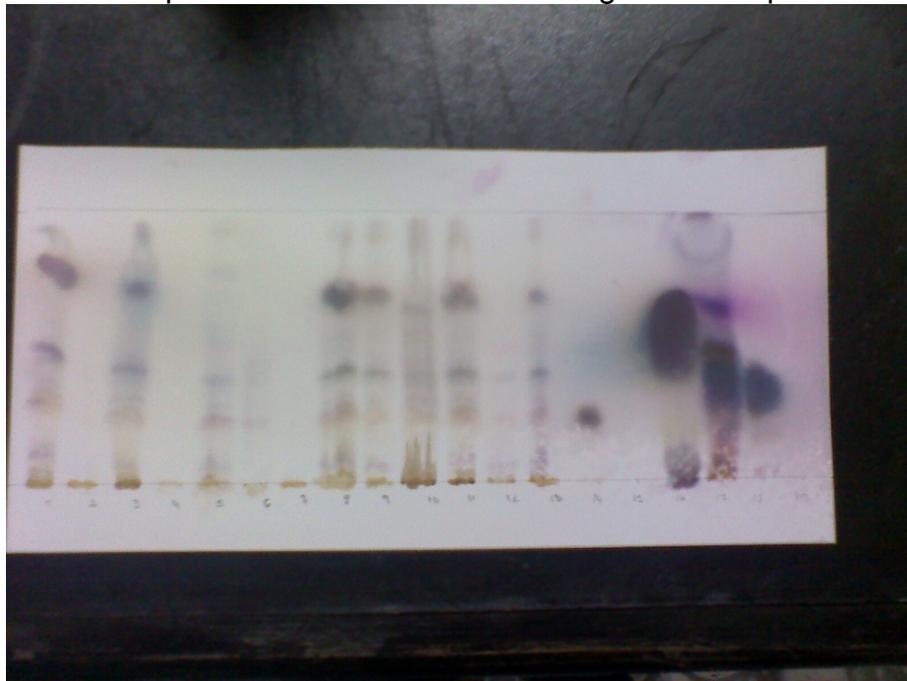
\*Fuente: [www.about-garden.com](http://www.about-garden.com)

Figura 26. Extracción de oleoresina de cardamomo.



\*Fuente: cámara SONY Cyber-shot DSC-W55 7.2 Mega pixeles 2.5"LCD monitor.

Figura 27. Cromatoplasmas resultado de la cromatografía en capa fina.



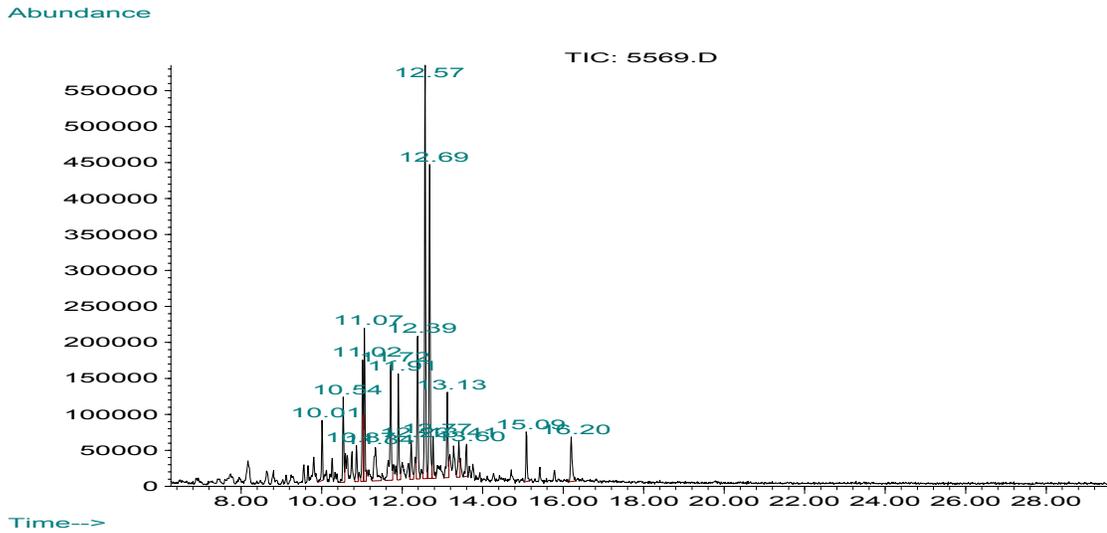
\*Fuente: cámara SONY Cyber-shot DSC-W55 7.2 Mega pixeles 2.5"LCD monitor.



## APÉNDICE F Cromatogramas

### Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas: Cromatogramas.

Figura 28. Cromatograma para la maceración estática a 25 °C.



**Information from Data File:**

File: C:\HPCHEM\1\DATA\5569.D  
 Operator: mca  
 Date Acquired: 5 Mar 09 9:03  
 Method File: RAFAEL  
 Sample Name: 5569 MEF 3  
 Misc Info:  
 Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASE\WILEY275.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex  
 Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	10.02	2.78	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			cis-Carveol	38181	001197-06-4	64
			TRANS-2-CAREN-4-OL	38270	006617-35-2	60

trans-Carveol \$\$ 2-Cyclohexen-1-ol 38183 001197-07-5 49

2 10.54 3.81 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl) 35717 000089-83-8 91  
 Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl) 35737 000499-75-2 91  
 Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl) 35716 000089-83-8 90

3 10.87 1.99 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl) 23312 000099-87-6 46  
 1,2,3,4-Tetramethylbenzene 23441 000488-23-3 46  
 Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl) 23301 000535-77-3 38

4 11.02 5.72 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 LIMONENE GLYCOL 80772 000000-00-0 59  
 2(1H)-Naphthalenone, octahydro-, t 38332 016021-08-2 30  
 2-Hepten-4-ol 12410 004798-59-8 27

5 11.06 7.15 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 cis-Ocimene \$\$ 1,3,7-Octatriene, 3 24920 006874-10-8 83  
 Isoterpinolene \$\$ Cyclohexene, 3-m 25083 000586-63-0 81  
 CAMPHENE 25410 000000-00-0 76

6 11.35 3.96 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 3-Cyclohexene-1-methanol, 5-hydrox 55443 032226-54-3 50  
 Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6, 38133 000473-67-6 30  
 2(1H)-Pyridinone, hydrazone, dihyd 65350 062437-99-4 22

7 11.72 7.77 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 s-(+)-5-(1-Hydroxy-1-methylethyl)- 53446 060593-11-5 46  
 p-Menth-1-en-3,8-diol (cis?) 55508 000000-00-0 38  
 8-Hydroxycarvotanacetone \$\$ 2-Cycl 53243 007712-46-1 38

8 11.90 4.96 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 1,5,8-p-menthatriene 23450 000000-00-0 83  
 1,4-Cyclohexadiene, 3-ethenyl-1,2- 23413 062338-57-2 72  
 1(7),5,8-o-Menthatriene 23453 000000-00-0 50

9 12.23 2.33 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 (1R,2R,4R)-p-Menthane-1,2,8-triol 72503 093861-30-4 50  
 (1S,2S,4R)-p-Menthane-1,2,8-triol 72506 093861-32-6 50  
 (1S,2S,4R)-p-Menthane-1,2,8-triol 72507 093861-32-6 50

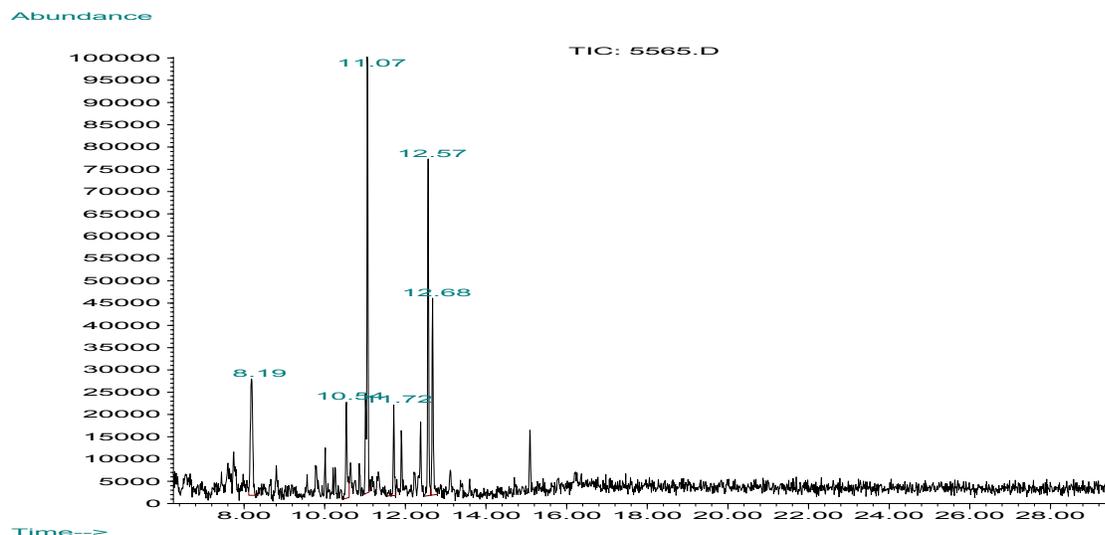
10 12.39 7.77 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 TRANS-2-CAREN-4-OL 38270 006617-35-2 72  
 trans-Carveol \$\$ 2-Cyclohexen-1-ol 38183 001197-07-5 70  
 Ethanone, 1-(1,4-dimethyl-3-cycloh 38158 043219-68-7 49

11 12.57 19.11 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 NEROLIDOL 108483 007212-44-4 91

- Farnesol \$\$ 2,6,10-Dodecatrien-1-o 108193 004602-84-0 90  
 Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien-3- 108178 007212-44-4 86
- 12 12.68 15.41 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Car-3-en-2-one 36056 000000-00-0 62  
 Acetic acid, 4-methylphenyl ester 35357 000140-39-6 47  
 Bicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-one, 4-me 35894 024545-81-1 46
- 13 12.77 2.27 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 3-Decen-1-yne, (Z)- (CAS) 24887 061827-88-1 30  
 .alpha.-terpinolene \$\$ Cyclohexene 25089 000586-62-9 30  
 3-methylene-bicyclo[3.2.1]oct-6-en 59445 122166-37-4 25
- 14 13.12 4.83 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 ENDO-ISOCAMPHONONE \$\$ Bicyclo[2.2. 38391 003767-44-0 22  
 Nonanoic acid, 9-oxo-, 1-methyleth 99583 034208-02-1 22  
 Butanoic acid, 2-hexenyl ester, (E 55232 053398-83-7 22
- 15 13.42 2.16 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Eudesmol \$\$ 2-Naphthalenemethanol, 108336 051317-08-9 56  
 .beta.-Eudesmol \$\$ 2-Naphthaleneme 108340 000473-15-4 56  
 (+)-Decahydro-.alpha.,.alpha.,4a,. 108389 071962-31-7 50
- 16 13.60 2.14 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 d-Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien- 108168 000142-50-7 80  
 Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien-3- 108177 007212-44-4 80  
 .alpha.-trans-sequicyclogeraniol \$ 108499 108287-12-3 64
- 17 15.09 2.56 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Hexadecanoic acid, ethyl ester (CA 165476 000628-97-7 93  
 Hexadecanoic acid, ethyl ester (CA 165484 000628-97-7 93  
 Hexadecanoic acid, ethyl ester (CA 165481 000628-97-7 93
- 18 16.20 3.27 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 ETHYL 9-OCTADECANOATE 185942 000000-00-0 83  
 9-Octadecenoic acid (Z)-, ethyl es 185930 000111-62-6 83  
 ETHYL OCTADEC-9-ENOATE 185928 000111-62-6 83

Tue Mar 10 12:13:28 2009

Figura 29. Cromatograma para la maceración dinámica a 25 °C.



Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\5565.D  
 Operator: mca  
 Date Acquired: 4 Mar 09 10:26  
 Method File: RAFAEL  
 Sample Name: 5565 MDF5 1UL  
 Misc Info:  
 Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASE\WILEY275.L Minimum Quality: 0

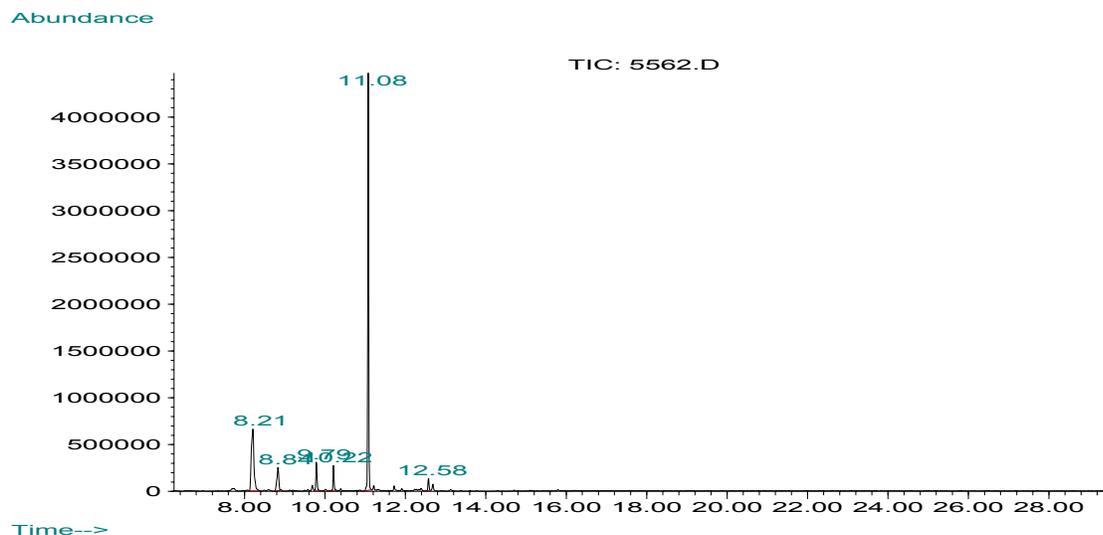
Unknown Spectrum: Apex  
 Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	8.20	16.03	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			Camphene \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptane,	25156	000079-92-5	45
			Bicyclo[3.1.0]hexan-3-one (CAS)	5165	001755-04-0	38
			Camphene \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptane,	25154	000079-92-5	25
2	10.54	8.26	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)	35719	000089-83-8	74
			CARVACROL	36060	000499-75-2	72
			Phenol, 2-ethyl-4,5-dimethyl-	35747	002219-78-5	72

- 3 11.07 33.82 C:\DATABASE\WILEY275.L  
(+)-M-MENTHA-1,8-DIENE \$\$ Cyclohex 25044 000499-03-6 90  
.alpha.-Terpinyl propionate \$\$ 3-C 95799 000080-27-3 87  
Camphene \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptane, 25153 000079-92-5 74
- 4 11.71 6.03 C:\DATABASE\WILEY275.L  
tricyclo[5.3.0.0(2,8)]deca-4-en \$\$ 23466 083298-53-7 52  
(2-Methylprop-1-enyl)-cyclohexa-1, 23454 000000-00-0 43  
1(7),5,8-o-Mentatriene 23453 000000-00-0 43
- 5 12.57 21.36 C:\DATABASE\WILEY275.L  
Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien-3- 108177 007212-44-4 91  
d-Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien- 108168 000142-50-7 91  
d-Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien- 108171 000142-50-7 86
- 6 12.68 14.50 C:\DATABASE\WILEY275.L  
2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1- 35854 002244-16-8 76  
2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1- 35848 002244-16-8 76  
2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1- 35857 000099-49-0 68

Tue Mar 10 10:18:59 2009

Figura 30. Cromatograma para la maceración estática a 50 °C.



Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\5562.D  
 Operator: MCS  
 Date Acquired: 27 Feb 09 8:16  
 Method File: RAFAEL  
 Sample Name: 5562 MEC. 5  
 Misc Info:  
 Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASE\WILEY275.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex

Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	8.21	24.99	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			LIMONENE	25358	000138-86-3	97
			dl-Limonene \$\$ Cyclohexene, 1-meth	25064	000138-86-3	96
			dl-Limonene \$\$ Cyclohexene, 1-meth	25055	000138-86-3	96
2	8.83	6.50	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			Cyclofenchene \$\$ Tricyclo[2.2.1.0(	25284	000488-97-1	60
			.DELTA.3-Carene \$\$ Bicyclo[4.1.0]h	25247	013466-78-9	60
			.DELTA.3-Carene \$\$ Bicyclo[4.1.0]h	25243	013466-78-9	60

3 9.80 5.49 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha., 40183 000098-55-5 91  
 1-.alpha.-Terpineol \$\$ 3-Cyclohexe 40199 010482-56-1 91  
 Linalyl propanoate 95982 000000-00-0 91

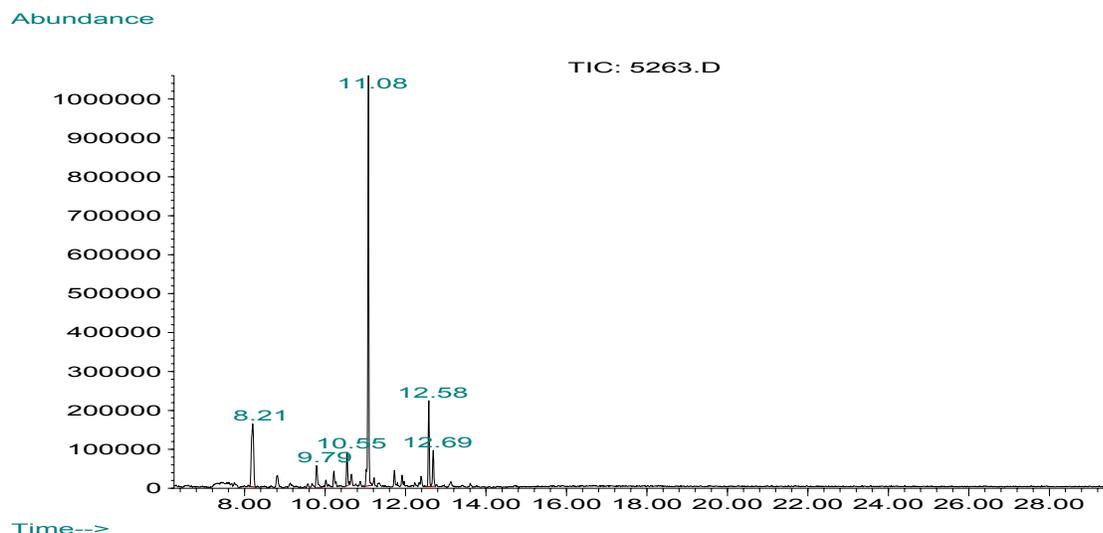
4 10.22 4.25 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Linalyl acetate \$\$ 1,6-Octadien-3- 80673 000115-95-7 83  
 1-.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]h 25212 018172-67-3 83  
 .gamma.-Terpinene \$\$ 1,4-Cyclohexa 25038 000099-85-4 76

5 11.08 56.81 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .ALPHA.-TERPINENYL ACETATE 80881 000080-26-2 91  
 1-P-MENTHEN-8-YL ACETATE \$\$ 3-Cycl 80738 000080-26-2 91  
 .ALPHA.-TERPINENYL ACETATE 80897 000080-26-2 91

6 12.58 1.96 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien-3- 108175 007212-44-4 87  
 NEROLIDOL B (CIS OR TRANS) 108579 000000-00-0 87  
 2-.BETA.-PINENE \$\$ Bicyclo[3.1.1]h 25219 000127-91-3 64

Tue Mar 10 09:26:23 2009

Figura 31. Cromatograma para la maceración dinámica a 50 °C.



Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\5563.D  
 Operator: MCS  
 Date Acquired: 27 Feb 09 12:45  
 Method File: RAFAEL  
 Sample Name: M.D.C. 2  
 Misc Info:  
 Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASE\WILEY275.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex  
 Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	8.21	18.94	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			LIMONENE	25358	000138-86-3	96
			LIMONENE	25366	000138-86-3	93
			LIMONENE	25408	000000-00-0	93
2	9.80	4.68	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			1-.alpha.-Terpineol \$\$ 3-Cyclohexe	40201	010482-56-1	72
			1-.alpha.-Terpineol \$\$ 3-Cyclohexe	40197	010482-56-1	59
			3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,	40175	000098-55-5	59

3 10.55 5.11 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl) 35733 000499-75-2 83  
 Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl) 35716 000089-83-8 83  
 Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl) 35718 000089-83-8 80

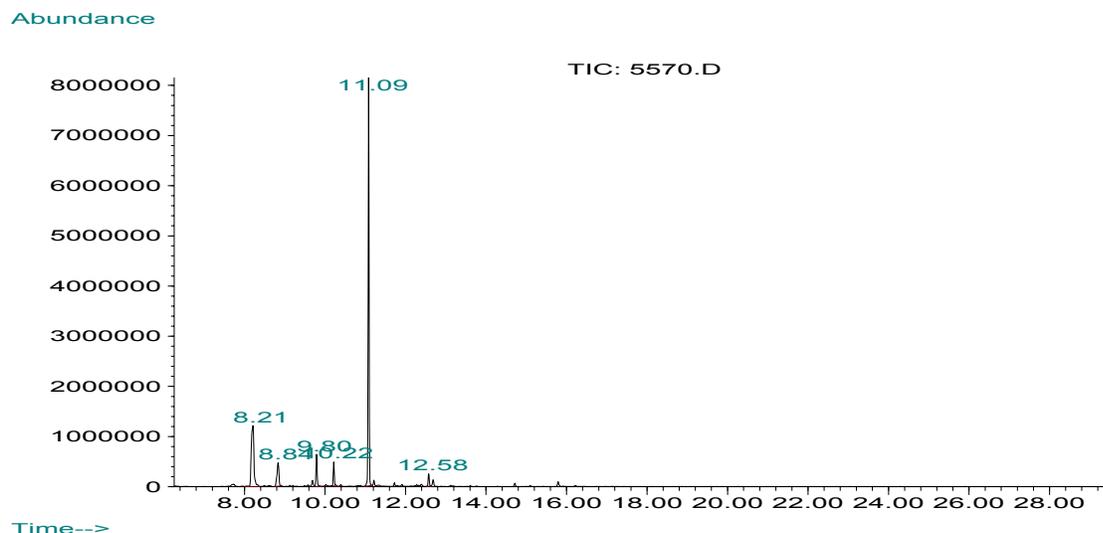
4 11.08 53.90 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .alpha.-Terpinene \$\$ 1,3-Cyclohexa 24988 000099-86-5 83  
 .alpha.-Terpinene \$\$ 1,3-Cyclohexa 24978 000099-86-5 83  
 .ALPHA.-TERPINENE 25417 000000-00-0 83

5 12.58 11.46 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien-3- 108178 007212-44-4 91  
 3,7,11-trimethyl-3-hydroxy-6,10-do 163589 107697-30-3 83  
 TRANS-.BETA.-FARNESENE 89697 028973-97-9 62

6 12.69 5.91 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 1-(3,5-Dimethyl-2-pyrazinyl)-1-eth 35266 000000-00-0 46  
 1-(3,5-DIMETHYL-2-PYRAZINYL)-1-ETH 35258 000000-00-0 46  
 Acetamide, N-(4-aminophenyl)- (CAS 35231 000122-80-5 38

Tue Mar 10 09:47:28 2009

Figura 32. Cromatograma para la maceración estática a 78 °C.



Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\5570.D  
 Operator: FPM  
 Date Acquired: 9 Mar 09 14:40  
 Method File: RAFAEL  
 Sample Name: 5570 MEE 3  
 Misc Info:  
 Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASE\WILEY275.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex  
 Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	8.21	24.05	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			dl-Limonene \$\$ Cyclohexene, 1-meth	25058	000138-86-3	97
			LIMONENE	25358	000138-86-3	96
			Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methyle	25062	005989-27-5	95
2	8.84	6.57	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			Linalool \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7	40045	000078-70-6	95
			Tricyclene \$\$ Tricyclo[2.2.1.0(2,6	25280	000508-32-7	87
			L-LINALOOL	40556	000078-70-6	87

3 9.80 5.45 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 (-)-.ALPHA.-TERPINEOL 40555 010482-56-1 91  
 Linalyl propionate \$\$ 1,6-Octadien 95759 000144-39-8 91  
 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha., 40175 000098-55-5 90

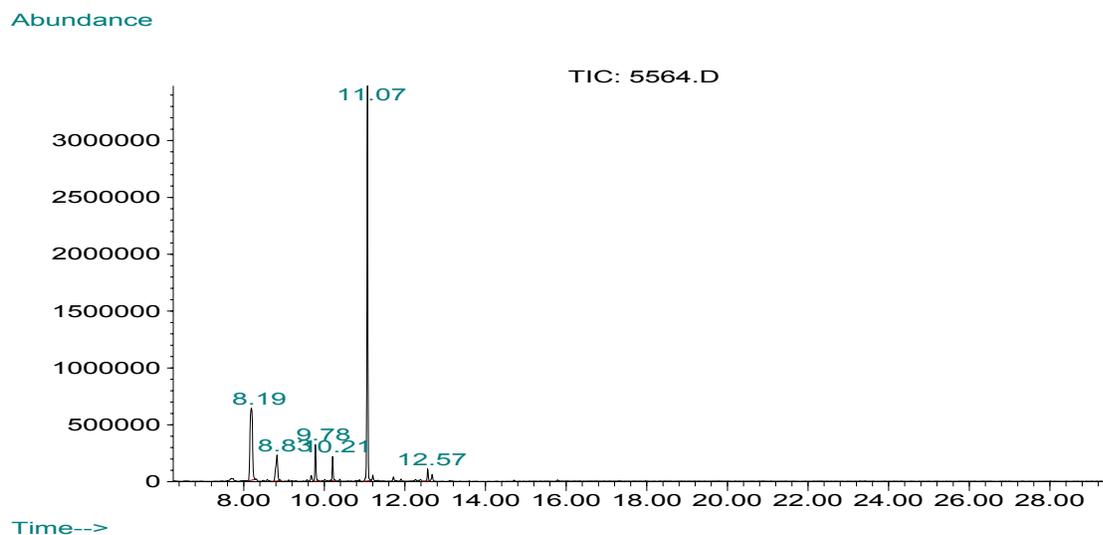
4 10.22 3.49 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 linalyl acetate 80869 000115-95-7 90  
 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 156000 007149-26-0 86  
 LINALYL ACETATE 80902 000115-95-7 86

5 11.09 58.39 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .ALPHA.-TERPINENYL ACETATE 80897 000080-26-2 91  
 1-P-MENTHEN-8-YL ACETATE \$\$ 3-Cycl 80735 000080-26-2 91  
 .ALPHA.-TERPINENYL ACETATE 80881 000080-26-2 91

6 12.58 2.05 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien-3- 108178 007212-44-4 90  
 d-Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien- 108171 000142-50-7 80  
 NEROLIDOL ISOMER 108169 000142-50-7 80

Tue Mar 10 12:15:43 2009

Figura 33. Cromatograma para la maceración dinámica a 78 °C.



Information from Data File:

File: C:\HPCHEM\1\DATA\5564.D  
 Operator: mca  
 Date Acquired: 4 Mar 09 8:58  
 Method File: RAFAEL  
 Sample Name: 5564 mwed 3  
 Misc Info:  
 Vial Number: 1

Search Libraries: C:\DATABASE\WILEY275.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex  
 Integration Events: Chemstation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	8.19	25.83	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			1-LIMONENE	25371	005989-54-8	98
			LIMONENE	25367	000138-86-3	97
			LIMONENE	25358	000138-86-3	96
2	8.83	7.29	C:\DATABASE\WILEY275.L			
			.DELTA.3-Carene \$\$ Bicyclo[4.1.0]h	25251	013466-78-9	87
			(-)-.BETA.-PINENE \$\$ 6,6-DIMETHYL-	25228	000127-91-3	55
			.DELTA.3-Carene \$\$ Bicyclo[4.1.0]h	25248	013466-78-9	55

3 9.78 5.88 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 (-)-.ALPHA.-TERPINEOL 40555 010482-56-1 86  
 .gamma.-terpinene 25328 000099-85-4 83  
 .alpha.-TERPINEOL 40614 000098-55-5 72

4 10.21 3.33 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .beta.-Myrcene \$\$ 1,6-Octadiene, 7 24936 000123-35-3 87  
 2-.BETA.-PINENE \$\$ Bicyclo[3.1.1]h 25224 000127-91-3 74  
 2-.BETA.-PINENE \$\$ Bicyclo[3.1.1]h 25218 000127-91-3 74

5 11.07 55.76 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 .ALPHA.-TERPINENYL ACETATE 80881 000080-26-2 91  
 .ALPHA.-TERPINENYL ACETATE 80897 000080-26-2 91  
 .ALPHA.-TERPINENE 25417 000000-00-0 83

6 12.57 1.89 C:\DATABASE\WILEY275.L  
 trans-.beta.-Farnesene \$\$ (E)-.bet 89123 000502-60-3 74  
 .beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dodecat 89127 018794-84-8 74  
 Nerolidol \$\$ 1,6,10-Dodecatrien-3- 108177 007212-44-4 68

Tue Mar 10 10:14:38 2009





Figura 35. Diagrama de cursos

