

00582



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**EXTRACCION DE CAROTENOIDES Y  
OTROS COMPUESTOS POR MEDIO DE CO<sub>2</sub>  
EN ESTADO SUPERCRITICO A PARTIR DE  
TAGETES ERECTA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS**

**P R E S E N T A :**

**SANDRA NARANJO MODAD**

285477



MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química en colaboración con el Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle de la Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Toulouse, bajo la dirección del Dr. Eduardo Bárzana García y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Dr. en Ciencias Químicas (alimentos) por el siguiente jurado:

<b>Presidente</b>	<b>Dra. Rachel Mata Essayag</b>	<b>Facultad de Química, UNAM</b>
<b>Primer vocal</b>	<b>Dr. Antoine Gaset</b>	<b>INPT, Toulouse, Francia</b>
<b>Segundo vocal</b>	<b>Dr. Gérard Vilarem</b>	<b>INPT, Toulouse, Francia</b>
<b>Tercer vocal</b>	<b>Dr. Jaime Vernon Carter</b>	<b>UAM-Iztapalapa</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dr. Jesús Gracia Fadrique</b>	<b>Facultad de Química, UNAM</b>
<b>Primer Suplente</b>	<b>Dr. Sergio Revah Moiseev</b>	<b>UAM-Iztapalapa</b>
<b>Segundo Suplente</b>	<b>Dr. Edmundo Brito de la Fuente</b>	<b>Facultad de Química, UNAM</b>

Este trabajo se realizó con el apoyo del CONACYT  
a través de los proyectos 25189-B y PCP No. 44

## Agradecimientos

Quisiera agradecer profundamente a mi supervisor académico, Eduardo Bárzana García, quien a pesar de todos los obstáculos tanto académicos, como administrativos y humanos, ha perseverado en apoyo y generación constante de ideas para la consecución del presente trabajo.

Agradezco también el interés y conocimiento puesto por Vicente Ridaura (Bioquimex-Reka, S.A. de C.V.), Agustín López-Munguía (Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Mor. México) y Francisco Viliesid (Bioquimex-Reka, S.A. de C.V.) quienes fungieron como integrantes de mi comité tutorial. Su apoyo y sus consejos fueron siempre de gran valor y utilidad para mí. Asimismo, quisiera dar gracias a los investigadores y técnicos del departamento de Alimentos y Biotecnología de la UNAM, quienes estuvieron abiertos a proporcionarme apoyo siempre que se los solicité. Agradezco particularmente a Angeles Valdivia, Francisca Iturbe, Hermilo Leal, Alberto Tecante, Edmundo Brito, Agustín Reyo, Idalia Flores, Rocío Santillana, Julieta Sandoval, Rebeca Pérez, Lilia Escalante, Arturo Navarro, Daniel López, Juan Guzmán, Lucía Mancilla, David Morales Zapatero, Carmen Wachter, Amanda Gálvez, Amelia Farrés.

Del departamento de Ing. Química quisiera agradecer a Fernando Barragán su apoyo en el esclarecimiento de los conceptos de equilibrio de fases, así como el apoyo en el uso de eqfases2.0.

Agradezco a Bioquimex-Reka S.A. de C.V. el suministro de las materias primas empleadas en este trabajo y el interés para la participación en el proyecto PCP de CONACyT.

Agradezco al CONACyT financiamiento a través de los proyectos PCP No. 44 y el 25189-B, así como a su contraparte en Francia: SPHERE.

A los doctores miembros de mi jurado en México: Rachel Mata Essayag, Jaime Vernon Carter, Jesús Gracia Fadrique, Sergio Revah Moiseev y Edmundo Brito de la Fuente agradezco el tiempo dedicado para la lectura y aportaciones al presente trabajo escrito.

Agradezco al Dr. Rodolfo Quintero sus consejos y su apoyo durante esta etapa.

Quant à mes collaborateurs en France, je remercie M. Antoine Gaset pour son enthousiasme et son appui persistant. J'ai appris maintes choses pas mal intéressantes pendant mes séjours en France. Pr. Gaset, merci de m'avoir accueillie dans votre vivant laboratoire. Je remercie Gérard Vilarem pour ses conseils et spécialement pour son amitié. Je remercie aux membres du jury, Melle. Elisabeth Borredon, M. Joël Bertrand, M. Martin Hernández spécialement aux rapporteurs, M. Bonet et M. Bessière. Un dernier mot pour mes copains à Toulouse, merci pour votre appui inconditionnel. Merci aussi aux techniciens au Laboratoire du Chimie Agro-Industrielle, spécialement a Didier Nicolas.

Je voudrais remercier aussi Pr. Jean-Marie Bessière son aide dans les analyses par CPG.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México la beca DGAPA.

Agradezco el apoyo de Betty, Diana, Rosalba, Alina, Gloria, Ana, Jorge, Faby y Carlos.

Finalmente agradezco a mi familia y amigos su apoyo incondicional durante esta etapa.

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE ANEXOS .....	8
RESUMÉ DE THESE.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
PRIMERA PARTE .....	16
I. ANTECEDENTES.....	17
1.1 LA FLOR DE CEMPASÚCHIL (TAGETES ERECTA).....	17
<i>Introducción</i> .....	17
1.1.2 <i>Actividad Biológica</i> .....	18
1.1.3 <i>Pigmentos de T. erecta</i> .....	19
1.1.4 <i>Explotación Comercial de T. erecta</i> .....	21
1.1.5 <i>T. erecta como fuente de polisacáridos</i> .....	23
1.2 CAROTENOIDES.....	24
1.2.1 <i>Ocurrencia natural</i> .....	24
1.2.2 <i>Estructura Básica, Nomenclatura</i> .....	24
1.2.3 <i>Configuración y Solubilidad</i> .....	26
1.2.4 <i>Síntesis y Explotación Comercial</i> .....	27
1.2.5 <i>Estabilidad y Oxidación</i> .....	27
1.2.6 <i>Biosíntesis y Funciones Biológicas</i> .....	29
1.3 LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	31
1.3.1 <i>Surgimiento y Desarrollo Actual</i> .....	31
1.3.2 <i>Características de los Fluidos Supercríticos</i> .....	33
1.3.3 <i>Solubilidad de solutos en un fluido supercrítico</i> .....	35
1.3.4 <i>Extracción con Fluidos Supercríticos</i> .....	38
1.3.5 <i>Uso de Modificadores</i> .....	41
1.3.6 <i>Extracción de carotenoides con CO<sub>2</sub> supercrítico</i> .....	42
1.4 OBJETIVOS .....	44
1.4.1 <i>Objetivo general</i> .....	44
1.4.2 <i>Objetivos particulares</i> .....	44
SEGUNDA PARTE.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
ADQUISICIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	46
2.1 ANÁLISIS GENERALES DE LA MATERIA PRIMA .....	47
2.1.1 <i>Humedad</i> .....	47
2.1.2 <i>Grasa</i> .....	47
2.1.3 <i>Cenizas</i> .....	47

2.1.4 Proteína.....	48
2.1.5 Fibra cruda .....	48
2.1.6 Xantofilas totales.....	49
2.1.7 Cromatografía en capa fina .....	50
2.2 METODOLOGÍAS GENERALES PARA LA OBTENCIÓN DE OLEORESINAS Y ACEITE ESENCIAL .....	50
2.2.1 Extracción con hexano .....	50
2.2.2 Obtención del aceite esencial.....	51
2.2.3 Análisis por cromatografía de gases del aceite esencial.....	52
2.2.4 Espectrometría de masas del aceite esencial y de los extractos supercríticos.....	53
2.3 EXTRACCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS DE HARINA DE FLOR.....	53
2.4 PRECIPITACIÓN AL ETANOL .....	54
2.5 EXTRACCIÓN CON CO <sub>2</sub> SUPERCRÍTICO .....	54
2.5.1 Descripción y especificaciones del extractor Hewlett Packard, 7680T.....	55
2.5.2 Extracción de muestras en el extractor HP 7680 T.....	56
2.5.3 Extracción de carotenoides de <i>T. erecta</i> .....	57
2.6 EXTRACCIÓN SELECTIVA DE COMPONENTES LIPÍDICOS NO COLORIDOS.....	61
2.7 PRUEBAS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	61
<b>TERCERA PARTE.....</b>	<b>63</b>
<b>III RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
3.1 ANÁLISIS GENERALES DE LA MATERIA PRIMA .....	64
3.2 OBTENCIÓN DE OLEORESINAS Y ACEITE ESENCIAL .....	66
3.2.1 Cromatografía de gases del aceite esencial.....	69
3.3 EXTRACCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS DE HARINA DE FLOR.....	74
3.4 PRECIPITACIÓN DE LÍPIDOS CON ETANOL .....	74
3.5 EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDEOS CON CO <sub>2</sub> SUPERCRÍTICO.....	75
3.5.1 Influencia del tipo de muestra: Diéster puro vs. diéster depositado .....	76
3.5.2 Cálculo del parámetro de solubilidad ( $\delta$ ) de los diésteres de xantofilas .....	77
3.5.3 Influencia de las variables de operación: Presión y temperatura.....	79
3.5.4 Cálculo de variables empíricas del modelo de Chrastil con los datos experimentales.....	82
3.5.5 Extracciones sucesivas de harina de flor .....	86
3.5.6 Extracción de carotenoides con mezclas de CO <sub>2</sub> supercrítico/ cosolventes.....	87
3.6 EXTRACCIÓN SELECTIVA DE COMPONENTES LIPÍDICOS NO COLORIDOS.....	92
3.7 PRUEBAS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	98
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>102</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>116</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b>	Compuestos con actividad biológica extraídos de especies <i>Tagetes</i> . . . . .	<b>20</b>
<b>Tabla 2</b>	Comparación de propiedades fisico-químicas de fluidos Supercríticos con líquidos y gases . . . . .	<b>33</b>
<b>Tabla 3</b>	Constantes críticas de compuestos puros empleados como fluidos supercríticos. . . . .	<b>34</b>
<b>Tabla 4</b>	Equivalencia del parámetro de solubilidad entre disolventes orgánicos y fluidos supercríticos . . . . .	<b>35</b>
<b>Tabla 5</b>	Variables de experimentación para determinar la solubilidad de diésteres de xantofilas de flor . . . . .	<b>59</b>
<b>Tabla 6</b>	Análisis proximal de la flor de <i>T. erecta</i> . . . . .	<b>64</b>
<b>Tabla 7</b>	Rendimientos de extracciones hexánicas en muestras de <i>T. erecta</i> . . . . .	<b>66</b>
<b>Tabla 8</b>	Extracción de aceite esencial de muestras de harina de <i>T. erecta</i> . . . . .	<b>68</b>
<b>Tabla 9</b>	Identificación de componentes del aceite esencial de <i>T. erecta</i> por cromatografía de gases y el método de índices de Kovat's . . . . .	<b>71</b>
<b>Tabla 10</b>	Compuestos identificados previamente en aceite esencial de hojas de <i>T. erecta</i> . . . . .	<b>72</b>
<b>Tabla 11</b>	Compuestos identificados previamente en aceite esencial de flores de <i>T. erecta</i> . . . . .	<b>73</b>
<b>Tabla 12</b>	Resultados de la precipitación al etanol de oleoresina obtenida de harina de flor . . . . .	<b>75</b>
<b>Tabla 13</b>	Cálculo del parámetro de solubilidad del dipalmitato de luteína a 25°C. . . . .	<b>78</b>
<b>Tabla 14</b>	Rendimiento en peso y pureza de extractos obtenidos a partir de harina de flor con CO <sub>2</sub> supercrítico . . . . .	<b>86</b>
<b>Tabla 15</b>	Cosolventes utilizados para la extracción de ésteres de xantofilas en CO <sub>2</sub> supercrítico . . . . .	<b>89</b>
<b>Tabla 16</b>	Rendimientos de extracción de componentes lipídicos no coloridos de harina flor con CO <sub>2</sub> supercrítico . . . . .	<b>92</b>
<b>Tabla 17</b>	Porcentajes relativos obtenidos por CG/SM y por CG de compuestos identificados en extractos supercríticos de harina de flor de <i>Tagetes erecta</i> . . . . .	<b>94</b>
<b>Tabla 18</b>	Porcentajes relativos obtenidos por CG/SM y por CG de compuestos identificados en aceite esencial de harina de flor de <i>Tagetes erecta</i> . . . . .	<b>95</b>
<b>Tabla 19</b>	Resultados de hidrólisis enzimática en fase continua agua-acetona y en dos fases hexano-agua . . . . .	<b>98</b>
<b>Tabla 20</b>	Resultados de hidrólisis enzimática en sistema con enzima inmovilizada en Dietilaminoetil celulosa en fase continua de hexano . . . . .	<b>99</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Diagrama de flujo para estudio de extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico de carotenoides y otros compuestos a partir de <i>Tagetes erecta</i> . . . . .	15
<b>Figura 2</b>	Flor de cempasúchil ( <i>Tagetes erecta</i> ) . . . . .	18
<b>Figura 3</b>	Naturaleza de la acilación en pigmentos de <i>T. erecta</i> . . . . .	19
<b>Figura 4</b>	Proceso industrial para la extracción de derivados de xantofilas . . . . .	22
<b>Figura 5</b>	Estructura química y numeración de los carbonos en los carotenoides . . . . .	25
<b>Figura 6</b>	Esquema general para biosíntesis de terpenoides . . . . .	30
<b>Figura 7</b>	Diagrama de fases para una sustancia pura . . . . .	32
<b>Figura 8</b>	Solubilidad del naftaleno en CO <sub>2</sub> supercrítico . . . . .	36
<b>Figura 9</b>	Ciclo de tratamiento con fluidos supercríticos . . . . .	39
<b>Figura 10</b>	Extractor Hewlett Packard 7680 T y diagrama simplificado del extractor conectado a la bomba de cosolventes HP 1050 . . . . .	55
<b>Figura 11</b>	Sistemas para hidrólisis enzimática de diésteres de xantofilas . . . . .	62
<b>Figura 12</b>	Influencia de la presentación de la muestra en la reproducibilidad de extracción de diésteres de xantofilas . . . . .	76
<b>Figura 13</b>	Influencia de la densidad y de la temperatura en la recuperación de diésteres de xantofilas . . . . .	81
<b>Figura 14</b>	Solubilidad de diésteres de xantofilas en CO <sub>2</sub> Supercrítico. Cálculo de las variables empíricas de la ecuación de Chrastil . . . . .	82
<b>Figura 15</b>	Estimación de la concentración de diésteres de xantofilas en CO <sub>2</sub> supercrítico en función de la temperatura. . . . .	83
<b>Figura 16</b>	Estimación de la concentración de diésteres de xantofilas en CO <sub>2</sub> supercrítico en función de la presión . . . . .	84
<b>Figura 17</b>	Influencia de la temperatura en el rendimiento de extracción y las pérdidas de diésteres de xantofilas en CO <sub>2</sub> supercrítico . . . . .	85
<b>Figura 18</b>	Influencia de la fracción molar del cosolvente en el rendimiento de extracción . . . . .	88
<b>Figura 19</b>	Influencia del tiempo de contacto en la recuperación de diésteres de xantofilas con etanol como cosolvente y sin cosolvente . . . . .	90
<b>Figura 20</b>	Extracción de diésteres de xantofilas con mezclas de CO <sub>2</sub> -cosolventes al 5-6% fracción mol . . . . .	91
<b>Figura 21</b>	Efecto de la densidad y la temperatura del CO <sub>2</sub> en el rendimiento de extracción de compuestos no coloridos de <i>T. erecta</i> . . . . .	93

## Índice de Anexos

- I. Esterificación del residuo generado a partir de la producción de pigmentos de *T. erecta*
- II. Aparato de hidroddestilación Clevenger
- III. Cromatograma del Aceite Esencial I obtenido de Harina de Flor
- IV. Cromatograma del Aceite Esencial obtenido de Residuo Industrial y de Oleoresina
- V. Cromatogramas del Aceite esencial II obtenido de Harina de Flor y de los Extractos Supercríticos no Coloridos
- VI. Espectros de Masas de los Compuestos presentes en el Aceite Esencial II obtenido de Harina de Flor
- VII. Curva de Calibración para determinación de Diésteres de Xantofilas
- VIII. Requisitos de Esfases<sup>2</sup>
- IX. Envoltentes Presión Temperatura de Sistemas CO<sub>2</sub>-Cosolventes
- X. Barrido Espectrofotométrico de Diésteres de xantofilas

## Resumé de these

Les pétales de *Tagetes erecta* sont une source importante de diesters de xanthophylles (principalement de la lutéine diestérifiée). Actuellement, les caroténoïdes de cette espèce sont extraits industriellement par l'hexane afin d'obtenir des oléorésines avec un contenu d'environ 70 g de xanthophylles totaux par kilogramme d'oléorésine. L'hexane extrait aussi les autres composés lipidiques incolores de la fleur. Dans ce travail de recherche, l'extraction des caroténoïdes de *Tagetes erecta* par le CO<sub>2</sub> supercritique a été étudiée. La mise en œuvre d'une méthode statique dans un extractor batch de petite échelle (7 mL) a permis de faire varier les paramètres d'extraction et de mesurer la solubilité des diesters purifiés. La spectrophotométrie U.V. visible a été utilisée pour caractériser les caroténoïdes des différents extraits ce qui a permis de comparer les extraits au CO<sub>2</sub> supercritique avec les extraits obtenus par l'hexane. Le modèle proposé par CHRASTIL a été utilisé pour obtenir une équation qui prédit les solubilités en milieu CO<sub>2</sub> supercritique à partir des données expérimentales générées par le système étudié. L'utilisation de différentes températures d'extraction a mis en évidence une dégradation des caroténoïdes d'environ 50% pour des températures de 55°C dans le réacteur d'extraction. 20% en rendement d'extraction ont été obtenus (par comparaison avec l'hexane) dans les meilleures conditions qui ne dégradent pas les colorants ( $\rho = 0,9\text{g/ml}$ , 40°C). Ce faible rendement d'extraction est probablement dû à des problèmes de diffusion à l'intérieur du réacteur d'extraction qui n'est pas agité. De plus, la théorie des paramètres de solubilité prédit la faisabilité de l'extraction en CO<sub>2</sub> supercritique en-dessous des conditions utilisées. L'effet de divers co-solvants sur le rendement d'extraction a été étudié. Divers co-solvants de polarités différentes (log PP a été utilisé comme paramètre). Une relation entre log PP du co-solvant et le rendement d'extraction a été constatée. Le co-solvant qui présente le meilleur rendement d'extraction est le chloroforme log PP = 2 (65 % de récupération). Diverses extractions successives de farine de fleurs ont été menées à  $\rho = 0,9\text{g/ml}$  et 40°C. L'extrait le plus riche en xanthophylles est obtenu après la dernière extraction (trois passages identiques, 50 g/kg contre 310 g/kg). On a pu déterminer que le mélange de ces trois extraits fournit un produit similaire à celui actuellement obtenu par l'extraction à l'hexane.

D'autres conditions supercritiques ont été mises en œuvre pour obtenir des composés lipidiques incolores de *Tagetes erecta*. Ces extraits ont été analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse afin de déterminer leur nature chimique. Cette dernière sera comparée à la nature chimique obtenue pour les huiles essentielles. Les composés habituels dans l'huile essentielle sont représentés en faible quantité tandis que d'autres types de composés lipidiques assimilés à des cires ainsi que le composé nématocide phototoxique  $\alpha$ -tertiényl sont présents en plus grande quantité. La possibilité d'esterifier le résidu d'extraction pour obtenir des films thermoplastiques a été étudiée. De même, l'hydrolyse enzymatique des diesters de xanthophylles de *Tagetes erecta* a été réalisée.

## Resumen

Los pétalos de *Tagetes erecta* son una fuente importante de diésteres de xantofilas (principalmente luteína diesterificada). En la actualidad los carotenoides de esta especie se extraen comercialmente con hexano para obtener oleoresinas con un contenido de aproximadamente 70 g/kg de xantofilas totales. El hexano extrae además otros componentes lipídicos no coloridos de la flor.

En el presente trabajo se estudió la extracción de los carotenoides de *T. erecta* con CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas. Variando los parámetros de extracción se midió la solubilidad de los diésteres purificados utilizando un método estático en un extractor batch a pequeña escala (7 mL). Se utilizó espectrometría uv-v para medir los carotenoides de los extractos, lo que permitió comparar al CO<sub>2</sub> con respecto al hexano. El modelo propuesto por Chrastil (1982) sirvió para obtener una ecuación que predice la solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico utilizando los datos experimentales generados en el sistema de estudio.

Al utilizar diferentes temperaturas de extracción, se encontró una degradación del 50% para temperaturas de 55°C en la cámara de extracción. Se consiguió un 20% de rendimiento de extracción (comparando con hexano) con las mejores condiciones que no degradan los colorantes ( $\rho=0.9\text{g/mL}$ , 40°C). Se propone que este bajo rendimiento de extracción es debido a problemas de transferencia dentro de la cámara de extracción no agitada, pues por otro lado, la teoría de parámetros de solubilidad predice la factibilidad de su extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico bajo las condiciones empleadas.

Se estudió el efecto de diversos cosolventes en el rendimiento de extracción. Se compararon cosolventes de diferentes polaridades ( $\log P$  se usó como índice) y se encontró una relación entre el  $\log P$  del cosolvente y el rendimiento de extracción. El cosolvente que presentó un mayor rendimiento fue el cloroformo con  $\log P = 2$  (65% de recuperación).

A  $\rho=0.9\text{g/mL}$ , 40°C se llevaron a cabo extracciones sucesivas de harina de flor, encontrando que el extracto era más rico en xantofilas en el último paso de extracción de tres pasos idénticos (50 g/kg vs. 310 g/kg). Se determinó que al mezclar estos tres extractos se obtiene un producto similar al que se obtiene actualmente con hexano.

Se probaron además otras condiciones supercríticas para extraer componentes lipídicos no coloridos de *T. erecta*. Estos extractos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para conocer su naturaleza química y se compararon al obtenido por hidrodestilación (aceite esencial). Se determinó que se obtenían pocos de los compuestos presentes en el aceite esencial y en mayor medida otro tipo de materiales lipídicos que forman parte de las ceras, además del compuesto nematocida fototóxico  $\alpha$ -tertienil.

Se estudió también la posibilidad de esterificar el residuo de extracción para obtener películas termoplásticas, así como la hidrólisis enzimática de los diésteres de xantofilas de *T. erecta*.

## **Abstract**

*Tagetes erecta* flower petals are an important source of xanthophyll diesters (mainly diesterified lutein). Currently, carotenoids from *T. erecta* are industrially extracted with hexane for the obtention of oleoresins with 70 g of total xanthophylls per kg of oleoresin. Thus hexane extracts also other soluble non-colored lipids. Carotenoids from *T. erecta* have been extracted with supercritical CO<sub>2</sub> in the current study. Solubility was measured for purified xanthophyll diesters using a static method in a supercritical CO<sub>2</sub> analytical scale extractor (total volume 7 mL). U.V.-Visible spectrophotometry was used for measuring solubility, permitting the comparison of the supercritical extracts to the hexane extracted oleoresin. Chrastil's supercritical extraction model (1982) was used for the obtention of a mathematical model with the experimental data from the studied system. Such model predicts the solubility in the studied system. 50% color loss was found while using temperatures of 55°C in the extraction chamber, while 20% recuperation yields (compared to hexane) were found as the best conditions that would not degrade carotenoids ( $\rho=0.9\text{g/mL}$ , 40°C). It is proposed that this low yield is due to a lack of transfer within the extraction chamber during the static non-agitated extraction, because solubility parameter theory predicts the feasibility of the extraction at the supercritical operation conditions. Yield was increased by the incorporation of cosolvents to the supercritical fluid. The effect of different polarity cosolvents on yield was evaluated using log P as index of polarity. Log P was related to the extraction yield. The best cosolvent was chloroform, with 65% yield and log P= 2.

Repeated extractions were performed at  $\rho=0.9\text{g/mL}$ , 40°C, finding the last of three extracts to be the richest in carotenoid content (50 g/kg for the first vs. 310 g/kg for the last). It was calculated that the mixture of these three extracts would render an oleoresin similar in purity to that obtained by hexane.

Other supercritical extractions were performed for the obtention of non-colored materials from *T. erecta*. These extracts were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry for the identification of compounds. These extracts were compared to the essential oil obtained by hydrodistillation. Small amounts of essential oil components were found, together with higher amounts of other lipids which may be classified as cuticular waxes. A phototoxic, nematocidal compound,  $\alpha$ -terpinenyl, was also found in the extracts.

Finally, the possibility of esterification of the industrial waste generated by this industry was studied, as well as enzymatic hydrolysis of lutein diesters.

## Introducción

La extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico representa una alternativa al uso de disolventes orgánicos (Perrut, 1990). La sustitución de disolventes por CO<sub>2</sub> supercrítico tiene alta aceptación en algunos procesos de la industria alimentaria, biotecnológica y farmacéutica ya que permite obtener productos libres de disolventes y por tanto, aptos para consumo humano (Randolph, 1990; Clifford, 1996; Kossik, 1996). Aunque una de las primeras aplicaciones industriales de esta tecnología fue la extracción de cafeína a partir de café y la obtención de extractos de lúpulo, en la actualidad la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico se vislumbra como alternativa viable para extraer lípidos de casi cualquier fuente susceptible. Algunos ejemplos son la extracción de aceite de soya (Friedrich y List, 1982), de aceite de girasol (Favati *et al.*, 1989), la extracción de germen de maíz, (Christianson, *et al.*, 1984), de germen de trigo (Taniguchi, *et al.*, 1985), etc. Se ha observado, como en los casos citados, que para obtener rendimientos rentables en la extracción de triglicéridos, es necesario utilizar presiones de 500 bars o más, aunque muchos procesos de extracción supercrítica pueden efectuarse a presiones menores con iguales resultados, gracias a la adición de cosolventes. Los cosolventes son disolventes orgánicos añadidos al fluido supercrítico principal y son capaces de romper las interacciones soluto-matriz (Hawthorne *et al.*, 1995). Más aún, los cosolventes, pueden también incrementar la solubilidad de ciertos solutos, al modificar la polaridad del disolvente de extracción (Montanari y King, 1989).

La extracción supercrítica de aromas a partir de diversas fuentes naturales también ha sido investigada. Sato, *et al.*, (1995) han utilizado el CO<sub>2</sub> supercrítico como medio de remoción de terpenos en aceite de frutos cítricos y Goto *et al.*, (1993) han llevado a cabo extracciones a partir de hierbabuena. En estos casos, la presión de operación del reactor supercrítico es ajustada de acuerdo a la naturaleza de los solutos a extraer, ya que es claro que los compuestos de bajo peso molecular (100-600 g/mol) pueden ser extraídos a presiones menores a 500 bars.

Siendo el CO<sub>2</sub> un fluido más bien no polar, es útil para extraer compuestos de polaridad baja a moderada y de peso molecular variable. Los parámetros de operación serán ajustados de acuerdo a la naturaleza de los compuestos a extraer y podrán efectuarse extracciones en varios pasos, para la obtención de compuestos diferentes de una misma fuente, pero difícilmente separables durante una extracción con un solo disolvente orgánico.

Para conocer la factibilidad técnica o elegir las condiciones más apropiadas para llevar a cabo un proceso extracción supercrítica, es necesario llevar a cabo estudios de solubilidad de los compuestos de interés. Para ello es necesario contar con metodologías analíticas que permitan medir la concentración de los analitos en el fluido supercrítico bajo determinadas condiciones de extracción. Posteriormente, pueden emplearse una amplia variedad de métodos para analizar los datos obtenidos, como el propuesto por Chrastil (1982) que permite hacer predicciones basándose en los datos experimentales generados. Es posible también tener aproximaciones de la solubilidad de un soluto gracias a modelos teóricos predictivos. Tal es el caso del uso de parámetros de solubilidad de soluto y disolvente (Kuk, 1998) y del uso de ecuaciones de estado, como la de Peng-Robinson (Cygnarowicz, 1990). La determinación experimental de la solubilidad puede llevarse a cabo por medio de métodos estáticos o métodos dinámicos (McHugh y Krukoniš, 1985), donde el término estático o dinámico se refiere al flujo del fluido supercrítico a través de la muestra. Los equipos de extracción supercrítica pueden ser microextractores, usualmente de diseño *in-house* (Vieville, *et al.* 1993), extractores analíticos, como el empleado en el presente trabajo o plantas piloto de mayor complejidad (Rizvi y Bhaskar, 1995; Ambrogi e Eggers, 1997).

*T. erecta* es una flor de intensa coloración anaranjada, originaria de América y cultivada comercialmente para la producción de carotenoides, (Tafoya y García Hernández, 1993). Los pigmentos que componen la fracción colorida han sido identificados como ésteres de luteína (Philip y Berry, 1975). El carácter no polar de estos pigmentos los hace susceptibles a ser extraídos con disolventes orgánicos no polares, principalmente hexano. Así, la extracción industrial con hexano produce oleoresinas, las que pueden posteriormente pasar por una reacción de hidrólisis alcalina, para ser finalmente mezcladas con el alimento de pollos para consumo humano. El hexano empleado para la extracción solubiliza también otros compuestos lipídicos de la especie, entre ellos se encuentran triglicéridos, ceras y tiofenos. Por ello, la extracción hexánica limita la pureza que puede obtenerse en el proceso de obtención de colorantes.

En el campo de los productos naturales con actividad biológica, *T. erecta* ha sido también valorada por sus aceites esenciales, los cuales han demostrado propiedades antifúngicas e insecticidas (Kourany, *et al.*, 1988; Weils, *et al.*, 1993). Entre los compuestos activos que presenta esta especie, se encuentran una serie de terpenoides, obtenidos por hidrodestilación (aceite esencial) y también el  $\alpha$ -tertienil, tiofeno ubicado principalmente en la raíz de las plantas pertenecientes a la especie *Tagetes*.

En el presente trabajo, la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico fue estudiada como una alternativa a la extracción con hexano, puesto que esta tecnología podría resultar inoperante en el futuro debido a razones ambientales.

En el inicio este proyecto pretendía llevar a cabo la hidrólisis enzimática y la extracción de los pigmentos en CO<sub>2</sub> supercrítico en un solo paso. Por lo anterior, se exploró en fase orgánica y en fase acuosa la hidrólisis enzimática de los diésteres de xantofilas como alternativa a la hidrólisis alcalina. Sin embargo, los resultados correspondientes a la hidrólisis enzimática desalentaron la idea de llevar a cabo la hidrólisis enzimática en CO<sub>2</sub> supercrítico.

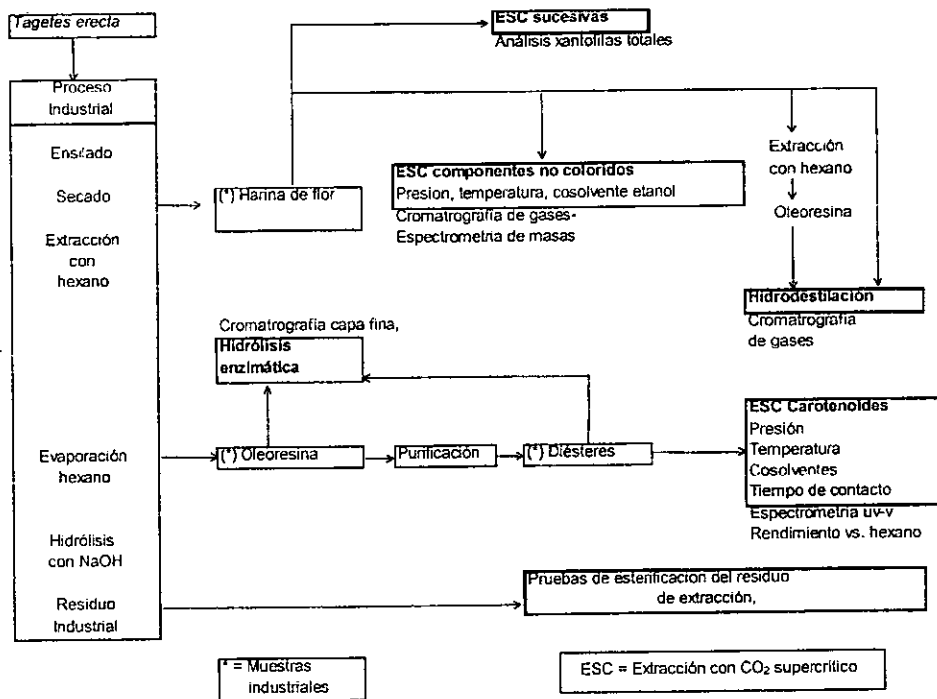
De manera adicional, se estudió la extracción de aceites esenciales a partir de la harina industrial de flor y la esterificación del residuo de extracción generado por esta industria, con el objeto de proponer estrategias para el aprovechamiento integral de la especie. Los resultados iniciales de la esterificación del residuo demostraron su capacidad de ser esterificado, aunque se pueden considerar solamente preliminares puesto que la naturaleza del residuo polisacárido exige de un estudio mucho más amplio, que sobrepasaba los objetivos de esta investigación. Los resultados de esterificación del residuo pueden encontrarse en el **anexo I**.

En contraste, la extracción de sustancias lipídicas no coloridas, tanto de naturaleza terpenoide, como de otro tipo se incorporó adecuadamente al estudio de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico.

La determinación experimental de la solubilidad (método estático) de los ésteres de luteína en CO<sub>2</sub> supercrítico y su optimización con mezclas CO<sub>2</sub>-cosolventes, así como la extracción en pasos, permitió evaluar la eficiencia de extracción de los colorantes. Asimismo, la caracterización química de los productos de extracción permitió ampliar los alcances de utilidad de esta tecnología para la obtención de otros productos además de los colorantes.



El trabajo de esta tesis ha sido compartido entre la Facultad de Química de la UNAM y el Laboratorio de Agre Recursos de la ENSCT. Bioquimex-Reka, S.A. de C.V. del grupo DESC suministró amablemente las materias primas de origen industrial que hemos empleado. La estrategia de investigación que incluye algunos de los métodos analíticos empleados, se presenta en la **Figura 1.**



**Figura 1. Diagrama de flujo para estudio de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de carotenoides y otros compuestos a partir de *Tagetes erecta*.**

**PRIMERA PARTE**

En esta primera parte se expondrán los antecedentes bibliográficos que sustentan esta investigación, tanto desde el punto de vista de viabilidad, como desde el punto de vista de utilidad. Pretendemos también que el lector conozca el trabajo de algunos grupos de investigación que sirvieron de base a nuestro trabajo, así como los conceptos y terminología que son utilizados para exponer el presente estudio.

Describiremos primeramente la materia prima, *Tagetes erecta*, así como las características físico-químicas de los carotenoides, que son los metabolitos que dan importancia comercial a esta especie. Posteriormente expondremos las características de los fluidos supercríticos, sus propiedades y aplicaciones. Expondremos posteriormente los antecedentes bibliográficos que describen la extracción de carotenoides con CO<sub>2</sub> supercrítico. Finalmente enunciaremos los objetivos del presente trabajo.

## **I. Antecedentes**

### ***1.1 La flor de cempasúchil (Tagetes erecta)***

#### **Introducción**

La flor de cempasúchil (**Figura 2**) pertenece a la familia de las compuestas (*Compositae*) y es originaria de América. Las distintas especies de *Tagetes* conocidas, que en la actualidad suman 40, crecen en distintas regiones de este continente, del sur de los Estados Unidos de América hasta Argentina. Algunas de ellas se encuentran distribuidas en todo el mundo por ser utilizadas como plantas de ornato. En este caso se habla de *T. patula* L., *T. lucida* Cav., *T. erecta* L. y *T. tenuifolia* HBK. (Lawrence, 1985). *Tagetes erecta* es una planta herbácea, anual, que alcanza de 50 a 60 cm de altura. Sus hojas son opuestas, divididas y olorosas; las flores son de color amarillo o anaranjado, grandes (5 ó 6 cm de diámetro). Las flores dobles son las que se cultivan preferentemente, puesto que el rendimiento de colorante es el más alto para éstas. En cultivo anual, esta especie florece alrededor del mes de octubre. Existen variaciones en el tamaño y la forma de las hojas y flores entre las diversas subespecies de *Tagetes erecta*.

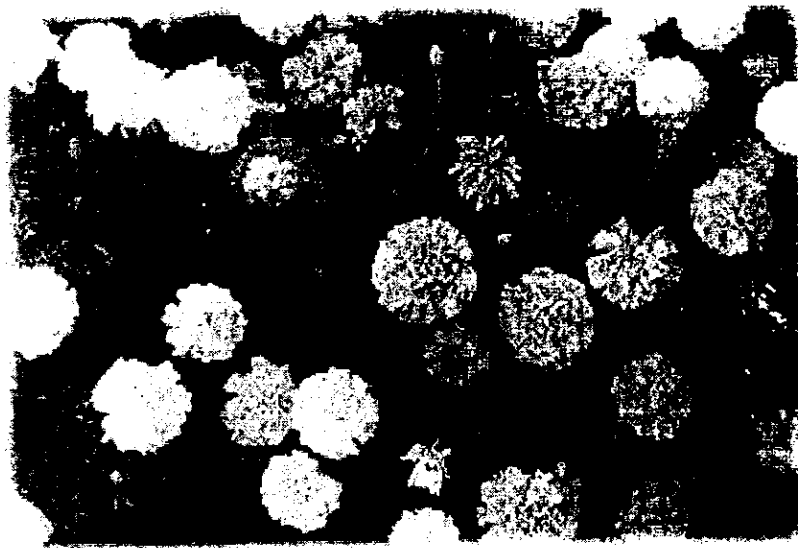


Figura 2. Flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*)

### 1.1.2 Actividad Biológica

Estas especies resaltan por la presencia de aceites esenciales odoríferos, lo cual ha despertado el interés de diversos grupos de investigación en todo el mundo. Se ha buscado caracterizar el aceite esencial obtenido por hidrodestilación o por destilación con arrastre de vapor, encontrándole propiedades útiles como fungicida, antiviral, insecticida y antimicrobiano. Con este propósito se han estudiado los aceites esenciales de *T. erecta* (Gupta y Bhandari, 1974; El-Tantawy *et al.*, 1994; Baslas, y Singh, 1980; Shi, *et al.*, 1988; Garg y Dengre, 1983; Grover y Tirumala, 1978; Wells, *et al.*, 1993; Héthelyi, 1986), *T. patula* (Wells, *et al.*, 1993; Héthelyi, *et al.*, 1986; Bicchi, *et al.*, 1992; Thappa, *et al.*, 1983), *T. minuta* (Thappa, *et al.*, 1983; Weaver, *et al.*, 1994; Singh, *et al.*, 1992; Zygadlo y Guzman, 1994; Baser y Malyer, 1996), *T. lemonii* Gray (Tucker y Maciarello, 1996), *T. terniflora* HBK (Zygadlo *et al.*, 1992), entre otras. Los aceites esenciales de esta familia de plantas están compuestos principalmente por monoterpenoides y sesquiterpenoides que se derivan de la ruta biosintética común a todos los terpenoides. Hasta el momento la especie cuyo aceite esencial presenta mayor potencial como insecticida es el de *T. minuta*, comparada con *T. erecta* y *T. patula*, (Wells, *et al.*, 1993) siendo las flores por contraposición a las raíces, tallos y hojas, las que presentan la mayor actividad biológica. Wells,

*et al.*, (1993) han postulado que el conjunto de sustancias presentes en el aceite esencial son las que, de manera sinérgica, causan dicha actividad. Además de las sustancias presentes en el aceite esencial, existen otros compuestos útiles en los extractos de las especies de *Tagetes* (Tabla 1). Algunos se encuentran concentrados principalmente en las raíces, como en el caso de los tiofenos. *T. patula* ha sido preferida para el estudio de estos últimos, pues los tiofenos bioactivos son más abundantes en esta especie. Se ha buscado enriquecer el rendimiento de tiofenos utilizando técnicas de cultivo de tejidos en esta especie (Kyo, *et al.*, 1990).

### 1.1.3 Pigmentos de *T. erecta*

Entre las especies mencionadas se reconoce a *T. erecta* como la fuente común con mayor concentración de xantofilas, (Philip y Berry, 1975). De esta manera, los pétalos de *T. erecta* o sus derivados han sido utilizados como fuente de coloración añadida al alimento para pollos con la finalidad de colorar su piel y la yema de los huevos que ponen, (Alam, *et al.*, 1968). Desde finales de los sesentas se ha estudiado la naturaleza química de las xantofilas de la flor, encontrándose que el principal pigmento es luteína mono y diesterificada con los ácidos palmítico y mirístico y que representa más del 60% de los carotenoides presentes en la flor (Figura 3).

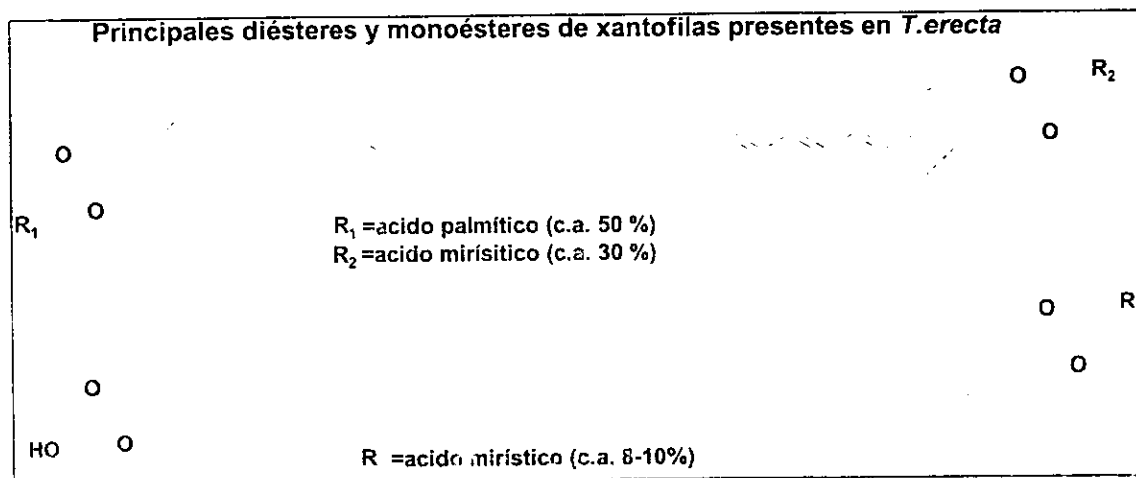


Figura 3. Naturaleza de la acilación en pigmentos de *T. erecta* (tomado de Philip y Berry, 1975 y 1976).

**Tabla 1. Compuestos con actividad biológica extraídos de especies *Tagetes***

Tiofenos	Utilidad Atribuída	Planta	Referencia
2-(but-3-en-1-il)-5-(pental,3-diinil)-tiofeno	Insecticida	Mutantes <i>T. erecta</i>	Jacobs <i>et al</i> 1995
5-(but-3-ene-1-il)-2,2'-bitiofeno; 5 (but-3-ene-1-il)-5'-metil-2,2'-bitiofeno; 2,2',5',2''-tertiofeno ( $\alpha$ -tertienil); 5-metil-2,2',5',2''-tertiofeno	Insecticidas	<i>T. minuta</i>	Perich, <i>et al</i> 1995
5-(3-buten-1-il)-2,2'-bitiofeno; $\alpha$ -tertienil; hidroxitremetona	Alergenos de contacto (agentes sensibilizadores)	<i>Tagetes</i> sp.	Hauscn y Helmke, 1995
5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitienil tiofeno 5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitienil 5-(3-buten-1-enil)-2,2'-bitienil tiofeno 2,2',5',2''-tertienil $\alpha$ -tertienil	Insecticidas	Raíces <i>T. erecta</i>	Mukundan y Hjortso, 1990
	Insecticida fotoactivo Atrapador de metales pesados Fotosensibilizador de la piel (tratamiento soriasis)	<i>Tagetes</i> sp.	Nivsarkar <i>et al</i> 1996
	Nematocida	<i>Tagetes</i> sp.	Towers, <i>et al</i> 1986
	Insecticida	<i>T. patula</i>	Kyo <i>et al</i> , 1990
	Antifúngico	<i>T. erecta</i> <i>T. patula</i>	Singh, <i>et al</i> , 1987 Romagnoli <i>et al</i> 1994
5-(3-buten-1-il)-2,2'-bitiofeno 5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitiofeno 5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitiofeno	Insecticidas	<i>T. patula</i>	Meneiaou, <i>et al</i> . 1991
5-(buten-1)-2,2'-bitiofeno	Nematocidas	<i>T. patula</i>	Mukundan <i>et al</i> 1990
5-(but-3-ene-1-il)-2,2'-bitiofeno 5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitiofeno 5-(but-3-ene-1-il)-2,2'-bitiofeno acetato	Insecticidas	<i>T. patula</i>	Helsper <i>et al</i> 1988
5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitienil 5-(3-buten-1-enil)-2,2'-bitienil 5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitienil $\alpha$ -tertienil	Insecticidas	<i>T. patula</i>	Tosi <i>et al</i> . 1988
5-(but-3-en-1-il)-2,2'-bitiofeno 5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitiofeno 5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitiofeno 5-etenil-5'-propinil-2,2'-bitiofeno	Biocidas	<i>T. patula</i>	Ketel, 1988
	Fotoquímico	<i>T. erecta</i>	D'Auria <i>et al</i> 1986
5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitienil 5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitienil $\alpha$ -tertienil	Antifúngicos	<i>T. erecta</i>	Kourany, <i>et al</i> , 1988
5-(3-buten-1-il)-2,2'-bitienil 5-(3,4-diacetoxi-1-butenil)-2,2' bitienil 2,2',5',2''-tertiofeno (I) 5-metil-2,2',5',2''-tertiofeno (II) 5-(but-3-ene-1-il)-2,2'-bitiofeno (III) 5-(but-3-ene-1-il)-5'-etil-2,2'-bitiofeno (IV)	Insecticidas I y II estables a luz III y IV inestables	<i>T. minuta</i>	Wells, <i>et al</i> 1993.
Otros compuestos	Utilidad Atribuída	Planta	Referencia
Piretrina I	Insecticidas	<i>T. erecta</i>	Kamal y Mangla, 1987
Piretrina II		<i>T. patula</i>	
1,7 dimetil-6,7-dioxo-1,3-octadieno	Sustratos para producción de potenciador de aroma	Marigold	Wilson, <i>et al</i> 1989
Acido sinigrico	No especificada	<i>T. erecta</i>	Tripathy, <i>et al</i> 1991
Metil-3,4-dihidroxi-4-metoxibenzoato			
Quercetina			
Acidos octadecatrienoicos	Inhibidores de la síntesis de prostaglandinas	<i>Tagetes</i> sp	Numteron y Christ-Hazelhof, 1987
Acidos octadecadienoicos			
Acidos eicosatetraenoicos			
Miricetin-3-glucósido	Flavonoides	<i>Tagetes</i> sp.	De Israilev <i>et al</i> . 1991
Miricetin-7-glucósido			
Indol	No especificada	Hojas <i>T. erecta</i>	Machado <i>et al</i> 1994

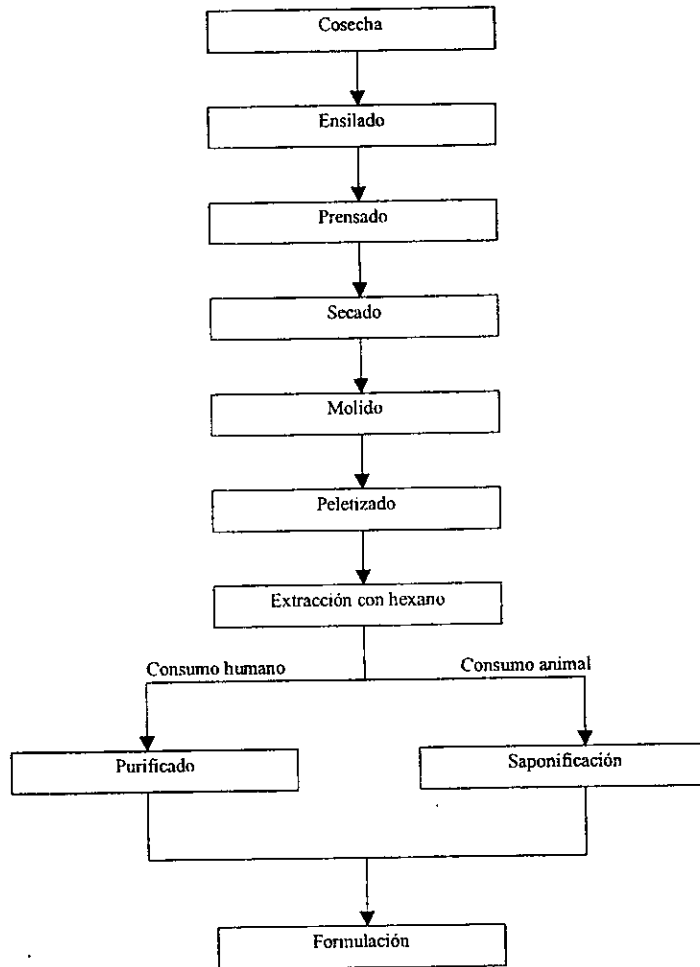
Los pigmentos de *T. erecta* también pueden ser añadidos a la dieta del pez cola amarilla (*Seriola quinqueradiata*) para incrementar la coloración de su piel, la cual resulta inaceptable cuando se le alimenta sólo con alimento formulado para peces (Takii *et al.* 1991).

Algunos autores han reportado la purificación de los diésteres y de la luteína a partir de la flor. La purificación de los diésteres consiste en llevar a cabo una extracción con disolventes para luego precipitar los diésteres con isopropanol:eter de petróleo (80:20) (Philip y Berry, 1976). Para purificar la luteína se extraen los pigmentos ya saponificados para luego precipitarlos y recrystalizarlos con una solución de hexano:acetona (80:20), (Tyczkows'ki y Hamilton, 1991). La luteína también se puede cristalizar con metanol (Davies, 1976).

Si bien la luteína es el pigmento principal de *Tagetes erecta*, también se encuentran presentes otros carotenoides en la planta como  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina, auroxantina, etc, (Goodwin, 1973).

#### 1.1.4 Explotación Comercial de *T. erecta*

En México se encuentra el mayor número de productores de colorantes de *T. erecta* a nivel mundial y que exportan a países como Japón, España y EUA. Hasta el momento, la mayoría de la venta de este producto está destinada a la alimentación animal. Se estima, por otra parte, que la demanda mundial de este tipo de colorantes crece a un ritmo de 2 al 6% al año, cifra que podría incrementarse debido a que se han venido reconociendo últimamente como regeneradores de tejidos dañados, lo que podría conferirles un carácter de fármacos preventivos contra el cáncer, las enfermedades coronarias y la degradación macular en los ojos (Seddon *et al.*, 1994; Howard, *et al.*, 1996). Las xantofilas de *T. erecta* han demostrado inhibir la mutagenicidad del 1-nitropireno en colonias bacterianas, vía la formación de un complejo que limita la biodisponibilidad de dicho mutágeno, (González de Mejía, *et al.*, 1997). Asimismo, la suplementación alimenticia de xantofilas ha retardado o inhibido la aparición de tumores de mama en ratones, (Chew, *et al.* 1996). Lo anterior indica que estos colorantes podrían comercializarse en mucho mayor medida para consumo humano, lo que requiere que se cumplan los criterios de calidad que demanda el consumidor. El proceso industrial actual para la obtención de los derivados de xantofilas se esquematiza en la **Figura 4**.



**Figura 4. Proceso industrial para la extracción de derivados de xantofilas**

Modificado de: Tafoya y García Hernández, 1993

La saponificación industrial se explica por que los pigmentos no esterificados se absorben dos veces más rápido que los diésteres en el tracto digestivo de los pollos, (Hudon, 1994). Esta se lleva a cabo utilizando sosa o potasa, al igual que la saponificación que tiene como finalidad el análisis posterior de los carotenoides, por ejemplo el análisis espectroscópico (Davies, 1976). Matsuno (1992) ha utilizado la hidrólisis enzimática para carotenoides sensibles al álcali.

La secuencia industrial enumerada anteriormente (Figura 4) se ha venido empleando por muchos años sin modificaciones importantes. En cuanto al proceso de extracción, Delgado-Vargas y Paredes-López (1997) proponen un tratamiento enzimático macerativo previo a la extracción con hexano con la finalidad de extraer los pigmentos con más facilidad. Klaus (1994) patentó un proceso de extracción que emplea ácidos orgánicos inmiscibles en agua y alternativamente,



enzimas capaces de degradar las células vegetales. En lo que al proceso de saponificación se refiere, no se tiene conocimiento de patentes o procesos alternativos que puedan ser útiles en el ámbito industrial. Los carotenoides libres obtenidos mediante el proceso industrial contienen residuos de sosa o potasa que limitan su venta para consumo humano. Por lo anterior, se pensó integrar un proceso de extracción supercrítica a uno de hidrólisis enzimática.

Existe la posibilidad de que se prohíba el uso de hexano por autoridades ambientales y de salud, lo que provocaría una transformación obligatoria del proceso. Sin embargo, un proceso más eficiente y/o más rápido, que permitiera ampliar el mercado de los productos industriales, sería un motivo de mejora inmediata, una vez salvados los criterios económicos inherentes a cualquier proceso industrial. Se sabe que la inversión de capital para los procesos de extracción supercrítica es alta; sin embargo, una planta industrial de extracción supercrítica para la extracción de grasa de leche, cuesta entre 1.2 y 4.4 millones de dólares, con una vida útil de aproximadamente 20 años y un periodo de recuperación de la inversión de 5 años (Rizvi y Bhaskar, 1995). En el caso de la extracción de grasa de leche, el producto es comercializado directamente para consumo humano, lo cual implica que para que la extracción de xantofilas a partir de *T. erecta* fuera rentable, sería necesario establecer estrategias de venta de los productos obtenidos, sea como colorantes para uso alimentario o como nutracéuticos.

### **1.1.5 *T. erecta* como fuente de polisacáridos**

En el campo de los polisacáridos, *T. erecta* se ha estudiado como fuente alternativa de goma arábiga. La goma arábiga forma soluciones con alta concentración de sólidos pero baja viscosidad. Tiene propiedades emulsificantes, soporta altas temperaturas y forma películas. Sin embargo, su disponibilidad se ha visto limitada en el pasado pues es un producto sujeto a variaciones climáticas, económicas y políticas. *T. erecta* tiene polisacáridos que envuelven o protegen a lípidos, lo que le confiere *a priori* propiedades emulsificantes, además de que el residuo generado de la producción de pigmentos es cuantioso: 40,000 ton anuales (Berniller *et al.*, 1989). Es por lo anterior que se investigaron las propiedades de los polisacáridos derivados de *T. erecta*. Se ha determinado que los polisacáridos se encuentran unidos a proteínas y que la fracción de polisacáridos está constituida por un arabinoglucogalactano ácido altamente

ramificado, (Bemiller *et al.*, 1989). Los purificados de este polisacárido tienen propiedades emulsificantes y estabilizantes.

Otras líneas de investigación en el campo de los polisacáridos buscan aportar un valor agregado a estos biopolímeros, sean éstos de desecho o para consumo humano, (ver **anexo I**).

## **1.2 Carotenoides**

### **1.2.1 Ocurrencia natural**

Los carotenoides son pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza, algunos de los ejemplos más obvios de ello son el color naranja de algunas flores (cempasúchil, girasol), los colores rojo-naranja de las frutas (jitomate, naranja), y las raíces rojas de las zanahorias. La mayor producción de carotenoides ocurre en los tejidos fotosintéticos de plantas y algas, aunque también se encuentran en el aparato fotosintético de microorganismos.

### **1.2.2 Estructura Básica, Nomenclatura**

Los carotenoides son un tipo de hidrocarburos (carotenos) y sus derivados oxigenados (xantofilas). La mayoría de los carotenoides son tetraterpenos y como tales, pueden ser visualizados como el resultado de la unión de ocho moléculas de isopreno, tal y como se muestra en la **Figura 5**. Los carotenoides se generan por la condensación de dos unidades de pirofosfato de geranil-geranilo (cola-cola), las cuales están formadas por cuatro unidades isoprenoides cada una (cabeza-cola). Por lo anterior, en el centro de la molécula el orden es revertido de modo que los dos grupos metilo centrales guardan una relación de posición 1-6; de esta forma, el esqueleto  $C_{40}$  de los carotenoides es simétrico visto como un todo.

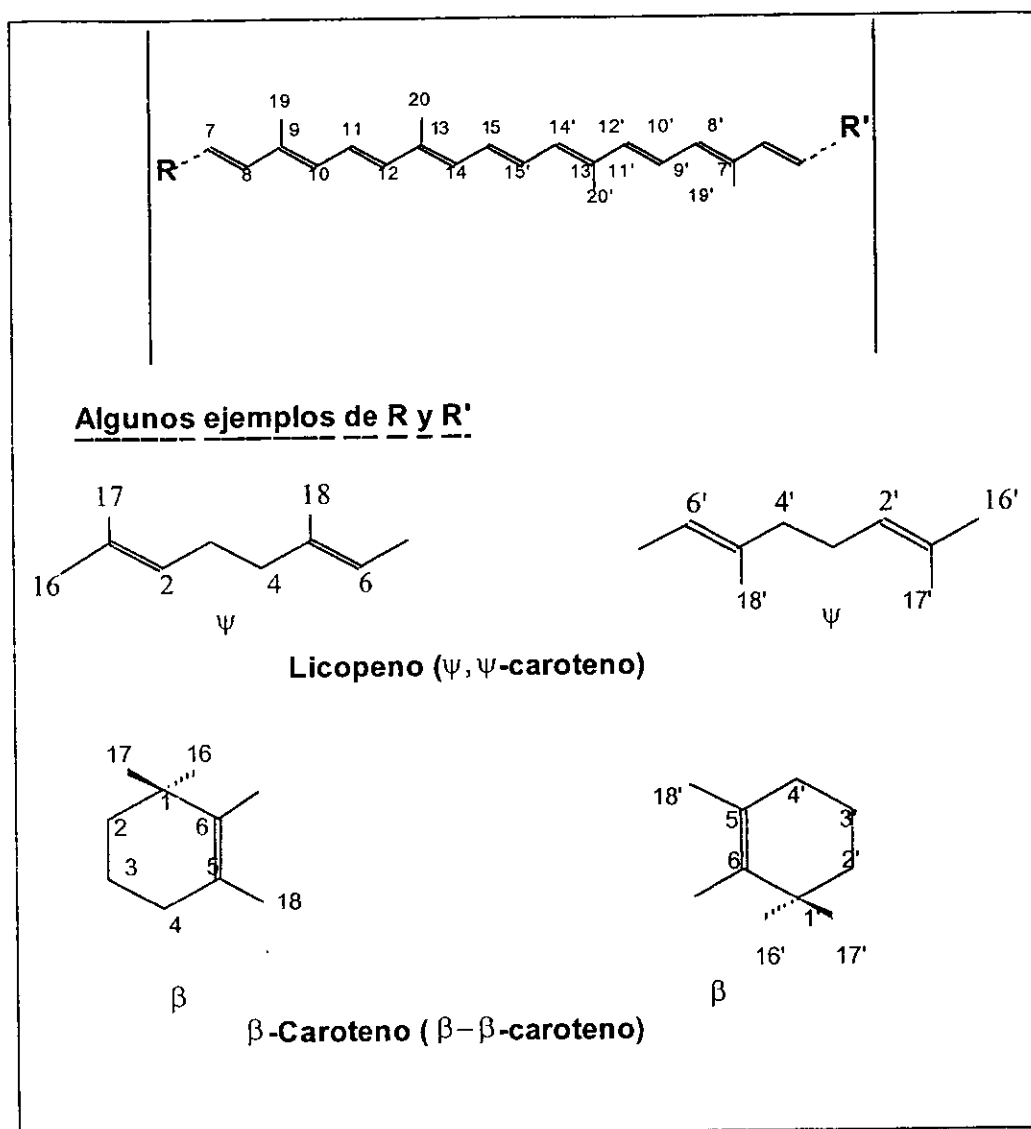


Figura 5. Estructura química y numeración de los carbonos en los carotenoides (Fuente: Davies, 1976)

La nomenclatura semi sistemática para los carotenoides se basa en la designación de los grupos extremos por medio de letras griegas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  ó  $\psi$ ) seguida del nombre "caroteno". A pesar de la existencia de la nomenclatura semisistemática, es usual que se empleen los nombres comunes. Para la nomenclatura de las xantofilas se emplean además los siguientes prefijos y sufijos: "ol" (-OH), "ona" (= O), "epoxi" (-O-), etc. Los apocarotenoides son carotenoides de los que se han quitado unidades isoprenoides en los extremos de la molécula. Se utiliza la numeración para indicar en qué carbono se hizo la remoción.

Todos los carotenoides son derivados formalmente de una estructura  $C_{40}H_{56}$ . La cadena isoprenoide básica ( $C_{40}$ ) puede sufrir modificaciones (hidrogenación, deshidrogenación, ciclización, y oxidación) las cuales solas y combinadas dan origen a los más de 600 carotenoides conocidos. Existen también carotenoides de 45 y 50 carbonos que resultan de la adición de unidades isoprenoides. Asimismo, los carotenoides de 30 carbonos son característicos de algunos tipos de bacterias, (Davies, 1976). En las xantofilas la incorporación de átomos de oxígeno resulta en la formación de las siguientes especies: hidroxí (mono-oles, dioles, polioles) epoxi (5,6 y 5,8), metoxi, aldehído, oxo, carboxi y ester.

### 1.2.3 Configuración y Solubilidad

Más de la mitad de los carotenoides conocidos son quirales portando de 1 a 5 átomos de carbono asimétricos. En la mayoría de los casos, sin embargo, cada carotenoide ocurre en una sola configuración en una misma fuente, (Britton, 1995). La luteína y la astaxantina ocurren en diferentes configuraciones en fuentes distintas.

La cadena poliélica da lugar a la existencia de isómeros *cis/trans*. Cada carbono con doble ligadura puede teóricamente tomar dos configuraciones, pero la mayoría de los carotenoides aislados de la naturaleza portan carbonos todos *trans* pues esta es la forma más estable. La configuración es muy importante en lo que a propiedades se refiere. Por ejemplo, los isómeros *cis* son en general más solubles que los *trans*, pero los *trans* pueden más fácilmente penetrar en las estructuras celulares por su carácter lineal. Los carotenoides *cis* pueden resultar de la isomerización de sus contrapartes *trans* bajo ciertas condiciones ambientales, como el calor, la luz y el oxígeno, (Britton, 1995). En el caso de *T. erecta* el pigmento mayoritario es la luteína y ocurre principalmente en su configuración *trans*. La determinación de la configuración absoluta de los carotenoides puede llevarse a cabo con ayuda de la espectroscopía uv-visible, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X, (Moss y Weedon, 1976).

Los carotenoides son básicamente no polares, propiedad que varía según la estructura química. Son, por ello, extraídos con disolventes orgánicos (libres de peróxidos para evitar oxidación) como éter, acetona, hexano, cloroformo, etc, (Davies, 1976). Los carotenos son en general menos

polares que las xantofilas, debido a la incorporación de oxígeno en las estructuras de estas últimas.

#### 1.2.4 Síntesis y Explotación Comercial

En 1950 se llevó a cabo la síntesis química del primer carotenoide:  $\beta$ -caroteno. Desde entonces se han venido elucidando rutas para la síntesis de otros carotenoides. En la actualidad existen 6 carotenoides sintéticos de importancia comercial:  $\beta$ -apo-8'-carotenal ( $C_{30}$ ),  $\beta$ -apo-8'-éster etílico ácido carotenoico (etil-8'-apo- $\beta$ -caroten-8'-oato) ( $C_{32}$ ), citranaxantina (5',6'-dihidro-5'-apo-18-no- $\beta$ -caroten-6'-ona) ( $C_{30}$ ),  $\beta$ -caroteno ( $C_{40}$ ), cantaxantina ( $C_{40}$ ) y astaxantina racémica ( $C_{40}$ ), (Pfander, 1992).

Los carotenoides son empleados como colorantes naturales en alimentos animales y humanos, se usan como precursores de vitamina A. De los 600 conocidos, 50 de ellos, como el  $\beta$ -caroteno tienen esta cualidad, (Deshpande *et al.*, 1996) y están en etapa de investigación como fármacos de prevención de algunos tipos de cáncer y de degradación macular. El precio de los carotenoides sintéticos con un contenido del 5 al 10% de la sustancia varía entre \$ 600 USD/kg para el  $\beta$ -caroteno y \$ 2,500 USD/kg para la astaxantina. Las ventas anuales de carotenoides sintéticos corresponden a \$ 300 millones de dólares a nivel mundial, (*idem*, 1992).

#### 1.2.5 Estabilidad y Oxidación

La cadena de polieno de los carotenoides, responsable del color de los mismos, es también en gran medida responsable de la inestabilidad de estos pigmentos. Ejemplo de ello son su susceptibilidad a la oxidación por aire o peróxidos, la adición de electrófilos, incluyendo  $H^+$  y ácidos de Lewis, y la isomerización E/Z ocasionada por el calor, luz o químicos, (Deshpande *et al.*, 1996). Pueden darse también otras reacciones químicas en otras partes de la molécula, especialmente en los grupos terminales, lo cual puede ocasionar modificaciones estructurales indeseables.

En los alimentos la causa principal del deterioro de los carotenoides es la oxidación. Los pigmentos se pueden autooxidar por reacción con oxígeno atmosférico a velocidades que

dependen de la luz, el calor y la presencia de pro- y antioxidantes. En general, las reacciones de oxidación son debidas a la formación de radicales libres en tres etapas distintas. (Fennema, 1993). Sin embargo, en un estudio acerca del  $\beta$ -caroteno, se observó que durante la oxidación del pigmento no existe una fase *lag*, típica de la autooxidación de las grasas y que la reacción no es autocatalítica; esto es, no se da la formación de un intermediario reactivo que se descomponga en otras especies que a su vez catalicen la reacción. Cuando existe oxígeno en el medio, al igual que en el caso de las grasas, la reacción entre el  $\beta$ -caroteno y el oxígeno es dependiente de la presencia de iones metálicos (El-Tinay y Chichester, 1970).

En general los carotenoides sufren la oxidación acoplada en presencia de lípidos a velocidades que dependen del sistema. Los carotenoides ordinariamente son más estables en sistemas con alto grado de insaturación, posiblemente por que el sistema lipídico acepta los radicales libres más fácilmente que el caroteno. Al contrario, los carotenos son menos estables en sistemas lipídicos con bajo grado de insaturación, aunque existen excepciones a este respecto. Los carotenoides pueden actuar como antioxidantes o pro-oxidantes dependiendo del sistema (Fennema, 1993). Así, algunos carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, la luteína y el licopeno actúan como antioxidantes en fases lipídicas atrapando radicales libres o extinguiendo físicamente el oxígeno singulete, (Deshpande *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha observado que el  $\beta$ -caroteno actúa como un pro-oxidante en la oxidación de triglicéridos purificados de aceite de colza, en presencia o ausencia de luz. La luteína actúa también como pro-oxidante de triglicéridos; los resultados indican que, a mayor concentración de luteína, mayor la formación de hidroperóxidos provenientes de la autooxidación de triglicéridos en ausencia de luz. Por otro lado, la combinación de luteína con  $\gamma$ -tocoferol resulta en una inhibición de la formación de hidroperóxidos en presencia de luz (Haila *et al.*, 1996).

En poblaciones humanas con diferentes hábitos alimenticios se ha demostrado una correlación inversa entre el nivel de xantofilas en la sangre y la incidencia de enfermedades coronarias (Howard, *et al.*, 1996), lo que resulta altamente significativo.

En soluciones orgánicas, la actividad antioxidante de los carotenoides está relacionada con la concentración de oxígeno, la estructura de los pigmentos y la presencia de otros antioxidantes.

Algunos carotenoides son inestables en presencia de ácido; particularmente los 5,6-epóxidos como la neoxantina y la violaxantina, sufren fácilmente un rearrreglo a la forma 5,8-epóxido. La mayoría de los carotenoides son estables en presencia de álcalis. Algunos carotenoides sin

embargo, no pueden tolerar la presencia de álcali y sufren modificaciones estructurales; la fucoxantina, las  $\alpha$ -hidroxicetonas como la astaxantina y algunas cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas como la 3'-dehidroluteína, son ejemplo de ello.

Dada la susceptibilidad de los carotenoides a los factores anteriormente descritos, existen ciertas precauciones necesarias al trabajar con estos pigmentos. Entre estas precauciones se encuentran la exclusión de oxígeno, adición de antioxidantes, exclusión de luz solar, evitar el contacto con ácidos o álcalis, manejo de reacciones a temperaturas inferiores a la temperatura ambiente y almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 1.2.6 Biosíntesis y Funciones Biológicas

Los carotenoides son biosintetizados en microorganismos y en plantas (pero no en animales, los cuales pueden sólo modificarlos) a partir del isopentenil pirofosfato ( $\text{C}_5$ ) que es la unidad isoprenoide básica, (Britton, 1976). Este precursor inicia la síntesis de terpenos y de carotenoides por igual. Posteriormente aparece el geranylgeranyl pirofosfato ( $\text{C}_{20}$ ), del cual se deriva el fitoeno ( $\text{C}_{40}$ ), precursor de todos los carotenoides, (**Figura 6**). Esto nos lleva a pensar que para cualquier organismo existe una mezcla de carotenoides variante con el tiempo en función de su estado fisiológico. En efecto, el balance de carotenoides se ve afectado a medida que avanza la maduración de una fruta (Rodríguez, *et al.*, 1976; Monma, *et al.*, 1994). Mientras algunos carotenoides se encuentran en trazas, otros alcanzan concentraciones importantes.

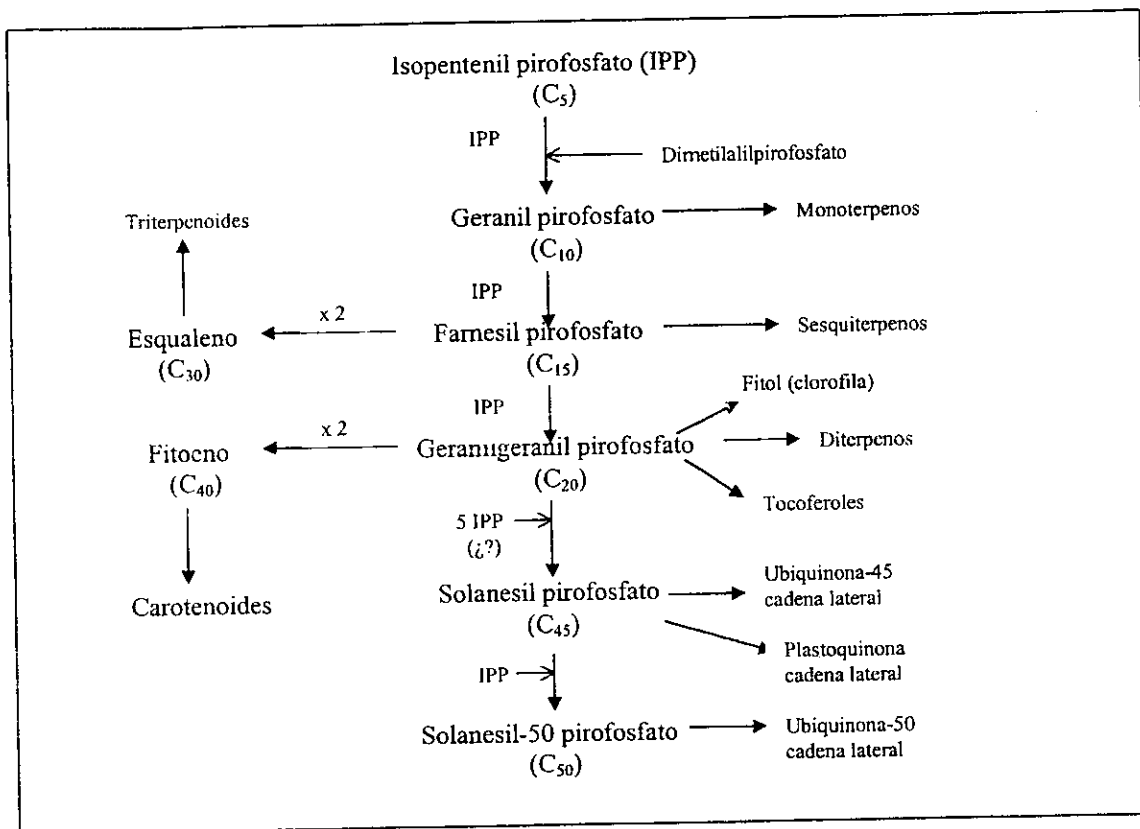


Figura 6. Esquema general para biosíntesis de terpenoides (Britton, 1976).

En cuanto a las enzimas que catalizan todas estas transformaciones se conocen algunas de las que intervienen en los pasos iniciales de la biosíntesis y que son comunes a muchos organismos, pero a medida que se avanza en la ruta, las enzimas van siendo típicas de especies diferentes, lo que complica la elucidación de los mecanismos. Aparte de las rutas de síntesis, existen otros procesos biológicos de importancia, como la isomerización. A este respecto, la información es casi inexistente. Existe un estudio acerca de una enzima del germen de trigo que regula la esterificación y desesterificación de la luteína. Esta es una acilhidrolasa altamente específica para la luteína, cuya regulación está siendo investigada (Kaneko y Oyanogi, 1995).

Las funciones de los carotenoides son varias en los seres vivos:

1) Proporcionan fotoprotección a los organismos fotosintéticos. La función de los carotenoides en la fotosíntesis es altamente dependiente de su localización y orientación relativa a otros componentes, especialmente la clorofila o bacterioclorofila en los complejos pigmento-proteína de las membranas fotosintéticas. En plantas y algas, la función más importante del caroteno es la



protección contra la oxidación fotosensible, protección que se da gracias a que apaga la energía de excitación del oxígeno singulete. Si los carotenoides no actuaran de esta manera, la fotosíntesis en un ambiente aerobio no sería posible.

2) Son precursores de vitamina A en mamíferos, siendo éste el papel nutricional más importante de los carotenoides. El aldehído de la vitamina A, retinal, cromóforo de los pigmentos visuales en el ojo, es central en el proceso de la visión.

3) Proporcionan protección contra algunas enfermedades; son capaces de desactivar radicales libres en membranas celulares, (Deshpande *et al.*, 1996). En este sentido, se ha sugerido que los efectos protectores de los carotenoides en contra del cáncer y enfermedades del corazón, no se encuentran siempre relacionados con la formación de vitamina A. Así, algunos carotenoides como el licopeno o la luteína, que no tienen actividad pro-vitamina A, pueden ser tan efectivos como el  $\beta,\beta$ -caroteno. Para desempeñar estos papeles, los carotenoides deben ser capaces de entrar en los tejidos en donde son requeridos y adquirir una localización intracelular correcta.

4) Luteína y zeaxantina son parte de la mácula del ojo en primates.

5) Se utilizan como marcadores sexuales en algunas especies de pájaros.

### **1.3 Los fluidos supercríticos**

#### **1.3.1 Surgimiento y Desarrollo Actual**

Los fluidos supercríticos son sustancias puras que al someterse a temperatura y presión superiores a las críticas (constantes para cada compuesto) dejan de ser líquidos, dejan de ser gases y pasan a un nuevo estado, denominado "supercrítico". Como se aprecia en la **Figura 7**, más allá del punto crítico ( $T_c$ ,  $P_c$ ) no existe frontera (o línea de equilibrio) entre el estado líquido y el gaseoso frontera que sí existe entre el líquido y el gas abajo del punto crítico.

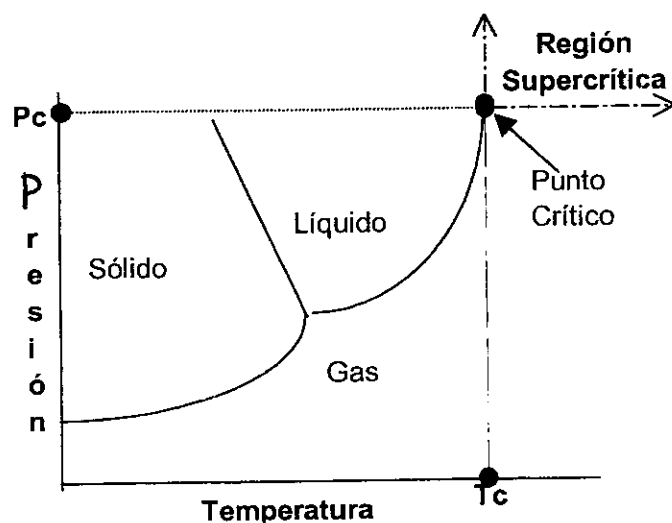


Figura 7. Diagrama de fases para una sustancia pura donde  $P_c$  y  $T_c$  son la presión y temperatura críticas respectivamente.

Los fluidos supercríticos se conocen desde principios de 1800, pero no fue sino hasta los cincuentas que se empezaron a considerar como una alternativa de uso industrial. Paulatinamente el área fue creciendo en importancia. Hoy en día ya existen instalaciones industriales que aplican esta tecnología. En cuanto a la aplicación del método de extracción con fluidos supercríticos, están los casos como la descafeinización de café, la obtención de extractos de lúpulo, la limpieza de piezas de cuarzo y de componentes de equipos para aviación, la limpieza de huesos para cirugías reconstructivas, la obtención de derivados útiles a partir de residuos de refinerías petroleras, etc. (Phelps, *et al.*, 1996; Kiran y Brennecke, 1993; Perrut, 1990). Adicionalmente, los sistemas de cromatografía con fluidos supercríticos ya están disponibles en el mercado. Las fases móviles y sistemas de detección disponibles, así como las aplicaciones de estos sistemas van en aumento, pues éstos presentan una serie de ventajas que se derivan directamente de la naturaleza de los fluidos supercríticos (Lee y Markides, 1987; Chester y Pinkston, 1990). La investigación en fluidos supercríticos no se ha limitado a la extracción para la purificación, sino que es también una tecnología de extrusión (Mulvaney y Rizvi, 1993) y de obtención de cristales o partículas con características definidas *a priori* y que resultan de utilidad para industrias como la farmacéutica (Mohamed, *et al.*, 1989; Larson y King, 1986). La extracción con fluidos supercríticos es altamente prometedora pues día con día se le encuentran nuevas aplicaciones. Entre ellas existen algunas tan espectaculares como la que promete nuevas soluciones al problema de los residuos tóxicos en áreas confinadas o suelos (*i.e.* remediación) y la que la

promueve como alternativa a la incineración. En los Estados Unidos se ha estimado que para el año 2000, 15% de los residuos que contienen materia orgánica, serán tratados con tecnología de oxidación con agua supercrítica, (Phelps, *et al.*, 1996).

### 1.3.2 Características de los Fluidos Supercríticos

Los fluidos supercríticos tienen propiedades intermedias entre los gases y los líquidos como se aprecia en la **Tabla 2**

**Tabla 2.** Comparación de propiedades físico-químicas de fluidos supercríticos con líquidos y gases

Propiedad	Gas	Fluido Supercr.	Líquido
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	(0.6-2.0) x 10 <sup>-3</sup>	0.2- 0.9	0.6-1.6
Coefficiente de difusión (cm <sup>2</sup> /s)	0.1- 0.4	(0.2-0.7) x 10 <sup>-3</sup>	(0.2-2.0)x 10 <sup>-5</sup>
Viscosidad cP	(1.0-3.0) x 10 <sup>-2</sup>	(1.0-9.0) x 10 <sup>-2</sup>	0.2-3.0

Fuentes: Ponce Ramírez e Izcapa Treviño (1989); Perrut, (1990).

Así, estas sustancias tienen propiedades que permiten su uso como disolventes, substituyendo en algunos casos a disolventes tan contaminantes como los clorofluorocarbonos. Las propiedades favorables de los fluidos supercríticos se combinan para conferir algunas ventajas al proceso de extracción supercrítica: 1) La difusividad, mayor que la de los líquidos, reduce limitaciones de transferencia de masa y puede dar lugar a tasas de extracción intensificadas para la extracción a partir de matrices sólidas porosas; 2) La tensión superficial baja permite una mejor penetración y mojado de poros pequeños que aquellos accesibles con disolventes líquidos; 3) Hay una pronunciada sensibilidad de la solubilidad a cambios en presión y temperatura, lo cual provee la posibilidad de manipulación de la selectividad en una extracción; 4) Se pueden llevar a cabo procesos a baja temperatura permitiendo el manejo de sustancias termolábiles (Randolph, 1990).

Vale la pena destacar el hecho de que se pueden "sintonizar" las características de los fluidos supercríticos por medio de la modificación de la presión y temperatura (dentro de la región supercrítica) para adecuar sus propiedades a cada aplicación en particular. Sin embargo, la modificación de las propiedades llega, usando presión y temperatura, a un límite a partir del cual no hay mayor cambio. Si se desea modificar aún más las propiedades existen dos opciones:

1) Utilizar un fluido supercrítico con distintas propiedades ó 2) Utilizar modificadores o cosolventes, que son disolventes orgánicos agregados en cantidades pequeñas (5-10%) al fluido principal para cambiar sus propiedades. En cuando a modificadores también se investiga el uso de modificadores no disolventes, como los surfactantes y los quelatantes que promueven la disolución de sustancias (Yazdi, *et al.*, 1996; Johnston, *et al.*, 1989; Smith, *et al.*, 1989), ampliando el espectro de uso de los fluidos supercríticos.

El CO<sub>2</sub> es, con mucho, el fluido supercrítico más utilizado por su inocuidad, bajo costo y sus moderadas variables críticas (Tabla 3). Sin embargo, el CO<sub>2</sub> se comporta básicamente como un fluido no polar, limitando la extracción de sustancias de polaridad intermedia. Por ello se pueden emplear otros fluidos supercríticos. En la Tabla 3 se muestran las variables críticas de algunos de ellos.

**Tabla 3. Constantes críticas de compuestos puros empleados como fluidos supercríticos**

Sustancia	Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (atm)
CO <sub>2</sub>	31.3	72.9
N <sub>2</sub> O	36.5	72.5
NH <sub>3</sub>	132.5	112.5
Xe	16.6	58.4
Ar	150.9	48.0
H <sub>2</sub> O	374.1	217.7
CCl <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	111.8	40.7

Fuente: Phelps *et al.*, (1996).

El poder solvente de los disolventes orgánicos se compara con el de los fluidos supercríticos en la **Tabla 4**

Tabla 4. Equivalencia del parámetro de solubilidad entre disolventes orgánicos y fluidos supercríticos

Disolventes orgánicos	Parámetro de solubilidad $\delta$ (a)	Fluidos Supercríticos con $\delta$ equivalente
Metanol	14-15 13-14	NH <sub>3</sub>
Etanol	12-13	NO <sub>2</sub>
2-Propanol	11-12	H <sub>2</sub> S, HBr, HCl
Piridina, Dioxano	10-11	N <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> SH, Cl <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> Cl
Benzeno, Cloroformo, Acetato de etilo, Acetona	9-10	CH <sub>2</sub> CHF/(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH
Ciclohexano, Tetracloruro de carbono, Tolueno, Hexano	8-9	CH <sub>3</sub> CHF <sub>2</sub> , CHF <sub>3</sub> , Freon, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>
Eter etílico, Pentano	7-8	CCl <sub>2</sub> F <sub>2</sub> , CClF <sub>3</sub> , SF <sub>6</sub> , CO

Fuente: Phelps *et al.*, (1996).

- a) En el caso de disolventes líquidos,  $\delta = (\Delta E_v/V)^{1/2}$  donde  $\Delta E_v$  es la energía de vaporización y  $V$  el volumen molar.
- b) CO<sub>2</sub> @  $\rho = 1.23 \text{ g/cm}^3$  corresponde a estos disolventes.
- c) CO<sub>2</sub> @  $\rho = 0.9 \text{ g/cm}^3$  tiene un parámetro de solubilidad equivalente a los disolventes en este rango.
- d) CO<sub>2</sub> @  $\rho = 0.6 \text{ g/cm}^3$  puede sustituir a estos disolventes.

### 1.3.3 Solubilidad de solutos en un fluido supercrítico

El efecto de las variables críticas en la solubilidad de un soluto se explica convenientemente por medio de la ecuación propuesta por Chrastil (1982):

$$c = \rho^k \exp(a/T + b),$$

donde  $c$  es la concentración del soluto en el fluido,

$\rho$  la densidad,

$T$  la temperatura,

$k$  representa en número de moléculas de fluido que rodean al soluto en el equilibrio

$a$  y  $b$  son constantes empíricas.

Esta ecuación pronostica los siguientes efectos:

- La solubilidad aumenta con la densidad del fluido a temperatura constante.
- La solubilidad puede aumentar o disminuir cuando la temperatura aumenta a presión constante. (Perrut, 1990, Krukonis, 1984) (**Figura 8**)

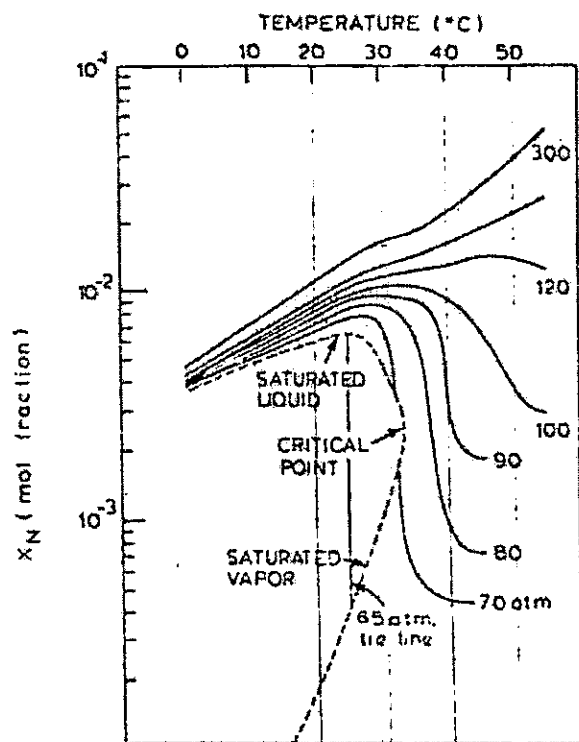


Figura 8. Solubilidad del naftaleno en CO<sub>2</sub> supercrítico, (Krukonis, 1985).

Es posible obtener las constantes empíricas  $a$ ,  $b$  y  $k$  de un soluto puro. El método consiste en determinar su solubilidad bajo diferentes condiciones de presión y temperatura y elaborar posteriormente un modelo que permite predecir la solubilidad de dicho soluto bajo un rango definido de condiciones supercríticas. El modelo ha sido empleado con éxito para algunos solutos puros, entre ellos, trioleína (Chrastil, 1982), capasicina y  $\beta$ -caroteno (Sakaki, 1992; Škeget *et al.*, 1995), ácido oleico (Škeget *et al.*, 1995). Chrastil (1982) también estableció un método para sistemas ternarios que se aplica cuando dos solutos desean separarse entre sí por medio de una extracción supercrítica. Conociendo las constantes empíricas de los dos solutos, la

ecuación predice bajo qué condiciones de extracción es posible separarlos. Esta ecuación es la siguiente:

$$\mu = c_1/c_2 = \rho^{k_1-k_2} \exp[(a_1/T) + b_1 - (a_2/T) - b_2],$$

donde  $\mu$  es el factor de separación de los dos solutos con concentraciones  $c_1$  y  $c_2$ ;  $k_1, k_2, a_1, b_1, a_2, b_2$  son las constantes empíricas para los solutos puros.

La ecuación de Chrastil (1982) se basa sólo en que la solubilidad de un soluto está en función de la densidad y temperatura del fluido. Por lo tanto ésta no puede ser utilizada al emplear cosolventes. Se ha propuesto, en el caso de los cosolventes, que éstos promueven la solubilidad vía efectos de polaridad, siendo prácticamente despreciable el efecto de la modificación en densidad (Dobbs, *et al.*, 1987).

Existen otras ecuaciones para explicar los fenómenos que ocurren durante la extracción supercrítica, tal es el caso de la Peng-Robinson, que es una de las más utilizadas (McHugh, *et al.*, 1983; Zou, *et al.*, 1989). Sin embargo, las ecuaciones de estado como la mencionada requieren, además de sustancias puras, datos de difícil adquisición, tales como la presión de vapor del soluto, su punto de ebullición, sus constantes críticas (las cuales se calculan tratándose de solutos termolábiles), etc. Por lo anterior son pocos los estudios que llevan a cabo estimaciones de este tipo tratándose de productos naturales. Cygnarowicz, *et al.*, (1995) determinaron la solubilidad del  $\beta$ -caroteno por este método.

Para determinar la solubilidad de solutos en fluidos supercríticos, también se puede utilizar la teoría de los parámetros de solubilidad (Tabla 4). Esta teoría sostiene que para maximizar la extracción de un soluto es necesario que su parámetro de solubilidad sea igualado al del fluido supercrítico, (Favati, *et al.*, 1988).

El parámetro de solubilidad se puede determinar conociendo las constantes críticas del fluido supercrítico por medio de la ecuación de Giddings *et al.*, 1968:

$$\delta = 1.25 P^{1/2} (\rho_{\text{rgas}} / \rho_{\text{r,L}}),$$

donde  $\delta$  es el parámetro de solubilidad,

$P$  es la presión,

$\rho_{\text{rgas}}$  es la densidad reducida del gas

$\rho_{\text{r,L}}$  es la densidad reducida del líquido.

$$\rho_{\text{r}} = \rho / \rho_{\text{crítica}}$$

En la **Tabla 4** se proporcionan valores de esta constante para el  $\text{CO}_2$  supercrítico bajo diferentes condiciones de operación.

Para estimar el parámetro de solubilidad del soluto a extraer, resulta práctico el método de contribución de grupos descrito por Fedors (1974). Este es un método aditivo que emplea constantes molares de atracción. Para conocer  $\delta$  de un soluto basta con conocer su fórmula molecular y obtener de tablas los valores de  $\Delta e$  y  $\Delta v$  que corresponde a cada grupo funcional o atómico que la molécula porta. Posteriormente, se lleva a cabo la sumatoria de estos valores y se obtiene  $\delta$  por medio de la siguiente ecuación:

$$\delta = \frac{[\sum \Delta e]^{1/2}}{[\sum \Delta v]^{1/2}}$$

donde  $\delta$  es el parámetro de solubilidad,

$\Delta e$  y  $\Delta v$  son las constantes atómicas aditivas y de contribución de grupos para la energía de sublimación y el volumen molar respectivamente.

Fedors (1974)

#### 1.3.4 Extracción con Fluidos Supercríticos

Existen dos maneras de llevar a cabo una extracción supercrítica: la dinámica y la estática. En la dinámica (o continua) se pasa al fluido a las condiciones de temperatura y presión elegidas a través de la muestra (**Figura 9**). Los materiales solubles pasan hacia el separador (trampa) o sistema de recuperación. La recuperación se lleva a cabo mediante una disminución de presión, lo



que propicia la precipitación fuera de solución de los analitos. La presión se disminuye hasta el valor para el cual, de acuerdo al diagrama de solubilidad, la solubilidad del compuesto es notablemente más baja.

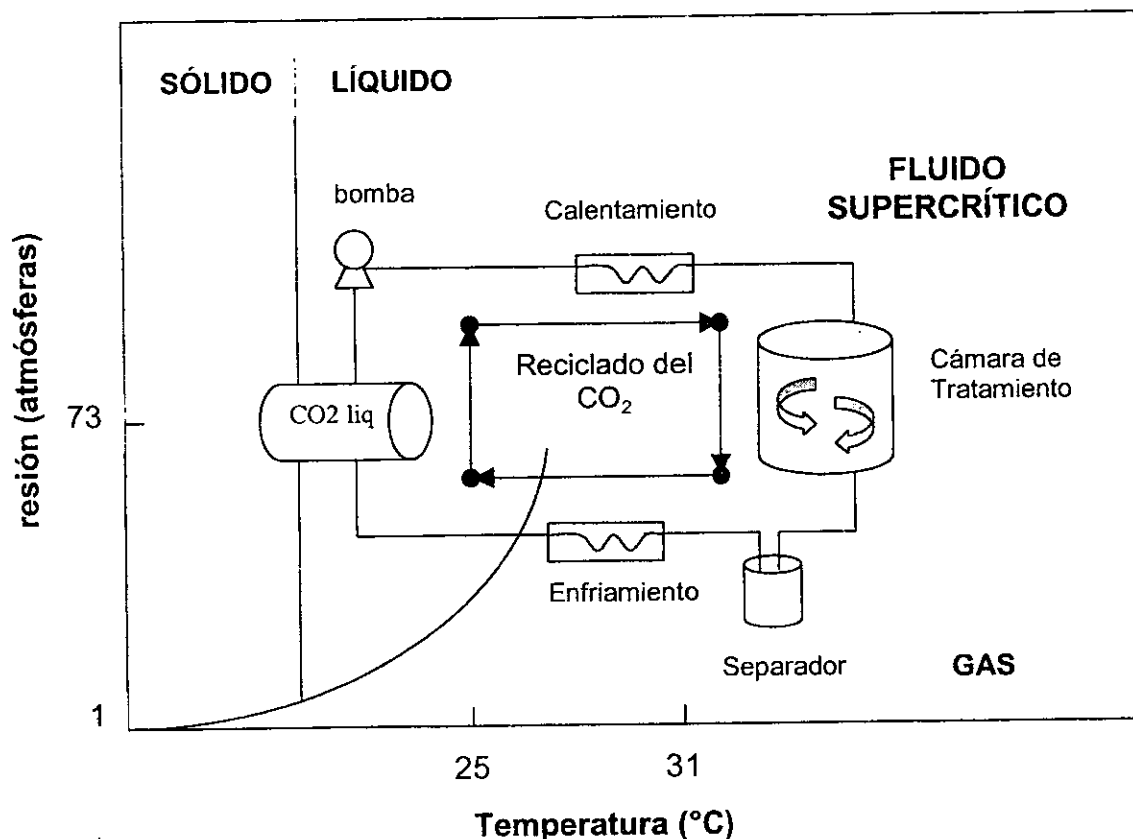


Figura 9. Ciclo de tratamiento con fluidos supercríticos

Por ejemplo, las condiciones de extracción para el naftaleno, cuyo diagrama de solubilidad se muestra en la **Figura 8**, serían 300 atm, 55°C en la cámara de extracción (concentración de 5% molar en el  $\text{CO}_2$ ) y 90 atm y 43°C en el separador (concentración de 0.02% molar en el  $\text{CO}_2$ ). El  $\text{CO}_2$  que sale del separador vuelve a comprimirse para ser nuevamente llevado hacia la muestra y el ciclo continua hasta que se haya extraído todo el compuesto de interés de la misma .

Alternativamente, la precipitación de analitos puede llevarse a cabo por disminución de temperatura, lo que permite comprar equipo un poco más barato (Krukoniš, 1985). En el caso del

naftaleno se disminuiría la temperatura a 300 bars de 55°C a 20°C (concentración de naftaleno 1.2% mol). Aún otra posibilidad consiste en que cerca del punto crítico, aumentos en temperatura propician la disminución de la solubilidad del naftaleno por lo que operando a presiones cercanas al punto crítico podría aumentarse la temperatura en el separador.

Durante la extracción estática (o intermitente), el fluido a las condiciones seleccionadas de presión y temperatura permanece, por un tiempo definido, en contacto con la muestra. Es común utilizar agitación durante este tiempo de contacto. Posteriormente es posible pasar al separador y disminuir la presión hasta presión atmosférica con o sin recuperación de CO<sub>2</sub>. En el caso de plantas productoras que operen en batch, la recuperación exhaustiva del CO<sub>2</sub> es necesaria por razones económicas, (Eggers y Sievers, 1989).

Hawthorne, *et al.* (1995) han propuesto que la solubilidad de un soluto se ve limitada en dos pasos: a) La desorción del soluto de la matriz y b) la solubilidad y elución del soluto por el fluido. Estos autores han llegado a las siguientes generalizaciones:

- Para las muestras en las que la concentración de solutos es alta y la interacción con la matriz es débil, la solubilidad estará limitada por el segundo paso, el de solubilidad y elución. Para estas muestras:
  - El incremento en el flujo del fluido aumentará la eficiencia de la extracción.
  - Las muestras pequeñas se extraerán más rápido que las muestras grandes.
  - La extracción estática será menos efectiva que la dinámica, si se emplea el mismo tiempo en ambas.
  - Para mejorar la eficiencia se recomienda incrementar la presión, modificar la temperatura y/o añadir un modificador.
- Las muestras en que los solutos están en baja concentración e interactuando fuertemente con su matriz, estarán limitadas por el paso de desorción del soluto de la matriz. Para este tipo de muestras:
  - El incremento de flujo no tiene mucho efecto en la rapidez de extracción.
  - La cantidad de muestra no tienen mucha relación con la rapidez de extracción.
  - Las extracciones estáticas son tan eficientes como la dinámicas llevadas a cabo durante el mismo periodo de tiempo.

- Para mejorar la eficiencia se recomienda reducir el tamaño de partícula de la muestra, añadir un modificador que rompa las interacciones entre matriz y soluto o incrementar la temperatura para incrementar la cinética de desorción.

### 1.3.5 Uso de Modificadores

Es práctica común el añadir modificadores tales como metanol, etanol, acetona y halocarburos al CO<sub>2</sub> supercrítico con la finalidad de incrementar las solubilidades de compuestos específicos (Phelps *et al.*, 1996). Los disolventes utilizados como modificadores se escogen siguiendo, en principio, los mismos lineamientos que se usan para los disolventes líquidos tradicionales (Sunol *et al.*, 1985), es decir, tomando en cuenta la naturaleza química del soluto que se desea extraer como prioridad ante las interacciones de éste con el fluido supercrítico o con la matriz. Últimamente se ha venido reconociendo, sin embargo, que la matriz juega un papel muy importante, comportándose un poco como la fase estacionaria en la cromatografía (Clifford, 1996). Básicamente existen los modificadores polares y los no polares. Los modificadores pueden también actuar como reactivos, en estos casos, se usará el modificador más apropiado para llevar a cabo la reacción. Tal es el caso de las transesterificaciones en fluidos supercríticos (Jackson y King, 1996) y de las derivatizaciones en fluidos supercríticos que tienen por objeto modificar químicamente los solutos para incrementar su solubilidad en el fluido.

La adición de un cosolvente al fluido supercrítico modifica las fuerzas intermoleculares atractivas entre disolvente, solutos y matriz. Se ha llegado a la conclusión de que en la región supercrítica la modificación de la densidad del disolvente debida a la adición de modificadores, no contribuye de forma importante en la intensificación de la solubilidad. El aumento de solubilidad se entiende, entonces, como una función de las fuerzas intermoleculares entre el soluto y la mezcla CO<sub>2</sub>/modificador, (Dobbs *et al.*, 1987). Por otro lado, los modificadores pueden romper interacciones existentes entre el soluto y sitios activos de la matriz (Hawthorne *et al.*, 1995), o hinchar la matriz de tal forma que los analitos queden liberados y la extracción sea más eficiente (Knipe *et al.*, 1993).

Para que el cosolvente rinda el efecto esperado deberá formar una sola fase con el fluido supercrítico en lo que se llama la "presión crítica de la mezcla", que para la mayoría de los cosolventes se encuentra entre 100 y 150 atm a 50°C (Clifford, 1996). Para estimar la presión

crítica y la temperatura crítica de la mezcla se ha empleado el método de Heidemann y Khalil (1980). Resulta más práctico, sin embargo, llevar a cabo una inspección visual de la celda de extracción para encontrar las constantes críticas de la mezcla. Para ello se han empleado reactores de cuarzo o de zafiro, los cuales están diseñados para soportar la presión crítica de la mezcla (Dobbs *et al.*, 1987; Vieville, *et al.*, 1993 ).

### 1.3.6 Extracción de carotenoides con CO<sub>2</sub> supercrítico

Se cuenta con algunos reportes de la extracción de carotenoides con CO<sub>2</sub> supercrítico. En todos ellos se emplea material vegetal liofilizado. En el caso de Spanos *et al.*, (1993) se liofilizaron camotes antes de extraerles el  $\beta$ -caroteno, para evitar el fenómeno del "*case hardening*" (endurecimiento de la capa externa del material) durante el secado convencional, el cual demostraron, impide la migración de carotenoides de la matriz hacia el fluido supercrítico.

Todas las investigaciones coinciden en que se requiere presiones "altas" para maximizar la extracción. Hay que señalar que los equipos utilizados en estos ensayos tenían capacidades diferentes. Favati *et al.*, (1988) extrajeron luteína y  $\beta$ -caroteno con un equipo que logró alcanzar presiones de hasta 700 atm, mientras que en el estudio de Spanos *et al.*, (1993) sólo se alcanzaron presiones de 414 atm. Barth *et al.* (1995) extrajeron  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, investigando la adición de etanol al 5 y 10% como modificador, encontrando a 300 atm. y 10% de etanol el máximo rendimiento de la extracción. Dichos autores sostienen que el uso de modificadores de polaridad intermedia o baja como el cloruro de metileno o el hexano no mejora el rendimiento de extracción. En el estudio de Subra *et al.*, (1989) se llegó sólo hasta 280 bars, pero se investigaron temperaturas de hasta 67°C para la extracción de carotenos de la zanahoria. Los mismos autores investigaron el tamaño de partícula, encontrando que al reducir el tamaño de partícula la eficiencia de extracción mejora. Esto último confirmaría, de acuerdo a Hawthorne, *et al.*, (1995) que las interacciones de los carotenos con su matriz (en este caso zanahoria) son fuertes y se requiere de mecanismos para liberarlos. A Subra y colaboradores (1989) les funcionó el incrementar la temperatura, lo cual ya menciona Hawthorne (1995), pero existe un límite que no debe excederse: siendo los carotenoides sensibles al calor la temperatura no debe pasar los 56°C

para tiempos iguales o menores a 20 minutos o no debe exceder 40°C en cualquier otra condición (Davies, 1976).

Por otro lado, se ha encontrado en los casos de Favati *et al.*, (1988) y Spanos *et al.*, (1993) que la extracción es más eficiente al incrementar el volumen total de fluido utilizado, en una extracción siempre dinámica, pero no se ha investigado el efecto del tiempo de contacto.

Favati *et al.*, (1988) uso la teoría de parámetros de solubilidad para postular que se necesitarían presiones de 1400 atm. para maximizar la extracción de luteína libre con puro CO<sub>2</sub> supercrítico, mientras que para el β-caroteno se requeriría una presión más baja. Sin embargo, como demostraron Barth *et al.*, la presión puede ser sustancialmente reducida al incorporar un modificador al proceso de extracción, efecto que también fue observado por Vasilakos *et al.*, (1984) durante la extracción supercrítica de carbón. Residuos de un modificador como el que Barth *et al.*, utilizaron (etanol) no presenta problemas aún en los productos para la industria farmacéutica, la que permite la presencia de pequeñas cantidades de éste en drogas terapéuticas (Clifford, 1996).

Como se ha expuesto, *Tagetes erecta* es una especie rica en metabolitos de interés: abundante en carotenoides de valor en la industria avícola que pueden resultar fármacos poderosos para el tratamiento de enfermedades degenerativas, también posee sustancias con actividad insecticida y fungicida. La especie aún podría tener importancia como fuente de polisacáridos de naturaleza hemicelulósica, cuyas propiedades los hacen susceptibles de sustituir a la goma arábica, tan buscada por sus propiedades emulsificantes y formadoras de películas.

La utilización productiva de esta especie requiere de tecnologías limpias y efectivas, que permitan por un lado la obtención y conservación de propiedades biológicas específicas y por el otro, el cuidado del medio ambiente.

La extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico cuenta con las características buscadas, ya que permite la extracción selectiva de compuestos de polaridad o peso molecular distinto y es además un método limpio.

## **1.4 Objetivos**

Con base en la información presentada hemos formulado los siguientes objetivos de trabajo.

### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar la extracción de los carotenoides contenidos en *T. erecta* mediante CO<sub>2</sub> supercrítico.

### **1.4.2 Objetivos particulares**

1. Determinar la influencia de la presión y de la temperatura del CO<sub>2</sub> supercrítico en la eficiencia de la extracción de ésteres de xantofilas.
2. Determinar la influencia del uso de cosolventes en la extracción de ésteres de xantofilas.
3. Extraer selectivamente los terpenos u otros componentes lipídicos no coloridos contenidos en la flor y comparar este extracto con el aceite esencial obtenido por hidrodestilación.

Habiendo presentado en esta primera parte los antecedentes que dan lugar al presente trabajo de investigación, en la segunda parte se describirán los experimentos llevados a cabo. Finalmente se discutirán los resultados obtenidos, comparándolos con la literatura disponible en la parte final de este trabajo.

## **SEGUNDA PARTE**

En esta segunda parte se presentarán las metodologías que se emplearon para el presente trabajo. Merecen especial atención aquellas metodologías desarrolladas para la extracción mediante CO<sub>2</sub> supercrítico: el tratamiento de la muestra previo a la extracción, los criterios para selección de cosolventes y la selección de variables de operación necesaria para la optimización del proceso propuesto.

## **II. Materiales y Métodos**

### ***Adquisición y tratamiento de las muestras***

Las pruebas preliminares en el extractor con CO<sub>2</sub> supercrítico, algunas hidrólisis enzimáticas y el análisis proximal de los pétalos de flor de cempasúchil se llevaron a cabo con flor fresca posteriormente liofilizada. La muestra fue la siguiente:

Flores de cempasúchil obtenidas en el Mercado de Sonora (México, D.F.)

Cortado y congelado a -70°C

Liofilizado y molido

Tamizado en malla No. 40

El resto de los experimentos, tanto las extracciones con CO<sub>2</sub> supercrítico, las hidrodestilaciones, las hidrólisis enzimáticas y la esterificación del residuo se llevaron a cabo con muestras industriales.

Muestras Industriales proporcionadas por Bioquimex-Reka (Querétaro, Qro., México)

- Flor ensilada, seca y molido (denominada harina de flor)
- Residuo industrial
- Purificado de diésteres de xantofilas
- Oleoresina de flor



## **2.1 Análisis generales de la materia prima**

Estos análisis se llevaron a cabo utilizando las metodologías propuestas por el AOAC (1995) dentro del apartado de alimento para animales. Los análisis realizados fueron los siguientes:

### **2.1.1 Humedad**

La opción de método para determinación de humedad se llevó a cabo en función del material disponible sea en la UNAM o en la ENSCT.

a) Secado en estufa de vacío:

Secar una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 2 g de materia seca hasta peso constante en una estufa a 95-100°C y 100 mm Hg (aproximadamente 5 hr).

b) Destilación con tolueno:

Conectar un matraz de vidrio de 250 mL por medio de un receptor volumétrico de agua (5 mL) del tipo Bidwell-Sterling a un condensador Liebig. Meter 30 g de muestra al matraz y cubrir con tolueno. Llenar el tubo receptor con tolueno a través del condensador. Llevar a ebullición y destilar suavemente (2 gotas/seg) durante el periodo inicial cuando se extrae la mayoría del agua. Posteriormente incrementar a 4 gotas/seg. Al finalizar la extracción de agua, enjuagar el condensador con tolueno y redestilar hasta no ver incremento en el volumen de agua. Dejar enfriar y leer el volumen de agua.

### **2.1.2 Grasa**

Colocar 2 g de muestra seca en un cartucho de extracción. Extraer con éter dietílico anhidro en extractor soxhlet. Secar a 100°C por 30 min. Enfriar y pesar.

### **2.1.3 Cenizas**

Pesar 2 g de muestra en crisol de porcelana previamente tarado a peso constante. Calcinar a 600°C por dos horas. Transferir a desecador, enfriar y pesar.

#### 2.1.4 Proteína

Colocar 0.7-2.2 g de muestra en un matraz para digestión de 500-800 mL. Agregar 0.7 g de HgO, 15 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y 25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (93-98%). Inclinar frasco y calentar lentamente hasta que cese el burbujeo. Hervir cuidadosamente por 2 hr. Enfriar y añadir 200 mL de agua. Enfriar y añadir 25 mL de solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (80 g/L). Mezclar para precipitar el Hg. Añadir gránulos de Zn, inclinar matraz y añadir capa de NaOH (450 g/L) sin agitar. Conectar inmediatamente a digestor y sumergir la punta del condensador en matraz receptor con solución estándar ácida (HCl 0.1N) con 5-7 gotas de indicador (rojo de metilo, 1 g/200 mL alcohol). Rotar frasco para mezclar componentes y calentar hasta que todo el NH<sub>3</sub> se haya destilado (150 mL de destilado). Retirar receptor, lavar punta del condensador y titular exceso de ácido con solución estándar de NaOH (0.1 N). Corregir usando determinación blanco con los reactivos.

$$\% N = [(mL \text{ ácido estándar} \times 0.1N) - (mL \text{ NaOH estándar} \times 0.1N)] (x1.4007/ g. Muestra) \times 6.25$$

#### 2.1.5 Fibra cruda

Extraer con éter etílico 2 g de material molido. Transferir a vaso de reflujo de 600 mL. Añadir 0.25 g de perlas de ebullición y 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.25% caliente lentamente. Reflujar por intervalos de 5 min hasta completar 30 min, rotando periódicamente para evitar que el material se pegue en las paredes. Filtrar al vacío (25 mm Hg) en embudo de vidrio especial (que no requiera papel) previamente calentado con agua muy caliente (no en ebullición), lavando los sólidos hacia el embudo con agua muy caliente. Filtrar a sequedad y lavar el residuo cuatro veces con porciones de 40-50 mL de agua muy caliente. No añadir solución de lavado al embudo sometido a vacío. Pasar el residuo a otro vaso de reflujo con la ayuda de una solución de NaOH (1.25%) caliente. Reflujar por intervalos de 5 min. hasta completar 30 min. Filtrar al vacío (25 mm Hg) en crisol lavado y precalentado con agua muy caliente. Transferir todos los sólidos con la mínima cantidad de agua muy caliente. Lavar el residuo una vez con 25-30 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.25% y luego con dos porciones de agua muy caliente de 25-30 mL, filtrando después de cada lavado.

No añadir solución de lavado al crisol sometido a vacío. Secar el crisol con el residuo 2 hr a  $130\pm 2^{\circ}\text{C}$ , enfriar en desecador y pesar. Calcinar 2 hr a  $550\pm 10^{\circ}\text{C}$ , enfriar y pesar.

$\% \text{ fibra cruda} = \text{pérdida de peso por calcinación} \times 100 / \text{peso de la muestra.}$

### 2.1.6 Xantofilas totales

En este caso se siguió un procedimiento basado en el método oficial del AOAC (1995) y modificado subsecuentemente por Bioquimcx-Reka. El procedimiento es el siguiente:

- Homogenizar la muestra y pesar con exactitud alrededor de 1 g. Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL.
- Agregar 50 mL de mezcla extractante (hexano:acetona:etanol absoluto:tolueno, 10:7:10:6).
- Calentar a baño maría  $50 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Enfriar a temperatura ambiente.
- Esperar a que se sedimenten las partículas. Tomar con pipeta volumétrica 5 mL de la muestra y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL que contenga 25 mL de mezcla extractante.
- Agregar 2 mL de hidróxido de potasio metanólico (solución al 40%).
- Colocar el matraz en baño maría  $56 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Colocar condensador para evitar pérdidas de disolvente. Enfriar a temperatura ambiente utilizando agua fría.
- Añadir al matraz 30 mL de hexano grado reactivo.
- Agregar 20 mL de sulfato de sodio solución al 10% y agitar vigorosamente durante 1 min.
- Aforar con sulfato de sodio 10% y agitar vigorosamente.
- Dejar reposar en oscuridad una hora hasta la separación de fases. La fase superior hexánica es de 50 mL.
- Tomar con pipeta volumétrica 5 mL de la solución hexánica y transferir a un matraz volumétrico de 25 mL.
- Aforar con hexano grado reactivo y mezclar.
- Medir la absorbancia de la muestra a 474 nm utilizando hexano grado reactivo como blanco. La absorbancia deberá estar entre 0.25 y 0.75
- Utilizar la siguiente fórmula para calcular las xantofilas totales:

$$\text{Xantofilas totales (g/kg)} = \frac{A \times D}{P \times 236}$$

A = absorbancia

D = factor de dilución

P = peso de la muestra en g

### 2.1.7 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se utilizó como análisis cualitativo para monitorear la hidrólisis enzimática de los ésteres de xantofilas. El método empleado fue proporcionado por Bioquimex-Reka. El sistema de eluyentes utilizado fue hexano:acetato de etilo (90:10) en placas de gel de sílice. Este sistema permite distinguir entre xantofilas libres, xantofilas monoesterificadas y xantofilas diesterificadas. Los Rf para este sistema son los siguientes:

Componentes	Rf
Xantofilas libres	0.06
Xantofilas monoesterificadas	0.32-0.038
Xantofilas diesterificadas	0.92

## 2.2 Metodologías generales para la obtención de oleoresinas y aceite esencial

### 2.2.1 Extracción con hexano

Las extracciones con hexano se llevaron a cabo para conocer el rendimiento de oleoresina con respecto a la flor y poder posteriormente determinar el contenido de xantofilas libres en la oleoresina así obtenida. Estos datos serían base comparativa de los extractos supercríticos. La oleoresina también fue hidrodestilada y este aceite esencial analizado.

Se llevaron a cabo extracciones por triplicado. Para ello se empleó un aparato soxhlet tradicional. Las extracciones se consideraron completas cuando los componentes coloridos habían sido todos

extraídos (8 h). Se extrajeron muestras de 25 g con 600 mL de hexano. El hexano se evaporó a presión reducida y el material extraído se pesó para calcular el rendimiento. El material así obtenido se denomina oleoresina de laboratorio en lo sucesivo

### 2.2.2 Obtención del aceite esencial

Si bien se tenían algunos reportes de aceites esenciales de esta planta, no se conocía cual podría ser la diferencia de éstos con la materia prima industrial (harina de flor). Las hidrodestilaciones permitieron conocer la cantidad y la calidad del aceite esencial.

Se extrajo aceite esencial a partir de harina de flor, oleoresina de flor y residuo industrial de flor. Esto se llevó a cabo con la finalidad de determinar si los perfiles cromatográficos de los aceites esenciales recuperados eran iguales o distintos. Los perfiles obtenidos a partir de harina de flor también servirían para tener un extracto contra el cual comparar los extractos supercríticos obtenidos y los obtenidos a partir del residuo industrial permitirían conocer si esta muestra estaba libre o no de lípidos.

El aceite esencial se extrajo por hidrodestilación utilizando un aparato similar al descrito en la Farmacopea Europea (Koedam A, 1987). En el **anexo II** se encuentra un diagrama de un aparato similar al empleado. Se pesaron 250 g de harina de flor y se colocaron en el matraz bola del aparato junto con 4 L de agua destilada. Transcurridas las 4 hr de hidrodestilación, el aceite pegado en las paredes internas del aparato se recuperó utilizando hexano. Posteriormente el hexano se evaporó al aire y se calculó el rendimiento por diferencia de pesos. Las hidrodestilaciones se llevaron a cabo por triplicado. Los perfiles de las muestras descritas se obtuvieron por cromatografía de gases (**anexos III y IV**). Posteriormente se obtuvo un perfil de aceite esencial de harina de flor y se identificaron algunos de los compuestos por espectroscopía de masas (**anexos V y VI**). Este último se comparó con los extractos supercríticos obtenidos durante el mismo período (**anexo V**)

## 2.2.3 Análisis por cromatografía de gases del aceite esencial

La cromatografía de gases es un método muy utilizado para el análisis de aceites esenciales. Se puede obtener el perfil de los aceites antes de proceder a su identificación definitiva. Esto permite tener idea de la abundancia relativa de los compuestos, así como llevar a cabo una preidentificación.

Los perfiles cromatográficos de los diferentes aceites esenciales se determinaron en utilizando el siguiente equipo:

Hewlett Packard 5890 A, equipado con un inyector split (1:100) y un detector de ionización de flama. Integrador Hewlett Packard 3396 A.

Se fijaron las condiciones óptimas de separación en las siguientes columnas capilares:

Columna OV101 (Dimetilpolisiloxano, 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor, 0.22 mm diámetro interno, 50 metros): 100°C a 220°C, 2°C/min.

Columna CBW 20 M (polietilenglicol, 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor, 0.25 mm diámetro interno, 60 metros): 60°C a 220°C, 2°C/min.

Para ambas  $T_{\text{inyector}}=220^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{detector}}=220^\circ\text{C}$ . El gas acarreador fue Helio (0.9mL/min)

Los principales componentes del aceite esencial obtenido de las muestras se identificaron utilizando el método de los índices de retención o índices de Kovats (Kondjoyan y Berdagué, 1996). Este método consiste en inyectar estándares de hidrocarburos lineales ( $\text{C}_9$  a  $\text{C}_{17}$ ) para conocer sus tiempos de retención en cada columna bajo las condiciones del análisis. Posteriormente, se calcula el índice de retención de cada pico del cromatograma, con base en los tiempos de retención de los alcanos, utilizando la siguiente fórmula:

$$IK = \left( \frac{T_R - T_n}{T_{n+1} - T_n} + n \right) * 100$$

Donde,

IK Índice de Kovats del compuesto

$T_R$  = Tiempo de retención del compuesto analizado

$T_n$  = Tiempo de retención del alcano más cercano con tiempo de retención menor que el compuesto analizado

$T_{n+1}$  = Tiempo de retención del alcano n-1

n = Número de átomos de carbono del alcano n

Los índices de Kovats obtenidos se comparan con valores de tablas (*idem*, Davies, 1990) para la identificación de cada pico.

#### **2.2.4 Espectrometría de masas del aceite esencial y de los extractos supercríticos**

La cromatografía de gases-espectrometría de masas utilizada junto con los índices de retención, permite aumentar la confiabilidad de la identificación de los compuestos contenidos en el aceite esencial. Esta se efectuó en la muestra de aceite esencial extraído de harina de flor en un cromatógrafo idéntico al ya descrito. En este caso se empleó un detector selectivo de masas por impacto electrónico (HP 5971 series, energía de ionización de 70eV). Se usó una columna OPTIMA5 30 metros (0.20 mm; espesor 0.1  $\mu$ m) y helio (0.6 mL/min) como fase móvil. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: de 50 a 250°C (4°C/min).  $T_{\text{inyector}}=220^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{detector}}=270^{\circ}\text{C}$ .

Con el mismo método se analizaron los extractos supercríticos obtenidos bajo distintas condiciones y se compararon con el aceite esencial obtenido en el mismo período (**anexos V y VI**).

#### **2.3 Extracción de fosfolípidos de harina de flor**

La extracción de fosfolípidos se llevó a cabo para confirmar la presencia de estos materiales en la oleoresina de flor. El método clásico para la extracción de fosfolípidos emplea cloroformo y metanol. El extracto obtenido se fracciona y posteriormente se identifican y/o cuantifican los fosfolípidos. Se montó un equipo que consiste en un matraz balón con reflujo y agitación mecánica, sumergido en un baño de ultrasonido. Se usó el doble sistema de agitación puesto que el mismo sistema sin baño de ultrasonido no extrajo fosfolípidos. Se agregaron 20 g de harina de flor y 250 mL de una mezcla cloroformo: metanol en proporción 2:1. Después de una hora de extracción, se filtró y se volvió a extraer con una mezcla cloroformo:metanol (98:1, 250 mL) por un período de una hora. Se juntaron los extractos y se removió el disolvente en un rotavapor. La oleoresina resultante se lavó 10 veces con 100 mL de acetona a  $-10^{\circ}\text{C}$  con lo cual se

separaron la mayoría de los componentes coloridos, (Gober, *et al.*1993). La presencia de fosfolípidos se comprobó en cromatografía de capa fina utilizando sucesivamente dos sistemas de eluyentes:

1. Hexano:acetona (75:25) con el cual se separan los triglicéridos y lípidos relacionados y corren cerca del frente del disolvente.
2. Cloroformo:metanol:agua:amoníaco al 25% (60:30:4:2). Con este sistema se obtienen bandas de fosfolípidos que son reveladas por aspersion con un reactivo de azul de molibdeno (trióxido de molibdeno 1.3% en ácido sulfúrico 4.2M, Sigma), (Camciuc, 1997). El azul de molibdeno desarrolla una coloración azul en los compuestos que contienen fósforo.

#### ***2.4 Precipitación al etanol***

La precipitación al etanol se emplea para fraccionar compuestos a partir de oleoresinas obtenidas por extracción con disolventes. Esta técnica permite obtener extractos ricos en sustancias polares por un lado y un precipitado rico en compuestos no polares y pesados, por el otro.

Para obtener dichas fracciones se pesó medio gramo de oleoresina (obtenida por extracción con hexano) y se le agregaron 50 mL de etanol absoluto. Se metió esta mezcla a un baño de ultrasonido por 10 min y se metió al congelador (-24°C) por 4 hr. Luego se centrifugó a 1000 rpm, -5°C, 5 min. Se obtuvo de este modo un concreto (precipitado) y un sobrenadante (absoluto).

#### ***2.5 Extracción con CO<sub>2</sub> Supercrítico***

Las extracciones con CO<sub>2</sub> supercrítico se llevaron a cabo en un extractor diseñado por Hewlett Packard (**Figura 10**) para extracción analítica.



## 2.5.1 Descripción y especificaciones del extractor Hewlett Packard, 7680T.

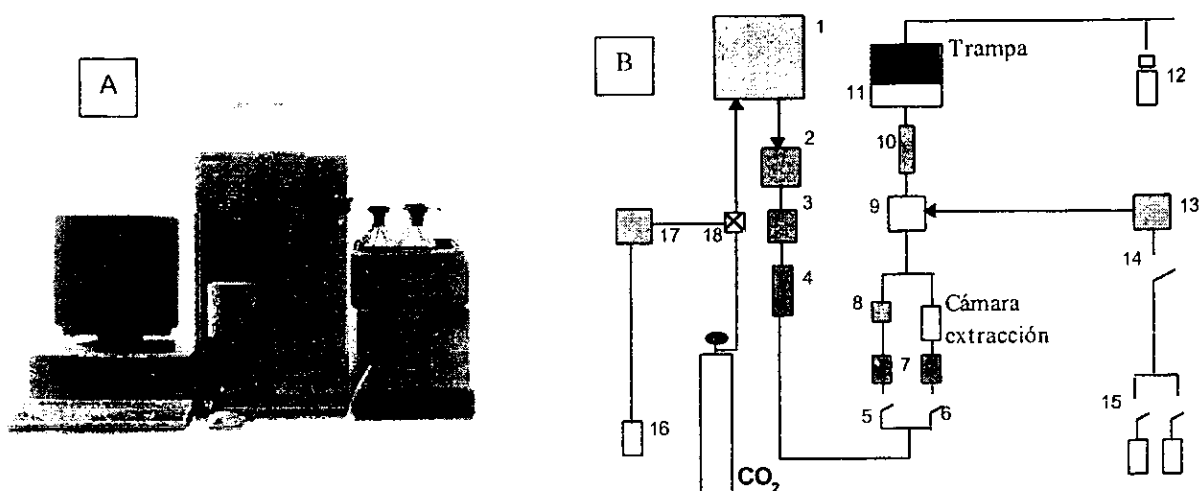


Figura 10. Extractor Hewlett Packard 7680 T (A) y diagrama simplificado del extractor conectado a la bomba de cosolventes HP 1050 (B) 1. Bomba de alta presión; 2. Controlador de pulsos; 3. Transductor de sobrepresión; 4. Filtro pre-válvula; 5. Válvula bypass; 6. Válvula de la cámara; 7. Precalentadores; 8. Transductor de control de presión; 9. Válvula de aislamiento de presión; 10. Filtro pre-restrictor; 11. Restrictor; 12. Charola de viales; 13. Bomba de disolventes para enjuague de trampa; 14. Válvula de bomba de cosolventes; 15. Válvulas de selección de disolvente de enjuague; 16. Cosolvente; 17. Bomba 1050 para cosolventes; 18. Válvula *check*.

### Especificaciones

Bombas y fluidos: bomba recíproca dual (bomba de cromatografía líquida modificada) enfriada criogénicamente optimizada para entregar CO<sub>2</sub> líquido. Rango de operación 77 a 386 bars (1,100 a 5,560 psi). Temperatura de operación 4°C. Rango de flujo de CO<sub>2</sub> líquido: 0.5-4.0 mL/min programable para cada paso de extracción. Exactitud de 2±% para una presión de 340 bars.

Cámara de extracción: capacidad de 8 cartuchos de extracción. Modos de extracción estático y dinámico. Temperatura de 25 a 150°C programable para cada paso de extracción. Rango de densidad 1.5 a 0.95 g/mL CO<sub>2</sub> programado automáticamente para cada paso de extracción. Hasta 300 min de tiempo programable por extracción dinámica, (6000 min total por método) y hasta 60 min extracción estática (1200 min total por método). Pasos de extracción por muestra: 20.

Cartuchos de extracción: Cartuchos de sello automático a fuerza constante de cerrado. 7 mL de capacidad con sellos peek, orientación vertical y tamaño de poro de 2.0 micras en los sellos. Tapones colocables a mano. Presión máxima 540 bar. Detección de fugas por computadora.

Sistema de *back-Pressure*: Un restrictor variable controla la presión del sistema seleccionada para cada paso de extracción independientemente del flujo de CO<sub>2</sub>. Rango de temperatura de 5 a 150°C.

Trampas para recuperación de analitos: Diol, tenax, C<sub>18</sub>, ciano y acero inoxidable. Rango de temperatura de operación: -30 a 150°C. Opción de dos disolventes de enjuague.

Colección de fracciones: Capacidad del carrusel: 21 viales de 2 mL cada uno. Capacidad de los viales de 0.2 a 1.8 mL. Capacidad del puerto de desecho: 0.2 a 10 mL ajustable para cada fracción.

Especificaciones físicas: Tamaño 68 cm x 43 cm x 53 cm; 83 cm x 46.3 cm x 52.8 cm con botellas de disolventes de enjuague y charola del carrusel. Peso: 68 kg.

Requerimientos de potencia: Consumo 740 VA máximo. Voltajes 100/120/220/240. Frecuencia 47.5 a 66 Hz.

El extractor se encuentra acoplado a una computadora HP 486 que tiene un software especialmente diseñado para este equipo (Chemstation de HP)

### **2.5.2 Extracción de muestras en el extractor HP 7680 T**

El procedimiento para llevar a cabo una extracción en un solo paso es el siguiente:

1. Filtrar y desgasificar los disolventes de enjuague y los cosolventes si se van a usar. Los disolventes deberán ser preferentemente calidad HPLC.
2. Purgar la bomba de disolventes de enjuague y de cosolventes si se va a utilizar.
3. Cargar la muestra en el cartucho o celda de extracción. Taparlos, colocando un círculo de papel filtro en cada tapón para evitar paso de partículas hacia la tubería.
4. Ajustar las condiciones de extracción en la computadora:
  - Temperatura y densidad de trabajo (la presión se ajusta automáticamente)
  - Flujo de CO<sub>2</sub>
  - Tiempo de contacto estático
  - Tiempo de flujo dinámico
  - Temperatura del restrictor durante la extracción

- Temperatura de la trampa durante la extracción
  - Selección de disolvente(s) de enjuague de la trampa
  - Selección del volumen muerto de la trampa
  - Flujo de enjuague hacia la trampa, volumen total y número de enjuagues
  - Temperatura de enjuague del restrictor
  - Temperatura de enjuague de la trampa
  - Selección del cosolvente a utilizar
  - Porcentaje en volumen del cosolvente (el porcentaje fracción mol se ajusta automáticamente)
5. Correr el método de extracción
  6. Recuperar en el disolvente de enjuague los analitos extraídos para análisis posterior. Esta solución se deposita automáticamente en viales.

### **2.5.3 Extracción de carotenoides de *T. erecta***

#### **2.5.3.1 Estudios de Solubilidad de Diésteres de xantofilas**

Se trabajó con el purificado de oleoresina de flor, que contiene 92% de diésteres de xantofilas, lo cual se determinó con el método de xantofilas totales descrito anteriormente. El purificado se utilizó tal cual y también se depositó sobre varios soportes. La deposición se llevó a cabo con la finalidad de mejorar la disponibilidad y con ello, la reproducibilidad de las extracciones.

#### **Deposición**

Como soportes se probaron algodón, fibra de vidrio (en hebras) perlas de vidrio pequeñas y perlas de vidrio grandes. Se procedió a determinar si el soporte liberaba eficientemente la muestra, pues esta debía ser completamente recuperable al lavar con hexano. Tanto el algodón como la fibra de vidrio y las perlas de vidrio pequeñas retenían colorante después de lavadas con hexano. Se observó que las perlas de vidrio grandes (diámetro promedio = 1.06 mm ) permitían

la recuperación completa e inmediata de la muestra al ser lavadas con hexano. Por lo anterior, se utilizaron estas perlas en lo sucesivo.

Para depositar la muestra se disolvió una cantidad conocida de diésteres (100 mg, 50 mg o 30 mg) en 10 mL de hexano. A esta solución se agregaron 10 g de perlas de vidrio previamente lavadas y secas. Se agitó y posteriormente se evaporó el disolvente mediante una corriente suave de nitrógeno. De esta manera se obtuvieron perlas de vidrio coloreadas con un contenido entre 3.7 y 1.7  $\mu\text{g}$  diésteres/mg de perlas. Estas perlas se observaron en el microscopio para encontrar que la muestra no estaba distribuída homogéneamente sobre ellas, es decir, había regiones donde la capa de muestra sobre la perla era más espesa que sobre otras partes de la misma perla. A pesar de esta heterogeneidad, se encontró que al obtener muestras del mismo lote de perlas se recuperaba con  $\text{CO}_2$  supercrítico una cantidad constante de diésteres. Las muestras se mantuvieron en congelación por 2 semanas, tiempo en el cual no disminuía apreciablemente su absorbancia inicial. Es importante señalar que, aunque se repitió el mismo protocolo para preparar muestra cada vez, se encontró cierta variación en el contenido de diésteres de lotes diferentes (aproximadamente  $\pm 0.5$   $\mu\text{g}$  diéster/mg de perlas).

La solubilidad de los diésteres en  $\text{CO}_2$  supercrítico se midió por medio de un método estático, (McHugh y Krukoni, 1985). Este método consiste en extraer una cantidad fija de muestra con un volúmen fijo de fluido en un sistema cerrado. El tiempo de contacto o de residencia del fluido en la cámara de extracción es variable, lo que permite determinar un tiempo de equilibrio, a partir del cual ya no se extrae mayor cantidad de pigmentos. Las variaciones de este tiempo fueron desde 0 min hasta 60 min de 10 en 10 min (1 hr es lo máximo permitido por el software del extractor).

Con un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 2) se midió la absorbancia de los extractos recuperados en hexano a 474 nm y se comparó con la de una curva patrón previamente obtenida con el purificado de diésteres de xantofilas, (**anexo VII**). Se calculó de igual manera el contenido de diésteres que permanecían en el residuo. De esta manera se tuvo el balance de diésteres durante el proceso de extracción.

Se variaron parámetros que habían demostrado ser relevantes en los estudios preliminares (presión y temperatura) (Tabla 5). Se dejó fijo el volumen de lavado (1 volumen) una vez transcurrida la extracción estática, o sea que se utilizaron 7 mL de CO<sub>2</sub> para extraer el diéster en todos los casos.

**Tabla 5: Variables de experimentación para determinar la solubilidad de diésteres de xantofilas de flor.**

A densidad fija		A temperatura fija	
$\rho$ (g/mL)	T (°C)	T (°C)	$\rho$ (g/mL)
0.9 (P =280 bars)	40	40	0.7 (P=115 bars)
0.9 (P=316 bars)	45	40	0.8 (P=164 bars)
0.9 (P= 350 bars)	50	40	0.9 (P=280 bars)
0.9 (P=365 bars)	55		

Se obtuvieron curvas de equilibrio para el sistema empleado que permitieron la obtención de datos de solubilidad de los diésteres de xantofilas bajo las distintas condiciones empleadas. Estos datos se racionalizaron por medio del método de Chrastil (1982).

### **2.5.3.2 Extracciones sucesivas de harina de flor**

Debido a que se observaron rendimientos medios de extracción con CO<sub>2</sub> puro a temperaturas que no degradaran el colorante, se decidió probar qué tan útil resultaba llevar a cabo extracciones sucesivas. Para ello se extrajo tres veces una misma muestra de 1.0 g harina previamente tamizada (malla 40 para estandarizar el tamaño de partícula). Se llevó a cabo una extracción estática con 45 min. de tiempo de contacto y 30 min. de extracción dinámica con un flujo de 4 mL/min. La densidad y temperatura de extracción fijaron en 0.9 g/mL y 40°C respectivamente, de acuerdo a los resultados obtenidos para la solubilidad de diésteres de xantofilas.

### **2.5.3.3 Extracción de carotenoides con mezclas CO<sub>2</sub> supercrítico/ cosolventes**

La adición de cosolventes se llevó a cabo por medio de una bomba para HPLC (modelo HP 1050) conectada al extractor, como se muestra en la **Figura 10**.

Con el propósito de incrementar el rendimiento de extracción mediante variaciones en la polaridad, se estudió la incorporación de cosolventes al CO<sub>2</sub> supercrítico. Se utilizó la misma muestra que para el estudio de solubilidad con CO<sub>2</sub> supercrítico puro, lo que permitiría hacer comparaciones. Basándose en la polaridad, se deseaba encontrar una tendencia que permitiera optimizar la elección del cosolvente.

Fue importante considerar que las propiedades críticas del CO<sub>2</sub> se modifican al incorporarle cosolventes y la mezcla tiene diferentes constantes críticas que el fluido puro. Para predecir las constantes críticas de la mezcla empleó el software Eqfases versión 2.0, desarrollado en la Facultad de Química (UNAM) y proporcionado amablemente por Fernando Barragán Aroche.

#### **Descripción de Eqfases2**

Eqfases2 es un programa para la predicción rigurosa del equilibrio de fases mediante la utilización de ecuaciones de estado cúbicas en el volumen. El programa tiene tres módulos: un módulo interno de evaluación de propiedades, otro intermedio para la predicción de equilibrio de fases mediante procedimientos iterativos y un tercer módulo encargado de determinar la secuencia de cálculos adecuada para seguir las trayectorias de estado descritas por el sistema multicomponente en uso (Barragan y Guzmán, 1999). Los requerimientos de Eqfases2 se describen en el **anexo VIII**. Este software determina, entre otras cosas, las constantes críticas con base en el método de Heidemann y Khalil (1980), el cual ya se ha empleado para predecir constantes críticas de mezclas de fluido supercrítico con modificadores (Cygnowicz, et al, 1990). El software modela las variables críticas de cualquier mezcla, conociendo las fracciones molares de los componentes. Ejemplos de dicha aplicación se muestran en el **anexo IX**. Eqfases2 predice el punto crítico de la mezcla, pero no delimita la región supercrítica. En todos los casos se trabajó por arriba de la presión crítica de la mezclas (280 bars), pero de acuerdo a la teoría de equilibrio de fases, ésto no asegura que se está trabajando en una sola fase o en estado

supercrítico. Cuando se desea corroborar que se está trabajando en una sola fase se emplea un reactor de zafiro o cuarzo que permita ver separación de fases (Dobbs, et al, 1987).

También fue importante fijar la composición de cada mezcla para que fuera posible hacer comparaciones entre ellas. Desde un punto de vista comercial puede parecer más práctico fijar porcentajes en volumen, pero si se desea hacer una comparación a nivel molecular resulta más adecuado fijar el número de moles que intervendrán en la extracción. Un 5% en volumen de metanol corresponde a un 5.8 % molar; en cambio, un 10% en volumen de hexano corresponde a un 3.8% molar. El extractor que utilizamos permite fijar el porcentaje en volumen del cosolvente, más no la fracción molar. Es por ello que no fue posible utilizar el mismo porcentaje molar para todos los cosolventes, sino que se aproximaron los valores lo más que el equipo permitió.

## ***2.6 Extracción selectiva de componentes lipídicos no coloridos***

Se probaron varias condiciones de extracción, tratando de determinar si era o no posible separar aceites esenciales u otros lípidos sin obtener colorantes. Se trabajó por debajo de las condiciones supercríticas que extraían colorante, es decir, por debajo de la densidad límite a una temperatura dada. Se probó etanol al 5% como cosolvente con dos finalidades: a) determinar si al incorporarlo se lograba una extracción selectiva de los compuestos oxigenados contenidos en el aceite esencial y b) probarlo como agente disruptor de las fuerzas matriz-analitos, lo que incrementaría el rendimiento.

Se utilizaron 0.7 g de harina de flor para extraer con CO<sub>2</sub> puro los compuestos no coloridos. Se extrajo la muestra con un flujo de 1mL/min, 10 min. de tiempo de contacto y 10 min. de tiempo de extracción. El extracto se recuperó con hexano y luego se evaporó con nitrógeno gaseoso para tener el peso del extracto.

## ***2.7 Pruebas de hidrólisis enzimática***

La hidrólisis enzimática se pensó como alternativa a la hidrólisis alcalina que se lleva normalmente a cabo durante el proceso industrial de obtención de xantofilas.

Se tomó como base el artículo de Matsuno (1992) quien utilizó la hidrólisis enzimática para sustituir la hidrólisis básica en carotenoides sensibles a la alcalinidad. El procedimiento de base es el siguiente: Una solución acetona:buffer Tris-HCl (1:99) de diésteres de carotenoides (0.5 mg) se incuba con 360,000 unidades de lipasa. La enzima fue adquirida de Sigma, de fuente *Candida cylindracea* o *Candida rugosa*. Sus características fueron las siguientes: 835 unidades/mg de sólido. Una unidad es definida como un miliequivalente de ácido graso de aceite de oliva por hora a 37°C, pH = 7.2. La enzima tiene lactosa como excipiente y se utilizó sin purificación posterior.

Se utilizaron tres sistemas de reacción (Figura 11), considerándose así tres opciones para llevar a cabo la hidrólisis: 1) en fase continua agua:acetona; 2) en fase orgánica (hexano) con enzima inmovilizada y 3) en dos fases (hexano-agua). Para llevar a cabo la reacción en fase continua de hexano se utilizó un sistema similar al de la Figura 11 adicionado con un refrigerante de agua. La conversión se monitoreó por cromatografía de capa fina a diferentes tiempos dependiendo del tipo de sistema.

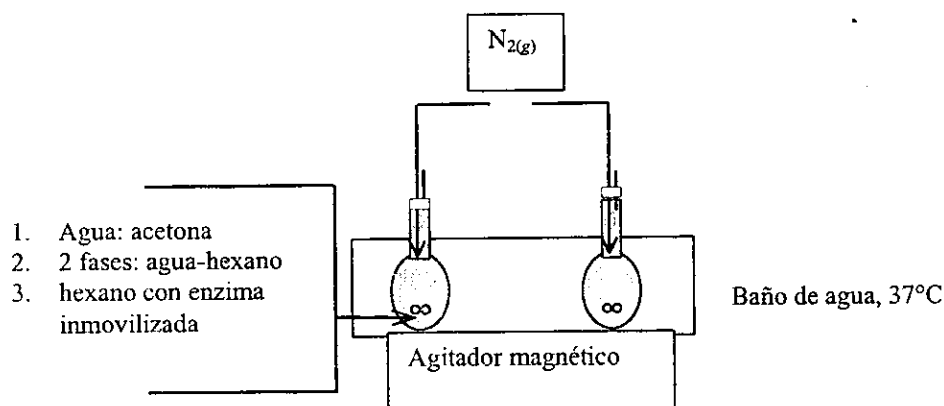


Figura 11. Sistemas para hidrólisis enzimática de diésteres de xantofilas.



**TERCERA PARTE**

En esta tercera parte se describirán y discutirán los resultados obtenidos durante el presente proyecto. Comenzaremos por los análisis generales de la materia prima, los que nos permite conocer mejor las características de *T. erecta*. Posteriormente abordaremos el tema principal, es decir, la extracción supercrítica de los carotenoides y de algunos otros compuestos contenidos en la especie de estudio.

### **III Resultados y Discusión de Resultados**

#### ***3.1 Análisis generales de la materia prima***

De la **Tabla 6** se aprecian las diferencias entre la flor secada por liofilización y la harina obtenida por ensilado y secado industrial.

**Tabla 6. Análisis proximal de la flor de *T. erecta***

Componente	% en flor fresca	% en flor seca	% en harina seca
Humedad	86.3	2.0	6.7 **
Cenizas	0.9*	6.3	28.2
Grasa	1.2*	8.6	11.8
Fibra cruda	2.1*	15.4	39.8
Proteína	1.3*	9.2	9.1
Fibra dietética	8.2	58.5	4.4
(por diferencia)			

\* = Datos calculados a partir del valor para flor seca.

\*\* = Secado en estufa de vacío.

La harina presenta una cantidad menor de fibra dietética que la flor desecada por liofilización, debido al ensilado previo de la muestra. El ensilado consiste en una fermentación ácido láctica durante la cual se producen enzimas y ácidos orgánicos. Consecuentemente los tejidos se hidrolizan y se libera agua, lo que facilita no sólo el secado de la muestra, sino la extracción hexánica posterior. El ensilado o la hidrólisis enzimática previa a la extracción se ha empleado repetidamente para incrementar la eficiencia de extracción de varias materias primas vegetales

(Tengerdy *et al.* 1992; Klaus, 1994; Delgadovargas y Paredeslopez, 1997). La hidrólisis enzimática (que emplea pectinasas, celulasas y hemicelulasas) tiene la ventaja de ser más controlada en comparación con el ensilado. En cambio, la hidrólisis que se lleva a cabo en el ensilado puede ser más o menos importante, dependiendo de la forma en que se lleve a cabo y de las condiciones ambientales, como la temperatura. De la **Tabla 6** se aprecia que el 90% de los polisacáridos que constituyen la fibra dietética de la flor se han hidrolizado en la muestra de harina, asumiendo que la muestra original es la misma. Por lo anterior, el porcentaje de fibra cruda aumenta. Esta fibra cruda es la que podría reutilizarse como sustrato de esterificación para la fabricación de films de tipo termoplástico. Bemiller *et al.* 1989 hicieron un análisis de los polisacáridos de la flor de un residuo industrial, encontrando que estaban constituidos por hemicelulosas básicamente. En el estudio de referencia la muestra había sido calentada y secada previo a la extracción de colorantes. Si bien el calentamiento pudo propiciar cierto grado de hidrólisis de los polisacáridos, éste no es comparable al de una muestra ensilada como la que aquí hemos analizado. Por lo anterior, se puede concluir que la naturaleza de los polisacáridos que constituyen el residuo industrial proporcionado es desconocida. De la **Tabla 6** también podemos observar que la cantidad de cenizas de la muestra industrial es marcadamente mayor que en cualquiera de las otras muestras. Esto se debe, muy probablemente, a la presencia de cantidades importantes de tierra en la muestra, debido a las prácticas de procesamiento de la flor. De confirmarse lo anterior, sería necesario desarrollar un programa de calidad de suministro, alentando a los productores de materia prima a mejorar sus procesos de cosecha/procesamiento. Finalmente, podemos observar que se obtuvieron proporcionalmente mayor cantidad de grasas en la harina de flor (entre las cuales se encuentran los carotenoides). Es posible que las muestras industriales provengan de una variedad mejorada de flor, que al proporcionar un mayor rendimiento de carotenoides totales, aumentara también el rendimiento en grasas totales.

### 3.2 Obtención de oleoresinas y aceite esencial

#### a) Oleoresina

Las oleoresinas son mezclas complejas que en ocasiones, como en el caso de *T. erecta*, pueden obtenerse por extracción; se obtienen con la finalidad de aislar los componentes a estudiar o a comercializar de la masa vegetal en cuestión. Una o varias purificaciones posteriores permiten el aislamiento de alguna familia o de algún compuesto de interés. Por ejemplo, durante la obtención de aromas se puede llevar a cabo una extracción con disolventes, seguida de una precipitación en frío para aislar los compuestos de interés (Ganou, 1993). La extracción hexánica ha sido empleada para obtención de tiofenos con actividad biológica (Kyo, 1990) y la extracción tradicional de carotenoides incluye siempre un paso de extracción con algún disolvente orgánico o una mezcla de éstos (Davies, 1976).

En el caso de *T. erecta* las oleoresinas constituyen la masa rica en carotenoides que puede posteriormente concentrarse o hidrolizarse, diluirse o mezclarse con otros componentes, obteniendo así productos comercializables. El residuo que resulta de la extracción podría ser reaprovechado como material rico en polisacáridos, evaluando previamente su calidad. En vista de aprovechar este residuo para la fabricación de películas plásticas, es importante conocer si contiene materiales residuales que puedan dificultar de cualquier modo la obtención de películas plásticas.

A pesar de que la extracción hexánica (Tabla 7) remueve gran cantidad de grasas de la flor (la totalidad si se compara con la extracción etérea) no logra agotar por completo los colorantes de la materia prima, pues la oleoresina obtenida del residuo es también colorida.

Tabla 7. Rendimientos de extracciones hexánicas en muestras de *T. erecta*

Material *	Promedio $\pm$ Desviación estándar**
Harina de flor	11.30 $\pm$ 0.17
Residuo industrial	0.37 $\pm$ 0.04

\* =Porcentajes en base seca. Humedad = 7.90 %  $\pm$  0.01,

humedad por destilación con tolueno.

\*\* =Resultado de tres determinaciones.

Kasumov (1992) ha reportado rendimientos desde 9 hasta 22% en oleoresina colorida a partir de once variedades distintas de *T. erecta*. Las características de la oleoresina obtenida del residuo están en función de la selectividad del disolvente de extracción (hexano), puesto que al residuo de extracción se le hicieron también extracciones con isopropanol y se encontró que se seguía obteniendo una oleoresina poco abundante (5.6% p/p). Ningún disolvente es absoluto en términos de solubilización y es por lo demás rara vez selectivo, así que por lo general se escoge el disolvente que da mejores rendimientos comparado con su disponibilidad. Se toman también en cuenta otros factores como el costo y el impacto ecológico y toxicológico (Ganou, 1993). Es por lo anterior que durante la extracción de una materia vegetal compleja como la flor de cempasúchil quedan compuestos residuales sin extraer junto con el colorante residual. Como se plantea en el **anexo I**, la oleoresina residual es susceptible de reacción en el transcurso de la esterificación con cloruro de octanoilo, que se lleva a cabo para la obtención de las películas plásticas a partir de los polisacáridos del residuo industrial.

### **b) Aceite esencial**

Los aceites esenciales obtenidos fueron de color más o menos amarillo con tendencia a formar cristales una vez que el disolvente se había evaporado por completo.

El aceite esencial se redisolvió en hexano y se obtuvo el barrido espectrofotométrico. Se encontró un espectro típico de diésteres de luteína, es decir, con máximos a 420, 445 y 475 nm. (**anexo X**). Se calculó, midiendo la absorbancia a 475 nm, que contenía aproximadamente 0.5% de carotenoides p/v. Esto se explica porque en el transcurso de la hidrodestilación los colorantes pueden ser co-arrastrados por el agua en ebullición a pesar de su alto peso molecular (en promedio 1031 g/mol para los diésteres de luteína). Los terpenos (peso molecular 200-250 g/mol), son los compuestos volátiles preferentemente extraídos durante la hidrodestilación (Koedam, 1987).

Los porcentajes de rendimiento de aceite esencial que se tienen como referencia son sumamente diferentes (**Tabla 8**), lo cual denota las grandes diferencias que pueden existir entre distintas variedades de la misma especie o los métodos utilizados para la hidrodestilación.

**Tabla 8. Extracción de aceite esencial de muestras de *T. erecta***

	%Promedio $\pm$ Desviación Estd. *	Porcentajes de referencia
Material		Promedio (ref.)
Harina de flor	0.09 $\pm$ 0.03	0.08 (Gupta y Bhandari, 1974) ** 0.34 (Baslas y Singh, 1980) ** 0.04 (Piccaglia <i>et al.</i> , 1997) ***
Residuo extracción hexánica	0.02 $\pm$ 0.00	--
Residuo industrial	0.02 $\pm$ 0.00	--
Oleoresina	1.45 $\pm$ 1.10	--

\* = Resultado de tres repeticiones.

\*\* =El aceite esencial fue obtenido de flores frescas.

\*\*\* = El aceite esencial fue obtenido de flores secadas al aire.

De la **Tabla 8** se observa que muchos de los compuestos del aceite esencial son extraídos por el hexano durante la obtención de derivados de xantofilas. Es por lo anterior que los compuestos del aceite esencial se encuentran más concentrados en la oleoresina que en la harina. Las variaciones en el rendimiento de hidrodestilación de oleoresina se observan probablemente por la hidrofobicidad de la oleoresina que tiende a pegarse en las paredes internas del matraz de hidrodestilación. La penetración del agua en estas gotas de oleoresina depende del tamaño de la gota, así que resulta lógico encontrar variaciones importantes en estas extracciones. La hidrodestilación del residuo industrial permite obtener aún aceite esencial, aunque en un porcentaje bajo comparado con lo que se obtiene de las otras materias primas.

Si el aceite esencial tiene alguna actividad biológica, es posible que la oleoresina la tenga también. Esta actividad podría ser potenciada o disminuída por la presencia de los carotenoides. Los estudios de actividad biológica de la flor se enfocan sobre purificados las xantofilas (Howard, *et al.*, 1996; González De Mejía, *et al.*, 1997; Chew, *et al.*, 1996) o sobre los aceites esenciales (Piccaglia, *et al.*, 1997; Garg y Dengre, 1983) y en cuanto a oleoresinas se conoce solamente la actividad biológica de extractos etanólicos. Un estudio de la toxicidad de extractos etanólicos obtenidos de flores de *T. erecta*, (Singh, 1987) comprobó que al exponer 10 larvas de mosquito (*Culex tritaeniorhynchus*) al extracto floral (0.1 g/L), la población moría en 220 minutos en presencia de luz solar. Se determinó que la luz solar no causaba la alteración de los

compuestos del extracto, puesto que los extractos expuestos al sol no dañaron a los mosquitos. Este resultado podría estar relacionado con el contenido de  $\alpha$ -tertienil en los extractos, aunque no se determinó la cantidad de este compuesto en los extractos. En el caso de Grover y Hiradhar (1992), se comprobó que la alimentación de cucarachas caseras (*Periplaneta americana linnaeus*) con papel filtro impregnado con extracto etanólico de flores de *T. erecta*, causaba disminución en la actividad proteolítica y amilolítica en el aparato digestivo de las cucarachas. En este estudio no se intentó determinar qué compuestos podrían ser los responsables de los resultados obtenidos. Es probable que las oleoresinas obtenidas con etanol sean diferentes a las obtenidas con hexano, puesto que el etanol es un disolvente más polar, capaz de establecer interacciones tipo puente de hidrógeno con compuestos oxigenados del aceite esencial. En este sentido, no se puede atribuir actividad biológica a los extractos hexánicos sin hacer pruebas con insectos o con microorganismos.

### 3.2.1 Cromatografía de gases del aceite esencial

Del aceite esencial se presenta una identificación preliminar de sus componentes, la cual se llevó a cabo por medio del método de los índices de retención. El único componente confirmado mediante el uso de un estándar fue el  $\beta$ -cariofileno que representa aproximadamente de 30 a 40% de los terpenos del aceite esencial. El análisis se enfocó exclusivamente a los compuestos aromáticos volátiles del aceite (monoterpenos y sesquiterpenos). Los compuestos más pesados, que pertenecen a la familia química de las ceras, no fueron identificados debido a que estos no son parte de las sustancias que se conocen como "aceite esencial". Sin embargo, algunos son en efecto, co-arrastrados por el agua junto con los otros compuestos, como en el caso de los diésteres de xantofilas (**anexo III**). En la **Tabla 9** aparecen los componentes más importantes.

Tanto en la harina, como en la oleoresina y en el residuo industrial, el  $\beta$ -cariofileno fue el más abundante de los terpenos. Es claro, sin embargo, que el aceite esencial obtenido de oleoresina es una mezcla mucho más rica y a la vez compleja de lípidos que el aceite esencial de las otras fuentes analizadas. De la oleoresina se obtuvo un aceite esencial con mayor cantidad de compuestos pesados que eluyeron tarde en el análisis cromatográfico (**anexo IV**). Estos

compuestos, que aparecen como picos débiles en los otros cromatogramas, fueron extraídos de la harina con el hexano, el cual es reconocido como buen disolvente para lípidos neutros. La matriz guarda los lípidos en un ambiente inaccesible al agua durante la hidrodestilación, pero ya liberados por el hexano fueron más fácilmente arrastrados por el agua.

Puesto que hay sustancias cuyos índices de retención son muy cercanos, el análisis se llevó a cabo en dos columnas. Esto permite tener dos índices de retención de cada compuesto, si es que el compuesto se separa de los demás en ambas columnas. La asignación de un nombre a cada señal del cromatograma resulta complejo además de que algún(os) compuestos pueden quedar retenidos irreversiblemente en la columna o bien, eluir junto con otro(s), (Founau-Brunel, 1995). Así, la identificación queda como tentativa y se apoya fuertemente en los datos generados previamente con respecto a los compuestos que ocurren en *T. erecta*. Por lo anterior, esta la caracterización se volvió a llevar a cabo utilizando espectrometría de masas como método adicional de identificación.



**Tabla 9. Identificación de componentes del aceite esencial de *T. erecta* por cromatografía de gases y el método de índices de Kovat's**

Columna OV101				Columna CBW 20M				IDENTIFICACIÓN
T. R. (min)	**KI Calculado	KI Refer.	% Relativo	T. R. (min)	**KI Calculado	KI Refer.	% Relativo	
6.751	1026	1020	0.8	17.252	1285	1272	1.8	<i>p</i> -cimeno ?
7.793	1080	1074	0.7			1287		Terpinoleno ?
10.120	1166	1164	0.9	41.581	1700	1698	0.9	Borneol ?
		1171	0.9	35.913	1602	1612	0.5	Mentol ?
10.465	1178	1175	1.1	36.974	1621	1628	0.6	Terpinen-4-ol ?
		1185		39.264	1660	1661	1.1	$\alpha$ -terpineol ?
		1195		43.510	1735	1730	3.0	Verbenona ?
12.328	1231	1222	3.4		1660	1661		Citral ?
		1230		40.549	1682	1662	2.2	Pulegona ?
		1247		44.090	1745	1739	1.3	Piperitona ?
20.223	1408	1425	0.7		1621	1642	0.6	$\gamma$ -elemeno ?
20.625	1416	1428	52.5	35.32	1592	1617	49.5	$\beta$ -cariofileno*
21.557	1434	1426	0.5	39.475	1664	1671	1.0	$\beta$ -farneseno ?
22.269	1447	1445	2.0		1621	1626	0.6	$\beta$ -copaeno ?
23.175	1483	1478	0.6		1664	1662	1.0	Alloaromadendreno ?
24.368	1487	1477	1.8		1735	1727	3.0	$\beta$ -selineno ?
24.920	1498	1496	1.0		1745	1745	1.3	$\beta$ -bisaboleno ?
25.120	1501	1500	0.5		1735	1730	3.0	$\alpha$ -muuroleno ?
25.199	1503	1518	1.1		1755	1766	1.1	$\gamma$ -cadineno ?
25.681	1512	1524	4.3	44.523	1753	1761	4.1	$\delta$ -cadineno ?

\* = Confirmado en ambas columnas mediante el uso de un estándar.

\*\* = Índices de Kovat's calculados.

Todos los compontes que aparecen en la **Tabla 9** habían sido ya identificados en diferentes muestras de *T. erecta* (*i.e.* en muestras de diferentes partes de la planta) (Gupta y Bhandari, 1974; Lawrence, 1985; Baslas y Singh, 1980; Héthelyi et al. 1986; Shi, 1988; El-Tantawy, 1994; Piccaglia, *et al.*, 1997; Wells, 1993).

En las **Tablas 10 y 11** se presentan los compuestos más importantes identificados previamente en aceite esencial de hojas y flores de *T. erecta*.

**Tabla 10. Compuestos identificados previamente en aceite esencial de hojas de *T. erecta* (\*)**

Compuesto	Gupta y Bhandari, (1974)	Baslas y Singh, (1980)	Shi. <i>et al.</i> (1988)	Machado, <i>et al.</i> , (1994)	El-Tantawy, <i>et al.</i> (1994)	Piccaglia, <i>et al.</i> , (1997)
n-nonano	-	-	-	-	3.26	-
α-Pineno	-	1.36	tr.	0.78	-	0.39
Sabineno	-	-	-	1.51	-	0.45
β-Pineno	-	0.89	0.7	0.07	-	0.1
Mirceno	-	-	0.2	2.01	-	0.91
n-decano	-	-	-	-	10.28	-
Limoneno	38.00	19.67	6.0	11.02	13.74	10.91
4-metil,1-6-hepten-3-ona	-	-	12.7	-	-	-
Alilciclohexano	-	-	3.1	-	-	-
Decadienal	-	-	2.6	-	-	-
Tagetenona	-	-	3.8	-	-	-
Dipenteno	-	0.67	-	-	-	-
Cis-ocimeno	29.80	13.21	6.2	3.16	6.92	1.17
Trans-ocimeno	-	-	0.8	13.13	0.99	11.53
α-terpineno	-	-	-	-	13.83	0.1
γ-terpineno	-	-	-	0.26	-	0.37
Terpinoleno	-	-	4.7	12.41	-	11.34
α-d-felandreno	5.20	-	-	-	-	-
β-felandreno	-	4.97	-	-	-	-
Tagetona	4.70	13.39	-	-	-	-
Linalool	5.90	26.8	0.9	0.65	-	0.8
p-menta-1,3,8-trieno	-	-	-	1.02	-	0.52
Terpinen-4-ol	-	-	0.5	0.28	-	1.39
3-hexen-1-ol acetato	-	-	1.3	-	-	-
Perillal	-	-	2.8	-	-	-
Citral	-	-	2.2	-	-	-
α-terpineol	-	-	2.0	-	-	-
Exo-isocamfanona	-	-	10.2	-	-	-
2-fenetil acetato	-	-	2.2	-	-	-
Alcohol cumico	-	-	2.9	-	-	-
Verbenona	-	-	5.4	-	-	-
Patchulano	-	-	1.0	-	-	-
Geraniol	-	0.86	1.0	-	-	-
2-copaen-11-ol	-	-	1.7	-	-	-
Cineol	4.80	-	-	-	1.63	-
n-nonylaldehído	6.00	1.34	-	-	9.19	-
Linalilacetato	6.10	3.56	-	-	2.66	-
Mentol	-	0.93	-	-	1.78	-
2-metilnon-1-en-5-ona	-	-	-	-	4.69	-
Undecano	-	-	-	-	-	3.63
p.menta-dien-ol	-	-	-	-	-	0.62
p.menta-dien-ol isómero	-	-	-	-	-	-
n-dodecano	-	-	-	-	-	-
Cis-ocimenona	-	-	-	-	-	-
Trans-ocimenona	-	-	-	-	-	-
Piperitona	-	-	-	20.02	4.59	32.05
Timol	-	-	-	4.44	-	-
Indol	-	-	-	2.85	-	-
Carvacrol	-	-	-	1.02	-	-
n-tridecano	-	-	-	-	9.78	-
n-tetradecano	-	-	-	-	4.05	-
Piperitenona	-	-	-	2.7	-	-
Trans-cariofileno	-	-	3.8	3.6	2.37	3.56
Cis-β-farneseno	-	-	-	1.65	-	-
Nerolidol	-	-	-	2.08	-	0.8
Isopululeno	-	-	-	-	-	2.68
Oxido de cariofileno	-	-	-	-	-	2.47

(\*) = Se presentan los porcentajes reportados como mayores a 0.8 %. En el caso de que el porcentaje presentado en la tabla sea menor, se debe a que el compuesto fue identificado por algún otro autor en cantidad mayor al 1%; (-) = No identificado; (tr.)= Trazas

**Tabla 11. Compuestos identificados previamente en aceite esencial de flores de *T. erecta* (\*)**

Compuesto	Gupta y Bhandari, (1974)	Baslas y Singh, (1980)	Shi. <i>et al.</i> (1988)	Piccaglia, <i>et al.</i> , (1997)
α-Pineno	-	1.32	-	tr.
Sabineno	-	-	-	tr.
β-Pineno	-	-	0.8	tr.
Mirceno	-	-	-	0.79
n-decano	-	-	-	-
Limoneno	31.40	21.47	9.2	6.65
Cis-ocimeno	18.00	7.57	-	0.34
Trans-ocimeno	-	-	-	15.58
α-d-felandreno	3.50	-	-	-
β-felandreno	-	5.61	-	-
Tagetona	4.00	15.21	-	-
Linalool	13.60	22.01	0.9	3.21
Terpinen-4-ol	-	-	-	11.6
Citronelal	-	-	4.7	-
Isopulegol	-	-	2.3	-
Pulegol	-	-	1.0	-
Ketona	-	-	1.0	-
Copaeno	-	-	0.9	-
α-cubebeno	-	-	2.8	-
β-gualeno	-	-	0.8	-
β-cubebeno	-	-	2.2	-
β-selineno	-	-	1.6	-
γ-Cadineno	-	-	14.6	tr.
α-Munroleno	-	-	3.5	-
δ-cadineno	-	-	17.9	-
Acido dodecanoico	-	-	1.5	-
α-patchuleno	-	-	1.3	-
2-dodecenal	-	-	2.1	-
β-eudesmol	-	-	2.0	-
Acido tetradecanoico	-	-	1.7	-
Geraniol	-	0.96	-	-
2-copaen-11-ol	-	-	-	-
Cineol	11.90	4.36	-	-
n-nonylaldehído	6.00	1.07	-	-
Linalilacetato	11.60	-	-	-
Mentol	-	0.89	-	-
n-dodecano	-	-	-	-
Cis-ocimenona	-	-	-	0.99
Trans-ocimenona	-	-	-	1.55
Piperitona	-	-	-	22.60
n-tetradecano	-	-	-	-
Cis-cariofileno	-	-	8.9	-
Trans-cariofileno	-	-	-	15.85
γ-Elemeno	-	-	4.6	-
α-Elemeno	-	-	4.5	-
Nerolidol	-	-	-	0.96
Espatulenol	-	-	-	2.26
Oxido de cariofileno	-	-	-	2.70

(\*) = Se presentan los porcentajes reportados como mayores a 0.8 %. En el caso de que el porcentaje presentado en la tabla sea menor, se debe a que el compuesto fue identificado por algún otro autor en cantidad mayor al 1%; (-) = No identificado; (tr.)= Trazas

Algunos de los terpenoides que son típicos de la planta no fueron encontrados en las muestras analizadas. Estos son: tagetona, tagetenona, ocimena y ocimenona, los cuales tienen tiempos de retención cortos, con índices de retención de alrededor de 1000 (son monoterpenoides). Es posible que estos se hayan perdido durante los procesos de ensilado y/o secado. Se sabe, por otro

lado, que la composición del aceite esencial de una misma planta puede variar (Zygadlo, *et al.*, 1990) debido a diferencias ambientales, genéticas y ontogénicas.

Como la composición del aceite esencial analizado es diferente a la reportada en la literatura, no es posible atribuirle ninguna propiedad biológica *a priori*, sino que habría que hacer las pruebas con mosquitos, hongos u otros organismos vivos.

### ***3.3 Extracción de fosfolípidos de harina de flor***

Es común que los fosfolípidos sean extraídos durante la extracción de lípidos neutros, por ejemplo durante la extracción de aceites vegetales (Gober *et al.*, 1993). Mediante el método descrito en la sección de materiales y métodos, se extrajeron fosfolípidos y lípidos neutros y se obtuvo un precipitado color naranja, rico en fosfolípidos (rendimiento 1% con respecto a la harina). Algunos de los componentes coloridos que quedaban en él, no fueron arrastrados por la acetona con la que se lavó para de-olificar el extracto. Tampoco fueron totalmente eliminados por los disolventes del primer sistema de elución en cromatografía en capa fina (hexano:acetona, 3:1). Esto último dificultó el revelado de las placas después de la elución en el segundo sistema cromatográfico. A pesar de estas dificultades, se apreciaron dos bandas azules para indicar la presencia de fosfolípidos. El sistema de extracción de fosfolípidos en nuestro caso no permitió la eliminación total de lípidos, lo que estorba a la identificación de las bandas. Como el precipitado obtenido era colorido, podemos decir que no es un rendimiento real de fosfolípidos el uno por ciento, sino que es seguramente menos. No hay reportes sobre la cantidad o naturaleza de los fosfolípidos presentes en la flor.

### ***3.4 Precipitación de lípidos con etanol***

Utilizando el método descrito en la sección de materiales y métodos, se obtuvo un precipitado anaranjado (30% peso/peso) y un sobrenadante rojo-naranja (70%, por diferencia). El sobrenadante se diluyó en hexano (1:25) y se inyectó en la columna Carbowax 20M del cromatógrafo de gases con las mismas condiciones usadas para el aceite esencial. Se deseaba conocer el perfil para compararlo con el del aceite esencial, sin embargo, no se obtuvieron picos,

posiblemente por estar demasiado diluídos los componentes aromáticos. No se inyectó más concentrada debido a la gran cantidad de componentes coloridos que quedaron en el sobrenadante, los cuales podrían dañar la columna.

Posteriormente se hizo la determinación de xantofilas totales en el precipitado y en la oleoresina de la cual se partió para hacer la precipitación, (Tabla 12).

**Tabla 12. Resultados de la precipitación al etanol de oleoresina obtenida de harina de flor**

	Oleoresina	Precipitado	Sobrenadante(absoluto)
Peso (g)	0.51	0.15	0.36 (por diferencia)
Xantofilas totales (g/kg)	72.3 ± 0.7	45 *	83 (por balance de materia)

\* = Análisis realizado una sola vez con la totalidad de la muestra

Haciendo un balance de materia se encontró que en el sobrenadante quedaron 82% de las xantofilas y el 18% restante quedó en el precipitado.

Los datos anteriores indican que la precipitación al etanol en frío no es útil como medio de purificación de sustancias aromáticas ni como medio de purificación de los ésteres de luteína. Philip y Berry (1976) investigaron la precipitación de los ésteres de luteína con un método no comparable al aquí investigado. Ellos concluyeron que el isopropanol es el mejor alcohol para purificar dichos ésteres habiendo investigado con n-propanol, isopropanol, n-butanol, tert-butanol y etanol.

El análisis de xantofilas totales de la oleoresina obtenida en el laboratorio arroja resultados similares a los de la oleoresina obtenida por Bioquimex-Reka (70 g xantofilas totales/kg), lo cual indica que ambos procesos son equivalentes en cuanto a la cantidad de xantofilas de las oleoresinas.

### **3.5 Extracción de carotenoides con CO<sub>2</sub> Supercrítico**

Las pruebas preliminares de extracción con el purificado de oleoresina demostraron que los colorantes de *T. erecta* son solubles en CO<sub>2</sub> supercrítico. La solubilidad de los diésteres se incrementa con la presión (hasta 300 atm en nuestro caso) y con la temperatura (de 40°C a 55°C),

lo que concuerda con lo reportado por Ambrogi y Eggers (1997). Los diésteres no se extraen con densidades del fluido inferiores a 0.7 g/mL a 40°C. Esto último es cercano al valor límite encontrado por Subra *et al.* (1989) para el  $\beta$ -caroteno: 0.65 g/mL a 37°C. Se demostró, por otro lado, que al incrementar la cantidad total de fluido y el tiempo de contacto, el porcentaje de recuperación se incrementa.

### 3.5.1 Influencia del tipo de muestra: Diéster puro vs. diéster depositado

Los resultados de las extracciones de diéster puro mostraron una gran dispersión, comparado con los resultados que arrojó la utilización del diéster depositado sobre perlas de vidrio, (Figura 12).

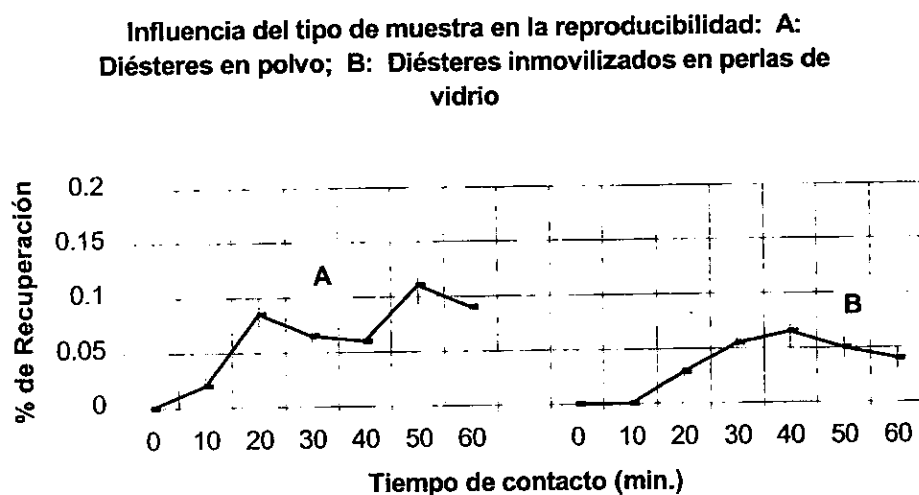


Figura 12. Influencia del tipo de muestra en la extracción de diésteres de xantofilas. Condiciones de extracción: densidad = 0.7 g/mL, T=40°C. Los resultados se muestran como el promedio de tres extracciones.

La dispersión de los datos al utilizar diéster tal cual se debe a:

- La distribución heterogénea de una muestra tan pequeña dentro de la celda de extracción (*i.e.* 1 mg de diéster en un volumen de 7 mL).
- La falta de homogeneidad en cuanto al tamaño de las partículas en la muestra, donde coexisten partículas de distintos tamaños.
- Posibles errores en el pesaje inicial de muestras muy pequeñas (1.0 mg).

La muestra depositada se utilizó con el fin de determinar si se mejoraba la reproducibilidad, eliminando al mismo tiempo los errores de pesada. En efecto, se aprecia una disminución de las desviaciones en los porcentajes de recuperación de las muestras de diésteres adsorbidos. Se ha demostrado al trabajar con muestras reales que las desviaciones estándar se disparan notablemente (incluso a más de 20%) (Chiou, 1996), por lo que en estos casos se llegan a hacer hasta 12 repeticiones para una misma condición. En nuestro caso se logró disminuir la dispersión a menos del 10% por lo que bastaron duplicados y en ocasiones triplicados.

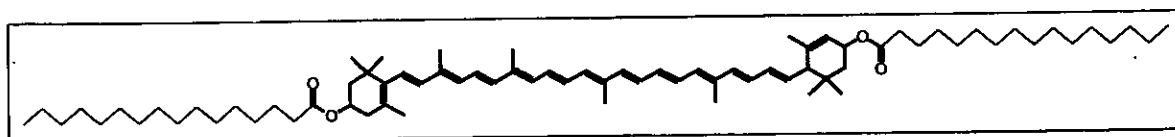
Se extrajo 1 mg de diéster depositado de la muestra de 2.7  $\mu\text{g}$  diéster/mg de perlas y también 1 mg de diéster de la muestra 1.7  $\mu\text{g}$  diéster/mg de perlas. En esta última muestra se veía a simple vista que las perlas estaban menos coloreadas que en la primera, es decir, estaba menos concentrado el analito de interés. Bajo las mismas condiciones de extracción (40°C,  $\rho = 0.9$  g/mL) la muestra menos concentrada se extrajo más eficientemente (30 % vs. 20% respectivamente). Este efecto resulta equivalente al de extraer analitos de menor tamaño de partícula pues la superficie de contacto de la muestra con el fluido se incrementa.

Independientemente del analito que se desee extraer, la matriz juega un papel muy importante en la cinética de extracción, pues puede tener interacciones más o menos fuertes con el soluto (Hawthorne, *et al.*, 1995) También las moléculas de soluto interaccionan entre sí. Estas interacciones intermoleculares se demostraron al emplear perlas con diferentes concentraciones de diésteres, pues en este caso la interacción con la matriz (vidrio) es despreciable.

### 3.5.2 Cálculo del parámetro de solubilidad ( $\delta$ ) de los diésteres de xantofilas

Para calcular el parámetro de solubilidad ( $\delta$ ) del diéster se tomó como modelo el dipalmitato de luteína y se calculó  $\delta$  por el método de contribución de grupos descrito por Fedors (1974). En la **Tabla 13** se muestra el cálculo de  $\delta$ :

## Dipalmitato de luteína



**Tabla 13. Cálculo del parámetro de solubilidad del dipalmitato de luteína a 25°C.**

Grupo	n *	$\Delta e_i$ (cal/mol)	$\Delta v_i$ (cm <sup>3</sup> /mol)	n $\Delta e_i$	n $\Delta v_i$
CH <sub>3</sub>	12	1125	33.5	3375	402.0
CH <sub>2</sub>	31	1180	16.1	36,580	499.1
CH	3	820	-1.0	2,460	-3.0
C	2	359	-19.5	718	-39.0
-CH=	15	1030	13.5	15,450	202.5
-C=	7	1030	-5.5	7,210	-38.5
COO	2	4300	18.0	8,600	36.0
OH	0	7120	10.0	0	0
Anillos de 5 miembros o más	2	250	16.0	500	32.0
Dobles ligaduras de los anillos	2	1200	-6.6	2400	-13.2
				$\Sigma = 77,293(\text{cal/mol})$	$\Sigma = 1077.9(\text{cm}^3/\text{mol})$

\* n= No. de veces que aparece el grupo funcional en la molécula.

Con los valores calculados, se utiliza la siguiente ecuación para calcular  $\delta$ :

$$\delta = \frac{[\Sigma \Delta e]^{1/2}}{[\Sigma \Delta v]^{1/2}}$$

Lo anterior da un valor  $\delta$  de 8.46 cal<sup>1/2</sup>cm<sup>3/2</sup>, parámetro de solubilidad que corresponde a una densidad de fluido de 0.9 g/mL, (8-9, según Phelps *et al*, 1996). Al igualarse los parámetros de solubilidad se adquiere un estado de “infinita miscibilidad”, puesto que la energía de requerida para mezclar soluto y disolvente se aproxima a cero, de acuerdo a la siguiente ecuación:



$$\delta E^M = f\{\varphi_1, \varphi_2, V_m^1\} \times (\delta_1 - \delta_2)^{1/2}$$

## ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

donde,

$\Delta E^M$  = Energía requerida para mezclar disolvente y soluto,

$\varphi$  = fracción molar

$V_m^1$  = volumen molar líquido

los subíndices 1, 2 y m corresponden al componente 1 (soluto); 2 (disolvente), y mezcla.

(Kuk, 1998)

El mismo cálculo para la luteína arroja un valor de  $9.90 \text{ cal}^{1/2}\text{cm}^{3/2}$ . Favati *et al.*, (1988) encontraron un valor de  $10.01 \text{ cal}^{1/2}\text{cm}^{3/2}$ . La contribución de los grupos OH en la molécula de la luteína libre hace su parámetro de solubilidad más alto (Tabla 13), por lo tanto es más difícil su extracción, es decir se requeriría de una densidad mayor del  $\text{CO}_2$ , tal como lo postula Favati *et al.* (1988).

A  $0.9 \text{ g/mL}$  y  $40^\circ\text{C}$  la extracción del palmitato de luteína debería ser óptima. Sin embargo, este método no considera más que las fuerzas intramoleculares, pero no prevee factores como la interacción de los analitos con su matriz o con otras moléculas que los rodeen, tales como los cosolventes. Como los porcentajes de recuperación que presentaremos a continuación no alcanzan ni siquiera el 50% a esas condiciones de operación, se podría pensar que existen problemas de difusión en la celda de extracción, puesto que el equipo no cuenta con ningún tipo de agitador. Los problemas de difusión han sido ya encontrados con anterioridad al utilizar fluidos supercríticos, lo cual ha propiciado el uso de sistemas de agitación durante la extracción supercrítica (Eggers, 1978; Vieville *et al.*, 1993).

### 3.5.3 Influencia de las variables de operación: Presión y temperatura

Una vez determinado que las perlas de vidrio como soporte mejoraban notablemente la reproducibilidad, se procedió a estudiar la influencia de la presión y la temperatura en la

extracción de estas muestras. Se tomaron muestras de entre 2.7-3.2  $\mu\text{g}$  diéster/mg de perlas. En todos los casos se llevó a cabo un balance de materia, para determinar cuánta muestra permanecía en el cartucho de extracción. Esto también permitió conocer el porcentaje de degradación de la muestra. Se hicieron por lo menos dos repeticiones de cada experimento, pues ya se había comprobado que la desviación estándar no era mayor a 10%. Las variables de extracción empleadas para este estudio se presentan en la **Tabla 5** de materiales y métodos.

Se ha comprobado durante la experimentación, que al aumentar la presión a temperatura constante el rendimiento se incrementa, al igual que al aumentar la temperatura a presión constante. Se ha observado, sin embargo, que a bajas presiones (*ca.*100 bar) el incrementar la temperatura disminuye el rendimiento de extracción de astaxantina (Yamaguchi, 1986), debido a una disminución de la densidad del fluido que es lo que ha probado ser el factor determinante de su poder como disolvente. El mismo efecto se ha demostrado durante la remoción de DDT de suelos contaminados (Dooley *et al.*, 1987). Es por lo anterior que se decidió fijar la densidad, siguiendo la recomendación de Chrastil (1982), quien postula que esta variable es la que determina el rendimiento de extracción.

En la **Figura 13** se muestran las solubilidades de los diésteres de luteína depositados en perlas de vidrio, bajo las diferentes condiciones de operación.

**SOLUBILIDAD DE DIESTERES DE XANTOFILAS  
EN CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO**  
(extracción de 1 mg de muestra en 7 ml CO<sub>2</sub>)

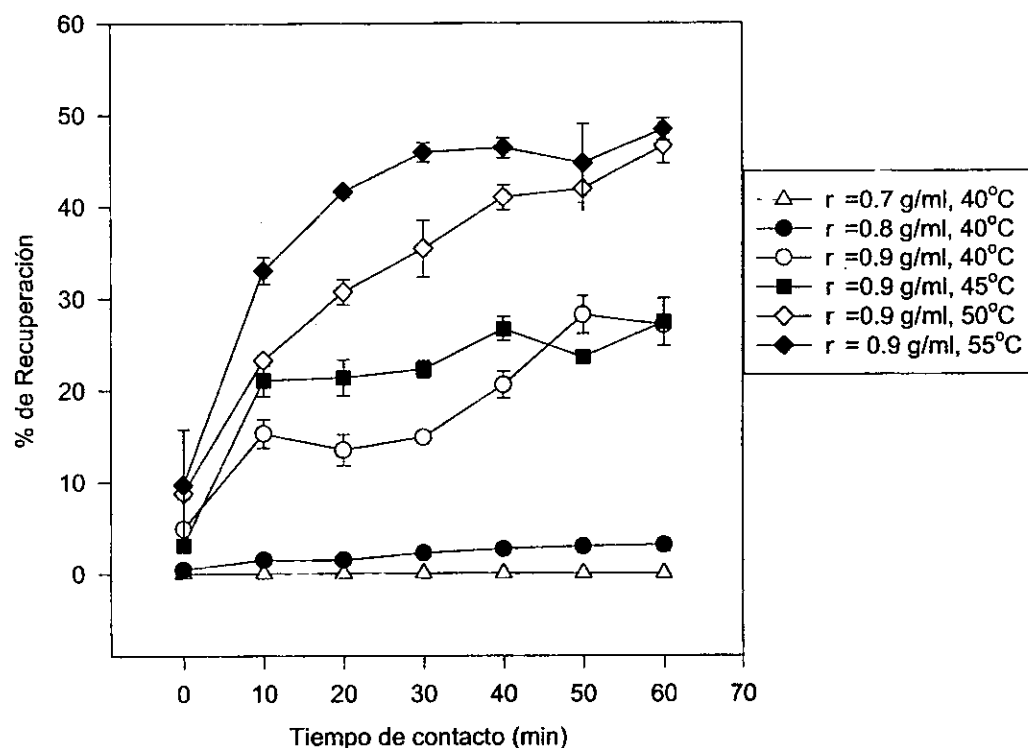


Figura 13. Influencia de la densidad y de la temperatura en la recuperación de diésteres de xantofilas

Podemos observar que a los 10 min. de tiempo de contacto se ha extraído prácticamente el 70% de los colorantes de la muestra y que a los 40-50 min. de tiempo de contacto se alcanza la saturación del fluido en el sistema estudiado. Al principio de la extracción se extraen rápidamente los carotenoides más disponibles al fluido, *i.e.* los que están físicamente en contacto con él. Transcurridos los primeros 10 min. comienza a establecerse el equilibrio de las moléculas de pigmento menos disponibles, o sea las que forman entre ellas grumos más espesos difíciles de acceder por el CO<sub>2</sub> estático. A las temperaturas empleadas, la muestra se funde parcialmente, pero no termina de formar una mezcla homogénea con el CO<sub>2</sub> supercrítico puesto que al terminar la extracción queda colorante depositado sobre el vidrio. Las moléculas que están en la parte

interna de la muestra, sin contacto directo con el fluido, son difícilmente accesadas aún transcurridos los 60 min de tiempo de contacto. Sin embargo, la gráfica nos indica que hay un equilibrio de moléculas desde la muestra hacia el CO<sub>2</sub> y viceversa a los 40-50 min.

### 3.5.4 Cálculo de variables empíricas del modelo de Chrastil con los datos experimentales

Una vez obtenida la solubilidad para cada condición estudiada, se elaboró un modelo predictivo basado en la densidad del fluido (Chrastil, 1982) que permite conocer la solubilidad de los diésteres bajo distintas condiciones de operación en el sistema de estudio (Figura 14)

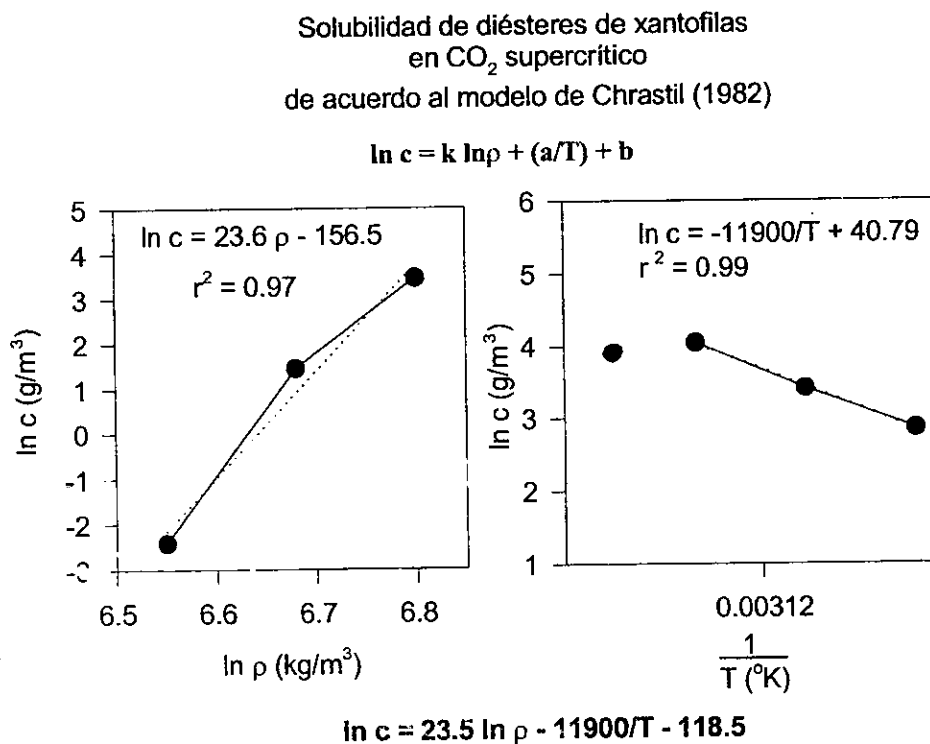


Figura 14. Solubilidad de diésteres de xantofilas en CO<sub>2</sub> Supercrítico. Cálculo de las variables empíricas de la ecuación de Chrastil

Como se aprecia en la gráfica de la derecha, el punto de más alta temperatura (que no fue incluido para la realización del modelo) empieza a alejarse de la tendencia expresada por los otros tres. Es posible que esta desviación se relacione con la degradación de los pigmentos a esta temperatura (55°C). La constante k resulta tener un valor lógico pues representa al número de moléculas de CO<sub>2</sub> que rodean al soluto en el equilibrio y podría corresponder teóricamente a la suma de la k para el β-caroteno más la k del ácido oleico multiplicada por dos  $\{5.5 + (8.6 \times 2)\} = 22.7$  (valores de Škerget,1995). El valor del modelo radica en su poder predictivo pero más aún en que, teniendo las constantes de un segundo soluto (por ejemplo trioleína), es posible determinar teóricamente bajo que condiciones es posible separarlos entre sí en una extracción supercrítica (Chrastil, 1982).

La estimación de la solubilidad de los diésteres de xantofilas, utilizando el modelo generado, se presenta en las Fig. 15 y 16.

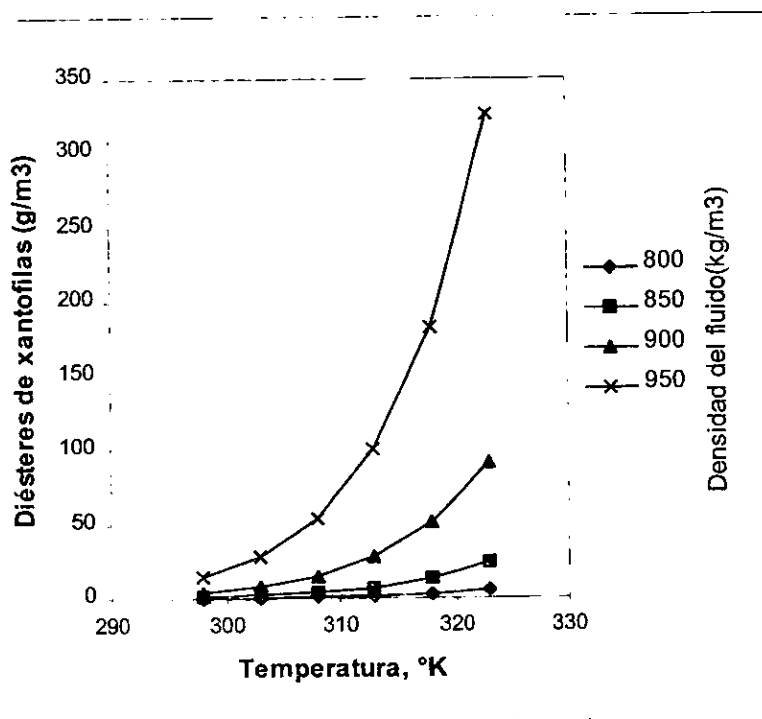


Fig. 15. Estimación de la concentración de diésteres de xantofilas en CO<sub>2</sub> supercrítico en función de la temperatura

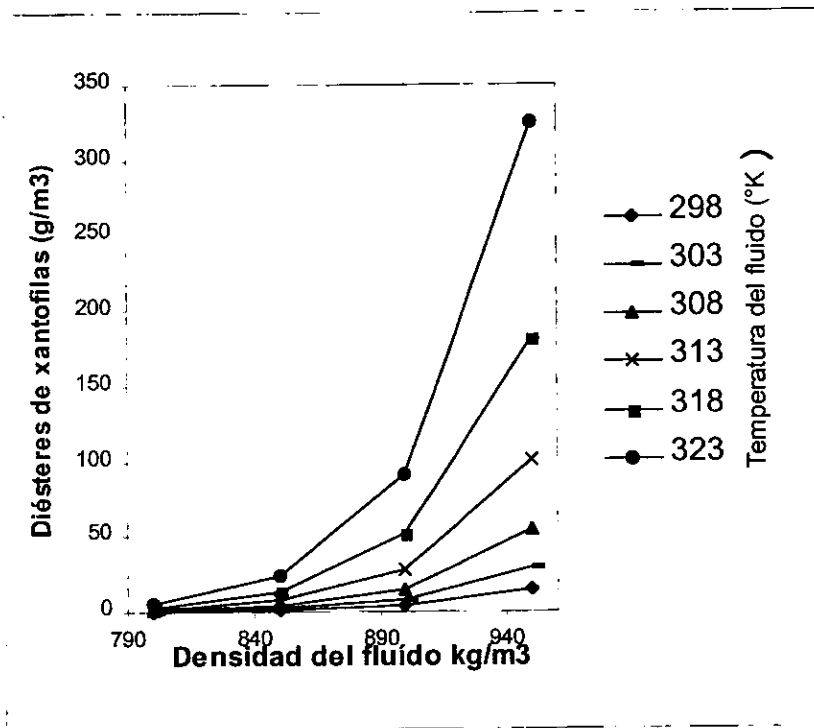


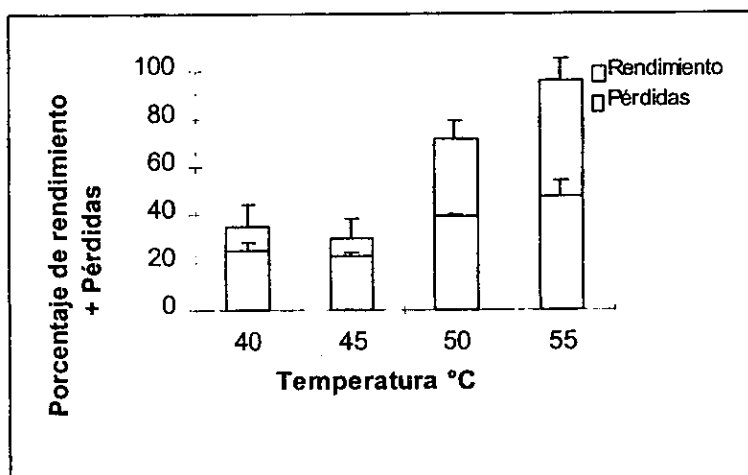
Fig. 16. Estimación de la concentración de diésteres de xantofilas en CO<sub>2</sub> supercrítico en función de la densidad

Como se aprecia, tanto el incremento de la temperatura como el de la densidad del fluido incrementan la solubilidad. Las gráficas están definidas para el rango estudiado, aunque se muestran también valores para densidades de 0.95 g/mL (950 kg/m<sup>3</sup>), dejando fuera los valores para temperaturas de 55°C. Si se tomaran en cuenta temperaturas de 55°C o superiores posiblemente se observaría una gráfica con un máximo que tendería a disminuir a causa de la degradación de los pigmentos, puesto que a mayores temperaturas

la degradación se incrementaría disminuyendo la cantidad disponible de colorantes.

Cygnarowicz y Seider (1990) han demostrado la viabilidad económica de la extracción de β-caroteno a partir de medios de cultivo. Han maximizado la solubilidad utilizando presiones superiores a las 1000 atm. Es posible que en el caso de los diésteres de xantofilas, presiones superiores a las que hemos utilizado incrementarían también la solubilidad.

La degradación de los pigmentos es mayor al incrementar la temperatura sin influir notablemente el tiempo de exposición a dicha temperatura, *i.e.* a 55°C independientemente del tiempo de contacto se recuperan aproximadamente 55% de los compuestos coloridos originales; a 40° C se recuperan el 90% independientemente del tiempo (**Figura 17**). Por lo menos el efecto del tiempo de contacto en la degradación no fue lo suficientemente claro o pronunciado como lo fue la temperatura. Notamos que cierta cantidad de colorante permanece, independientemente de las condiciones de extracción, dentro del equipo. Esto se comprobó durante el mantenimiento por observación de depósitos amarillos en el interior del extractor. Esta cantidad corresponde al 10% de material, como se aprecia en la **Figura 17**.



**Figura 17.** Influencia de la temperatura en el rendimiento de extracción y las pérdidas de diésteres de xantofilas en CO<sub>2</sub> supercrítico

Observando las barras de error de la **Figura 17** se puede decir que a 40 y 45°C la pérdida corresponde al error experimental, mientras que a 50 y 55°C la pérdida corresponde a la degradación. Para tratar de esclarecer el fenómeno de degradación, se probó añadir ácido ascórbico en polvo a la celda de extracción. Al ser el ácido ascórbico una molécula hidrófila se dificulta su incorporación a los diésteres en la preparación para la deposición sobre las perlas de vidrio. La finalidad de éste era que sirviera como atrapador de O<sub>2</sub>, el cual podría participar como agente oxidante de los carotenoides, aunque el contenido de oxígeno en el fluido supercrítico es prácticamente despreciable, debido a su alta pureza (>99%). Así, se repitió la extracción de diésteres a 55°C con ácido ascórbico en polvo sin lograr obtener ninguna protección a la oxidación. Podría intentarse añadir algún antioxidante liposoluble pero se extraería junto con los

carotenoides lo que iría en detrimento de la pureza del extracto. Parecería que la oxidación de carotenoides no es un mecanismo mediado por oxígeno, sino por algún otro agente oxidante del sistema. Los agentes oxidantes del sistema pueden ser peróxidos que ya existan en la muestra. Lo anterior podría aclararse midiendo la cantidad de peróxidos en la muestra antes y después de los experimentos. Los estudios de extracción de carotenoides con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico no parecen darle mucha importancia a este fenómeno de degradación y tampoco hay reportes que mencionen este asunto tratándose de ésteres de xantofilas, por lo que no está claro si los carotenoides oxigenados o los no esterificados son más propensos a la degradación durante la extracción supercrítica.

Por lo demás, la temperatura incrementa notablemente la recuperación de los diésteres, pues como se ha reportado, una muestra oleosa incrementa su solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico al incrementar la temperatura (Chiou, 1996).

### 3.5.5 Extracciones sucesivas de harina de flor

El rendimiento en peso y la pureza de las oleoresinas obtenidas se muestra en la **Tabla 14**. Como se aprecia en la tabla, el extracto va purificándose con cada extracción subsecuente, lo cual podría estar relacionado con que a) el fluido supercrítico no tiene preferencia por los diésteres de xantofila en la primera extracción, sino que extrae más bien otras sustancias presentes en la flor y/o b) los diésteres no están accesibles en un principio, sino hasta eliminar otros compuestos de la harina. Si se suman las xantofilas de los tres extractos se tiene una oleoresina equivalente a la extraída con hexano, *i.e.* con 70 g de xantofilas totales por gramo de oleoresina. Sin embargo, el rendimiento en peso es menor que para un extracto hexánico (7% comparado con 10%).

**Tabla 14: Rendimiento en peso y pureza de extractos de diésteres en CO<sub>2</sub> supercrítico**

	Rendimiento (%p/p)	Rendimiento acumulado (%p/p)	Xantofilas totales en la oleoresina (g/kg)
1ª. Extracción	5.2	5.2	50.9
2ª. Extracción	1.5	6.7	94.2
3ª. Extracción	0.4	7.1	312.1

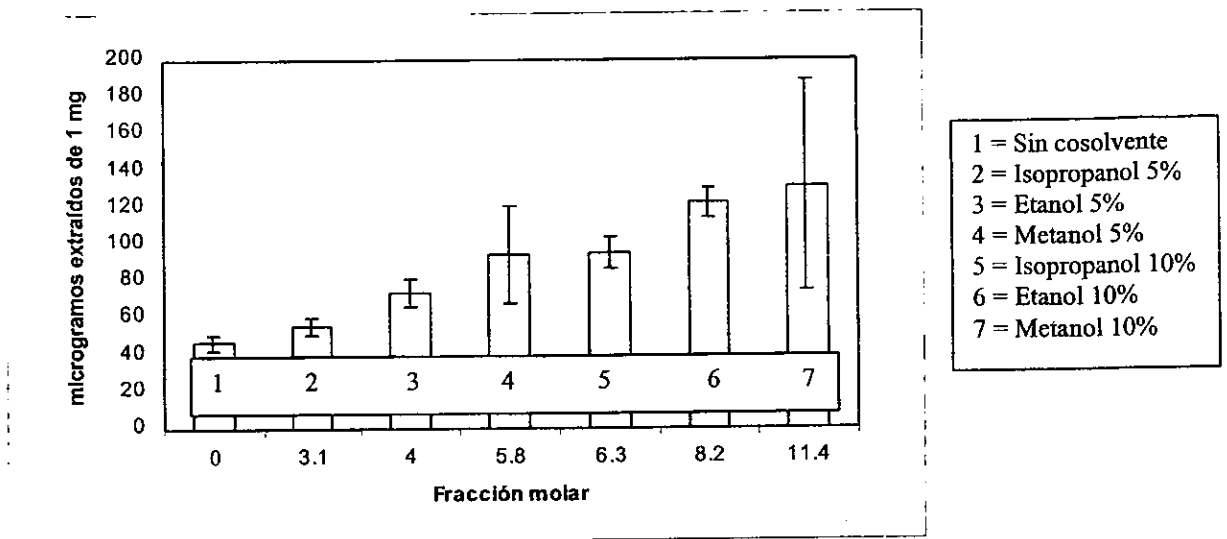


Los compuestos de la cutícula de la flor podrían corresponder a algunas de las impurezas de la primera extracción, pues son compuestos lipídicos, solubles en el fluido apolar y que además están disponibles para extracción inmediata pues se localizan sobre la superficie del vegetal. Las impurezas de estos extractos obtenidos por extracción sucesiva no se caracterizaron por no contarse con la metodología analítica. Sin embargo, en los experimentos destinados a la extracción de material volátil, se encontró una gran cantidad de ésteres de ácidos grasos e hidrocarburos pesados, los cuales fueron extraídos a densidades de fluido inferiores a las utilizadas para las extracciones sucesivas y por lo tanto pueden también encontrarse en los extractos obtenidos a densidades superiores.

### 3.5.6 Extracción de carotenoides con mezclas de CO<sub>2</sub> supercrítico/ cosolventes

En un principio fue difícil lograr reproducibilidad al trabajar con cosolventes, pues se determinó que bajo las condiciones empleadas, cierta cantidad de colorante permanecía en el extractor y estos restos influían en los resultados la corrida subsecuente. Por lo anterior se diseñaron varios métodos de limpieza, a utilizarse antes de cada corrida para asegurarse de a) arrastrar restos de extracto y b) dejar vacías las tuberías (sin modificador). También fue necesario ajustar la temperatura de la trampa a la temperatura de ebullición del cosolvente en cuestión para evitar pérdidas de material colorido hacia el desagüe. A pesar de utilizar altas temperaturas durante la recuperación del extracto en la trampa, fue evidente que al usar porcentajes en volumen de alrededor de 10% aún se vertía algo de colorante al desagüe. Por lo anterior, la dispersión en estos experimentos se incrementó. Sin embargo, haciendo triplicados y cuatriplicados en algunos casos, se logró disminuirla a valores aceptables.

Inicialmente se trabajó con diferentes cosolventes en concentraciones del 5 y 10% en volumen, con la idea de comparar el efecto en el rendimiento de extracción. La relación porcentual utilizada por el software del extractor es en volumen ya tanto el CO<sub>2</sub>, como los cosolventes son bombeados en forma líquida. En la **Figura 18** se presentan los resultados de extracción utilizando cosolventes al 5 y 10% en volumen. Como se aprecia, los datos adquieren cierta tendencia al transformar los porcentajes en volumen a porcentajes en fracción molar.



**Figura 18. Influencia de la fracción molar del cosolvente en el rendimiento de extracción, (densidad 0.9 g/mL; 40°C. Extracción dinámica con 7 ml de fluido)**

En el **Figura 18** se observa que la mejora en la solubilización de los diésteres de xantofilas resulta más bien del efecto de aumentar la fracción molar de los cosolventes, que de la naturaleza de éstos. Por lo anterior, se decidió fijar, hasta lo posible, la fracción molar de los cosolventes utilizar, así como incluir algún indicador numérico de la polaridad. En la **Tabla 15** se muestran las proporciones utilizadas de cada cosolvente para fines comparativos, así como las variables críticas de la mezcla. También se incluye log P, que se utilizó como indicador de la polaridad del cosolvente.

**Tabla 15. Cosolventes utilizados para la extracción de ésteres de xantofilas en CO<sub>2</sub> supercrítico**

Cosolvente	%	%	Log P *	Variables críticas de la	
	volúmen	fracción mol		mezcla (atm, °K) **	
Metanol	5	5.8	-0.76	98.3,	328.5
Acetonitrilo	6	5.4	-0.33	105.1,	334.4
Etanol	7	5.7	-0.24	104.1,	331.6
Acetona	9	5.9	-0.23	97.4,	332.0
Isopropanol	9	5.7	0.2	107.7,	335.3
Diclorometano	7	5.2	0.6	90.3,	325.0
Acetato de etilo	11	5.6	0.66	103.0,	336.2
n-Butanol	11	5.9	0.8	122.9,	339.6
Cloroformo	9	5.5	2.0	98.0,	330.67
Tetracloruro de carbono	11	5.1	2.8	100.9,	332.7
Hexano	14	5.5	3.5	95.4,	333.8

(\*) Log P es el logaritmo del coeficiente de partición del disolvente en el sistema de dos fases octanol-agua. Se calcula de acuerdo al método de Rekker, (1977)

(\*\*) Calculadas por Eqfases2, de acuerdo a Solórzano-Zavala *et al.*, (1996).

Las variables críticas para las mezclas de cosolventes-CO<sub>2</sub> se calcularon por medio de eqfases2, el cual emplea el método de Heidemann y Khalil (1980). Es difícil comparar los datos obtenidos por eqfases2 con datos experimentales, como los obtenidos Gurdial *et al.*, (1992), los cuales determinaron las constantes críticas para algunas mezclas de cosolventes y CO<sub>2</sub> supercrítico. En las investigaciones recopiladas los porcentajes en fracción molar son diferentes y aún más en el caso de equipos que no permiten fijar la fracción molar del cosolvente, como en el caso nuestro. Para los datos obtenidos por eqfases2 se observa que los valores de las variables críticas se incrementan con el tamaño (peso molecular) del modificador a una fracción molar fija. Esto también ocurre al incrementar la fracción molar del modificador en la mezcla. Para la mayoría de las mezclas se encontró un valor de presión crítica de entre 95 y 105 atm, valor inferior al referido por Clifford en 1996 (100-150 atm).

Para asegurar la saturación de la mezcla disolvente con los diésteres, se hicieron extracciones con tiempos de contacto de 45 min., lapso durante el cual se asumió el equilibrio (Figura 19). Los

modificadores incrementan el rendimiento vía modificación de la polaridad y se han utilizado también para romper las interacciones del soluto con la matriz (Hawthorne *et al.*, 1987).

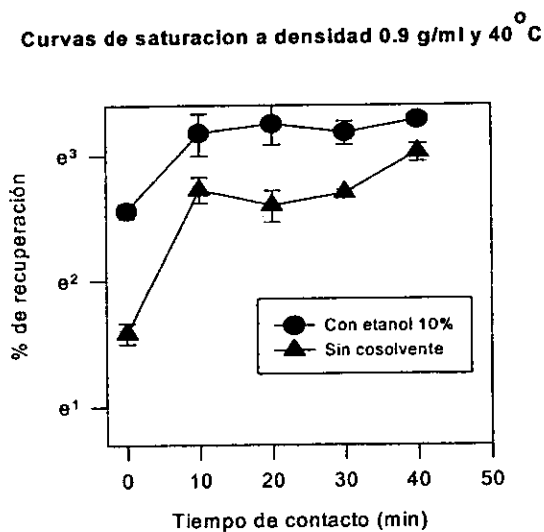
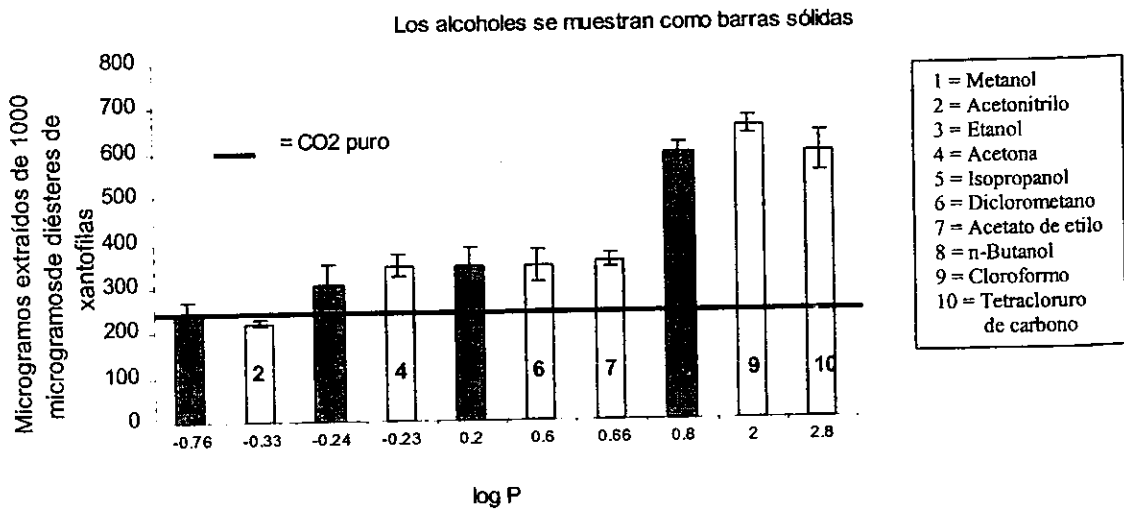


Figura 19. Influencia del tiempo de contacto en la recuperación de diésteres de xantofilas con etanol como cosolvente y sin cosolvente

Lo gráfica anterior muestra que utilizando la misma presión, es posible obtener un rendimiento más alto con empleo de cosolventes que sin él. Es decir que la presión de operación que brinda los mejores resultados puede ser disminuída al usar modificadores. Esto permite optimizar el proceso, ya que la presión será la mínima posible para procesos económicamente viables (Böhm *et al.*, 1989). Curvas similares a la **Figura 19** han sido obtenidas por otros autores durante el trabajo con modificadores (Dobbs *et al.*, 1987).

Los resultados de las experiencias comparativas entre cosolventes que se describen en la **Tabla 15** se resumen en la **Figura 20**.



**Figura 20. Extracción de diésteres de xantofilas con mezclas de CO<sub>2</sub>-cosolventes al 5-6% fracción mol (280 bars, 40°C)**

Para la familia de los alcoholes (metanol, etanol, isopropanol y n-butanol, que aparecen como barras sólidas) observamos un incremento en el rendimiento al aumentar el tamaño de cadena, (*i.e.* reducción de la polaridad). El rendimiento tan bajo al utilizar hexano, 13.5% (no mostrado en la gráfica 15), sugiere la existencia de una fase líquida de hexano que impide la extracción del colorante por el fluido supercrítico. Barth *et al.*, probaron etanol, cloruro de metileno y hexano como cosolventes en la extracción de  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno de zanahorias. Establecieron que el cosolvente a estudiar a fondo era el etanol, pues con los otros dos no consiguieron aumentar el rendimiento.

### 3.6 Extracción selectiva de componentes lipídicos no coloridos

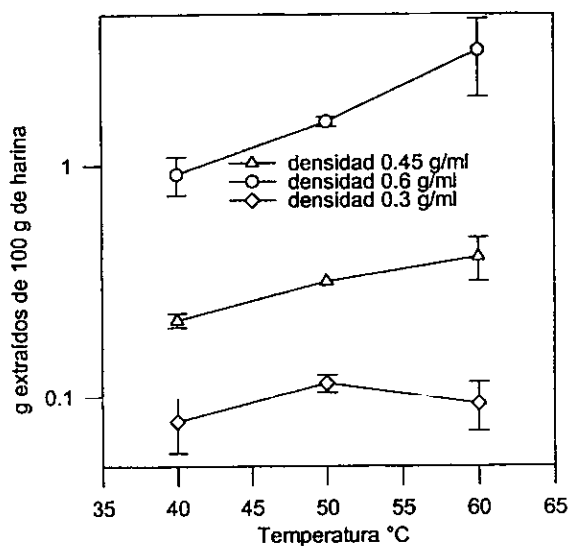
En la **Tabla 16** se muestran los rendimientos de experimentos llevados a cabo por duplicado o triplicado.

**Tabla 16. Rendimientos de extracción de componentes lipídicos no coloridos de harina de flor con CO<sub>2</sub> supercrítico.**

Densidad (g/mL) CO <sub>2</sub>	Presión (atm)	Temperatura (°C) CO <sub>2</sub>	% rendimiento (p/p) *± desv.std
0.3	81	40	0.08±0.02
	91	50	0.11±0.01
	101	60	0.09±0.02
0.45	89	40	0.21±0.01
	105	50	0.31±0.01
	122	60	0.40±0.08
0.6	97	40	0.91±0.17
	123	50	1.54±0.07
	149	60	3.14±1.17
0.8	90	25	2.44±0.29
0.8	114	30	A estas condiciones ya se obtiene un extracto colorido
0.6	123	50 (5% vol etanol)	3.14±0.41
0.7	115	40	A estas condiciones ya se obtiene un extracto colorido

\* En este caso el % de rendimiento es g de extracto por 100 g de harina.

El incremento de rendimiento causado por los cambios de densidad y temperatura se aprecia en la **Figura 21**.



**Figura 21. Efecto de la densidad y la temperatura del CO<sub>2</sub> en el rendimiento de extracción de compuestos no coloridos de *T. erecta***

El efecto de la densidad en el rendimiento y por tanto, en la solubilidad de los compuestos no coloridos, es palpable a partir de la **Figura 21** y aunque el incrementar la densidad disminuye al mismo tiempo la selectividad, (pues se incrementa el poder solvente del fluido) este efecto no fue observado en los extractos, puesto que la composición de todos es muy similar (**Tabla 17**).

En el caso del empleo del etanol como cosolvente se tiene un incremento de 100% si se compara con las mismas condiciones de extracción sin cosolvente. En este caso se podría pensar en el efecto del cosolvente como disruptor del tejido vegetal, lo que ha sido mencionado por Hawthorne *et al.*, 1987.

Durante la extracción a densidad de 0.8 g/mL y 25°C se emplean temperaturas que no disminuyen el rendimiento de extracción de los colorantes contenidos en la flor, por lo que estas condiciones resultan las mejores para pretratar la muestra previa a la extracción de los diésteres de xantofilas. Este rendimiento podría incrementarse si se empleara etanol durante la extracción.

**Tabla 17. Porcentajes relativos obtenidos por CG/SM y por CG de compuestos identificados en extractos supercríticos de harina de flor de *Tagetes erecta*. Condiciones de extracción (densidad en g/ml, temperatura °C).**

Compuesto	(0.3, 40)	(0.3, 60)	(0.45, 40)	(0.45, 50)	(0.45, 60)	(0.6, 40)	(0.6, 50)	(0.6, 60)	(0.8, 25)	(0.6, 50), 5% Et-OH
Cariofileno*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.03	n.d.	1.03	<0.5	n.d.
Oxido de cariofileno *	7.47	6.05	7.92	10.38	7.75	7.63	5.22	7.45	7.57	2.58
Acido hexadecanoico, éster metílico*	5.52	11.03	8.80	8.72	7.10	6.06	3.91	5.55	5.34	4.85
Acido hexadecanoico, éster etílico *	3.36	4.21	4.91	5.25	4.59	3.77	2.84	3.36	3.15	3.81
Acido hexadecanoico, éster propílico	6.97	6.14	8.87	9.05	7.70	7.22	4.88	6.97	6.82	6.63
9,12-ácido octadecadienoico, ester metílico	8.95	7.33	11.99	11.68	9.99	9.37	6.43	8.95	9.43	8.79
Heneicosano*	7.24	12.02	10.02	10.07	8.41	8.12	5.49	7.24	7.85	7.39
Acido octadecanoico, éster metílico*	1.61	n.d.	1.77	n.d.	n.d.	1.82	5.03	1.59	1.67	2.02
Acido linoleico éster etílico*	6.29	3.12	7.30	7.41	6.63	6.54	1.27	6.28	6.80	7.03
Docosano*	n.d.	5.6	1.73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,2':5',2''-Tertiofeno	4.25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.75	2.63	4.25	6.22	6.29
6,11-ácido eicosadienoic ,éster metílico	13.19	5.68	14.43	13.95	12.23	12.65	9.16	7.23	13.91	12.57
Tricosano *	13.63	13.37	10.86	11.89	11.22	12.68	11.92	13.63	14.33	13.13

\* Confirmados por índice de retención; n.d. no detectado



Cromatografía de gases/espectrometría de masas de los extractos no coloridos

En la **Tabla 18** se muestra la composición del aceite esencial obtenido en el mismo período y contra el cual se compararon los extractos supercríticos (**Tabla 17**).

**Tabla 18. Porcentajes relativos obtenidos por CG/SM y por CG de compuestos identificados en aceite esencial de harina de flor de *Tagetes erecta*.**

Indice de retención de referencia	Indice de retención calculado	Tiempo de retención (min.)	Compuesto	% en Aceite esencial
1158	1168	18.30	Para-cimen-8-ol*	2.23
1066	1077	18.43	$\alpha$ -Terpinoleno*	1.71
		20.47	Piperitona	3.79
1317	1315	23.50	Piperitenona *	2.16
		24.20	Eugenol	2.30
1418	1422	26.53	$\beta$ -Cariofileno*	6.29
1432	1429	27.30	Geranil acetona*	1.06
		28.43	$\gamma$ -cadineno	1.04
		28.54	Benzene,1-etil-3,5-diisopropil	1.39
		29.81	$\alpha$ -amorpheno	1.05
1514	1513	30.10	$\delta$ -cadineno *	3.95
1699	1663	31.59	Farnesol *	1.62
		32.44	Oxido de cariofileno	10.34
1583	1571	32.61	-(-)-globulol *	1.79
		34.49	$\gamma$ -muuroleno	2.05
		34.61	$\alpha$ -copaeno	2.55
1647	1646	35.07	$\alpha$ -cadinol *	2.67
		35.26	$\beta$ -elemeno	2.03
1909	1908	43.65	Acido hexadecanoico, éster metílico*	3.46
1955	1948	45.74	Acido hexadecanoico, éster etílico *	1.54
		48.61	Acido hexadecanoico, éster propílico	2.51
		48.85	9,12-ácido octadecadienoico, ester metílico	1.91
2100	2109	49.05	Heneicosano*	2.35
2109	2125	49.66	Acido octadecanoico, éster metílico*	1.0
2145	2137	50.75	Acido linoleico éster etílico*	1.31
2200	2200	51.81	Docosano*	1.0
		52.42	2,2':5',2''-Tertiofeno	1.94
		53.22	6,11-ácido eicosadienoico éster metílico	1.42
2300	2301	54.23	Tricosano *	1.31

\* Confirmado por su índice de retención.

En el **anexo V** se encuentra el cromatograma del aceite esencial II (correspondiente a estos experimentos) así como los cromatogramas de los extractos supercríticos.

El terpeno más abundante del aceite esencial, óxido de cariofileno, es extraído bastante eficientemente por el CO<sub>2</sub> supercrítico, aunque ciertamente la hidrodestilación extrae un poco más (5-7 % vs. 10%). Los otros terpenoides del aceite esencial, como la piperitona, piperitenona, cadinenos, etc. no fueron detectados en los extractos supercríticos. Es probable que estos sí se hayan extraído pero haya abandonado el sistema de recuperación junto con la corriente de CO<sub>2</sub> expandido puesto que se fijó una temperatura de 40°C en el restrictor y en la trampa de recuperación. Es probable que se hayan extraído porque se extrajeron otros compuestos de mayor peso molecular. No fue posible fijar temperaturas suficientemente bajas ( $T \leq 4^\circ\text{C}$ ) en la trampa de recuperación de analitos, puesto que estas provocaban que el sistema se tapara ocasionando problemas de despresurización del equipo. Esto se debió muy probablemente a la solidificación de algunos de los compuestos cuticulares, como los hidrocarburos (heneicosano, docosano, tricosano). La idea de usar densidades muy bajas (como por ejemplo 0.3 g/mL) era recuperar sólo los compuestos de menor peso molecular, como los mono y sesquiterpenoides. Sin embargo, el sistema de recuperación no es lo suficientemente eficiente como para permitir que éstos puedan ser detectados en la mezcla recuperada de la trampa.

No existen reportes sobre la cantidad o naturaleza de los compuestos cuticulares en *T. erecta*, sin embargo sí existen reportes de la existencia de ácidos grasos esterificados como parte de los compuestos cuticulares de ciertas especies (Hamilton, 1995). Por otro lado, los alcanos lineales de cadena larga se encuentran comúnmente en superficies cuticulares (Harwood, 1991).

Si se compara la composición del aceite esencial obtenida por el método de los índices de retención (**Tabla 9**) con el analizado por espectrometría de masas, se encuentra un material diferente (**anexo III vs. anexo V**). Lo anterior significa que hubo una transformación química de los terpenos contenidos en el material original. En el caso del terpenoide más abundante, el  $\beta$ -cariofileno, se transforma muy posiblemente en óxido de cariofileno, el cual no aparece en la caracterización original del aceite. Es muy posible que esta transformación se deba a una oxidación química. El óxido de cariofileno ha demostrado tener actividad insecticida entre otras (Bettarini *et al.*, 1993). Como en el caso del cariofileno, otros terpenos pueden también sufrir isomerizaciones o rearrreglos los cuales han sido reportados con anterioridad (Ganou, 1993).

Los índices de retención fueron calculados en una columna diferente a la empleada por el cromatógrafo que estaba acoplado al espectrómetro de masas. Debido a lo anterior, algunos compuestos no fueron detectados en el análisis por cromatografía de gases. Tal es el caso del  $\alpha$ -amorfenol, de los selinenos, del  $\alpha$ -copaeno, etc. El óxido de cariofileno y el globulol tienen tiempos de retención muy cercanos (por lo tanto índices de retención muy cercanos, 1571 para ambos) por lo que en este caso resulta difícil asignar una identificación positiva por el método de índices de retención. Sin embargo, los espectros de masas de ambos fueron identificados satisfactoriamente por la base de datos del espectrómetro de masas. En el caso de algunos otros compuestos, el índice de retención es desconocido, por lo que no es posible comparar los datos obtenidos directamente de la literatura, sino que habría que contar con los estándares e inyectarlos directamente en el cromatógrafo. En esta situación se encuentran los ésteres de ácidos grasos no confirmados por índice de retención, algunos terpenos y el tiofeno  $\alpha$ -tertienil.

En los extractos supercríticos se encuentra un pequeño incremento en el porcentaje relativo de  $\alpha$ -tertienil (2,2':5',2''-Tertiofeno), el cual no se esperaba que fuera identificado en ninguna de las muestras. Se sabe que los tiofenos bioactivos son sintetizados principalmente en las raíces de las especies *Tagetes*, pero también se ha demostrado que en las hojas de las plantas se encuentran altas concentraciones de  $\alpha$ -tertienil, presumiblemente porque en este caso el compuesto es sintetizado ahí. La muestra que hemos analizado fue cosechada industrialmente y estas prácticas por lo general retiran la planta del terreno sin gran selectividad. El  $\alpha$ -tertienil es un nematocida potente, cuya producción ha sido optimizada por varios autores principalmente vía cultivo de tejidos provenientes de raíces de *T. patula*, (Kyo *et al.*, 1990).

Si bien es conocido que los tiofenos bioactivos en *T. erecta* son inestables, también se sabe que el  $\alpha$ -tertienil es uno de los más estables junto con el 5-metil-2,2',5',2''-tertiofeno, comparado con otros tiofenos que ocurren en las especies *Tagetes* (Wells *et al.*, 1993). Por las razones anteriores es posible encontrar cantidades importantes de  $\alpha$ -tertienil en las muestras analizadas. Se anexan los cromatogramas de los extractos supercríticos, en los cuales aparecen algunos compuestos de tiempos de retención cortos que no fueron detectados en el aceite esencial pero que tampoco pudieron ser identificados con la suficiente resolución con el sistema del espectrómetro de masas. Es probable que la resolución del sistema cromatográfico no haya permitido una adecuada separación de estos compuestos, lo que en consecuencia impide una buena fragmentación molecular y por lo tanto una identificación confiable.

### 3.7 Pruebas de hidrólisis enzimática

Aunque se pretendía llevar a cabo la hidrólisis enzimática al mismo tiempo que la extracción supercrítica, primero se procedió a hacer algunas pruebas tanto en fase acuosa como en fase hexánica y en dos fases.

Se tomó el artículo de Matsuno (1992) como base y se hicieron las pruebas en fase acuosa, con las cuales se lograba un 100% de hidrólisis en 24 hr. Este sistema tenía varios inconvenientes:

- El sustrato no es soluble en agua, por lo que se tenía que usar acetona como cosolvente. La acetona puede ser un agente desnaturizante de la enzima (Gorman y Dordick, 1992), por lo que su empleo debe ser limitado. Aún incrementando el 1% de acetona que marcaba la reacción de base, la cantidad de sustrato que se podía disolver era muy limitada.
- La reacción de base utiliza mucha enzima (1 g) y muy poco sustrato (0.5 mg).

Por las razones anteriores se procedió a probar los sistemas de reacción en dos fases y en fase continua de hexano. Sin embargo, como se aprecia en la **Tabla 19**, los resultados fueron poco alentadores.

**Tabla 19. Resultados de la hidrólisis enzimática en fase continua (agua-acetona)**

Sustrato	Condiciones	Resultado
Oleoresina	0.5 mg S* +5 mL acetona+95 mL buffer +1 g E*	Hidrólisis total, 24 hr.
Diésteres purificados	100 mg S+ 10 mL acetona +90 mL buffer + 0.5 g E	Hidrólisis total, 24 hr.

**Tabla 19a. Sistema en dos fases (hexano-agua)**

Sustrato	Condiciones	Resultado
Oleoresina	0.5 mg S+80mL hexano+20 mL buffer +1 g enzima	No hidrólisis, 96 hr**
Oleoresina	5 mg S+1.5 mL hexano+50 mL buffer + 0.5 g enzima	Monoésteres, 30 hr
Esteres purificados	50 mg S+25 mL hexano+20 mL buffer + 0.5 g enzima	Monoesteres+luteína libre, 96 hr(**)

\* = S indica sustrato; E indica enzima.

\*\* = Aparición de manchas blancas en cromatoplaque que no aparecen en los demás sistemas. En el de esterres purificados aparecen en menor cantidad a pesar de que el sustrato está en mayor cantidad. Notar que la cantidad de agua disponible es distinta en los dos sistemas anteriores.

En cuanto a las manchas blancas mencionadas en la tabla, se pensó que las manchas podían deberse a la enzima en sí. Se hizo un control que resultó negativo. También se creyó que podrían

ser ácidos grasos libres. Se corrieron en las capas finas soluciones estándar de ácido palmítico, mirístico y esteárico (1 mg/mL) no encontrándose similitud alguna con las manchas blancas encontradas. Se volvió a hacer la reacción con estearasa de hígado, intentando manipular la selectividad enzimática, pero se encontraron las mismas manchas blancas. En el sistema que tuvo menos hexano, a las 12 hr el hexano se había evaporado a pesar del uso del condensador, quedando una sola fase continua. La reacción se volvió completamente acuosa a las 12 hr de reacción y hubo productos de hidrólisis.

En el sistema de dos fases, se formaba una emulsión estable durante la agitación del sistema. Dicha emulsión se rompía con NaCl o con etanol. Sin embargo, algunas mezclas debieron ser centrifugadas para separar los productos de reacción.

Para emplear el sistema de una fase continua en hexano, la enzima fue inmovilizada en Dietilaminoetil celulosa, siguiendo el método de Kang y Rhee (1989), quienes habían empleado este sistema para inmovilizar lipasa de *Candida rugosa* e hidrolizar aceite de oliva (Tabla 20).

**Tabla 20. Resultados de hidrólisis enzimática: sistema con enzima inmovilizada en Dietilaminoetil celulosa (soporte hinchado con agua) en fase continua de hexano**

Sustrato	Condiciones	Resultado
Oleoresina	0.5 mg S + 100mL hexano+1 g enzima inmovilizada(+ el peso del soporte)	No hidrólisis, 96 hr *
Esteres purificados	50 mg S + 25 mL hexano+0.5 g enzima(+ el peso del soporte)	Monoester +luteína libre 96 hr

\* =Aparición de manchas blancas en cromatoplaca

Nota: La inmovilización se monitoreó midiendo absorbancia a 280 nm

Se puede pensar que es imprescindible la existencia de un exceso de agua para que la hidrólisis se lleve a cabo. También parece ser válido que la escasez de agua produce las manchas blancas en la CCF, que podrían ser productos de síntesis. La ausencia de agua disponible para la reacción es capaz de cambiar el equilibrio, favoreciendo reacciones de síntesis más que reacciones de hidrólisis (Halling, 1984).

Por lo anterior, se podría pensar en el uso de otro disolvente o bien en cambiar el pH de la reacción. Otra posibilidad sería intentar agregar iones calcio (Halling, 1996) a la reacción llevada

a cabo en dos fases, lo cual propiciaría el paso de los ácidos grasos generados en la reacción hacia la fase acuosa, favoreciendo el equilibrio hacia hidrólisis.

No se descarta, por otro lado, que en el futuro pueda disponerse de enzimas mucho más específicas que sean capaces de llevar a cabo la reacción con los sistemas planteados.

## Conclusiones

Los resultados de la presente investigación nos permiten formular las siguientes conclusiones generales:

1. Los ésteres de xantofilas contenidos en *T. erecta* son extraíbles con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico. Su solubilidad se incrementa con la presión, hasta por lo menos 280 bars a 40°C. Es posible que la solubilidad siguiera incrementándose a temperatura constante al aumentar la presión de operación.
2. A pesar de que el incremento de temperatura mejora el rendimiento de extracción, temperaturas superiores a 50°C promueven la degradación de los diésteres, lo que resulta en pérdidas importantes de color. Estas temperaturas no son recomendables, a menos que se encuentre un mecanismo que pueda proteger al colorante sin mermar los rendimientos o la pureza de extracción.
3. La eficiencia de la extracción de los diésteres de xantofilas puede incrementarse del doble al triple utilizando cosolventes de polaridad intermedia, con valores de log P comprendidos entre 0.8 y 2.8.
4. Es posible llevar a cabo una extracción selectiva de compuestos no coloridos usando densidades inferiores a 0.6 g/mL a 60°C ó 0.7 g/mL a 40°C ó 0.8 g/mL a 25°C . Los rendimientos obtenidos de estos extractos pueden ser de hasta 3% p/p. Los extractos supercríticos obtenidos de este modo son muy diferentes al aceite esencial obtenido por hidrodestilación. Este último contiene mayores cantidades de terpenos volátiles y menores cantidades de lípidos cuticulares. Sin embargo, se cree los compuestos de los extractos supercríticos podrían fraccionarse después de la extracción en una serie de separadores cuya presión y temperatura estuvieran controladas.
5. Se comprobó la potencialidad de los polisacáridos de desecho para ser reutilizados como subproductos. Fue posible esterificarlos con cloruro de ácido graso para formar una película tipo termoplástica. Es posible también que se puedan fabricar agentes tensoactivos a partir de los oligosacáridos generados durante la reacción de esterificación. No se conoce la naturaleza de dichos polisacáridos, y es probable que su calidad sea variable, puesto que el ensilado es un proceso cuyas condiciones dependen de factores climáticos y de distintas prácticas agropecuarias.

6. El empleo de extracciones sucesivas a 40°C y densidad 0.9 g/mL permite la obtención de extractos cuya concentración en xantofilas totales aumenta con cada paso de extracción. Esto permite obtener productos con concentraciones diferentes para distintas aplicaciones. Por otro lado, la extracción de compuestos no coloridos previa a la extracción de carotenoides incrementaría necesariamente la pureza de éstos últimos pues a densidades mayores (aquellas que resultan más eficientes en cuanto a extracción de carotenoides) el poder solvente del fluido aumenta, lo cual disminuye su selectividad.

### **Perspectivas**

Como perspectivas a futuro, sugerimos las siguientes líneas de trabajo:

1. Llevar a cabo pruebas de extracción supercrítica a nivel planta piloto. Lo anterior debido a que la escala utilizada en este estudio es muy pequeña en relación a la escala industrial.
2. Investigar la separación selectiva de los compuestos extraídos a densidades altas (0.9 g/mL) utilizando un equipo que cuente con dos separadores centrífugos conectados en serie.
3. Caracterizar exhaustivamente el residuo industrial generado de la extracción de diésteres de xantofilas. Lo anterior permitiría trabajar más eficientemente la esterificación del residuo para la obtención de materiales agro-industriales.
4. Investigar la hidrólisis química o enzimática de los diésteres de xantofilas durante la extracción supercrítica. Se requeriría, sin embargo, de nuevos estudios de solubilidad, puesto que la naturaleza química de las xantofilas es alterada significativamente por el proceso de hidrólisis.



6. El empleo de extracciones sucesivas a 40°C y densidad 0.9 g/mL permite la obtención de extractos cuya concentración en xantofilas totales aumenta con cada paso de extracción. Esto permite obtener productos con concentraciones diferentes para distintas aplicaciones. Por otro lado, la extracción de compuestos no coloridos previa a la extracción de carotenoides incrementaría necesariamente la pureza de éstos últimos pues a densidades mayores (aquellas que resultan más eficientes en cuanto a extracción de carotenoides) el poder solvente del fluido aumenta, lo cual disminuye su selectividad.

### **Perspectivas**

Como perspectivas a futuro, sugerimos las siguientes líneas de trabajo:

1. Llevar a cabo pruebas de extracción supercrítica a nivel planta piloto. Lo anterior debido a que la escala utilizada en este estudio es muy pequeña en relación a la escala industrial.
2. Investigar la separación selectiva de los compuestos extraídos a densidades altas (0.9 g/mL) utilizando un equipo que cuente con dos separadores centrífugos conectados en serie.
3. Caracterizar exhaustivamente el residuo industrial generado de la extracción de diésteres de xantofilas. Lo anterior permitiría trabajar más eficientemente la esterificación del residuo para la obtención de materiales agro-industriales.
4. Investigar la hidrólisis química o enzimática de los diésteres de xantofilas durante la extracción supercrítica. Se requeriría, sin embargo, de nuevos estudios de solubilidad, puesto que la naturaleza química de las xantofilas es alterada significativamente por el proceso de hidrólisis.

## Referencias

1. Aburto-Anell J.A. (1998). "Étude de la réactivité de l'amidon vis-à-vis de dérivés d'acides gras. Obtention de matériaux thermoplastiques et hydrophobes". Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.
2. Alam, AU; Creger, CR; Couch, JR.(1968). Petals of Aztec Marigold, *Tagetes erecta*, as a Source of Pigment for Avian Species. *Journal of Food Science*, **33**:635-636.
3. Ambrogi, A; Eggers, R.(1997). Extraction and concentration of xanthophyll pigments from marigold (*Tagetes erecta*). Fourth Italian Conference on Supercritical Fluids and their Applications. Capri, Italy, 7/10 september, 1997.
4. AOAC.(1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (1990). 15th edition.
5. Barragan, F y Guzmán, E. (1999). <http://eros.pquim.unam.mx/balance/eqfases/Eqfases2.txt>.
6. Barth, MM; Zhou, C; Kute, KM; Rosenthal, GA.(1995). Determination of Optimum Conditions for Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids from Carrot (*Daucus carota*, L.) Tissue. *J. Agric. Food Chem.*, **43**(11):2876-2878.
7. Baslas, RK., Singh, AK (1980). Chromatographic Separation of Essential Oil of *Tagetes erecta*. *Indian Perfumer*, **XXIV**(3):163-165.
8. Baser, KHC and Malyer, H. (1996). Essential Oil of *Tagetes minuta* L. from Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, **8**, (May/Jun): 337-338.
9. Bemiller JN; Gupta, AK; Wickramasingha, DS.(1989). "Structure and Properties of the Water-Extractable Polysaccharide of Marigold (*Tagetes erecta*) Petals-2" in *Frontiers in Carbohydrate Research-1. Food Applications*. RP Millane, J.BeMiller, R. Chandra-sekaran eds. Elsevier Applied Sciences. London.
10. Bettarini, F; Borgonovi, GE; Fiorani, T; Gagliardi, I; Caprioli, V; Massardo, P; Ogoche, JIJ; Hassanali, A; Nyandat, E; Capya, A. (1993). Antiparasitic compounds from east african plants: isolation and biological activity of anonaine, matricarianol, canthin-6-one and caryophyllene oxide. *Insect Sci. Applic.*, **14**(1): 93-99.

11. Bicchì, C; Frattini, C; Pellegrino, G; Rubiolo, P; Raverdino, V. and Tsoupras, G. (1992). Determination of sulphurated compounds in *Tagetes patula* cv. nana essential Oil by gas chromatography with mass spectrometric, Fourier transform infrared and atomic emission spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, **609**: 305-313.
12. Böhm, F; Heinisch, R; Peter, S; Weidner, E. (1989). "Design, Construction, and Operation of a Multipurpose Plant for Commercial Supercritical Gas Extraction" in *Supercritical Fluid Science and Technology*. KP Johnston, JML Penninger, eds. American Chemical Society. Washington, DC.
13. Britton, G. (1976). "Biosynthesis of Carotenoids" in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, vol. 1. TW Goodwin, ed. 2nd. edition. Pp: 262-327.
14. Britton, G.(1995). Structure and Properties of Carotenoids in Relation to Function. *FASEB J.* **9**:1551-1558.
15. Camiuc, M.(1997). "Culture de l'espece *Abelmoschus esculentus* (L.) moench en France, étude du contenu moleculaire et perspectives de valorisation." Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
16. Carnevale, J; Cole, DE; Crank, G.(1980). Photocatalyzed Oxidation of Paprika Pigments. *J. Agric. Food Chem.*, **28**(5):953-956.
17. Chester, TL; Pinkston, JD. (1990). Supercritical Fluid Chromatography. *Anal. Chem*, **62**: 394R-402R.
18. Chew, BP; Wong, MW; Wong, TS.(1996). Effects of lutein from marigold extracts on immunity and growth of mammary tumors in mice. *Anticancer Research*, **16**(6B):3689-3694.
19. Chi, YM; Nakamura, K; Yano, T. (1988). Enzymatic Interesterification in Supercritical Carbon Dioxide. *Agric. Biol. Chem.*, **52**(6):1541-1550.
20. Chiou, RYY; Yu, ZR; Wu, PY; Chen, W; Weng, YM. (1996) Partial Defatting of Roasted Peanut Meals and Kernels by Supercritical CO<sub>2</sub> Using Semicontinuous and Intermittently Depressurized Processes. *J. Agric. Food Chem.* **44**:574-578.
21. Chrastil, J.(1982). Solubility of Solids and Liquids in Supercritical Gases. *J. Phys. Chem.*, **86**:3016-3021.
22. Christianson, DD; Friedrich, JP; List, GR; Warner, K; Bagley, EB; Stringfellow, AC; Inglett, GE.(1984). Supercritical Fluid Extraction of Dry-Milled Corn Germ with Carbon Dioxide. *Journal of Food Science*, **49**:229-232,272.

23. Christie WW (1982). "The Preparation of Derivatives of Lipids" in *Lipid Analysis* . 2nd edition. Pergamon Press.
24. Clifford, AA.(1996). "Supercritical Fluid Extraction and Chromatography" in *Downstream Processing of Natural Products*. MS Verrall, ed. John Wiley & Sons,Ltd.
25. Cygnarowicz, ML; Maxwell, RJ; Seider, WD.(1990). Equilibrium Solubilities of  $\beta$ -carotene in Supercritical Carbon Dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, **59**:57-71.
26. Cygnarowicz, ML, and Seider, WD. (1990). Design and Control of a Process to Extract  $\beta$ -Carotene with Supercritical Carbon Dioxide, *Biotech Prog.*, **6**, 1, 82-91
27. D'Auria, M; De Mico, A; D'Onofrio, F; Piancatelli, G.(1986). Photochemical approach to naturally occurring biothiophenes. Synthesis of a bithienyl component of *Tagetes erecta*. *Gazz.Chim.Ita.*, **116**(12):747-748.
28. Davies, BH. (1976). "Carotenoids" in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, vol. 2. TW. Goodwin, ed. 2nd edition. Academic Press.
29. Davies, NW. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography*, **503**:1-24.
30. De Israilev, LRA; Del Pero de Martínez, MA; Seeligmann, P. (1991). Myricetin in *Tagetes*: chemosystematic significance. *Phytochemistry*, **30**(12):4037-4038.
31. Delgadovargas, F. and Paredeslopez, O. (1997). Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flowers (*Tagetes erecta*). *Food Chemistry*, **58**(3): 255-258.
32. Deshpande, SS; Deshpande, US; Salunkhe, DK.(1996). "Nutritional and Health Aspects of Food Antioxidants" in *Food Antioxidants, Technological, Toxicological, and Health Perspectives*. DL Madhavi, SS Deshpande, DK Salunkhe eds. Marcel Dekker Inc. Pp: 361-469.
33. Dobbs, JM; Wong,JM; Lahiere, RJ; Johnston KP.(1987). Modification of Supercritical Fluid Phase Behavior Using Polar Cosolvents. *Ind. Eng. Chem. Res.* **26**: 56-65.
34. Dooley, KM; Chien-Ping, K; Gambrelli, RP; Knopf, C. (1987). The use of Entrainers in Supercritical Extraction of Soils Contaminated with Hazardous Organics. *Ind. Eng. Chem. Res.* **26**: 2058-2062.

35. Eggers, R.(1978). "Large-Scale Industrial Plant for Extraction with Supercritical Gases" in *Symposium on Extraction with Supercritical Gases*, Essen, 1978. Pp: 155-164.
36. Eggers, R; Ambrogi, A. (1997). "Extraction and concentration of xanthophyll pigments from marigold (*tagetes erecta*)" in *Fourth Italian Conference on Supercritical Fluids and their Applications*. E. Reverchon, ed. Pp:129-134.
37. Eggers, R; Sievers, U. (1989). "Current State of Extraction of Natural Materials with Supercritical Fluids and Developmental Trends" in *Supercritical Fluid Science and Technology*. K.P. Johnston, JML Penninger, eds. American Chemical Society. Pp: 478-498.
38. El-Tinay, AH; Chichester, CO. (1970). Oxidation of  $\beta$ -Carotene. Site of Initial Attack. *J. Org. Chem.*, **35**(7):2290-2293.
39. El-Tantawy, ME, Hamauda, MSM and Azzam, AS. (1994). Chemical Composition and Biological Actitivity of the Essential Oil of *Tagetes erecta* L. cultivated in Egypt. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.*; **32**(1):113-118.
40. Favati, F; King, JW; Friedrich, JP; Eskins, K.(1988). Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Carotene and Lutein form Leaf Protein Concentrates. *Journal of Food Science*, **53**(5):1532-1536.
41. Favati, F; Fiorentini, R; De Vitis, V.(1994). "Supercritical Fluid Extraction of Sunflower Oil: Extraction Dynamics and Process Optimization" in *Proceedings of the International Symposium on Supercritical Fluids*. Strasbourg, tome 2, Pp:305-316.
42. Fedors, RF.(1974). A method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids. *Polymer Eng. Sci.* **14**(2):147.
43. Fennema, O.(1993). *Química de los alimentos*. Ed. Acribia.
44. Founau-Brunel, V.(1995). "Analyse d'huiles essentielles, essais de constitution d'une banque de donnees." Memoire en vue de l'obtention du diplome d'etudes superieures. Université Paul Sabatier, Toulouse.
45. Fried, B (1988). "Lipids" in *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. J. Sherma, B. Fried, eds. Marcel Dekker, Inc. New York.
46. Friedrich, JP; List, GR.(1982). Characterization of Soybean Oil Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Hexane. *J. Agric. Food Chem.* **30**:192-193.

47. Ganou, L. (1993). "Contribution a l'étude de mecanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles." Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
48. Garg, SC. and Dengre, SL. (1983). Antifungal Activity of the essential oil of *Tagetes erecta*. *Riechstoffe-Aromen-Kosmetika*, **33**,(10): 218.
49. Giddings, JC; Myers, MN; McLaren, L; Keller, RA.(1968). High Pressure Gas Chromatography on Nonvolatile species. *Science* **162**:67.
50. Gober, KH; Günther, BR; Lünebach, G; Repplinger, G; Wiedemann, M. (1993). "Isolation and Analysis of Phospholipids and Phospholipid Mixtures" in *Phospholipids Handbook*. Gregor Cevc, ed. Marcel Dekker, Inc. New York
51. González De Mejía, E; Loarca, PG; Ramos Gómez, M.(1997). Antimutagenicity of xanthophylls present in Aztec Marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene. *Mutation Research*, **389**(2-3):219-226.
52. Goodwin, TW.(1973). "Carotenoids" in *Phytochemistry: The process and products of photosynthesis, vol. I*. L. P Miller, ed. Nostrand Reinhold Co. Pp:120
53. Gorman, LA; Dordick, JS.(1992). Organic Solvents Strip Water off Enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, **39**:392-397.
54. Goto, M; Sato, M; Hirose, T.(1993). Extraction of Peppermint Oil by Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **26**(4):401-407.
55. Grover, GS and Tirumala Rao, J. (1978). In vitro antimicrobial studies of the essential oil for *Tagetes erecta*. *Perfumer & Flavorist*, **3**(October/November): 28.
56. Grover, KS; Hiradhar, PK. (1992). Some Studies on Effects of Plant Extracts with possible Insect Control Potential on the Cockroach *Periplaneta americana linnaeus*. *J. Anim. Morphol. Physiol.*, **39** (1-2):99-108.
57. Gurdial, GS; Foster, NR; Jimmy Yun, SL; Tilly, KD.(1993). "Phase Behavior of Supercritical Fluid-Entrainer Systems" in *Supercritical Fluid Engineering Science*. E. Kiran; JF Brennecke, eds. ACS Symposium Series 514. Washington DC. Pp:1-8
58. Gupta, YN et al. (1974). *Indian Perfumer*, **2**:18.
59. Gupta, YN and Bhandari, KS (1974). Chemical Examination of Essential Oil From the Flowering Tops of *Tagetes erecta*. *Indian Perfumer*, **XVIII** (part II):29-33

60. Haila, KM; Lievonen, SM; Heinonen, MI. (1996). Effects of Lutein, Lycopene, Annatto and  $\gamma$ -Tocopherol on Autoxidation of Triglycerides. *J. Agric. Food Chem.* **44**(8):2096-2100.
61. Halling, PJ.(1984). Effects of water on equilibria catalysed by hydrolytic enzymes in biophasic reaction systems.*Enzyme Microb. Technol.* **6**:513-516.
62. Halling, PJ.(1996). Comunicación personal.
63. Hamilton, RJ. (1995). Analysis of Waxes in "Waxes: Chemistry, molecular biology and functions". The Oily Press, vol. 6. Dundee.
64. Harwood, JL. (1991). Lipid Structure in "The Lipid Handbook, 2<sup>nd</sup>. ed. FD Gunstone, JL Harwood & FB Padley, eds. Chapman & Hall Chemical Database.
65. Hausen, BM; Helmke, B.(1995). Butenylbithiophene, alpha-terthienyl and hydroxytremetone as contact allergens in cultivars of marigold (*Tagetes* sp.), *Contact Dermatitis*, **33**(1):33-37.
66. Hawthorne, SB; Galy, AB; Schmitt, VO; Miller, DJ.(1995). Effect of SFE Flow Rate on Extraction Rates: Classifying Sample Extraction Behavior. *Analytical Chemistry*, **67**(15):2723-2732.
67. Heidemann, RA; Khalil, AM. (1980). The Calculation of Critical Points. *AIChE Journal*, **26**(5): 769-779.
68. Helsper, JPF; Ketel, DH; Hulst, AC; Breteler, H.(1988). Production and secretion of thiophenes by differentiated cell cultures of *Tagetes*. *Bioact. Mol.*, **7**:279-285.
69. Héthelyi, E; Dános, B and Tétény, P. (1986). "GC/MS Analysis of Essential Oils of some *Tagetes* species" in *Progress in Essential Oil Research*. Walter de Gruyter, ed. Walter de Gruyter & Co. Berlin. Pp:131-137.
70. Howard, AN; Williams, NR; Palmer, CR; Cambou, JP; Evans, AE; Foote, JW; Marques-Vidal, P; McCrum, EE; Ruidavets, JB.(1996). Do hydroxy-carotenoids prevent coronary heart disease ? A comparison between Belfast and Toulouse. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **66**(2):113-118.
71. Hudon, J.(1994). Biotechnological Applications of Research on Animal Pigmentation. *Biotech. Adv.*, **12**:49-69.
72. Jackson, MA; King, JW.(1996). Methanolysis of Seed Oils in Flowing Supercritical Carbon Dioxide. *JAOC*S, **73**(3):353-356.

73. Jacobs, JJ; Aaroo, RR; De-Koning, EA; Klunder, AJ; Croes, AF; Wullems, GJ.(1995). Isolation and Characterization of Mutants of Thiophene Synthesis in *Tagetes erecta*. *Plant Physiology (Rockville)*, **107**(3):807-814
74. Johnston, KP; McFann, FJ; Lemert, RM.(1989). "Pressure Tuning of Reverse Micelles for Adjustable Solvation of Hydrophiles in Supercritical Fluids" in *Supercritical Fluid Science and Technology*. KP Johnston, JML Penninger, eds. American Chemical Society. Washington, DC.
75. Kamal, R; Mangla, M.(1987). Toxicity of natural pyrethrins against *Mesocyclops leuckarti* sensu lato, carrier of dranculiasis. *Pyrethrum. Post.*, **16**(4):125-127.
76. Kaneko, S; Oyanogi, A.(1995). Varietal Differences in the Rate of Esterification of Endosperm Lutein during the Storage of Wheat Seeds. *Biosc. Biotech. Biochem.*, **59**(12):2312-2313.
77. Kang, ST; Rhee, JS. (1989). Characteristics of Immobilized Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Olive Oil of High Concentration in Reverse Phase System. *Biotechnology and Bioengineering*, **33**:1469-1476.
78. Kasumov, M.A.(1992). New sources of plant raw material for production of yellow food dye. *Pokl. Akad. Nauk Azerb.*, Vol. Date 1990, **46**:(8-9) 60-4.
79. Kiran, E; Brennecke, J. (1993). "Current State of Supercritical Fluid Science and Technology" in *Supercritical Fluid Engineering Science*. E. Kiran y J. Brennecke, eds. American Chemical Society.
80. Ketel, DH.(1988). Accumulation of thiophenes by cell cultures of *Tagetes patula* and the release of 5-(4-hydroxy-1-butynyl)-2,2'-bithiophene into the medium. *Planta Med.*, **54**(5):400-405.
81. Klaus, P.(1994). Method for the isolation of vegetable oleoresins producible by hexane extraction. PCT Int. Appl. WO 9413743 A1. 23 Jun. 1994.,17 pp. Application WO 93-DK422.
82. Knipe, C; Miles, W; Rowland, F; Randal, L. (1993). "The Entwined Influence of Instrumentation and Sample upon an SFE Method" in *Designing a Sample Preparation Method that Employs Supercritical Fluid Etraction*. Hewlett-Packard Co. USA. Pp: 13-24
83. Koedam, A.(1987). "Capillary Gas Chromatography" in *Essential Oil Analysis..* P.Sandra and C.Bicchi, eds. Huethig, New York.Pp:13-27.



84. Kondjoyan, N; Berdagué, J.L.(1996). A Compilation of Relative Retention Indices for the Analysis of Aromatic Compounds. 1<sup>st</sup>. Ed. Edition du Laboratoire Flaveur.
85. Kossik, J. (1996). On Using Supercritical Fluids for Bioprocessing Downstream Operations. *Genetic Engineering News*, december. Pp: 27.
86. Kourany, E; Arnason, JT; Schneider, E.(1988). Accumulation of phototoxic thiophenes in *Tagetes erecta* (Astraceae) elicited by *Fusarium oxysporum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 33(2):287-297.
87. Krukonis, VJ.(1985). "Supercritical Fluid Extraction in Flavor Applications" in *Characterization and Measurement of Flavor Compounds*. ACS Symposium Series, 289. DD Bills y CJ Mussinan, eds. American Chemical Society, Washington, DC.Pp: 155-175.
88. Kuk, MS.(1998). "Use of Hildebrand's Solubility Parameter in Oilseed Lipid Extraction" in *Advances in Oils and Fats, Antioxidants, and Oilseed By-Products, Vol. II in the Proceedings of the World Conference on Oilseed and Edible Oils Processing*. SS Koseoglu, KC Rhee and RF Wilson, eds. AOAC Press, Champaign, Illinois. Pp:9-12.
89. Kyo, M; Miyauchi, Y; Fujimoto, T; Mayama, S.(1990). Production of nematocidal compounds by hairy root cultures of *Tagetes patula*, L. *Plant Cell Rep.*, 9(7):393-397.
90. Larson, KA; King, ML.(1986). Evaluation of Supercritical Fluid Extraction in the Pharmaceutical Industry. *Biotechnology Progress*, 2(2):73-82.
91. Lawrence, BM (1985). Essential Oils of the *Tagetes* Genus. *Perfumer & Flavorist*, 10 (October/November): 73-82.
92. Lee, M; Markides, KE. (1987). Chromatography with Supercritical Fluids. *Science*, 235:1342-1347.
93. Machado, MIL; Silva, MG; Matos, FJA; Craveiro, AA; Alencar, JV. (1994). The presence of indole as minor constituent of *Tagetes erecta* leaf oil. *J. Essent. Oil. Res.* 6(2):203-205.
94. Markley, KS (1961). "Esters and Esterification" in *Fatty Acids. Their Chemistry, Properties, Production and Uses*. 2nd edition. Klare S. Markley, ed. Interscience Publishers, Ltd. London.
95. McHugh, MA; Mallett, MW; Kohn, JP.(1983). "High Pressure Fluid Phase Equilibria of Alcohol-Water-Supercritical Solvent Mixtures" in *Chemical Engineering at Supercritical Fluid Conditions*. ME Paulaitis, JML Penninger, RD Gray Jr., P Davidson, eds. Ann Arbor Science, USA.

96. McHugh, MA and Krukonis, VJ (1986). *Supercritical Fluid Extraction. Principles and Practice.* Butterworths. Stoneham, MA.
97. Menelaou, MA; Fronczeck, FR; Hjorsto, MA; Morrison, AF; Foroozesh, M; Thibodeaux, TM; Flores, HE; Fischer, NH.(1991). NMR spectral data of benzofurans and bithiophenes from hairy root cultures of *Tagetes patula* and the molecular structure of isoeuparin. *Spectroscopy letters*, **24**(10):1405-1413.
98. Mohamed, RS; Halverson, DS; Debenedetti, PG; Prud'homme, RK. (1989). "Solids Formation After the Expansion of Supercritical Mixtures" in *Supercritical Fluid Science and Technology*. K.P. Johnston, JML Penninger, eds. American Chemical Society. Pp: 355-378.
99. Monma, M; Terao, J; Miwako, I; Saito, M; Chikuni, K. (1994). Carotenoid Components in Soybean Seeds Varying with Seed Color and Maturation Stage. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**(5):926-930.
100. Moss GP and Weedon BCL. (1976). "Chemistry of Carotenoids" in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, vol I, 2<sup>nd</sup>. edition. TW Goodwin, ed. Ac. Press. London.
101. Mukundan, U; Hjortson, MA.(1990). Thiophene content in normal and transformed root cultures of *Tagetes erecta*: A comparison with thiophene content in roots of intact plants. *Journal of Experimental Botany*, **41**(232):1497-1502.
102. Mukundan, U; Hjortso, MA.(1990). Effect of fungal elicitor on thiophene production in hairy root cultures of *Tagetes patula*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**(2):145-147.
103. Mulvaney, ST; Rizvi, SSH.(1993). Extrusion Processing with Supercritical Fluids. *Food Technology*, december: 74-82.
104. Nugteren, DH; Christ-Hazelhof, E. (1987). Naturally occurring conjugated octadecatrienoic acids are strong inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins*, **33**(3): 403-417.
105. Perrut, M.(1990). Les Fluides Supercritiques: Applications en abondance. *Informations Chimie*, **321** (octobre):166-177.
106. Perich, MJ; Wells, C; Bertsch, W; Tredway, KE.(1995). Isolation of the insecticidal components of *Tagetes minuta* (*Compositae*) against mosquito larvae and adults. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **11**(3):307-310.
107. Pfander, H. (1992). Carotenoids: An Overview. *Methods in Enzymology*, **213**. Lester Packer, ed. Academic Press.

108. Phelps, CL; Smart, NG; Wai, CM (1996). Past, Present and Possible Future Applications of Supercritical Fluid Extraction Technology. *Journal of Chemical Education*, **73**(12):1163-1168.
109. Philip, T. and Berry, JW. (1976). A Process for the Purification of Lutein-Fatty Acid Esters from Marigold Petals. *Journal of Food Science*, **41**:163-164
110. Philip T. y Berry, JW. (1975). Nature of Lutein Acylation in Marigold (*Tagetes erecta*) Flowers. *Journal of Food Science*, **40**:1089-1090.
111. Piccaglia, R; Marotti, M; Pesenti, M; Mattarelli, P; Biavati, B.(1997). "Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula* Essential Oils" in 27<sup>th</sup> International Symposium in Essential Oils (ISEO). Pp: 49-51.
112. Ponce Ramírez, L; Izcapa Treviño, C.(1989). Avances y Perspectivas de los Procesos de Extracción Supercrítica. UNAM.
113. Randolph, T. (1990). Supercritical Fluid Extractions in Biotechnology. *TIBTECH*, **8**:78-82.
114. Rekker, RF. (1977). "The Hydrophobic Fragmental Constant" in *Series Pharmacochemistry Library (vol. 1)*. Elsevier.
115. Ribeiro, MA; Bernardo-Gil, MG.(1995). Solubilities of Triolein in Supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Chem. Eng. Data*, **40**:1188-1192.
116. Rizvi, SSH; Bhaskar, AR.(1995). Supercritical Fluid Processing of Milk Fat: Fractionation, Scale-Up, and Economics. *Food Technology*, February. Pp: 90-100.
117. Rodriguez, DB; Raymundo, LC; Lee, T-C; Simpson, KL; Chichester, CO.(1976). Carotenoid Pigment Changes in Ripening *Momordica charantia* Fruits. *Ann. Bot.*, **40**: 615-624.
118. Romagnoli, C; Mares, D; Fasulo, MP; Bruni, A.(1994). Antifungal effects of alpha terphenyl from *Tagetes patula* on five dermatophytes. PTR. *Phytotherapy Research*, **8**(6):332-336.
119. Sakaki, K.(1992). Solubility of  $\beta$ -carotene in Dense Carbon Dioxide and Nitrous Oxide from 308 to 323 K and from 9.6 to 30 MPa. *J. Chem. Eng. Data*, **37**:249-251.
120. Sato, M; Goto, M; Hirose, T.(1995). Fractional Extraction with Supercritical Carbon Dioxide for the Removal of Terpenes from Citrus Oil. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **34**: 3941-3946.
121. Seddon, JM, et al. (1994). Preventing Macular Degeneration with Dietary Carotenoids. *JAMA*, **272**: 1413-1420.

122. Shi Wan-yang, He Wei, Wen Guang-yu, Chu Jian-qin, Li Xu, Jiang Ming (1988). Study on the Chemical Constituents from the Essential Oil of *Tagetes erecta* L. *Acta Botanica Sinica*, **30**(6): 629-634.
123. Singh, B; Sood, RP and Singh, V. (1992). Chemical Composition of *Tagetes minuta* L. Oil from Himachal Pradesh (India). *J. Essent. Oil Res.*, **4**, (Sep/Oct): 525-526.
124. Singh, SP; Sharma, P; Vats, LK.(1987). Light-dependent toxicity of the extracts of plant *Tagetes erecta* and alpha-terthienyl toward larvae of mosquito *Culex tritaeniorhynchus*. *Toxicol. Environ. Chem.*, **16**(1):81-88.
125. Solórzano-Zavala, M; Barragán-Aroche, F; Bazúa, ER(1996). Comparative Study of Mixing Rules for Cubic Equations of State in the Prediction of Multicomponent Vapor-Liquid Equilibria. *Fluid Phase Equilibria.*, **132**: 99-116.
126. Škerget, M; Knez,Š; Habulin, M. (1995). Solubility of  $\beta$ -carotene and oleic acid in dense CO<sub>2</sub> and data correlation by a density based model. *Fluid Phase Equilibria* **109**:131-138.
127. Smith, RD; Blitz, JP; Fulton, L.(1989). "Structure of Reverse Micelle and Microemulsion Phases in Near-Critical and Supercritical Fluid as Determined from Dynamic Light-Scattering Studies" in *Supercritical Fluid Science and Technology*. KP Johnston, JML Penninger, eds. American Chemical Society. Washington, DC.
128. Spanos, GA; Chen, H; Schwartz, SJ.(1993). Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of  $\beta$ -Carotene from Sweet Potatoes. *Journal of Food Science*, **58**(4):817-820.
129. Stahl, E; Schütz, E; Mangold, HK.(1980). Extracion of Seed Oils with Liquid and Supercritical Carbon Dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, **28**:1153-1157.
130. Subra, P; Catellani, S; Garrabos, Y.(1994). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carotenoids from Carrots in *Proceedings of the International Symposium on Supercritical Fluids*. Strasbourg, tome 2, Pp:447-452
131. Sunol, AK; Hagh, B; Chen, S.(1985). "Entrainer Selection in Supercritical Extraction" in *Supercritical Fluid Technology. Process, Technology Proceedings*, 3. JML Penninger, M Radosz, MA McHugh, VJ Krukoni, eds. Elsevier, New York.
132. Tafoya, A y García Hernández F. (1993). Colorantes en *Bioteología Alimentaria*: A. López-Munguía, R. Quintero y M. García-Garibay, eds. Limusa. México.
133. Taniguchi, M; Tsuji, T; Shibata, M; Kobayashi, T.(1985). Extraction of Oils from Wheat Germ with Supercritical Carbon Dioxide. *Agric. Biol. Chem.*, **49**(8):2367-2372.

134. Takii, K; Nakamura, M; Kumai, H; Hattori, T; Kondo, A.(1991). Effect of marigold xanthophyll supplementation to a formulated diet on pigmentation of yellowtail. *Suisan Zoshoku*, **39**(1):9-13.
135. Tengerdy, RP; Linden, JC; Wu, M; Murphy, VG; Baintner, F; Szakacs, G.(1992). Plant Processing by Simultaneous Lactic Acid Fermentation and Enzyme Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **34-35**:309-316.
136. Thappa, RK; Agarwal, SG; Kalia, NK and Kapoor, R. (1993). Changes in Chemical Composition of *Tagetes minuta* Oil at Various Stages of Flowering and Fruiting. *J. Essent. Oil Res.*, **5** (Jul/Aug): 375-379.
137. Tosi, B; Lodi, G; Dondi, F; Bruni, A.(1988). Thiophene distribution during the ontogenesis of *Tagetes patula*. *Bioact. Mol.*, **7**:209-216.
138. Towers, GH; Berns, MW; Abeysekera, B.1986. Characterization of cutaneous phototoxicity induced by topical alpha-terthienyl and ultraviolet A radiation. *J. Invest. Dermatol.*, Sep; **87**(3):354-357.
139. Trypathy, AK; Gupta, KR.(1991). Plant phenolics of *Tagetes erecta*. *Fitoterapia*, **62**(1):91-92.
140. Tucker, AO. and Maciarello, MJ. (1996). Volatile Leaf Oil of *Tagetes lemonii* Gray. *J. Essent. Oil Res.*, **8**, (Jul/Aug): 417-418.
141. Tyczkowski, JK; Hamilton, PB.(1991). Preparation of Purified Lutein and Its Diesters from Extracts of Marigold (*Tagetes erecta*). *Poultry Science*. **70**:651-654.
142. Vaca-Garcia C. (1997). "Étude de la réactivité de la cellulose et de déchets lignocellulosiques sur des acides gras et des esters d'acides gras en milieu hétérogène solide-liquide. Obtention de matériaux thermoplastiques et hydrophobes". Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.
143. Vasilakos, NP; Dobbs, JM; Parisi, AS.(1984). Solvent Effects in Supercritical Extraction of Coal. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, **24**(1):121-128.
144. Vieville, C; Mouloungui, Z; Gaset, A. (1993). Esterification of Oleic Acid by Methanol Catalyzed by *p*-Toluenesulfonic Acid and the Cation-Exchange Resins K2411 and K1481 in Supercritical Carbon Dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **32**:2065-2068.

145. Weaver, DK; Wells, CD; Dunkel, FV; Bertsch, W; Sing, SE and Sriharan, S. (1994). Insecticidal Activity of Floral, Foliar, and Root Extracts of *Tagetes minuta* (Asterales:Asteraceae) Against Adult Mexican Bean Weevils (Coleoptera:Bruchidae). *Journal of Economic Entomology*, **87**(6): 1718-1725.
146. Wells, C; Mongin, A; Bertsch, W.(1993). A study of photosensitive insecticidal volatile compounds in marigold (*Tagetes minuta*). *J.High Resolut. Chromatogr.*, **16**(1):53-55.
147. Wells, C; Bertsch, W. and Perich, M. (1993). Insecticidal Volatiles from the Marigold Plant (Genus *Tagetes*). Effect of Species and Sample Manipulation. *Chromatographia*, **35**, (3/4): 209-215.
148. Wilson, RA; Zampino, MJ; Mookherjee, BD; Trenkle, RW; Van Ouwerkerk, A; Hagedorn, ML; Monteleone, MG. (1990). U.S. Patent US 4960754 A, 2 Oct 1990. 57 pp. Application US 89-447848.
149. Yamaguchi, K; Marukami, M; Nakano, H; Konosu, S; Kokura, T; Yamamoto, H; Kosaka, M; Hata, K.(1986). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oils from Antarctic Krill. *J. Agric. Food Chem.*, **34**:904-907
150. Yazdi, AV; Lepilleur, C; Singley, EJ; Liu, W; Adamsky, FA; Enick, RM; Beckman.(1996). Highly Carbon Dioxide Soluble Surfactants, Dispersants and Chelating Agents. *Fluid Phase Equilibria*. **117**:297-303
151. Zou, M; Lim, SB; Rizvi, SSH; Zollweg, A. (1989). "Vapor-Liquid Equilibria of Fatty Acid Esters in Supercritical Fluids" in *Supercritical Fluid Science and Technology*. American Chemical Society. Pp: 98-110.
152. Zygadlo, JA; Grosso, NR; Abburra, RE; Guzman, CA.(1990). Essential oil variation in *Tagetes minuta* populations. *Biochem.Syst.Ecol.*,**18**(6):405-407.
153. Zygadlo, JA; Abburra, RE; Maestri, DM; Guzman, CA; Grosso, NR and Espinar, LA. (1992). Essential Oil Composition of *Tagetes terniflora* HBK and *Tagetes laxa* Cabrera. *Flavour and Fragrance Journal*, **8**: 273-275.
154. Zygadlo, JA and Guzman, CA (1994). Antifungal Properties of the Leaf Oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *J. Essent. Oil*, **6**, (Nov/Dec): 617-621.

**ANEXOS**

## **ANEXO I**

### **Esterificación del bagazo generado por extracción hexánica de *Tagetes erecta*.**

Como descrito para la celulosa y el almidón, (Vaca-García, 1997; Aburto-Anell, 1998), ciertas líneas de trabajo en el campo de los polisacáridos buscan la revalorización de estas materias primas por mecanismos distintos al consumo humano o animal directo. Es posible, obtener polímeros con cierto grado de biodegradabilidad por medio de una síntesis a partir de monosacáridos o disacáridos (Dirlikov, 1990). Partiendo del biopolímero se puede aprovechar que su estructura química lo hace susceptible de ser esterificados sea con anhídridos o con ácidos grasos, como en las referencias citadas anteriormente. La optimización de las reacciones de esterificación incluye parámetros como la temperatura y la agitación, el uso de diferentes reactivos y catalizadores. La reacción óptima produce un material hidrófobo (gracias a la inclusión de los ácidos grasos en la red polisacárida), buena resistencia mecánica (por la formación de redes) y capaz de ser tratado térmicamente para la obtención de una película tipo plástica (como las de polietileno, por ejemplo). También es posible obtener materiales que, mezclados con otros plásticos, resulten en productos con excelente desempeño mecánico y a la vez, cierto grado de biodegradabilidad, o bien, es posible fabricar adhesivos a partir de residuos agroindustriales (Heminway *et al.*, 1989).

#### ***Metodología de esterificación del residuo***

Con el fin de investigar el reaprovechamiento del residuo generado por la producción de pigmentos a partir de *Tagetes erecta*, se llevaron a cabo reacciones de esterificación de dicho residuo. Experimentos preliminares habían demostrado que tanto la fracción rica en lípidos como la rica en polisacáridos se esterificaban al someterse a la reacción. Estos experimentos se realizaron en la ENSCT.



## Experimento 1:

Se desgrasó (con hexano) lo más exhaustivamente posible la harina de flor. Posteriormente se hidrodestiló esta muestra. Una porción de 4 g de este residuo (muestra 1) se esterificó con la metodología de base en un reactor de vidrio (Figura L.1).

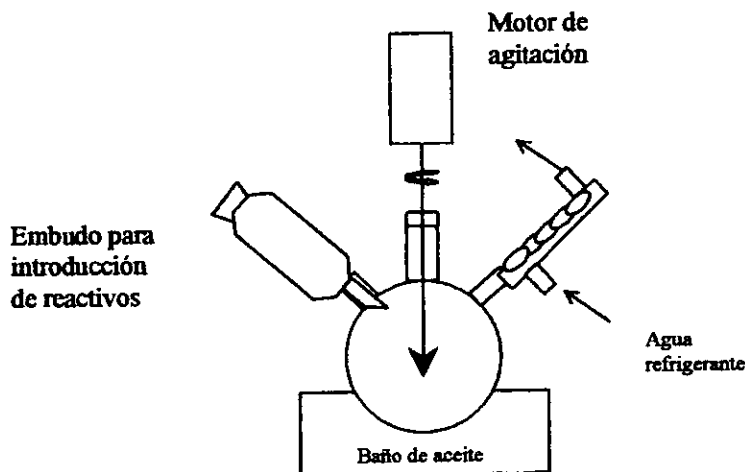


Figura L.1. Reactor para esterificación del residuo de extracción.

La metodología de base que se empleó fue la siguiente:

1. Añadir 50 mL de piridina anhidra.
2. Agitar 10 min a 115°C.
3. Añadir 19 mL de cloruro de octanoilo gota a gota con la ayuda de un embudo de separación conectado al reactor.
4. Agitar a 115°C por 3 hr.
5. Transferir a un vaso de precipitados con 700 mL de etanol.
6. Inducir la precipitación raspando las paredes del vaso.
7. Centrifugar 10 min a 3000 rpm (-5°C). Descartar el sobrenadante.
8. Lavar el precipitado con 200 mL de etanol y volver a centrifugar. Descartar el sobrenadante.
9. Seguir lavando con el mismo volumen de etanol hasta que desaparezca el olor a piridina. Descartar el sobrenadante

10. Lavar el precipitado con 100 mL de éter y recuperar el sobrenadante.
11. Secar el precipitado en estufa a 50°C, 12 h.
12. Evaporar el éter del sobrenadante recuperado por extracción en un rotavapor.
13. Calcular los rendimientos por diferencia de pesos.
14. Someter el precipitado y la oleoresina recuperada con éter a análisis de espectroscopía de infrarrojo.

El precipitado que resultó de esta reacción se prensó a 180°C para obtener un película de tipo termoplástico.

#### Experimento 2:

15 g de la muestra 1 se extrajeron con isopropanol (600 mL) por 2 hr para eliminar aún más material soluble y se obtuvo así la muestra 2. Se tomaron 4 g de esta muestra y se siguió el siguiente protocolo:

1. Añadir 6 mL de ácido fórmico para preparar los grupos reactivos.
2. Agregar gota a gota 29 mL de cloruro de octanoilo.
3. Agitar a 115°C por dos horas.  
El ácido fórmico residual se recupera en un tubo conectado al condensador durante la reacción. Se agregan para este fin 30 mL de etanol que también se recuperan con la ayuda del condensador.
4. Verter la mezcla de reacción en vaso de precipitados con 700 mL de etanol, enfriar a 4°C (12 h) y recuperar el precipitado.
5. Lavar el precipitado con etanol, descartar el etanol y secar el precipitado a 50°C, 12 hr.
6. Calcular rendimiento por diferencia de pesos.
7. Someter el precipitado a análisis de espectroscopía de infrarrojo.
8. Recuperar el sobrenadante del primer lavado con etanol (paso 4) y evaporar el solvente en rotavapor.
9. Extraer sobrenadante con agua en un embudo de separación. Separar cloruro de octanoilo residual (fase superior). Descartar fase superior.

10. Extraer fase acuosa con eter y recuperar esta última fase acuosa para determinación de azúcares totales.

### Experimento 3:

15 g de la muestra 1 se colocaron en un matraz bola con 500 mL de NaOH al 3%. Se calentó a 50°C por 2 hr. Esto se llevó a cabo para eliminar las bandas éster del material original (harina de flor). El pretratamiento con sosa también prepara los grupos reactivos para la reacción. Se filtró al vacío, se secó y se sometió a reacción como en el experimento 2. En este caso se burbujeó nitrógeno a la mezcla de reacción par evitar la hidrólisis de carbohidratos por HCl formado en la reacción. El N<sub>2</sub> permite arrastrar gran parte de éste hacia una trampa con una solución de NaOH. No se utilizó etanol para desplazar el ácido fórmico.

### *Resultados de la Esterificación del residuo rico en polisacáridos*

Los resultados presentados (tablas 7 y 8) sugieren que el residuo generado en el laboratorio por la producción de oleoresina esta más bien libre de la mayoría de las sustancias grasas que se encuentran en la materia prima original. Lo mismo se aplica para el residuo industrial, el cual demostró tener igual rendimiento en oleoresina y aceite esencial que el residuo generado en el laboratorio. Aunque así fuera, esto no impide que las que quedan en el residuo sean susceptibles de ser modificadas químicamente en una reacción posterior. Estas grasas podrían ser inclusive más reactivas que los mismos polisacáridos en el caso del uso de solventes apolares y/o sustancias grasas, debido a que tienen mayor solubilidad que los propios carbohidratos. Christie (1982) ya menciona que los lípidos pueden acetilarse a temperatura ambiente con piridina y cloruro de acetilo.

Los experimentos industrial indican que tanto la fracción polisacárida como la fracción lipídica son ambas susceptibles de ser esterificadas por los métodos empleados. Los experimentos realizados, son difícilmente comparables pues la materia prima y las condiciones de reacción fueron diferentes.

En la **Tabla L.1** se observa que en los experimentos de esterificación del residuo con piridina, el lavado al éter posterior a la esterificación extrajo material esterificado (banda IR 1746) que bien podría ser material lipídico esterificado. En esta solución también podrían encontrarse carbohidratos esterificados de bajo peso molecular, dado que el octanoilo que les ha sido unido, les confiere un carácter más apolar que el que tenían originalmente (Aburto-Anell, 1998). Se piensa que en la fase etanólica (el precipitado formado se lava con etanol) quedan los carbohidratos que son hidrolizados hasta azúcares durante la reacción. No se pudo medir espectrofotométricamente su cantidad por tener el medio productos muy oscuros probablemente resultantes de reacciones de caramelización. Estas reacciones son posibles por las temperaturas de reacción utilizadas (115°C) y por la presencia de HCl como subproducto de reacción, el cual puede efectuar una hidrólisis de los carbohidratos. Los carbohidratos esterificados que pasan a la fase etérea pudieran tener propiedades tensoactivas interesantes que habría que estudiar a detalle

En cuanto al sólido recuperado con etanol, es posible observar en los espectros que las bandas que corresponden a los grupos OH (provenientes de los polisacáridos) han disminuido después de llevar a cabo la reacción, mientras que las bandas correspondientes a CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub> son mayores en el material esterificado. Los grupos ester son mayores en la muestra esterificada que en la muestra original (**Fig. L.2**).

**Tabla L1 Esterificación de polisacáridos del residuo de extracción de *T. erecta*.**

Muestra Seca	Variaciones a condiciones de reacción *	ml etanol para formar precipitado	ml etanol para lavar precipitado	Lavados suplementarios	% ganancia en peso precipitado. Bandas ester precipitado	Observaciones
1	3 hr, piridina, cloruro de octanoilo	700	1000	Precipitado con 100 ml éter	70 % 1746 cm <sup>-1</sup>	Film obtenido del precipitado (fig. 14). Sustancia resinosa recuperada con lavados al éter
2	2 hr, ácido fórmico, cloruro de octanoilo	700	400	El sobrenadante con 40 ml agua y esta fase acuosa con 300 ml éter para determinar azúcares solubles**	-51% 1747 cm <sup>-1</sup>	Para mejorar precipitación, se enfrió a 4°C 12 hr.
3	2 hr, ácido fórmico, cloruro de octanoilo, nitrógeno gas	200	300	El sobrenadante con 40 ml agua y esta fase acuosa con 300 ml éter para determinar azúcares solubles**	-10.5 % 1746 cm <sup>-1</sup>	Se verificó ausencia de sosa en precipitado.

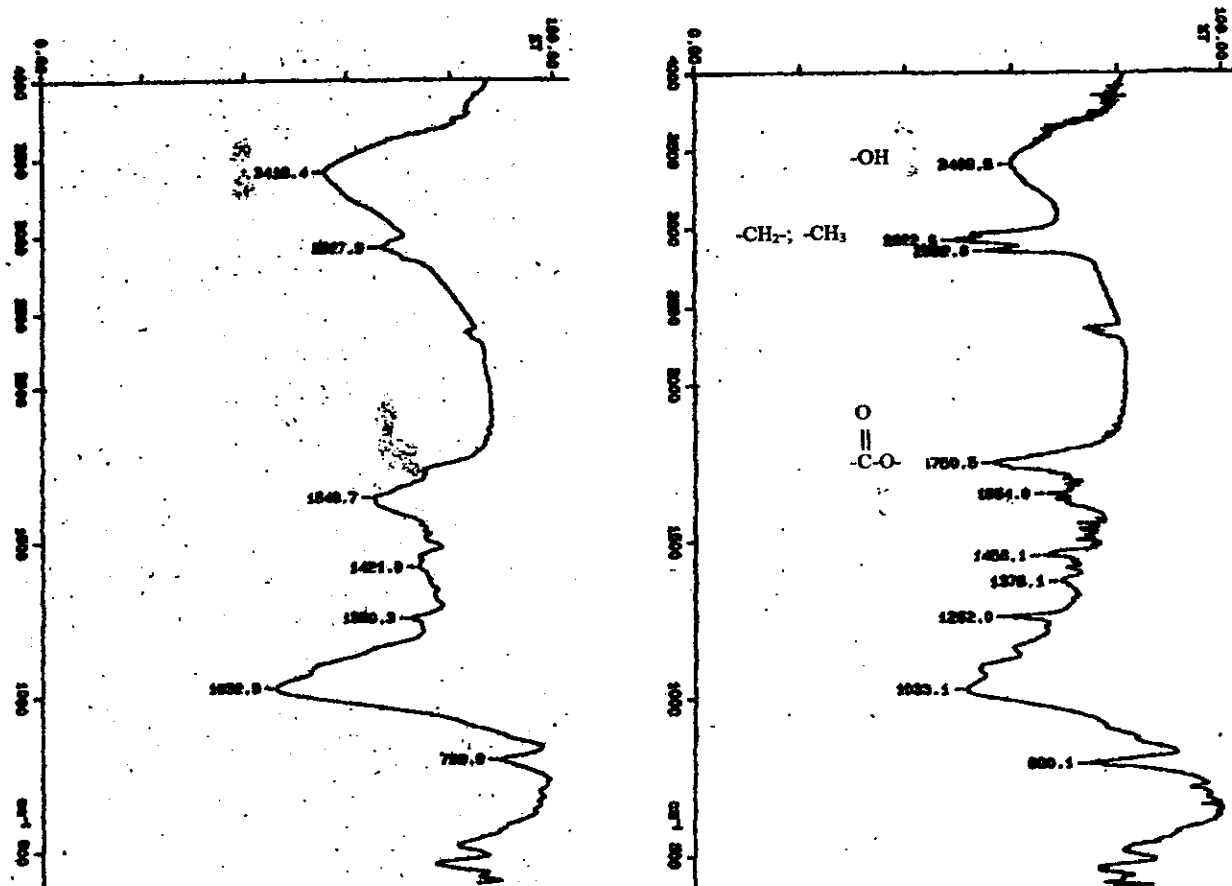
1. Harina de flor extraída con hexano y sometida a hidrodestilación (bandas éster 1734 y 1744 cm<sup>-1</sup>).

2. Muestra 1 extraída con isopropanol por 2 hr. (bandas éster 1733 cm<sup>-1</sup>).

3. Muestra 1 extraída con NaOH al 3% por 2 hr. (no presentó bandas éster).

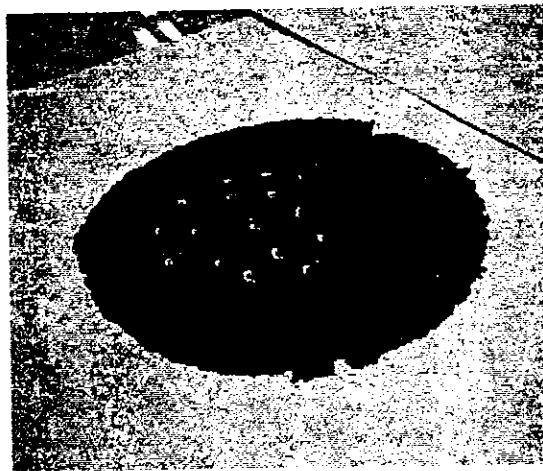
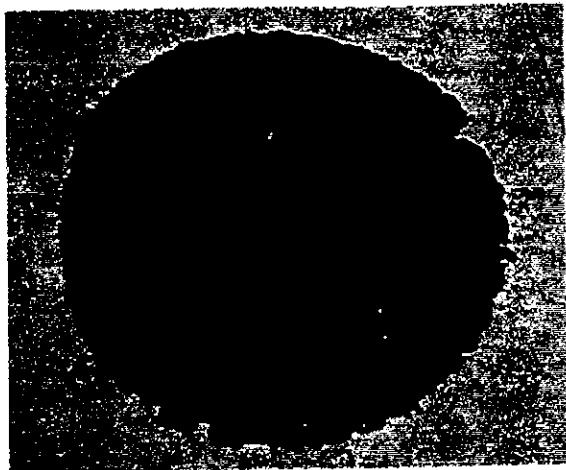
\*Condiciones de reacción: 4 g de muestra, 115°C, separación del precipitado por centrifugación a 3000 rpm, -5°C, 10 min.

\*\* La fase acuosa aún lavada con éter presentaba color café oscuro, lo que impidió determinar azúcar solubles por espectrofotometría.



**Fig. L2. A. Espectro infrarrojo de residuo industrial de flor;  
B. Espectro infrarrojo de polisacáridos de flor esterificados**

El experimento con piridina sirve como base para los experimentos posteriores, ya que es de lo mejor que se conoce para este tipo de reacciones. Sin embargo, es deseable encontrar otro sistema de reacción sin piridina que pueda rendir iguales o mejores resultados. Los otros sistemas probados no resultaron en un incremento de peso de la materia prima, lo cual se explica por la hidrólisis efectuada por el HCl que resulta de la reacción del cloruro de octanoilo y los grupos OH provenientes de la muestra original o la muestra hidrolizada. Con la muestra obtenida de la reacción con piridina, se hizo un película "plástica" fundiendo y prensando la muestra a 200 ° C (Fig. L3). Como se muestra, la película es hidrófoba, pero tiene tendencia a quebrarse.



**Fig. 1.3. Película hidrófoba obtenida con polisacáridos de *T. erecta*.**

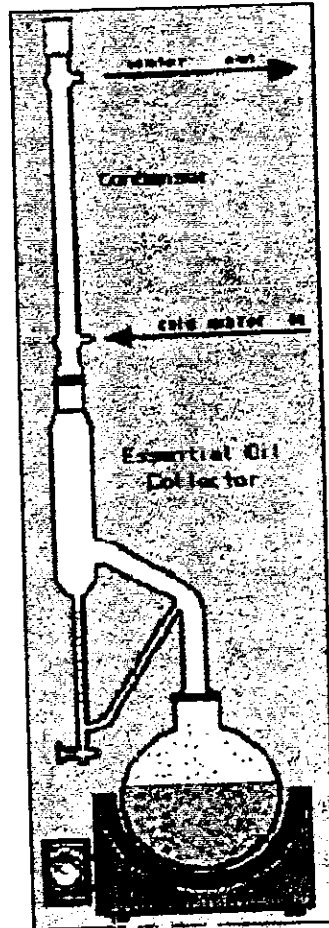
La muestra 1 se extrajo 2 hr con isopropanol y se obtuvo una oleoresina verde-amarillenta con un rendimiento del 5.6%. Con el tratamiento que se le hizo a la muestra 1 con NaOH al 3% (50°C, 2 hr) se perdieron las bandas éster que se presentaba la muestra original (bandas IR 1734 y 1744) y que permanecieron en la muestra tratada con isopropanol. Esto indica que la muestra original ya presentaba grupos éster, provenientes posiblemente de lípidos residuales.

En las tres reacciones se obtuvo esterificación, pero no se conoce qué se esterificó ni tampoco la cantidad de ésteres formados. No se sabe con claridad que tipo de polisacáridos están disponibles para esterificación, puesto que la muestra ya había pasado por un ensilado, el cual no permite referirnos a la composición original de polisacáridos de la flor, reportada por Bemiller *et al.*, (1989).

Para caracterizar mejor los productos de reacción habría que medir el grado de esterificación por medio de una saponificación y emplear algún otro método de separación para distinguir lípidos de carbohidratos, sin descartar una caracterización de los polisacáridos que ocurren en muestras industriales de *T. erecta*.

ANEXO II

**APARATO DE HIDRODESTILACIÓN CLEVINGER**



**Clevenger  
Hydro-Distillation  
Apparatus**



### ANEXO III

#### Cromatograma del aceite esencial I obtenido de harina de Flor

Gas Chromatograph:

Hewlett Packard 5890 A equipped with split Inyector and a flame ionization detector; Hewlett Packard integrator 3396A

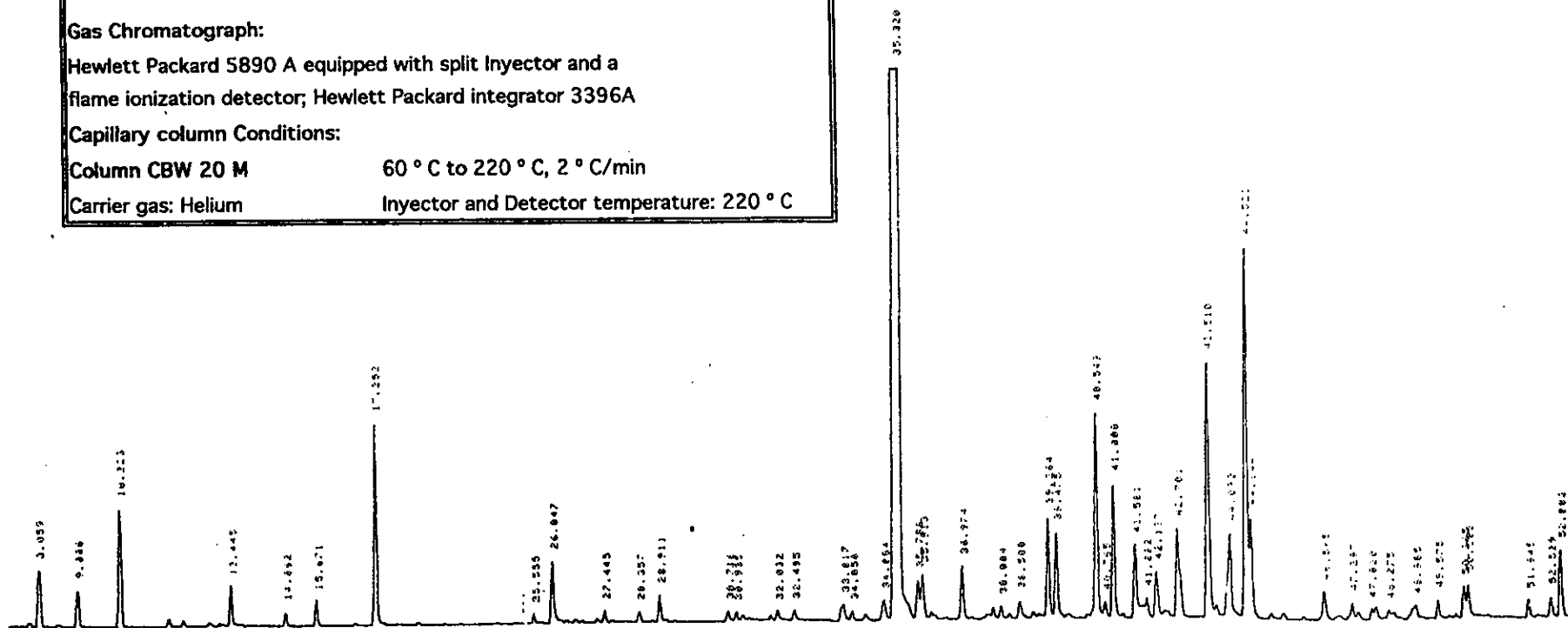
Capillary column Conditions:

Column CBW 20 M

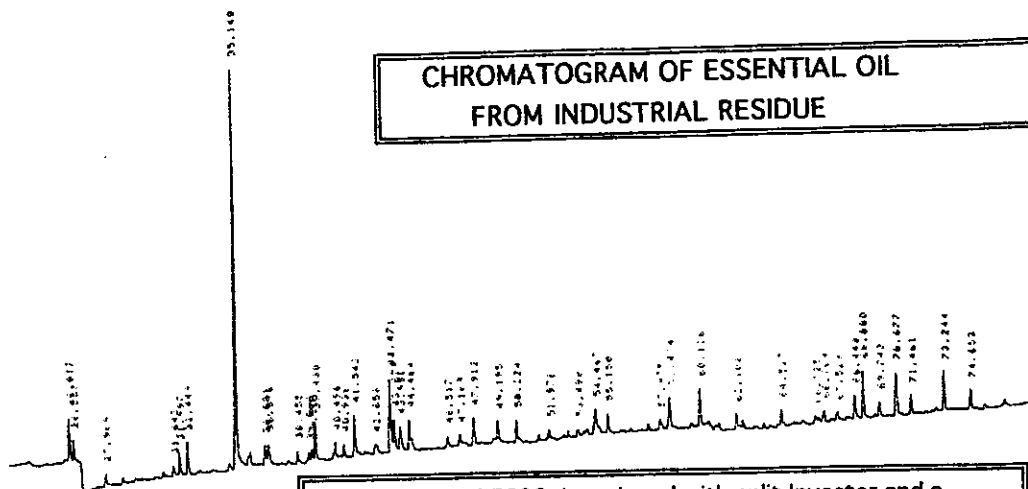
60 ° C to 220 ° C, 2 ° C/min

Carrier gas: Helium

Inyector and Detector temperature: 220 ° C



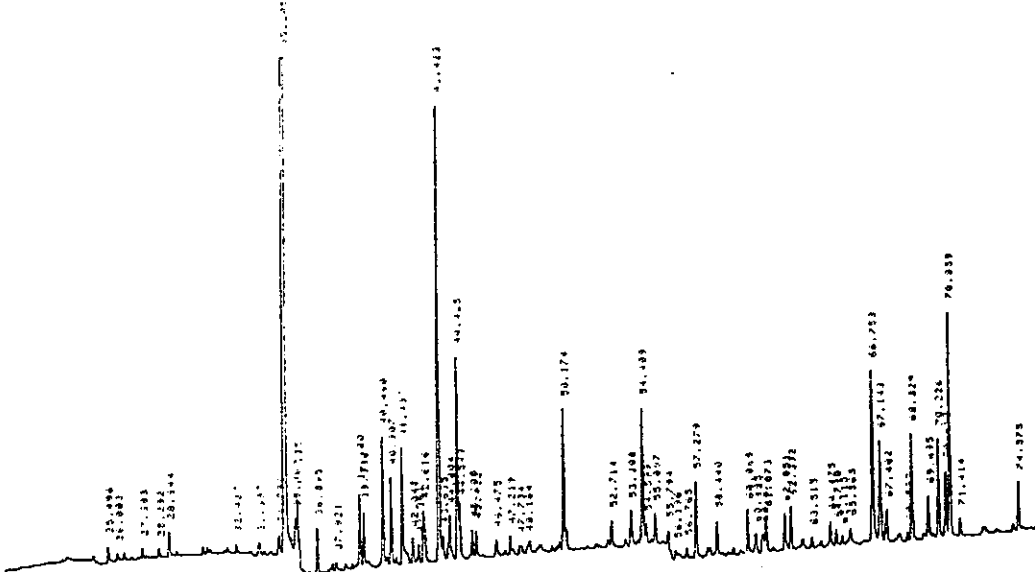
**Cromatograma del aceite esencial obtenido de residuo industrial y de oleoresina**



**CHROMATOGRAM OF ESSENTIAL OIL FROM INDUSTRIAL RESIDUE**

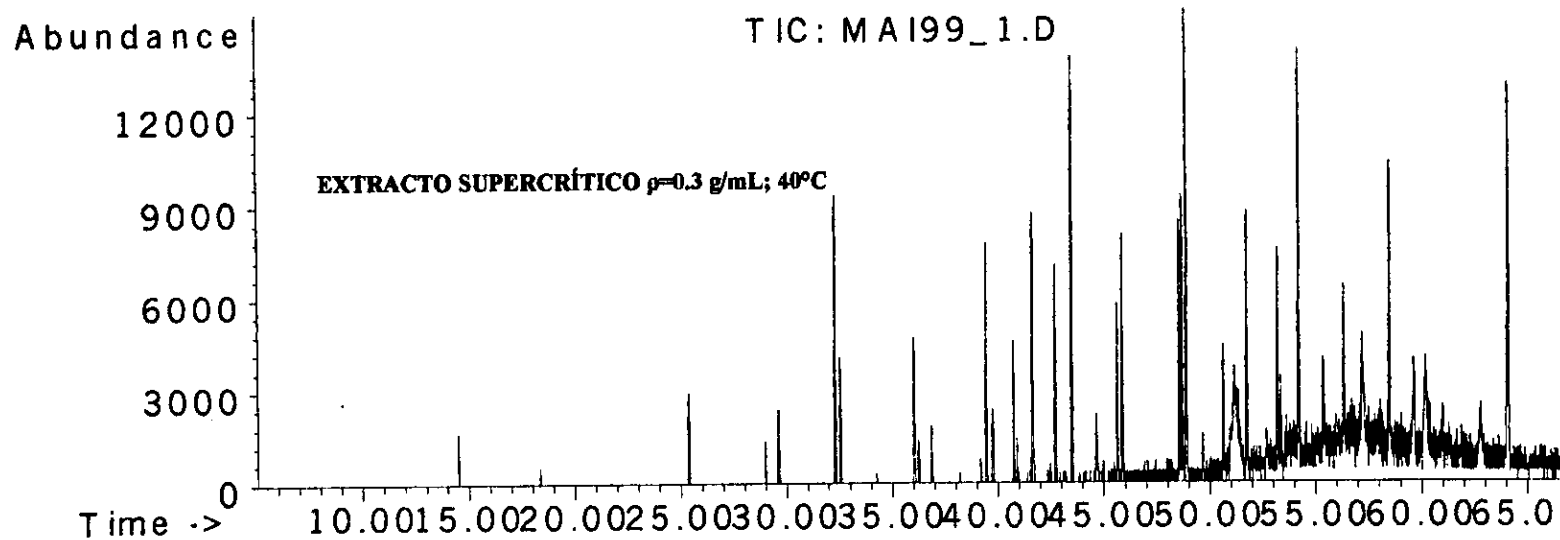
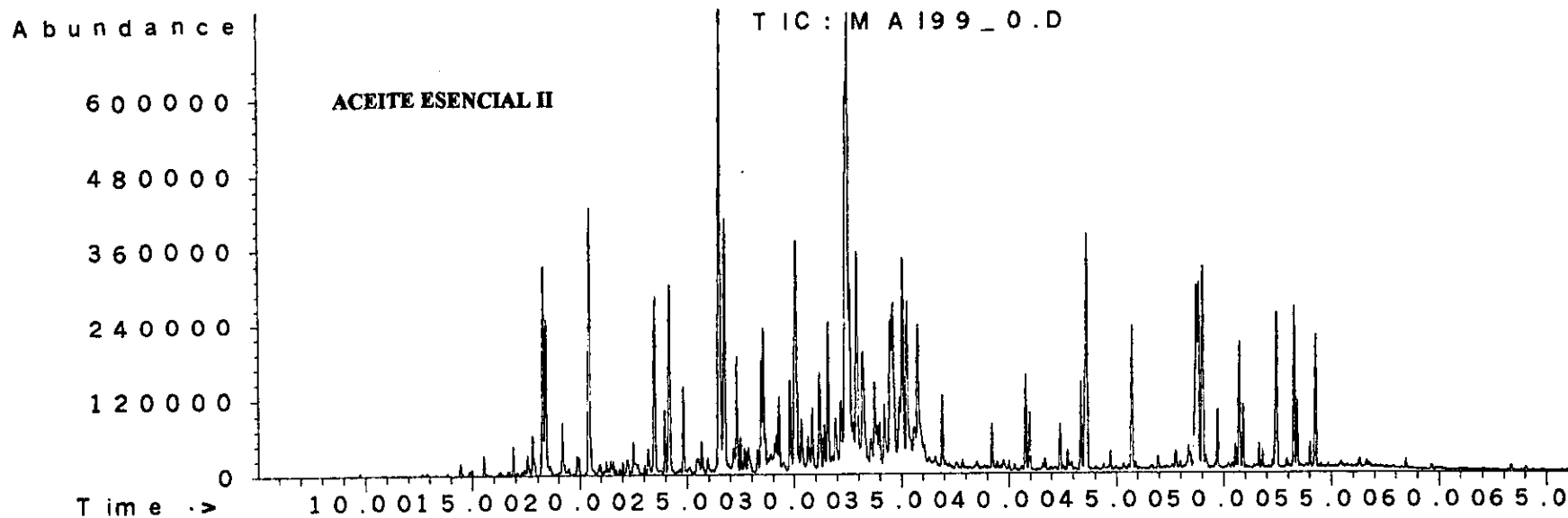
Hewlett Packard 5890 A equipped with split injector and a flame ionization detector; Hewlett Packard integrator 3396A  
 Carrier gas: Helium, injector and detector temp =220°C  
 Capillary column Conditions:  
 Column CBW 20 M 60 ° C to 220 ° C, 2 ° C/min

**CHROMATOGRAM OF ESSENTIAL OIL FROM OLEORESIN (OBTAINED BY HEXANE EXTRACTION)**

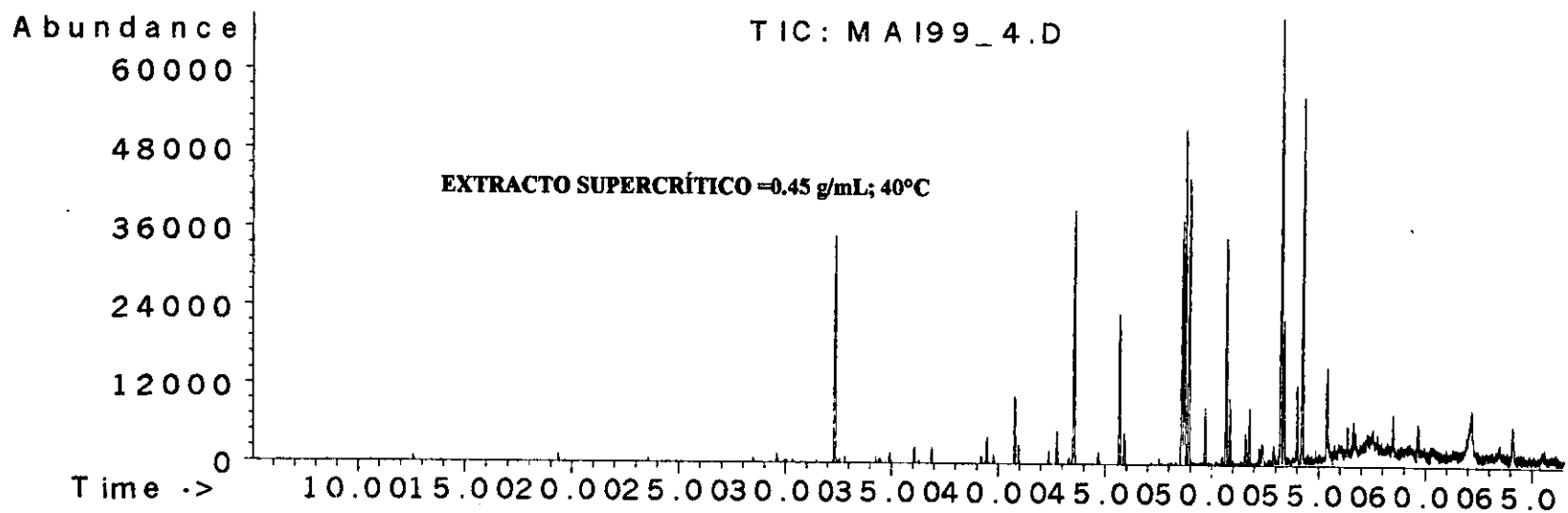
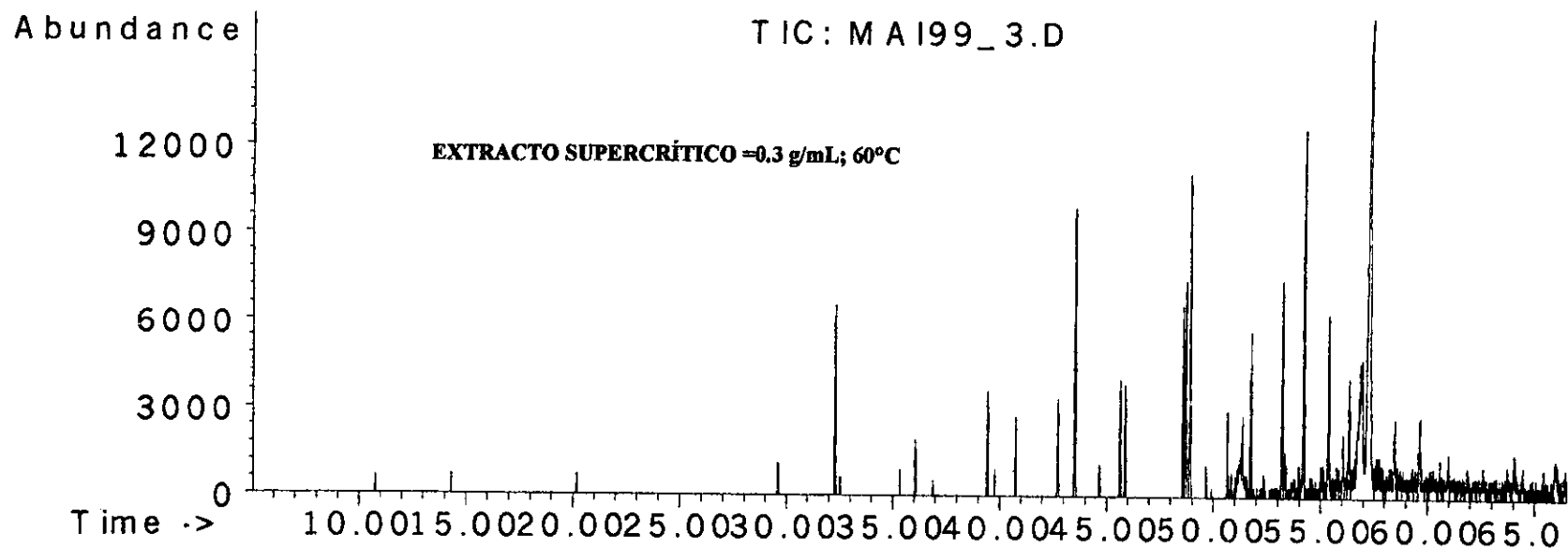


## **ANEXO V**

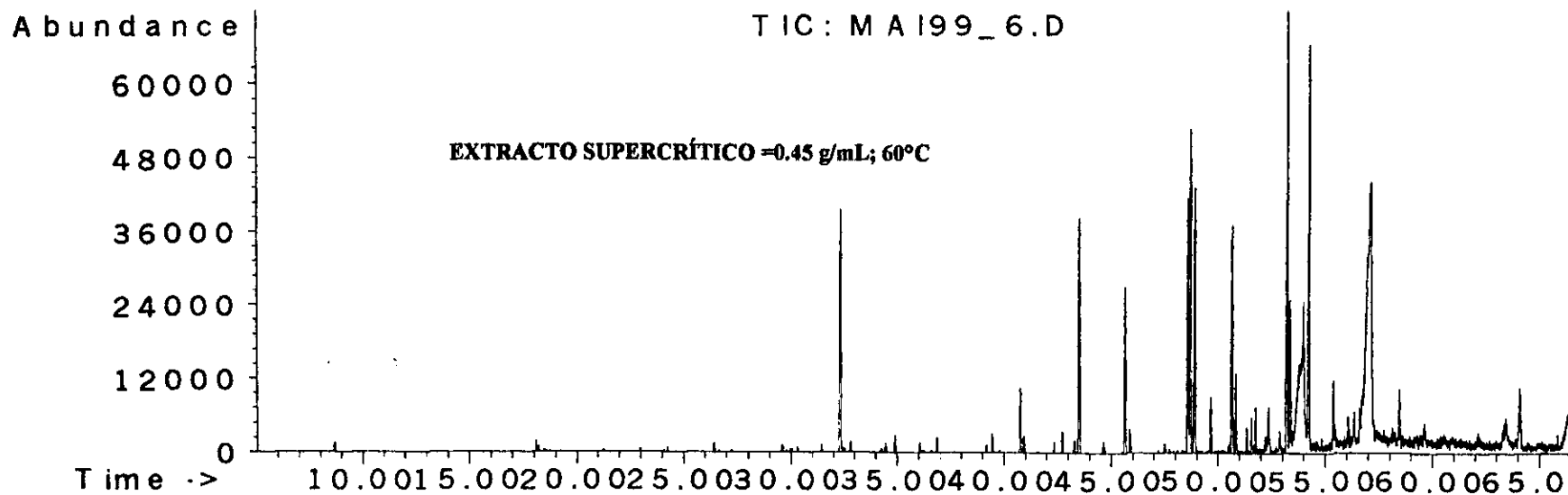
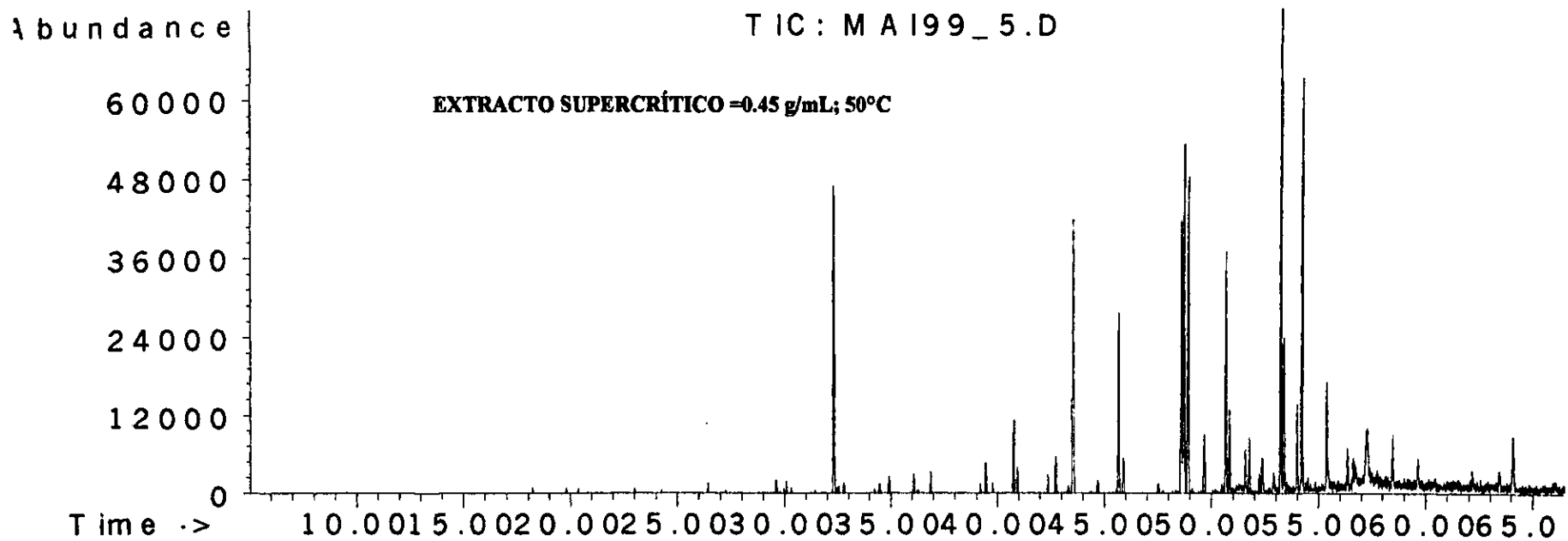
**Cromatogramas del aceite esencial II obtenido de harina de flor y de los extractos  
supercríticos no coloridos**



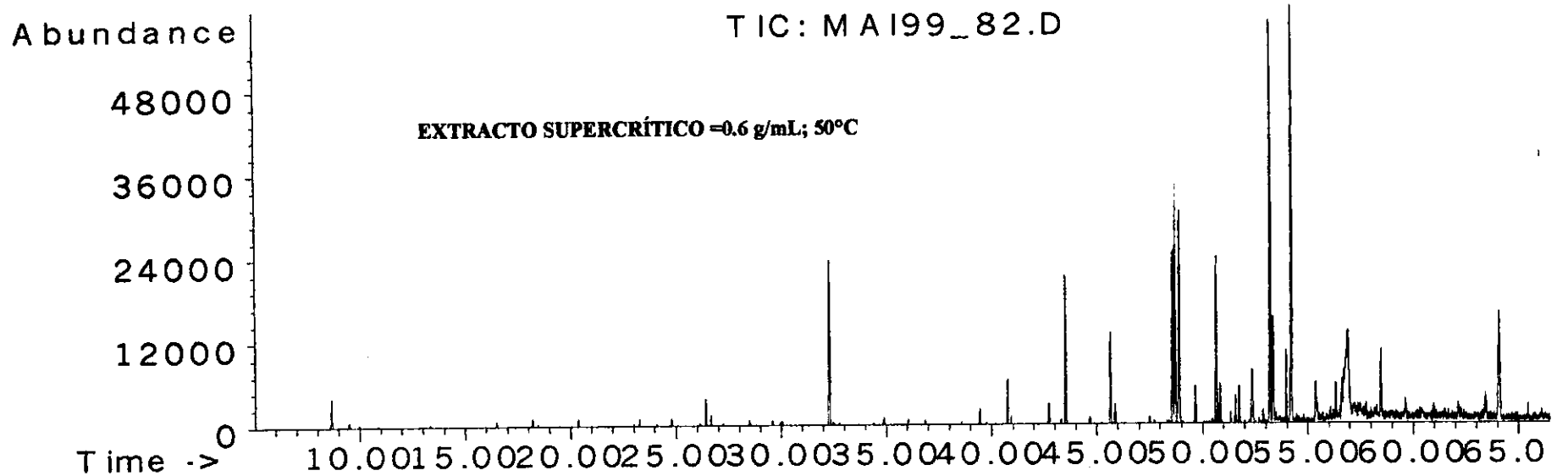
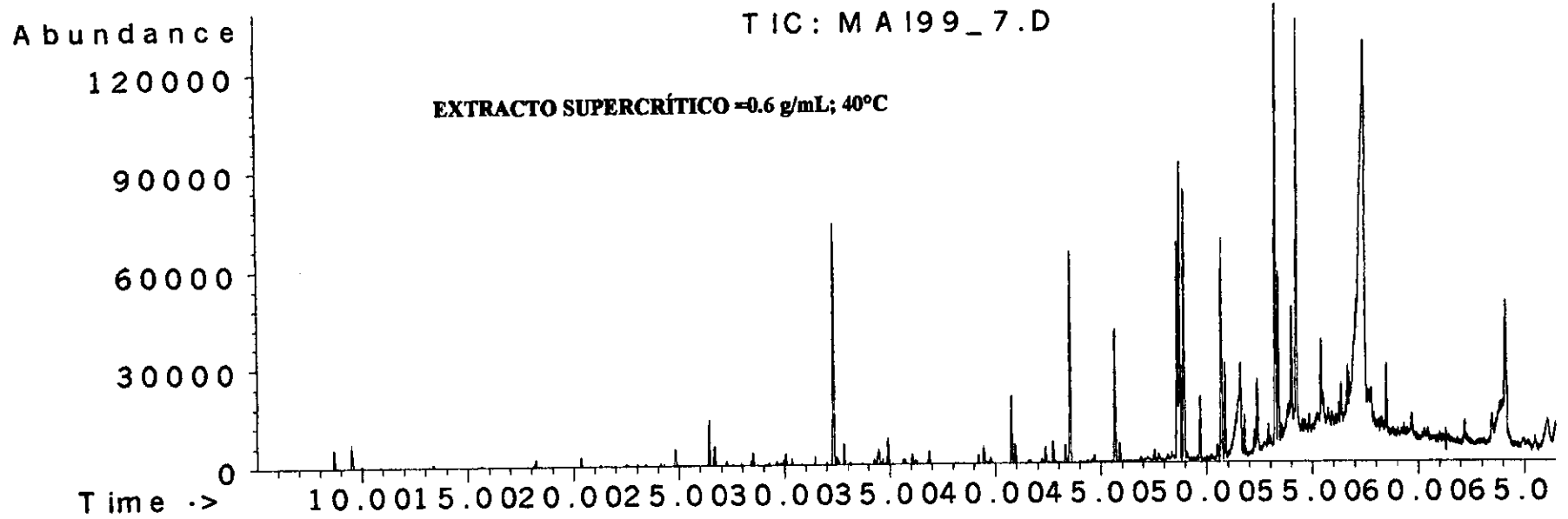
ANEXOS: CROMATOGRAMAS DE ACEITE ESENCIAL II Y EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS



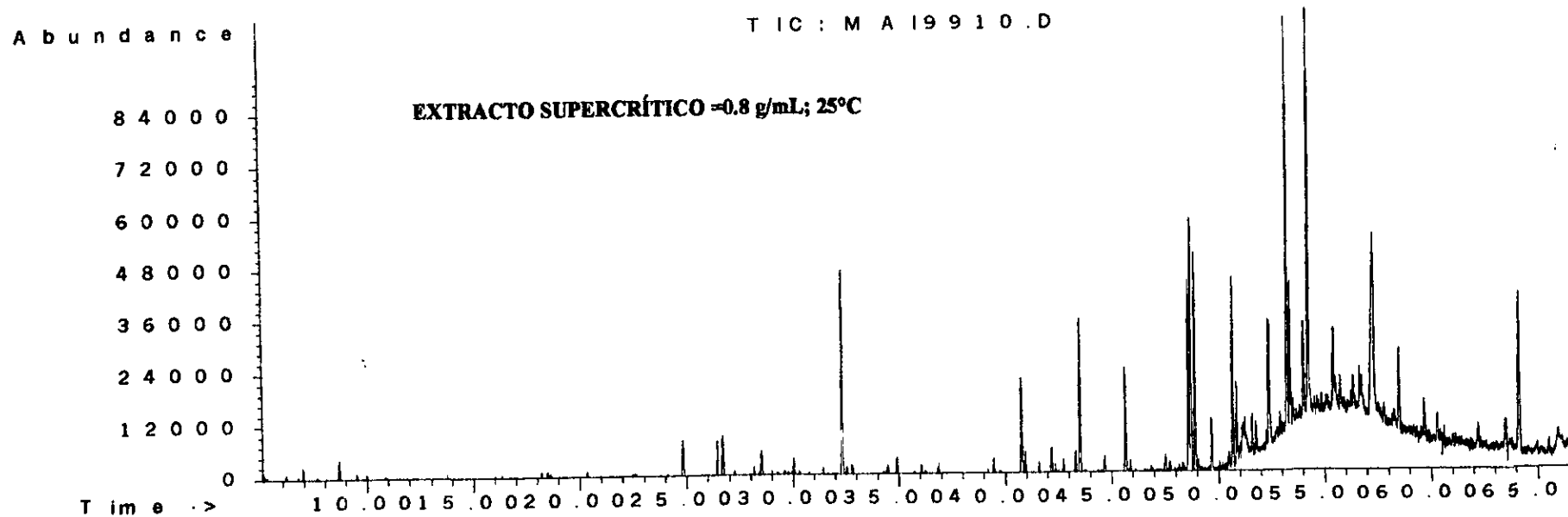
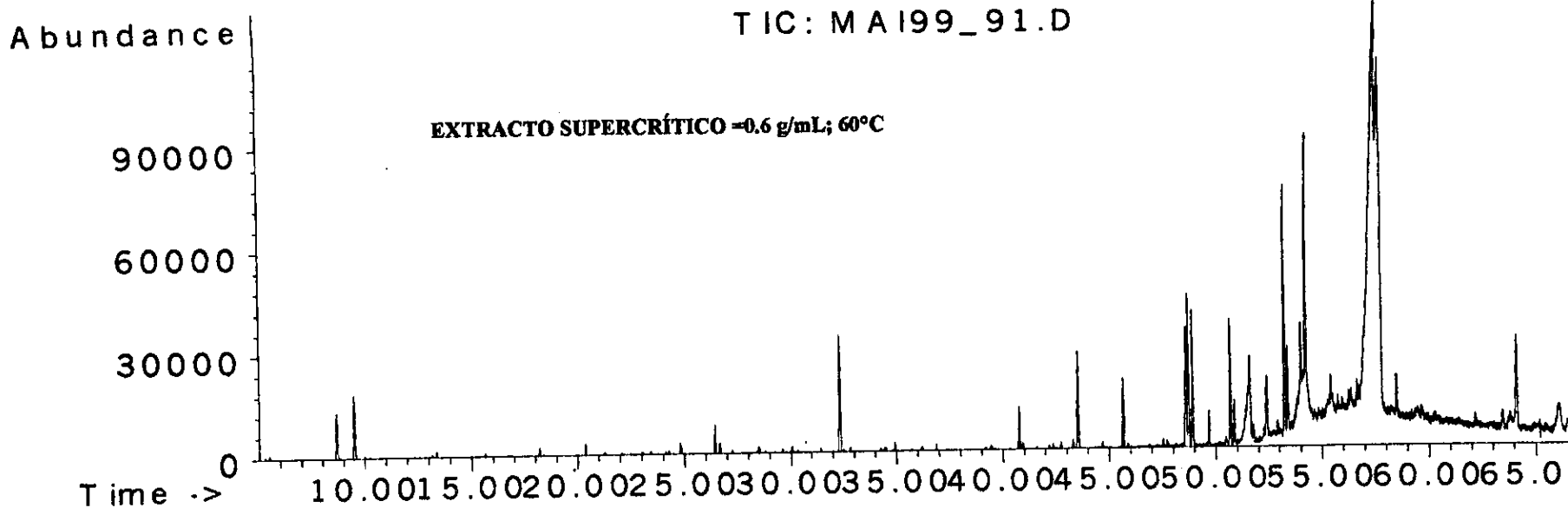
ANEXOS: CROMATOGRAMAS DE ACEITE ESENCIAL II Y EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS



ANEXOS: CROMATOGRAMAS DE ACEITE ESENCIAL II Y EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS

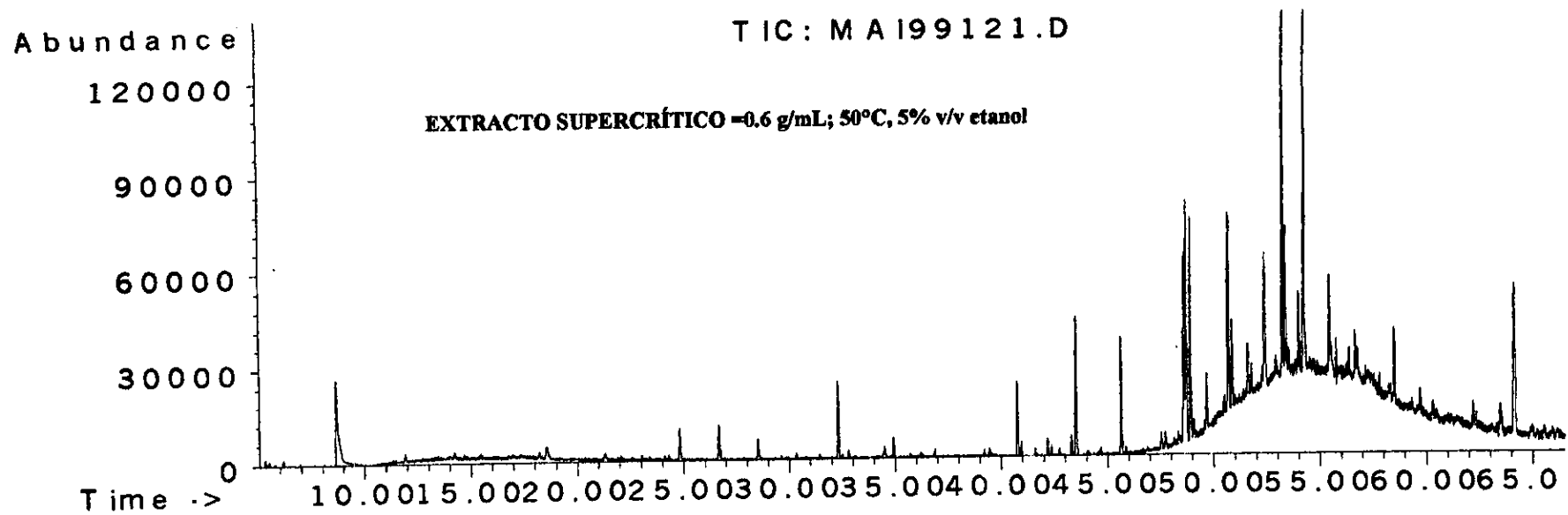


ANEXOS: CROMATOGRAMAS DE ACEITE ESENCIAL II Y EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS



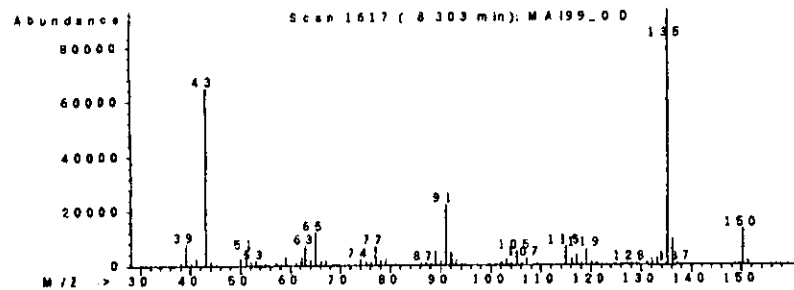
ANEXOS: CROMATOGRAMAS DE ACEITE ESENCIAL II Y EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS



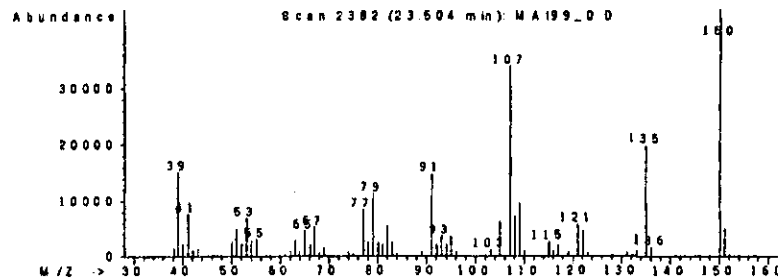


## **ANEXO VI**

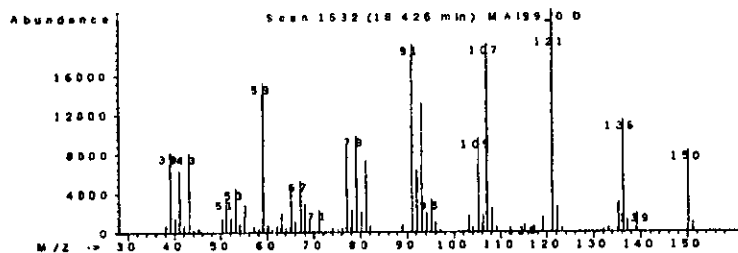
**Espectros de masas de algunos compuestos presentes en el aceite esencial II obtenido de  
harina de flor**



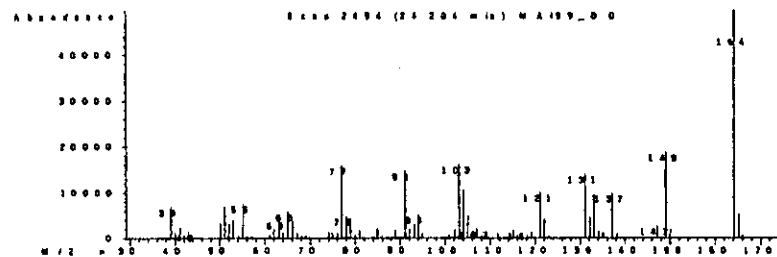
*p*-cimen-8-ol



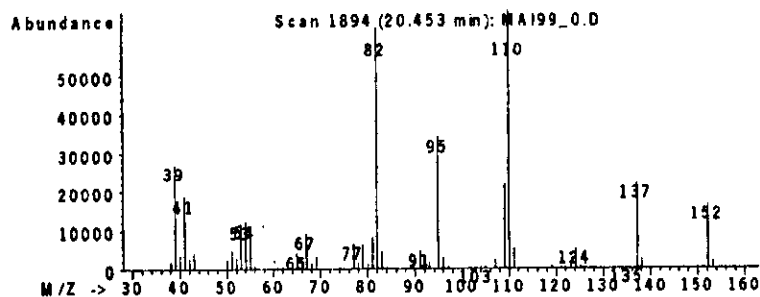
piperitenona



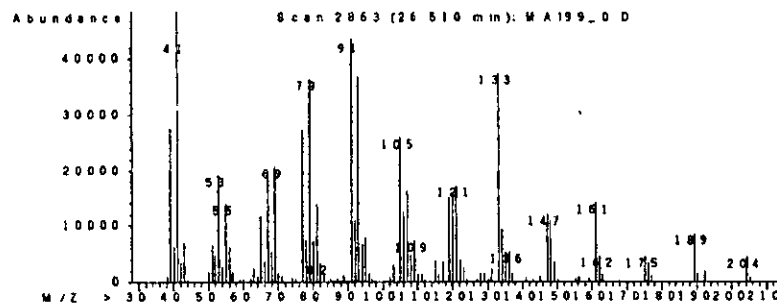
$\alpha$ -terpinoleno



eugenol

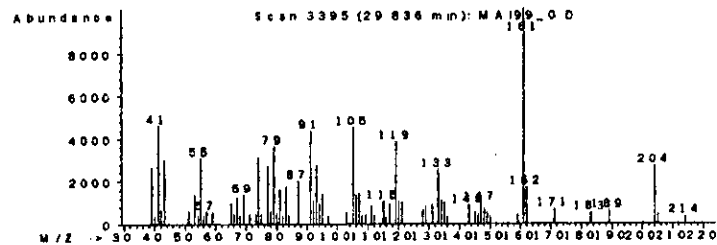
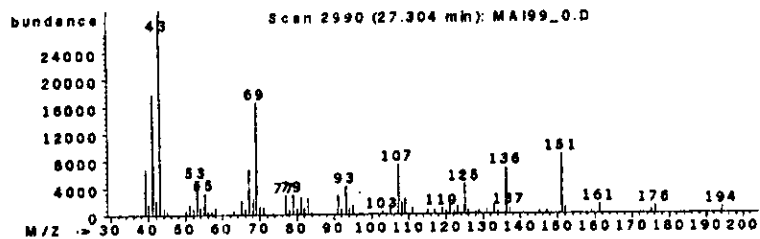


piperitona



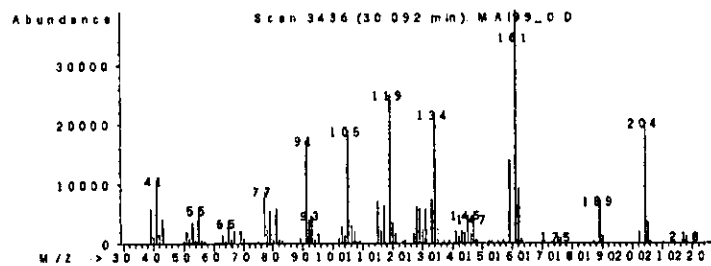
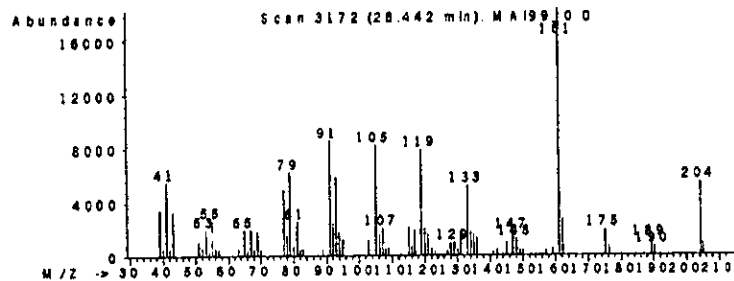
$\beta$ -cariofileno

ANEXOS: ESPECTROS DE MASAS DE ALGUNOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL



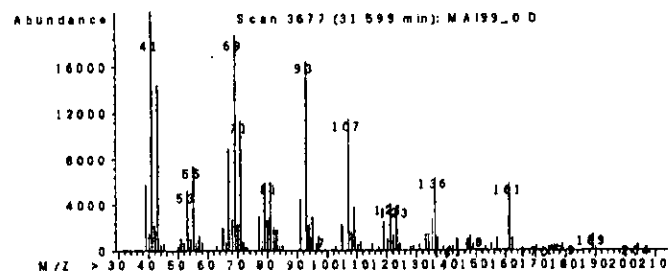
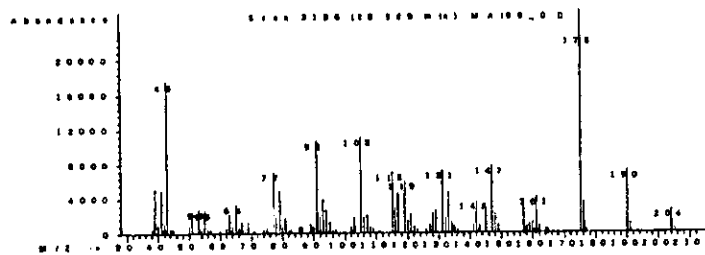
**geraniol**

**$\alpha$ -amorpheno**



**$\gamma$ -cadineno**

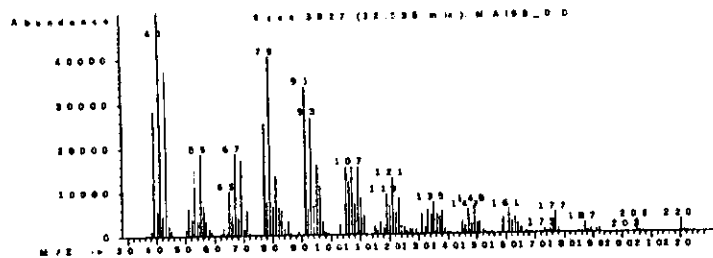
**$\delta$ -cadineno**



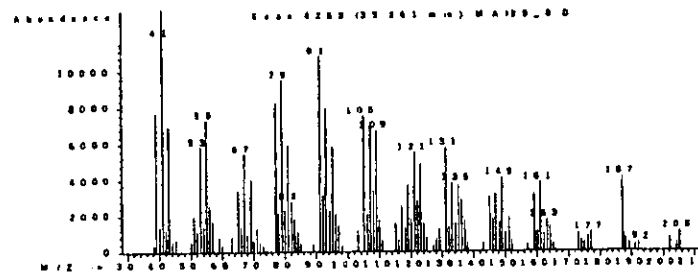
**1-etil-3,5-diisopropil benzeno**

**farnesol**

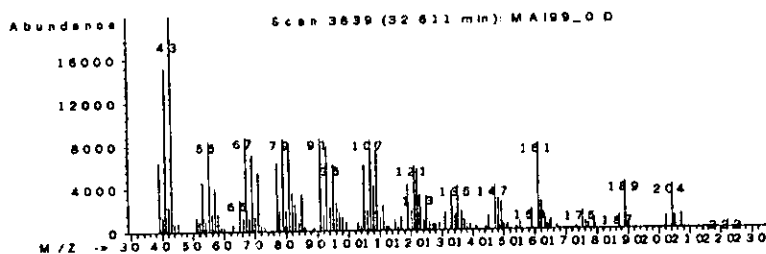
**ANEXOS: ESPECTROS DE MASAS DE ALGUNOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL**



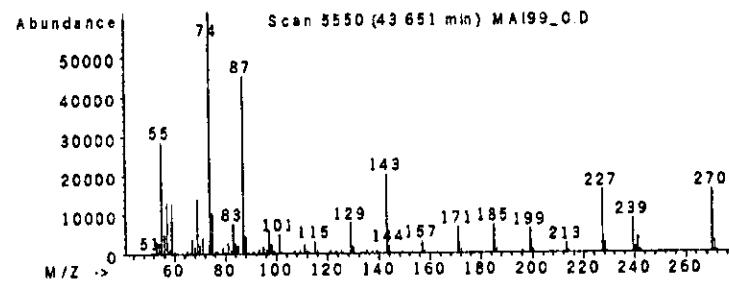
oxido de cariofileno



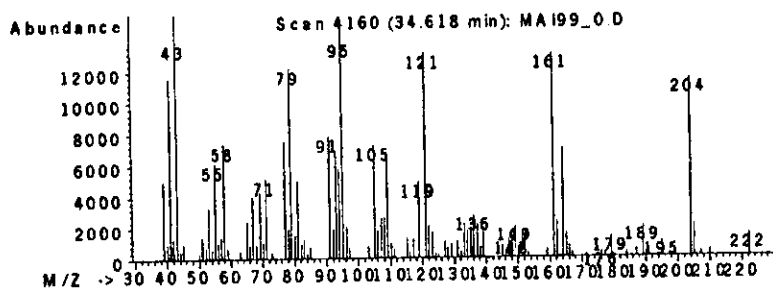
$\beta$ -elemeno



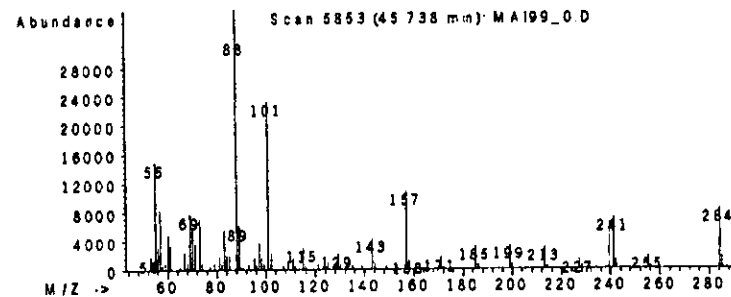
$(-)$  globulol



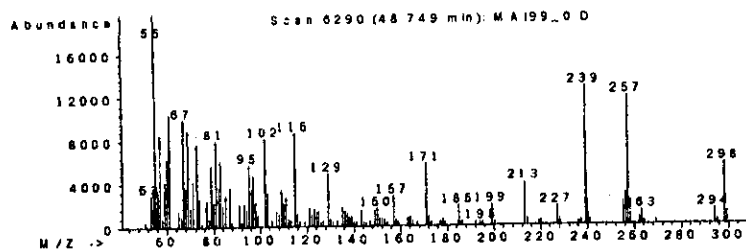
éster metílico de ácido palmítico



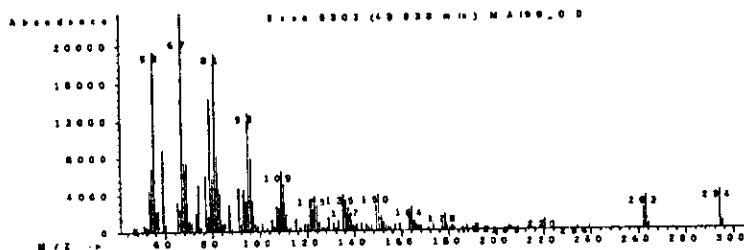
$\alpha$ -copaeno



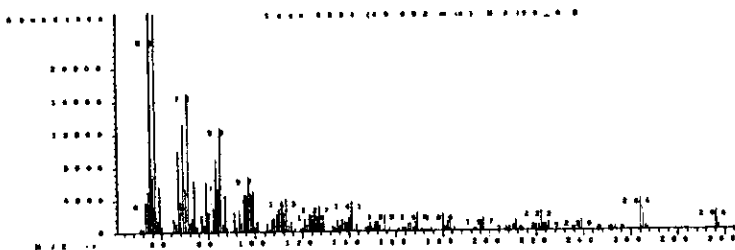
éster etílico de ácido palmítico



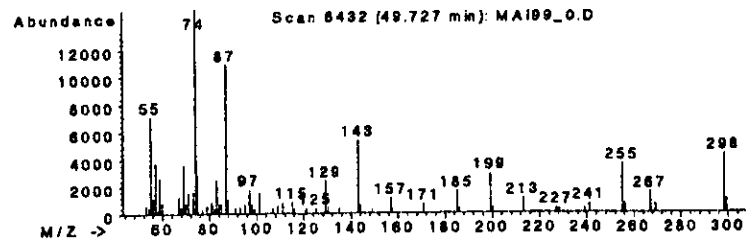
éster propílico de ácido palmítico



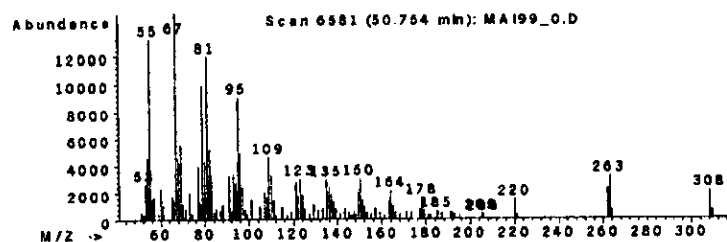
éster metílico de ácido linoléico



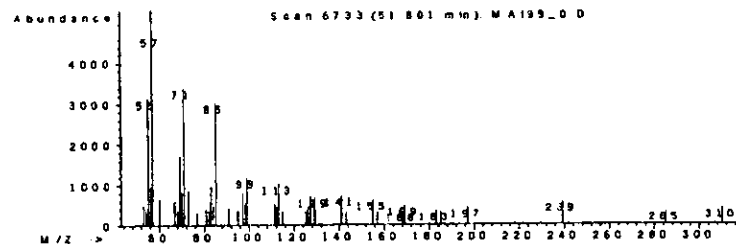
heneicosano



éster metílico de ácido esteárico

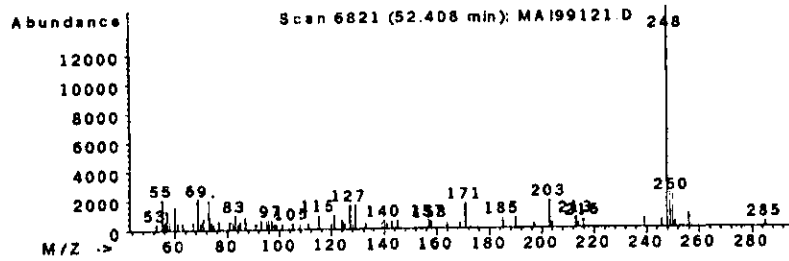


éster etílico de ácido linoléico

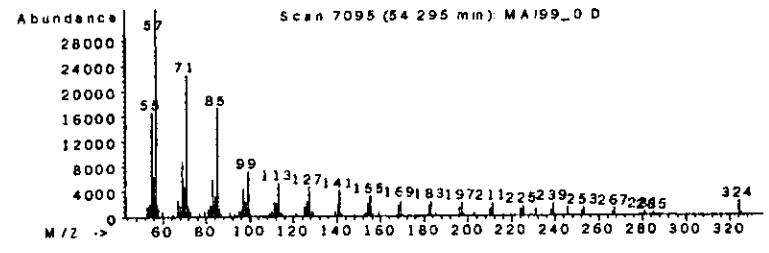


docosano

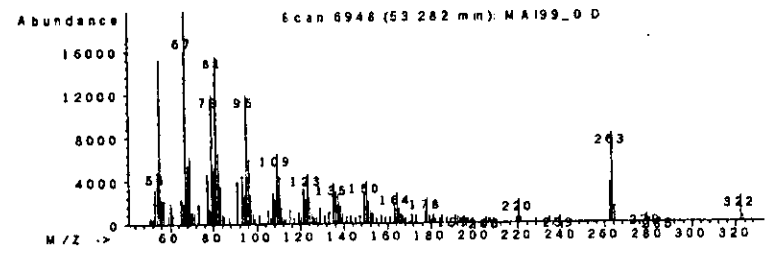
**ANEXOS: ESPECTROS DE MASAS DE ALGUNOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL**



**2,2':5',2''-tertiofeno (α-terienil o α-T)**



**Tricosano**

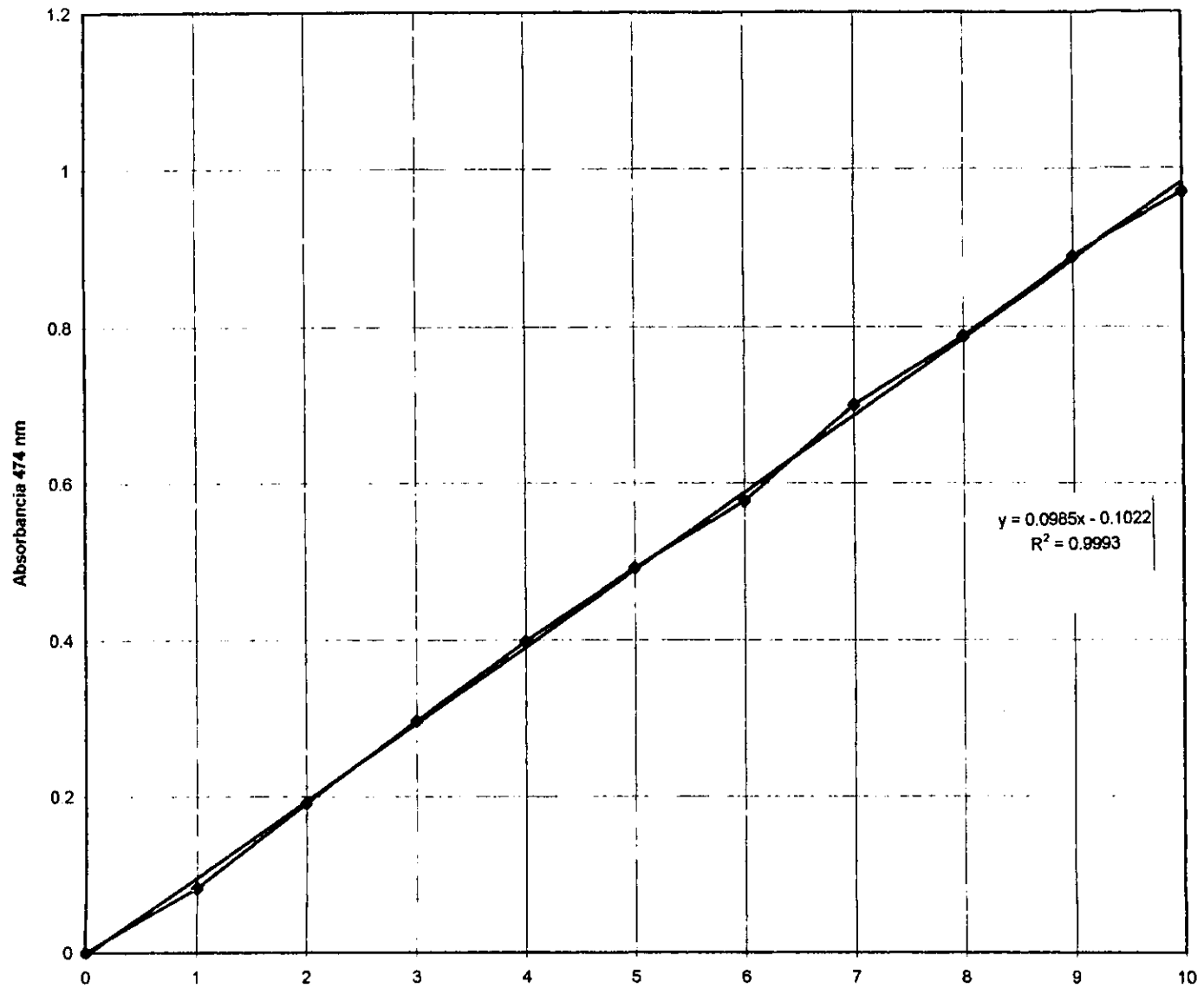


**éster metílico de ácido 6,11-eicosadienoico**

**ANEXOS: ESPECTROS DE MASAS DE ALGUNOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL**

## ANEXO VII

Curva de calibración para la determinación de diésteres de xantofilas





## ANEXO VIII

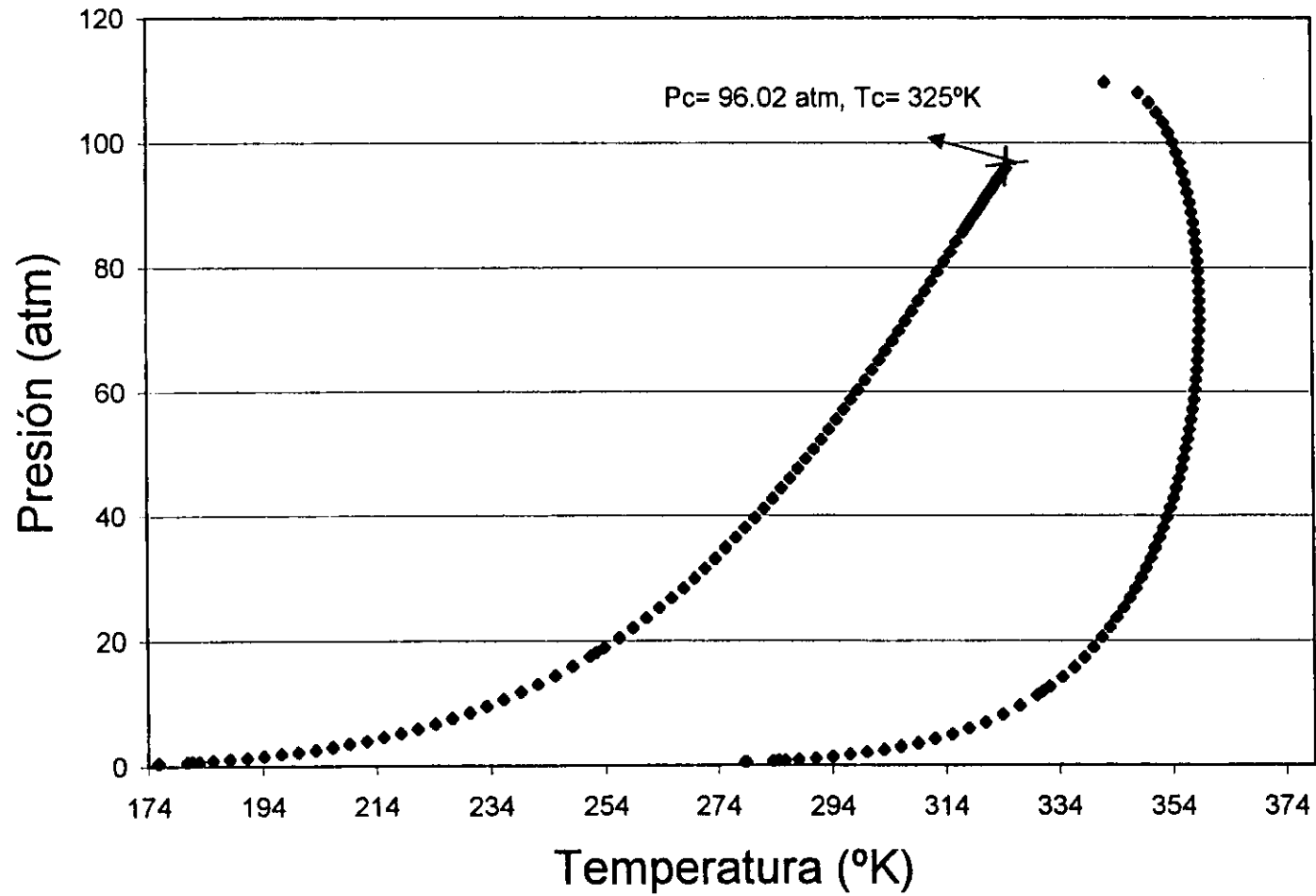
### **Requisitos del programa Eqfases2**

Memoria RAM:	320 K de memoria base (mínimo)
Video:	Monitor VGA (de preferencia a color)
Instalación:	140 K programa (Eqfases2.exe)
	110 K banco de datos (databank.dat)

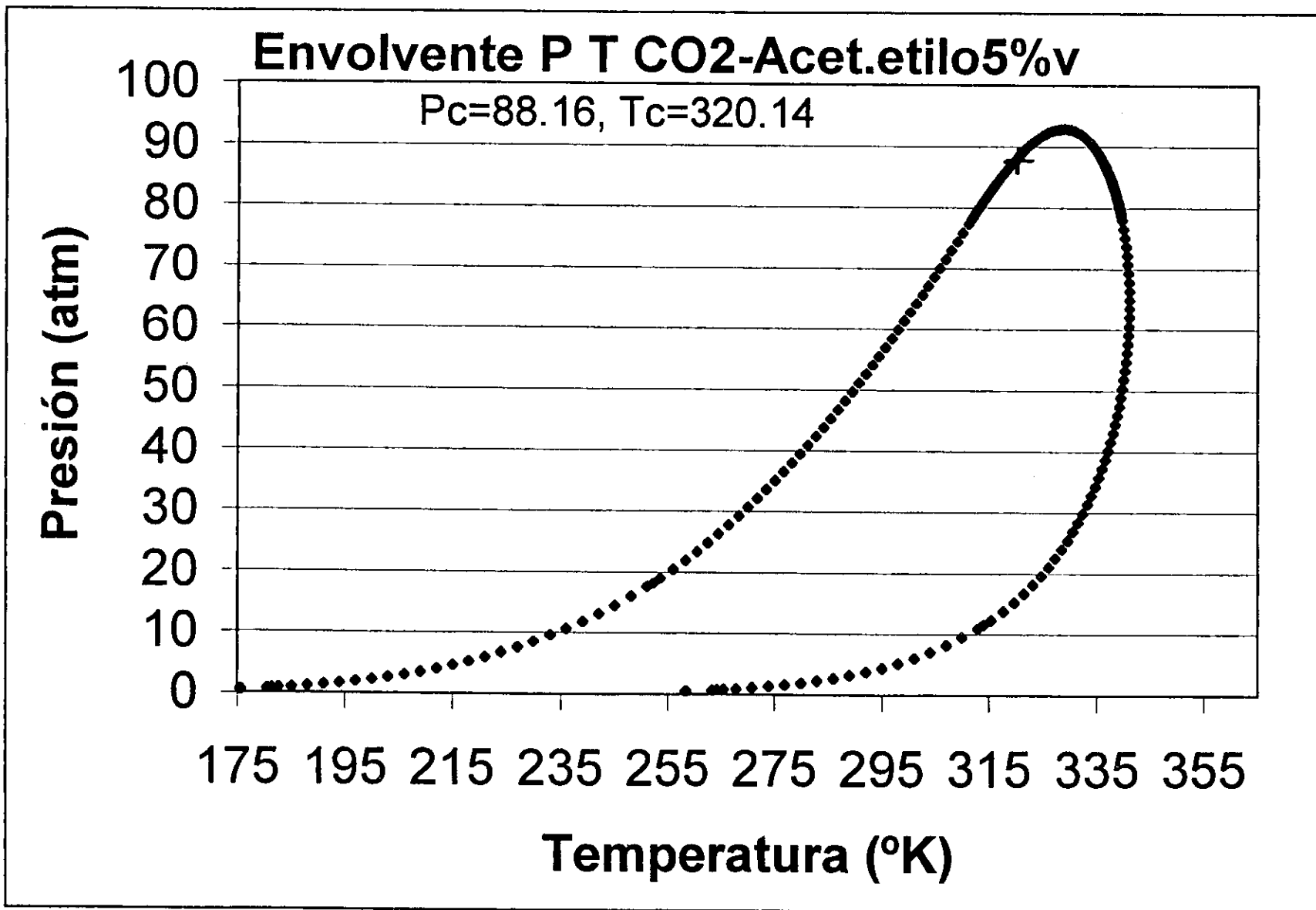
## **ANEXO IX**

**Envoltentes presión temperatura de sistemas CO<sub>2</sub> - cosolventes**

## Envolvente P T CO<sub>2</sub>-EtOH5%v

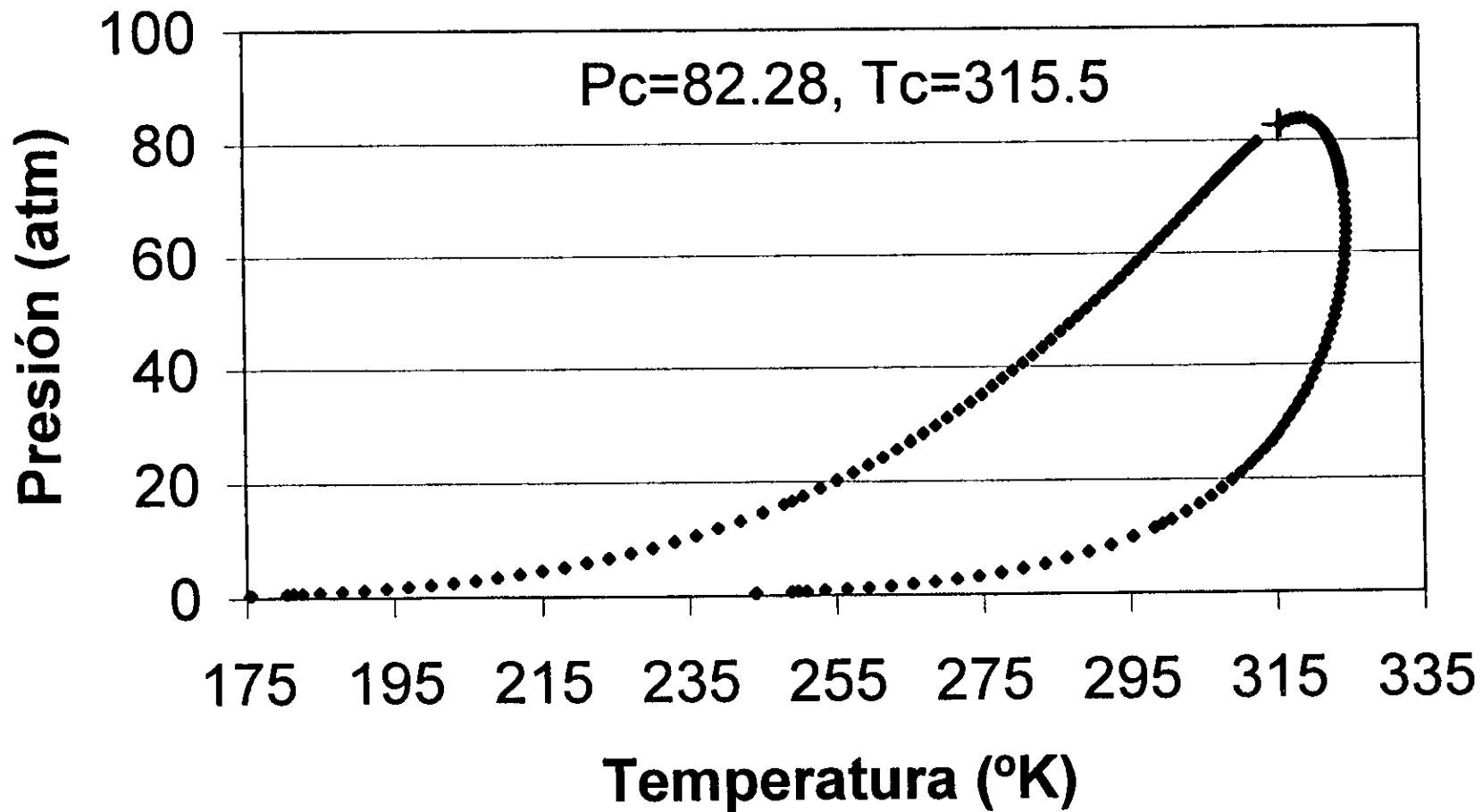


ANEXOS: PREDICCIÓN DEL PUNTO CRÍTICO DE SISTEMAS CO<sub>2</sub>-COSOLVENTE  
(EFECTUADO POR MEDIO DE FORASFS 0)



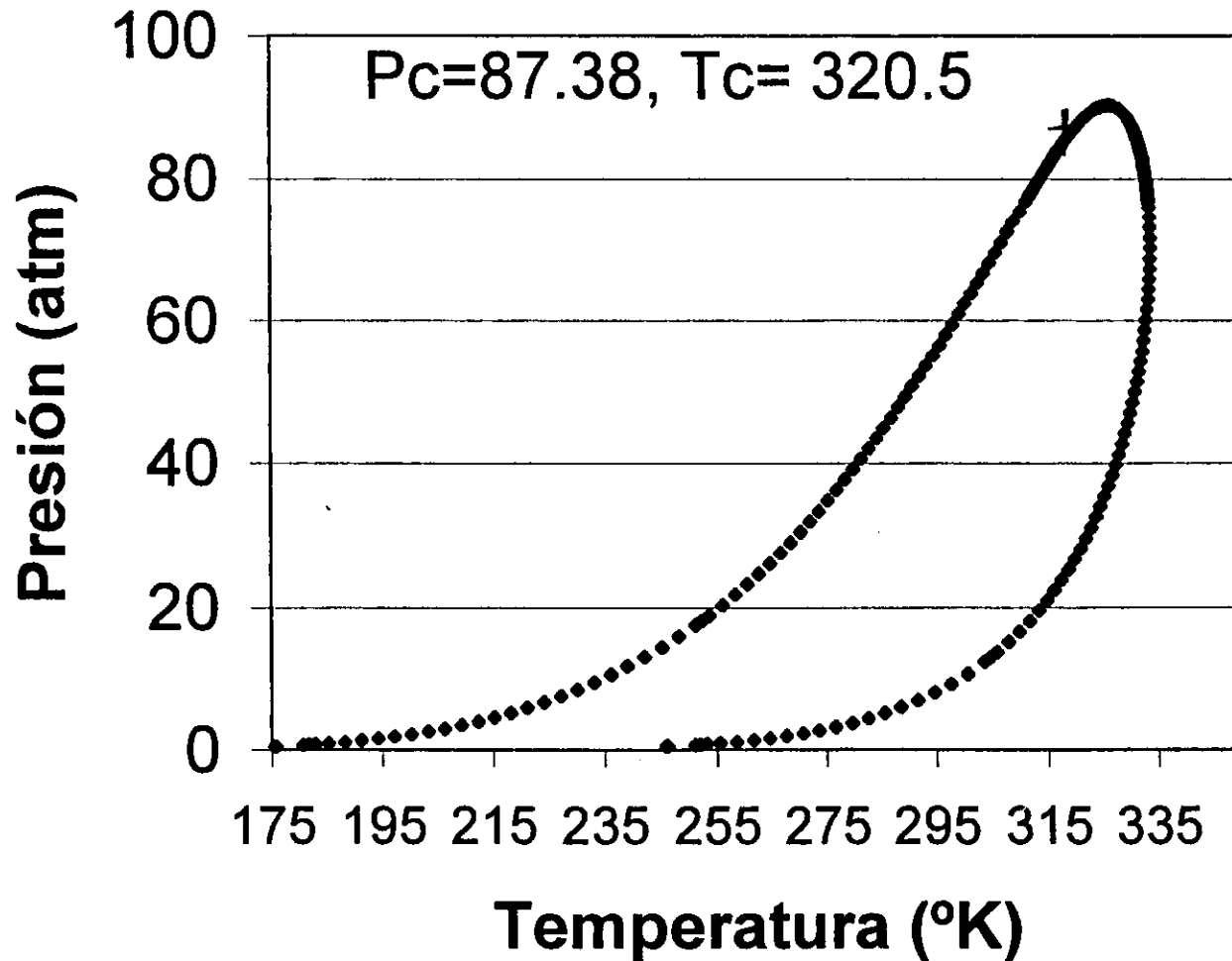
ANEXOS: PREDICCIÓN DEL PUNTO CRÍTICO DE SISTEMAS CO<sub>2</sub>-COSOLVENTE  
(EFECTUADO POR MEDIO DE EQFASES2.0)

## Envolvente P T CO<sub>2</sub>-hexano5%v



ANEXOS: PREDICCIÓN DEL PUNTO CRÍTICO DE SISTEMAS CO<sub>2</sub>-COSOLVENTE  
(EFECTUADO POR MEDIO DE EQFASES2.0)

## Envolvente P T CO<sub>2</sub>-Acetona5%v



ANEXOS: PREDICCIÓN DEL PUNTO CRÍTICO DE SISTEMAS CO<sub>2</sub>-COSOLVENTE  
(EFECTUADO POR MEDIO DE EQFASES2.0)

## ANEXO X

### Barrido espectrofotométrico de diésteres de xantofilas

