



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

"EXTRACCION DE ANTIOXIDANTES DE ROMERO

LIBRO DE REGISTRO
DE EXAMENES
PROFESIONALES

MEMORIA DE DESEMPEÑO PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO QUIMICO
P R E S E N T A :
EVARISTO FABIAN GUTIERREZ AGUILERA

ASESOR: M. EN C. HUMBERTO MAXIMO TRONCOSO ALTAMIRANO



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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

La Memoria de Desempeño Profesional: Extracción de Antioxidantes del Romero.

que presenta el pasante: Evaristo Fabián Gutiérrez Aguilera
con número de cuenta: 9041777-3 para obtener el título de:
Ingeniero Químico

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 7 de Noviembre de 2003

PRESIDENTE M. en C. Humberto Maximo Troncoso Altamirano

VOCAL Dr. Adolfo Obaya Valdivia

SECRETARIO Ing. Antonio Trejo Lugo

PRIMER SUPLENTE I.Q. Gilberto Atilano Amaya Ventura

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Bernardo Francisco Torres

DEDICATORIAS.

A mis padres: **Evaristo Gutiérrez Palma** y **Gabriela Aguilera Ortega**, ya que gracias a su ejemplo y dedicación he llegado a ser lo que soy hoy.

Gracias.

A mi querida esposa **Ceci**, que sin su apoyo y comprensión no hubiera podido concluir este trabajo.

Gracias, T.A.

AGRADECIMIENTOS.

Al **Ing. Ricardo Soto Carrillo**, por proporcionar los recursos técnicos y tecnológicos, para el desarrollo de este trabajo.

Al **M. en C. Humberto Troncoso Altamirano**, por su paciencia y dedicación en el desarrollo de este trabajo.

A cada uno de mis **Sinodales**, por el tiempo que dedicaron para la revisión de este trabajo.

ÍNDICE

	Página.
1. Índice	1
2. Resumen	2
3. Antecedentes	2
4. Introducción	4
5. Revisión Bibliográfica	6
4.1 Composición Química	6
4.2 Extracción	6
4.3 Composición e Identificación	8
4.4 Análisis Instrumental	10
6. Justificación	11
7. Desarrollo Experimental	12
6.1 Extracción con Acetona	14
6.2 Extracción con n-Hexano	14
8. Resultados	15
7.1 Rendimientos	18
9. Conclusiones	20
10. Referencias	21
11. Glosario	22
12. Apéndice	23

RESUMEN.

En este trabajo se reseñan los diferentes procesos para la obtención de estos compuestos antioxidantes, pasando desde una extracción con disolventes, hasta el empleo de fluidos supercríticos; así, como la importancia del empleo de técnicas de análisis y separación adecuadas, para el aislamiento e identificación de cada uno de estos compuestos, con la consecuente determinación de sus características físicas y químicas, explicando así el desempeño de cada uno de ellos en el rompimiento de la cadena de oxidación. De esta forma se sugiere el mejor proceso para la obtención de un producto con un gran poder antioxidante, de bajo costo y que cumpla con las especificaciones necesarias para ser utilizado en productos alimenticios.

ANTECEDENTES.

Desde principios del siglo XVII se tiene conocimiento de las propiedades medicinales del Romero (*Rosmarinus Officinalis Labiate*), así como también de su amplio uso como condimento. No es hasta el inicio de la década de los ochentas, cuando inicia a tener un mayor interés por el tipo y función de cada uno de los componentes de este arbusto. Entre los que destaca su gran actividad antioxidante, que en ciertos sustratos supera la de los antioxidantes sintéticos como el Butilhidroxianisol (BHA) o Butilhidroxitolueno (BHT).

El Romero (*Rosmarinus Officinalis L.*) es un arbusto de 1 a 1.5 m de altura, muy aromático, siempre verde, ramificado y de tallo cuadrado. Es original de la región Mediterránea y se presenta en climas cálido, semicalido, semiseco y templado, desde los 900 a los 3900 msnm.

Se menciona por primera vez en el siglo XVII por Gregorio López como una planta medicinal; posteriormente, a principios del siglo XVIII es referida por Juan de Esteyneffer con el mismo uso. En el Siglo XIX Eleuterio González señala su empleo en fumigaciones, fomentos, baños y unturas, ya en el siglo XX

se señala su uso en infusiones de todo tipo y por último se menciona por la Sociedad Farmacéutica de México como cáustica y eupéptica. Existen varios reportes que demuestran que el aceite esencial, ejerce un efecto antiespasmódico e inhibidor de las contracciones del músculo liso del íleon, músculo cardiaco de cuyo y tráquea. También se ha demostrado que los ácidos rosmarínico, ácido camósico, carnosol y rosmanol poseen actividad antilipoperoxidante.

INTRODUCCIÓN.

Los antioxidantes son sustancias que disminuyen la rapidez de oxidación de los Aceites y Grasas. Un carácter importante de los antioxidantes es su gran eficacia en concentraciones muy bajas, del orden de unas cuantas partes por millón. Están presentes naturalmente en casi todos los materiales orgánicos crudos de naturaleza no saturada y se añaden a muchos alimentos manufacturados, como grasas y aceites refinados, galletas, productos horneados y fritos, etc.

Una de las mayores consideraciones de este tipo de productos en su desarrollo, producción y venta, es su vida útil. El consumidor acepta los productos elaborados dependiendo de la conservación de sus propiedades originales frescura, sabor, olor y textura. Los costos de venta están directamente relacionados con el tiempo que el producto puede mantener sus propiedades. Muchos de estas propiedades dependen del cuidado que se ponga en su manufactura; algunos son, pérdida de humedad, descomposición microbiana, cambios enzimáticos y oxidación.

La degradación oxidativa, es un fenómeno químico complejo, que conduce a lo que se denomina comúnmente “enranciamiento”, cuyas repercusiones económicas pueden ser importantes puesto que termina con la pérdida de alimentos que se vuelven inconsumibles a causa de sus propiedades sensoriales alteradas. El proceso de oxidación inicia cuando el oxígeno reacciona con los dobles enlaces que se encuentran en la cadena de carbonos en los ácidos grasos libres de la grasa y/o aceites; estos dobles enlaces pueden ser representados como: $-C=C-$. Durante el proceso de oxidación, el oxígeno ataca el doble enlace, formando peróxidos, los cuales pueden entonces catalizar el rompimiento de más ácidos grasos a través de una serie de reacciones en cadena. Estos peróxidos pueden también atacar a otros nutrientes oxidables en el alimento, tales como las vitaminas A, D y E; además, las Xantófilas (pigmentos utilizados en los alimentos para pollo), ingredientes tales como maíz, harina de gluten de maíz y harina de cempasúchil, puede también ser oxidados resultando en pérdidas del pigmento.

Durante el proceso de oxidación, subproductos tales como cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos de cadena corta son formados, los cuales causan malos olores y sabores en el alimento. La ingestión por un animal de alimentos oxidados ejerce algunos efectos indeseables tales como la encefalomalacia en pollos, síndrome de grasa amarilla y esteatitis en el cerdo; en general deficiencias de vitaminas solubles en grasa en todos los animales; pobre desarrollo y baja conversión del alimento puede también ocurrir con el uso de alimentos conteniendo grasas rancias.

Al final de la década de los 40's, los antioxidantes sintéticos fueron introducidos a la industria de los alimentos para animales como un medio de minimizar la destrucción oxidativa de nutrientes, permitiendo aumentar su vida de anaquel.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Composición Química.

El Romero se caracteriza por la presencia de un aceite esencial (por contener olor característico) obtenido de sus ramas el cual tiene la siguiente composición: los monoterpenos 1-8 cineol, acetato de bornilo, alcanfor, alfa y beta pineno, linalol, alfa-terpineol, nerol, geraniol, eugenol, nerolidol, limoneno, verbenol, mirceno y beta-cariofileno; además de los compuestos 3-octanona, 3-octanol y trans-hexenol; los triterpenos, alfa- y beta-amirina, botulina y ácido botulínico; los ácidos ursólico y oleanólico; los flavonoides luteolina, apigenina, diosmetina, genkwanina e ispidulina y los componentes fenólicos: ácidos rosmarínico, labiático, clorogénico y caféico; vainillina, alcohol benzílico y alcohol fenil-etílico y el alcaloide rosmaricina.

Extracción.

Bracco *et al* (1), atribuyen la actividad antioxidante del extracto a la técnica de extracción empleada, esto es la polaridad del disolvente, el tamaño de la partícula y los parámetros de extracción utilizados. Describen un método de extracción en el cual el romero es molido y suspendido en aceite de cacahuete. Para ser micronizado (5-20 μm), se somete a calentamiento para deshacerse de los compuestos aromáticos y finalmente es sometido a una destilación molecular. Los compuestos antioxidantes en general son lábiles a las altas temperaturas y el contacto con el aire, ambas cosas son empleadas en este procedimiento por lo cual se obtienen antioxidantes con cierta degradación. Además, este proceso puede ser rentable para empresas que cuenten con dicho equipo, pues este representa una alta inversión, además de tiempos de proceso muy largos.

Nakatani *et al* (2), describen una extracción de las hojas previamente pulverizadas, en un disolvente polar con agitación a temperatura ambiente, para posteriormente separar las fases por filtración, realizando esta operación tres veces. Posteriormente, al extracto se le realiza una destilación con arrastre de vapor, nuevamente se separan las fases, se suspende el material obtenido en un

disolvente polar, para realizarle una serie de extracciones que van de un ácido, agua, carbonato de sodio, agua, una base y finalmente agua. Posteriormente, se lleva a cabo la desolventización. La mayor actividad antioxidante la obtuvo el extracto de la solución ácida.

Para Nguyen *et al* (3), las hojas deben ser molidas finamente, para ser sometidas a extracción con dióxido de carbono supercrítico, obteniendo dos fracciones por precipitación del fluido supercrítico. Estos extractos se someten a una nueva extracción con etanol al 95%. Este proceso también involucra la utilización de equipo especializado de un alto costo.

Aeschbach *et al* (4), proponen la extracción con un disolvente polar a temperatura ambiente en dos ocasiones, disminuir el volumen de la solución y realizarle extracciones con una base, para separar los compuestos antioxidantes; posteriormente, esta fase alcalina es acidificada para recuperar los antioxidantes del medio acuoso. A las hojas de romero extraídas con el disolvente polar, se les realiza una nueva extracción con etanol en las mismas condiciones, obteniendo un extracto de similar composición antioxidante y rendimiento semejante. En otro experimento Aeschbach *et al* (5)(6), al extracto obtenido con el procedimiento anterior (extracción con alcohol), lo combinan con un aceite vegetal y evaporan el disolvente de esta mezcla. Posteriormente, realizan una dilución de la mezcla en un disolvente polar con el fin de separar los compuestos que normalmente precipitan con el almacenamiento en los extractos obtenidos por métodos similares. Después, el extracto es decolorado por tratamiento con carbón activado y finalmente deodorizado. En un tercer experimento, realizan la extracción con un disolvente no polar, para posteriormente separar los compuestos antioxidantes por medio de una columna empacada con un adsorbente polar, donde serán retenidos los compuestos antioxidantes para posteriormente extraerlos con un disolvente polar.

Kahleyss *et al* (7), describen la extracción con dióxido de carbono supercrítico, con una extracción posterior con metanol. El producto se blanquea con carbón activado, se lava con agua, para así obtener un antioxidante sin olor ni sabor.

Chang *et al* (8), realizan en primer instancia una extracción con un disolvente orgánico de bajo punto de ebullición (recomiendan metanol, n-hexano, eter etílico, dioxano u otro alcohol). El producto se blanquea con carbón activado, se desolventiza y dispersa en aceite de algodón para someterlo a una destilación con arrastre de vapor. Descubren que los mejores resultados se obtienen con la planta desecada. De las pruebas realizadas obtienen la siguiente Tabla:

Tabla 1.- Pruebas realizadas por Chang *et al* (8)

Disolvente	% de Rendimiento	Valor de peróxido de manteca con 0.02% de antioxidante, después de 11 días a
n-Hexano	1.6	2.6 meq/Kg
Benceno	2.5	2.2 meq/Kg
Eter Etílico	2.5	1.6
Cloroformo	2.5	2.9
Dicloroetileno	2.3	1.4
Dioxano	3.6	2.0
Metanol	5.3	1.8
Control	-----	38.8

En esta tabla se puede observar la influencia de la polaridad en la cantidad de extracto obtenido de la planta de Romero, así como la efectividad antioxidante de cada uno de estos. También se puede apreciar que el metanol es el disolvente del que se obtiene un mayor rendimiento, con una buena acción antioxidante.

Yajima (9), afirma que la extracción se puede llevar acabo con éter etílico, cloruro de etileno, dioxano, acetona, etanol, etanol acuoso, metanol, acetato de etilo, propilenglicol o glicerina. Posteriormente el producto se blanquea con carbón activado, tierra diatomea o alguna arcilla ácida, se desolventiza se realiza una destilación por arrastre de vapor, se separa y seca.

Composición e Identificación de Compuestos.

Muchos compuestos con acción antioxidante han sido aislados e identificados de las hojas de romero; todos ellos, cuentan con la misma estructura principal de difenol vecinal (Figura 1). Chen *et al* (10), proponen la

extracción (del romero molido) con n-hexano, acetona o metanol; se blanquea con carbón activado y se hacen lavados con agua. De este extracto se realizó análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés), con un detector de masas; también, se evaluó su acción antioxidante y dichas pruebas arrojaron que los mejores antioxidantes son el Camosol y el Ácido Camósico; el ácido Ursólico no presentó acción antioxidante.

Wu *et al* (11), utilizaron metanol para extraer los antioxidantes del romero, después lo fraccionaron por medio de una columna empacada de sílica ácida, utilizando gradientes de elusión desde 5% de éter en n-hexano hasta éter puro y metanol puro, obteniendo una serie de 16 fracciones. De esta extracción, se identificaron los principales compuestos antioxidantes por medio de espectrofotometría infrarroja y resonancia magnética nuclear. También, determinaron que el camosol tiene una mayor acción antioxidante que el ácido ursólico.

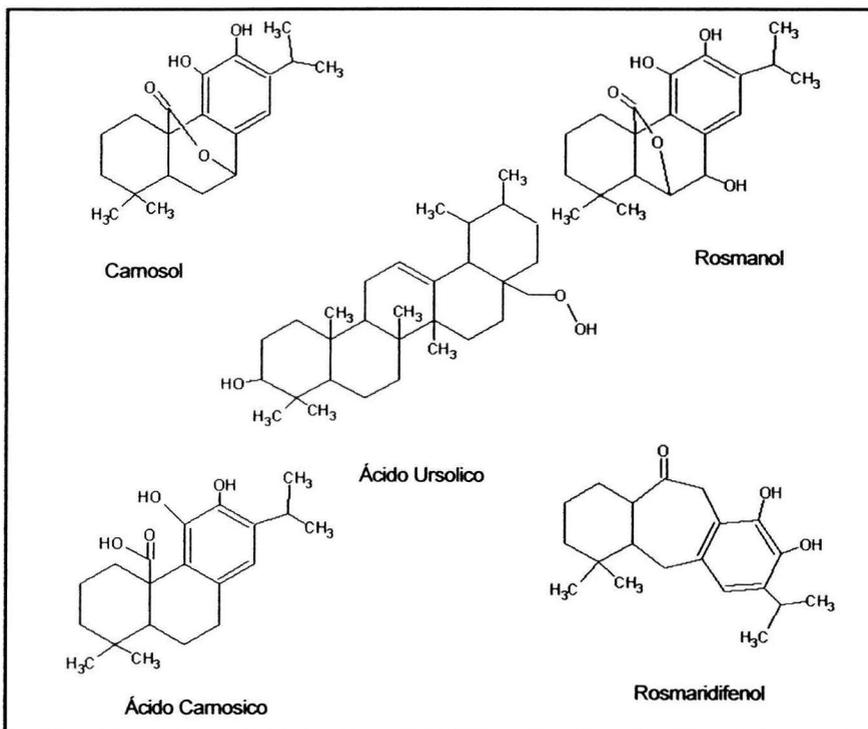


Figura 1.- Principales estructuras antioxidantes del Romero.

Houlihan *et al* (12), siguieron la técnica de extracción con metanol, para después separar los antioxidantes en una columna de sílica ácida, utilizando eluciones de n-hexano, éter y metanol, obteniendo un total de 15 fracciones. Posteriormente realizaron cristalizaciones para purificar rosmaridifenol que identificaron por medio de resonancia magnética nuclear e índice de refracción, presentando una actividad antioxidante similar a la de Butilhidroxitolueno (BHT).

Haraguchi *et al* (13), realizaron una separación cromatográfica de los compuestos antioxidantes identificando al ácido camósico, carnosol, rosmanol y epirosmanol el cual es un isómero del rosmanol.

Análisis Instrumental.

Chen *et al* (10), realizaron el análisis de los activos del extracto por HPLC, utilizando las siguientes condiciones:

- Detector de Masas
- Columna: C18 (12.5 x 0.46 cm DI).
- Fase Móvil: A: Agua con 1% de ácido acético

B: Acetonitrilo

C: Metanol con 1% de ácido acético

Programa: 30% de A, 70% de C a 5% A, 5% B, 90% C en 30 minutos en una relación lineal

- Flujo: 0.7 ml/min.

Para obtener de esta manera la concentración de los activos, algunos cromatogramas de su análisis se muestran en la Figura 2.

Richheimer *et al* (14), describen una extracción con acetato de etilo, con extracciones de un álcali, que posteriormente es neutralizada con un ácido y se extrae con éter dietílico; este extracto, se sometió a cromatografía en columna

varias veces con diferentes fases estacionarias y gradientes de elusión. También, describen el aislamiento del ácido camósico, su método inicia con la extracción de las hojas de Romero con etanol a temperatura ambiente, se desolventiza y se suspende el extracto en n-hexano por 70 horas y se filtra. Esta solución se concentra para ser tratada con ácido fosfórico, y luego la solución ácida se extrae varias veces con n-hexano. Esta solución de n-hexano se seca con sulfato de sodio y se concentra bajo vacío, hasta la aparición de cristales. Posteriormente, se realiza una recristalización evaporativa con n-heptano. Este procedimiento se llevó a cabo, pero no se obtuvieron los resultados esperados, pues no se obtuvo un producto puro o por arriba de 95% de pureza como lo describen los autores. Los autores también describen la realización de algunos otros estándares.

Las técnicas que se emplearon para la identificación de los compuestos antioxidantes, comprenden: resonancia magnética nuclear; cromatografía líquida de alta resolución/espectrometría de masas, principalmente.

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes:

Detector: Arreglo de diodos y amperimétrico.

Columna: 4.6 mm x 25 cm, Hypersil ODS 5 μ m.

Flujo: 1 o 1.5 ml/min

Fase Móvil: 65:35 Acetonitrilo:0.5% de Ácido Fosfórico con 1 mM de EDTA

Longitud de Onda: 230nm

Los cromatogramas correspondientes a algunas de sus determinaciones se muestran en la Figura 3.

JUSTIFICACIÓN.

El presente trabajo tiene como objetivo el evaluar la posibilidad de utilizar el romero como una materia prima para la obtención de antioxidantes de uso alimenticio.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Con base a lo anterior, se desprende que los compuestos antioxidantes contenidos en el romero tienen una bipolaridad, pues bien pueden ser extraídos con compuestos polares y no polares; sin embargo, tienen una mayor tendencia a presentar un carácter polar. En las fuentes consultadas, se remarca la utilización de disolventes polares para la extracción de antioxidantes, ya que se busca un extracto que este libre de olores y sabores, y los disolventes de baja polaridad presentan una baja afinidad por estos compuestos. En el presente trabajo se busca la extracción de la mayor cantidad de compuestos antioxidantes y no es preocupante la presencia de los compuestos saborizantes u odoríferos ya que se comercializan extractos que contienen estos, por lo cual, se optó por la extracción con disolventes de mediana polaridad, que proporcionan una mejor actividad sobre los compuestos antioxidantes y un mayor rendimiento de extracción de los mismos. Los disolventes evaluados fueron metanol y etanol; únicamente se evaluaron estos por ser disolventes que se pueden conseguir fácilmente a nivel industrial, son económicos, tienen un bajo punto de ebullición, propiedad vital debido a la labilidad de los antioxidantes frente a esta, y pueden manejarse con relativa seguridad. De estas pruebas se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2.- Resultados obtenidos en la experimentación.

Disolvente	% de Ácido Carnósico	Porcentaje de Extracto Obtenido
Metanol	28.3	10.97
Etanol	29.3	14.42

Como se puede observar, se obtiene un 31% más de extracto con etanol, además de que cuando se realizó el análisis del principal ingrediente activo en cada extracto, se encontró que el extracto metanólico contiene un 1% menos de ácido carnósico, comparado con el extracto etanólico. Por otro lado, en el análisis por HPLC, de estos extractos no se encuentra una diferencia significativa entre ellos en cuanto al número de compuestos extraídos, como se puede observar en las siguientes Figuras 4 y 5.

Una vez seleccionado el disolvente a utilizar se procedió a determinar el tiempo y temperatura óptimos, para obtener la mayor cantidad de extracto con el menor tiempo de proceso; se realizaron pruebas por medio de las cuales se determinó que la mejor forma de llevar a cabo la extracción es por medio de un reflujo por espacio de una hora. Una vez pasado este tiempo, se separaron las fases por medio de filtración. En esta etapa es importante mencionar que es mejor utilizar el Romero completo, es decir sin moler, a pesar de que en la literatura se informa que se da una mejor extracción con las ramas molidas, por llevarse un contacto más efectivo entre el disolvente y el sólido. Se realizaron pruebas para comprobar esta aseveración y las diferencias entre los porcentajes de extracción no son significativas, (a penas y rebasa el 1%), pero en cuestiones operativas representa un serio problema, pues tendría que utilizarse un filtro, prensa o similar, ya que los más sencillos de canasta, cartucho o papel filtrante, representarían problemas de taponamiento; sin embargo, teniendo las “ramas” completas se necesitará de un filtro con un tamaño de malla menor y por ende será mucho más fácil realizar este procedimiento.

La fase sólida “ramas”, son sometidas a un segundo proceso de extracción emulando de cierta forma el proceso utilizado en la extracción con disolventes de semillas oleaginosas, donde el disolvente recuperado de la primera extracción, es utilizado para realizar el tratamiento inicial de la semilla y el disolvente fresco se reserva para la segunda extracción donde se tiene menor material por extraer y por esto se necesita un disolvente con una alta eficiencia de extracción.

El extracto etanólico, obtenido de esta manera se somete a un tratamiento de blanqueo, con carbón activado a una relación de 10% en peso, referido a la cantidad de romero que se sometió a la extracción; una vez agregada esta cantidad de carbón, la mezcla se somete a reflujo a 60°C y se mantiene con agitación por espacio de una hora. Una vez transcurrido este tiempo, se realiza un nuevo proceso de filtración para separar el carbón del extracto etanólico.

Una vez separadas estas dos fases, se desolventiza el extracto etanólico a 56°C y 30 cm Hg, condiciones fácilmente reproducibles en reactores industriales, sin necesidad de emplear equipos con alta especialización.

Ya que ha sido extraído totalmente el disolvente, el sólido obtenido se somete a una extracción por arrastre de vapor, para separar la mayoría de los compuestos odoríferos del mismo; se comprobó que el tiempo óptimo para este paso es de 30 minutos, ya que después de este tiempo, la extracción de estos compuestos ya no es representativa, referida al costo del proceso, es decir el costo/beneficio se vuelve poco rentable.

Con el fin de retirarle la mayor parte de compuestos indeseables y obtener la mayor concentración de compuestos antioxidantes, se experimentó con dos técnicas de extracción las cuales serán descritas a continuación:

Extracción con Acetona.

Este procedimiento consistió únicamente en la realización de una separación de los compuestos antioxidantes de los demás componentes del extracto, por medio de la solubilización de los mismos con acetona. Al extracto en polvo se le adicionó acetona en una proporción de 5:1 en peso (Acetona:extracto); Se procedió a agitar por espacio de 30 minutos y posteriormente se filtró esta solución para eliminar los compuestos indeseables.

Extracción con n-Hexano.

Este procedimiento se basó en lo descrito por Stephen *et al* (15), para la realización de un estándar de ácido camósico; el procedimiento es como sigue: El extracto seco de Romero, se suspende en n-hexano, y posteriormente se filtra; esta solución en n-hexano se extrae con una solución de carbonato de sodio, para posteriormente ser neutralizada con ácido fosfórico, hasta un pH ácido; esta nueva solución ácida, se extrae nuevamente con n-hexano, en donde se recuperaran los compuestos antioxidantes.

RESULTADOS

El análisis empleado fue una adaptación de la técnica de análisis realizada por Stephen *et al* (15), la cual fue adaptada como sigue:

Tabla 3.- Condiciones para evaluación de extracto de Romero por HPLC.

Fase móvil:	Acetonitrilo : Ácido Fosfórico al 1% (60:40)
Flujo:	1.5 ml/min.
Atenuación:	32
Velocidad de carta:	1 cm/min.
Tiempo de corrida:	15 min.
Detector:	UV Vis
Longitud de onda:	230 nm.

En primera instancia, se realizaron pruebas de sensibilidad ante los disolventes que es soluble el extracto, para identificar posibles picos fantasmas, los cromatogramas obtenidos, se muestran en las Figuras 6 y 7.

Como se puede observar, a pesar de que el acetonitrilo se encuentra como fase móvil presenta una perturbación como si se tratara de un pico “negativo”; además, de que el extracto tiene una mayor solubilidad en n-hexano. Por lo que se eligió n-hexano como disolvente.

Una vez que se determinó el disolvente a emplear para el análisis de las muestras, se procedió a elaborar un estándar de ácido camósico, principal ingrediente antioxidante de este extracto; Stephen *et al* (15), describieron el siguiente proceso para la obtención de un estándar de ácido camósico:

1. Extracción de las hojas con etanol, para posteriormente desolventizar el extracto bajo vacío.
2. Este extracto es sometido a una extracción con n-hexano por 70 hrs.; una vez pasado este tiempo, se separa la fase insoluble por medio de filtración.
3. Se concentra la solución hexanólica hasta un tercio de su volumen, para posteriormente realizarle tres extracciones con una solución de NaHCO_3

al 5%.

4. Las fracciones combinadas de la extracción con NaHCO_3 se acidifican con H_3PO_4 hasta un pH de 2.2.
5. Posteriormente esta solución ácida se extrae con n-hexano, se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra bajo vacío, hasta la aparición de cristales blancos.
6. Posteriormente se realiza una recristalización evaporativa con n-heptano.

De este procedimiento se obtuvo un estándar de con 85% de pureza cuyo cromatograma se muestra en la Figura 8.

Es lógico que solamente se encuentren estos dos componentes dentro del extracto pues estos mismos autores encontraron que es un producto de descomposición del ácido carnósico. Una vez que se obtuvo el estándar, se procedió a realizar el análisis de los más importantes pasos del proceso de extracción, los cuales son los siguientes:

Tabla 4.- Análisis del porcentaje de extracto obtenido en extracción con etanol

Paso del Proceso de Extracción	% De Ácido Carnósico
Extracto Etanólico	29.38
Extracto Desolventizado (Polvo)	20.72

En las Figuras 9 y 10, se pueden apreciar estos cromatogramas, y cabe mencionar que para el caso de la solución etanólica, el análisis se realizó tomando la cantidad de sólido en la solución; es decir, se desolventizó el extracto dentro del matraz de aforo y se tomo el peso del sólido residual. En este procedimiento, se utilizó una temperatura de 30°C y alto vacío, con lo que se comprueba la alta sensibilidad del producto a la temperatura, pues es visible la diferencia de concentraciones en ambos cromatogramas (área de picos), y la desaparición de un pico intermedio entre el ácido carnósico y carnosol.

El siguiente paso fue la extracción con acetona de donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 5.- Porcentaje de ácido Carnosico presente después de cristalización con acetona

Paso del Proceso de Extracción	% De Ácido Carnósico
Retenido en Filtro de Cristalización con Acetona	4.97
Solución de Acetona	19.423

Los cromatogramas de estas fases se muestran en las Figuras 11 y 12.

El procedimiento alterno que se probó fue la extracción con n-hexano la cual arrojó los siguientes resultados:

Tabla 6.- Porcentaje de ácido Carnosico en cristalización con n-Hexano

Paso del Proceso de Extracción	% De Ácido Carnósico
Retenido en filtro de cristalización con n-hexano	0.0
Retenido en filtro de alcalinización	0.0
Retenido en filtro de acidulado	1.74
Solución acuosa después de acidificación	0.0

Como se puede observar, esta forma de purificación no tuvo éxito pues el extracto final (retenido en filtro después de acidificación), contiene una concentración muy baja de ingrediente activo, además de obtener un rendimiento muy bajo. Para comparar el extracto obtenido, se realizó un análisis de un extracto que ya se encuentra de venta en el mercado, del cual se obtuvo, que tiene una concentración de 5.93% de Ácido Carnósico, obteniendo el cromatograma que se muestra en la Figura 13.

RENDIMIENTOS.

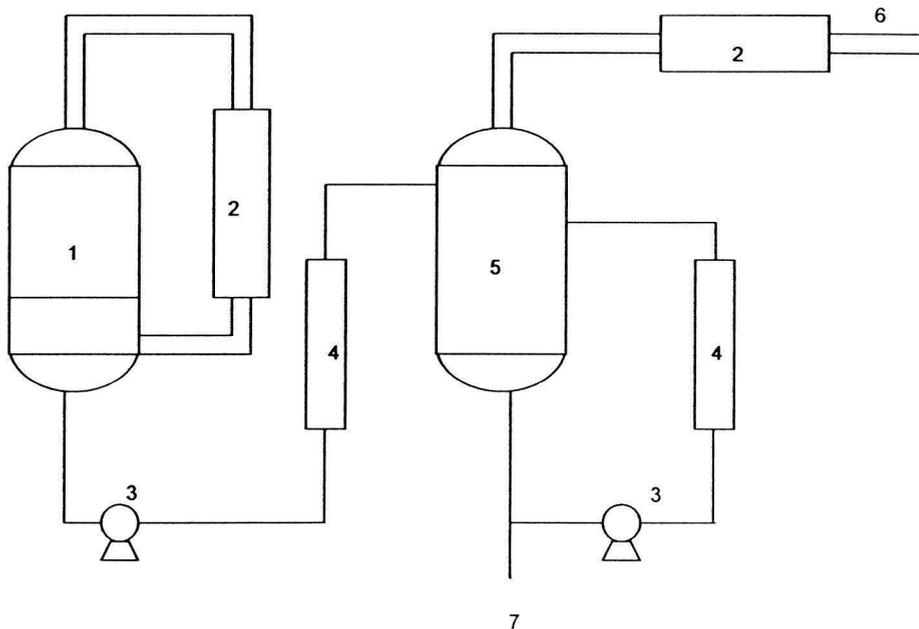
Una vez que se determinó el proceso completo de obtención del extracto, se procedió a realizar una serie de pruebas de las cuales se determinó que de un

kilogramo de ramas de Romero se obtienen 130 g de extracto con una concentración 14.6 % de Ácido Camósico, de lo cual se calcula que para producir un kilogramo de extracto de romero con una concentración comercial (5% de Ácido Camósico), son necesarias las cantidades de materia prima que muestra la Tabla 7.

Tabla 7.- Cantidades necesarias para la elaboración de 1Kg de extracto de Romero

Materia Prima	Cantidad en Kg.
Romero	2.64
Etanol grado industrial	7.92
Acetona	1.9
Aceite Vegetal	0.657
Carbón Activado	0.26

Para este proyecto solo se determina el arreglo y cantidad de equipo a necesitar, las dimensiones y capacidades de los mismos dependerá del volumen de producto terminado a manejar, lo cual aquí no fue evaluado. El arreglo propuesto se describe en la Figura 14.



1. Tanque con malla para retener el romero en la parte superior.
2. Condensador.
3. Bomba.
4. Filtro.
5. Tanque de desolventización, blanqueo y mezclado.
6. Salida de disolvente para su reutilización.
7. Descarga de Producto.

Figura 14.- Arreglo de equipos propuesto para la elaboración del extracto de Romero.

CONCLUSIONES.

Aun cuando los resultados de obtención fueron satisfactorios, no fue posible realizar el proyecto a una mayor escala debido al alto costo de la infraestructura necesaria y materia prima para su elaboración (a pesar de la reutilización del etanol). Aunado a esto, la dificultad de encontrar la principal materia prima para su elaboración, el Romero, esta planta no es cultivada a gran escala en nuestro país, solamente se puede encontrar en Europa, España principalmente, por lo que su uso se encarece grandemente, debido a los costos de transportación. Por otro lado aun no se ha desarrollado el mercado del uso de antioxidantes naturales en la industria. Una de las principales causas de su freno es el alto costo en la elaboración de estos, por los complicados procesos de extracción de estos y las diferencias en las dosis de inclusión en el sustrato. Es decir, es necesario utilizar una mayor cantidad de antioxidante natural debido al mayor peso molecular de este comparado con uno sintético como se puede observar en las siguientes Figuras:

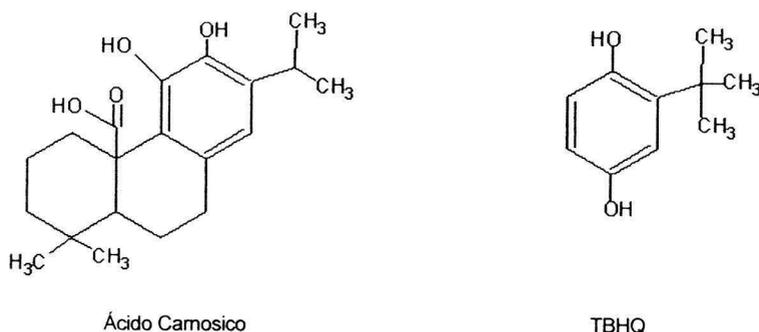


Figura 15.- Comparativo de estructuras químicas de antioxidantes.

Aun y con estos inconvenientes, se tienen buenas perspectivas para estos antioxidantes, ya que en fechas recientes se ha iniciado el cultivo de este importante arbusto en Canadá, además de que se han modificado los procesos de producción disminuyendo con esto el precio de venta de este extracto antioxidante. Todo esto aunado a la creciente tendencia en la utilización y consumo de productos 100% naturales.

REFERENCIAS.

1. Bracco, Löfliger and Viret. Production and Use of Natural Antioxidants. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* June **1981**. 686-690.
2. Nakatani, Inatani and Konishi. Antioxidative Compound, Method of Extracting Same From Rosemary, and Use of Same. Patent No. US 4,450,097. **1984**.
3. Nguyen, Frakman and Evans. Process for Extracting Antioxidants from Labiatae Herbs, Patent No. US 5,017,397. **1991**.
4. Aeschbach and Wille. Preparation of Spice Extract Antioxidant in Oil, Patent No. US 5,525,260. **1996**.
5. Aeschbach and Philippossian. Process for the Preparation of an Antioxidant Extract of SpicesI, Patent No. US 5,026,550. **1991**.
6. Aeschbach and Philippossian. Camosic Acid Obtention and Uses, Patent No. US 5,256,700. **1993**.
7. Kahleyss and Michlbaner. Process for the production of Natural Antioxidants, Patent No. US 5,433,949. **1995**.
8. Chang, Ostric-Mtjasevic, Huang and Hsieh. Method of Producing an Antioxidant Composition from Rosemary and Sage. Patent US 3,950,266. **1976**.
9. Yamiya. Method for Prevention of Oils and Fats and Soft Capsules Containing the Treated Oils and Fats. Patent US 4,525,306. **1985**.
10. Chen, Shi and Ho. Effects of Rosemary Extracts and Mayor Constituents on Lipid Oxidation and Soybean Lipoxygenase Activity. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **1992**. 69: 999-1002.
11. W. Wu, Lee, Ho, S. Chang, Elucidation of the Chemical Structures of Natural Antioxidants Insolated from Rosemary. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **1982**.
12. Houlihan, Ho and Chang. Elucidation of The Chemical Structure of a Novel Antioxidant, Rosmaridiphenol, Insolated from Rosemary. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **1984**. 61: 1036-1039.
13. Haraguchi, Saito, Okamura and Yagi. Inhibition of Lipid Peroxidation and Superoxide Generation by Diterpenoids from *Rosmarinus officinalis* , *Planta Med.* **1995**. 61:333-336.
14. RICHHEIMER, Bernart, King, Kent and Bailey. Antioxidant Activity of Lipid-Soluble Phenolic Diterpenes from Rosemary. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **1996**. 73: 507-513.
15. Stephen S. Chang, *et al.* Natural Antioxidants From Rosemary and Sage. *Journal of Food Science*, **1977**. 42:1102-1106.
16. Okamura, Fujimoto, Kuwabara and Yagi. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Camosic Acid and Camosol in *Rosmarinus Officinalis* and *Salvia Officinalis* , *Journal of Chromatography A*, **1994**. 679:381-386.
17. Kimura and Kanamori. Process for Producing Preservatives. Patent No. US 4,380,506. **1983**.

GLOSARIO.

msnm:	metros sobre el nivel del mar.
μm :	micrómetros.
meq/Kg:	miliequivalentes por Kilogramo.
ml/min:	mililitros por minuto.
mm:	milímetros.
cm:	centímetros.
mM:	milimoles.
UV Vis:	Ultra Violeta Visible.
nm:	nanómetros.
g:	gramos.
Kg:	Kilogramo

Extracción con Fluidos Supercríticos: Se entiende como fluido supercrítico a una sustancia llevada, mediante operaciones mecánicas, a unas condiciones operativas de presión y temperatura por encima de su punto crítico. Como características de un fluido supercrítico se encuentran:

- Gran poder disolvente junto con una enorme capacidad de penetración en sólidos, lo que permite el agotamiento rápido y prácticamente total de los sólidos extraíbles.
- Pueden separarse totalmente de forma sencilla de los extractos, simplemente modificando la presión o la temperatura, hasta el extremo, si es necesario, de que el fluido pase al estado gaseoso.

- Algunos compuestos usados para Extracción con Fluidos Supercríticos (EFS):
 - Dióxido de carbono (CO_2)
 - Agua (H_2O)
 - Etano (C_2H_6)
 - Eteno (C_2H_4)
 - Propano (C_3H_8)
 - Xenón (Xe)
 - Oxido nitroso (N_2O)

Las Figuras 14 y 15 muestran un diagrama esquemático del proceso de EFS. Los cuatro pasos primarios involucrados son: Extracción, Expansión, Separación y Compresión del solvente. Los cuatro equipos críticos del proceso son: Un extractor de alta presión, una válvula de reducción, un separador de baja presión y una bomba para elevar la presión del solvente reciclado. El proceso se inicia de la siguiente manera: La alimentación, generalmente un sólido molido, es cargada al extractor. El CO_2 es alimentado al extractor a través de una bomba de alta presión (100 a 400 Bar). El CO_2 comprimido es calentado en un Intercambiador de Calor hasta la temperatura de extracción (30 a 60 °C). Luego ingresa al extractor y procede a extraer la esencia de la matriz herbacea cargada. La mezcla CO_2 -extracto es enviada a un separador (150 a 50 Bar) con un previo paso a través de una válvula de reducción. A la temperatura y presión reducidas, el extracto precipita espontáneamente en el separador, mientras el CO_2 , libre de cualquier extracto, es reciclado al proceso, con pasos previos de enfriamiento y compresión.

La EFS para una alimentación sólida es un proceso semicontinuo, donde el CO_2 fluye en modo continuo, mientras la alimentación sólida es cargada en una canasta del extractor por etapas.

Un co-solvente es frecuentemente bombeado y mezclado con el CO₂ de alta presión para aumentar el poder de solvencia o la selectividad de la separación para componentes específicos. La separación es producida comunmente en etapas, manteniendo condiciones diferentes en dos o tres separadores para fraccionar el extracto, dependiendo de las solubilidades de los componentes y las especificaciones deseadas de los productos.

APENDICE.

En el presente apéndice se ilustran solo los cromatogramas representativos del estudio que se llevo a cabo. Se realizaron una mayor cantidad de análisis pero no tiene un sentido práctico el mostrarlos en su totalidad. Además se incluyen diagramas del proceso de extracción por medio de fluidos supercríticos.

ROSEMARY ANTIOXIDANTS

26

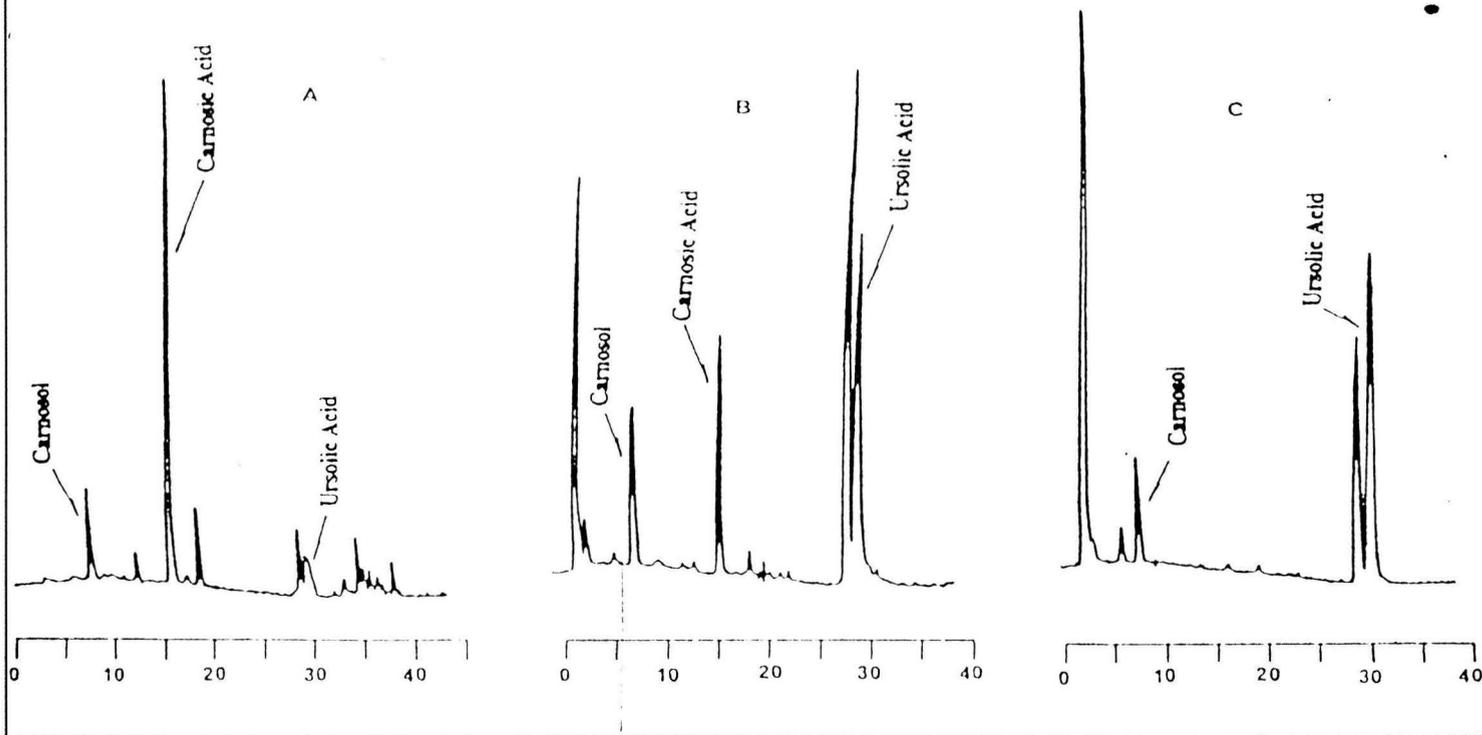


Figura 2.- Cromatografía Líquida de Alta Resolución Obtenida por Chen *et al*, A con Hexano, B con Acetona y C con metanol (4).

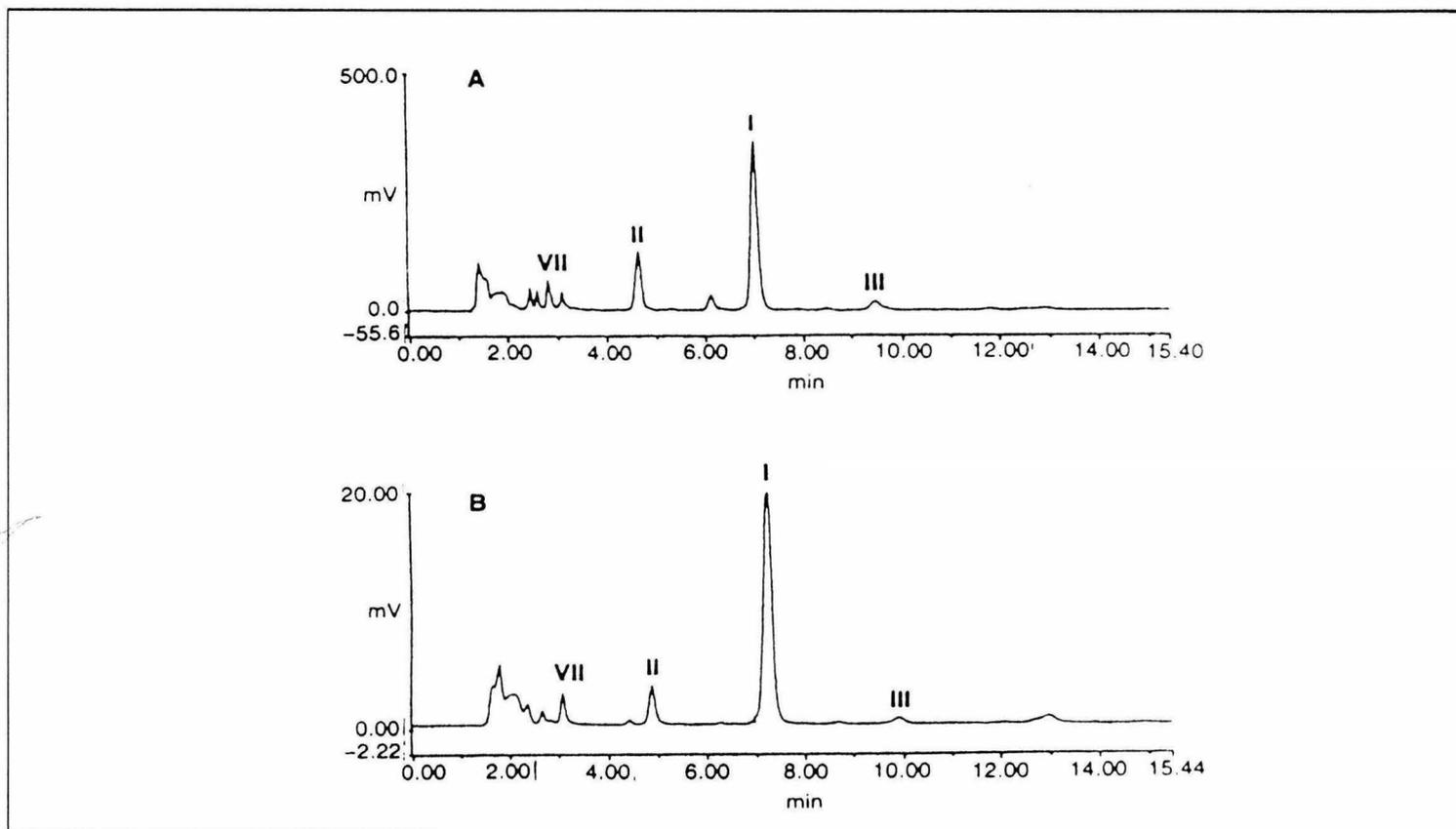


Figura 3.- Cromatogramas obtenidos por Richheimer *et al* (14), con HPLC de un extracto etanólico de Rosmary usando (A) detección ultravioleta a 230 nm y (B) detección electroquímica. (I) = Ácido Carnosico, (II) = Carnosol, (III) = 12-metoxi Ácido carnosico y (VII) = Rosmanol.(14)

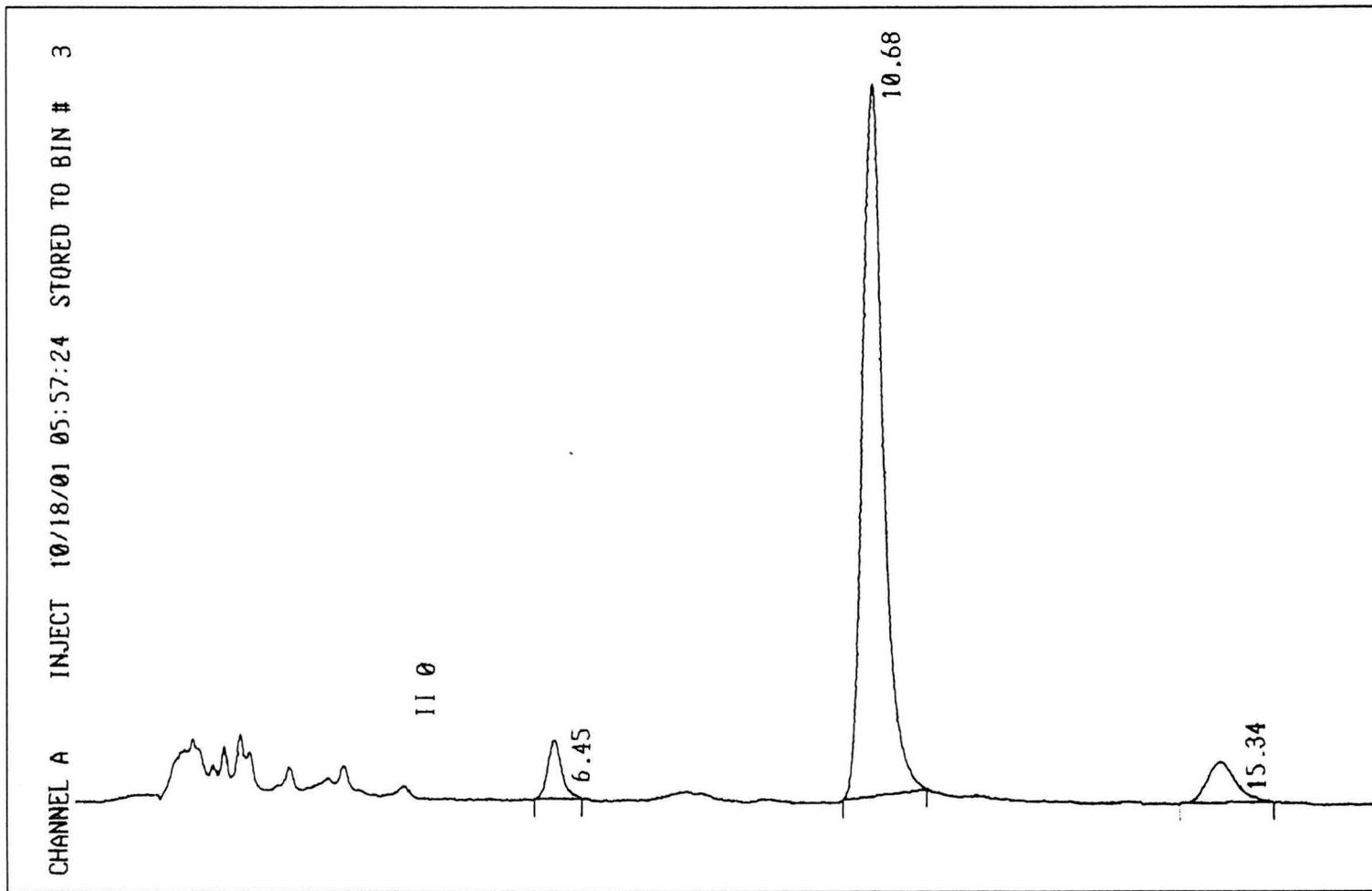


Figura 4.- Cromatograma de Extracto Etanólico.

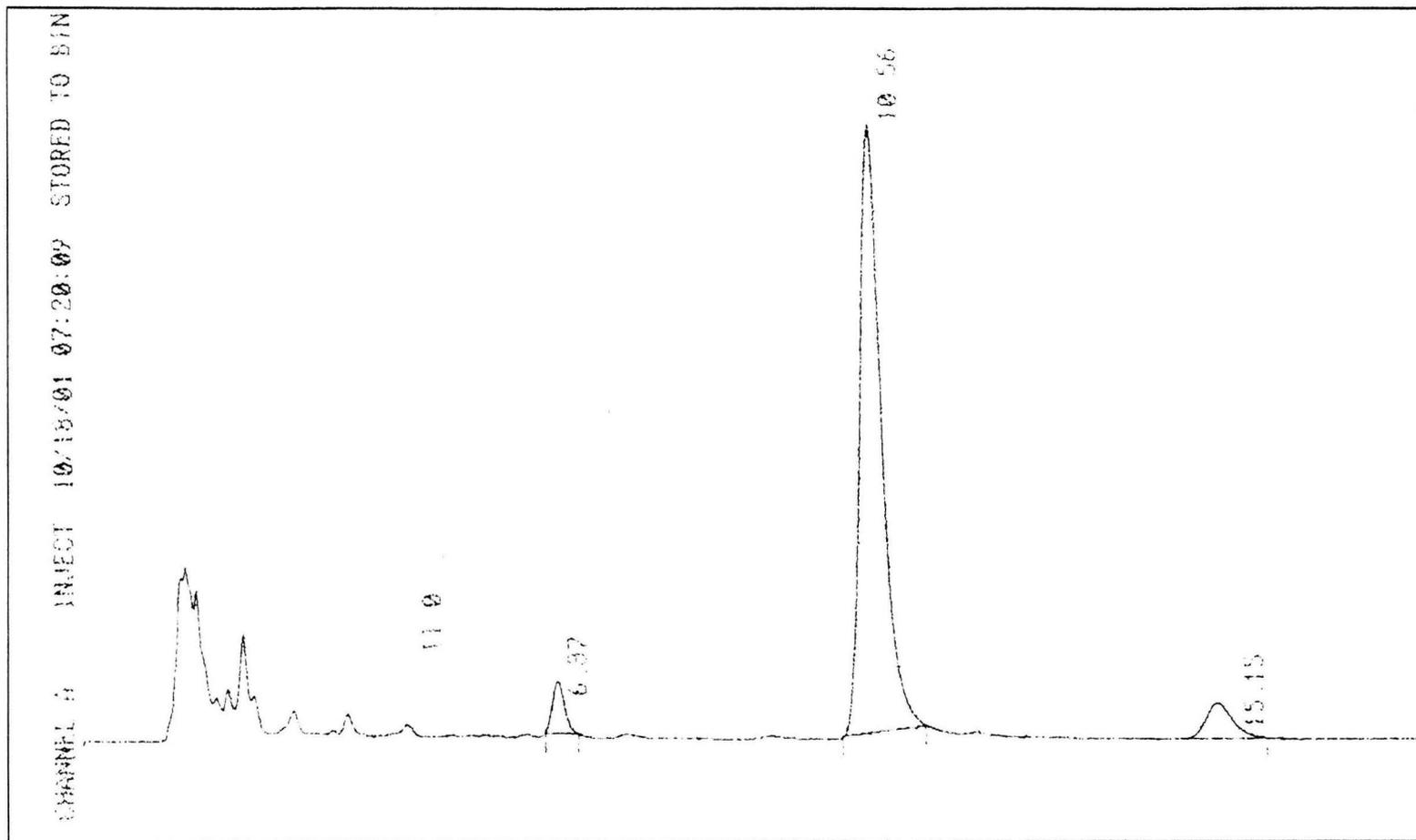


Figura 5.- Cromatograma de Extracto Metanólico.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

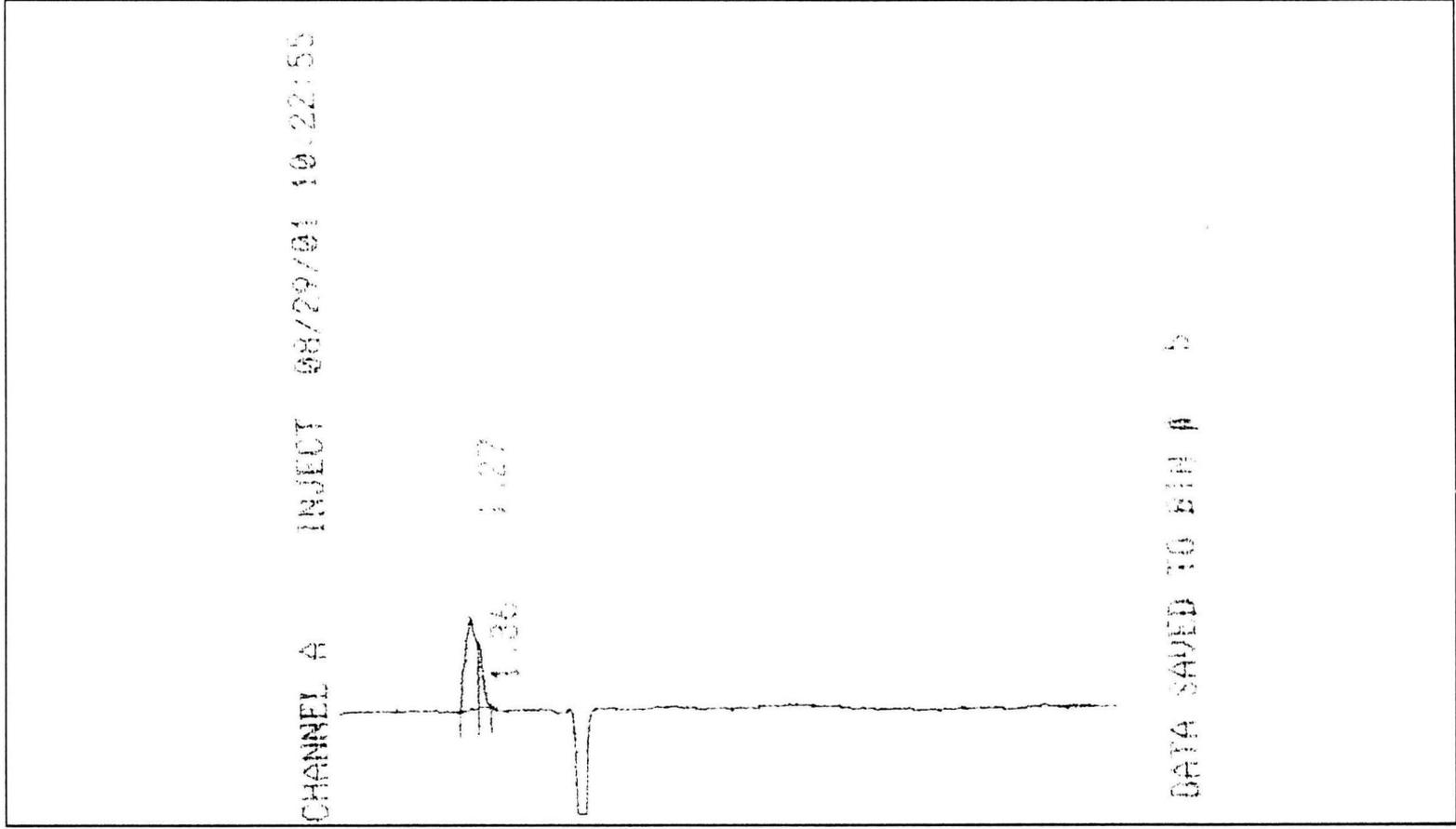


Figura 6.- Prueba de Sensibilidad de disolventes: Acetonitrilo

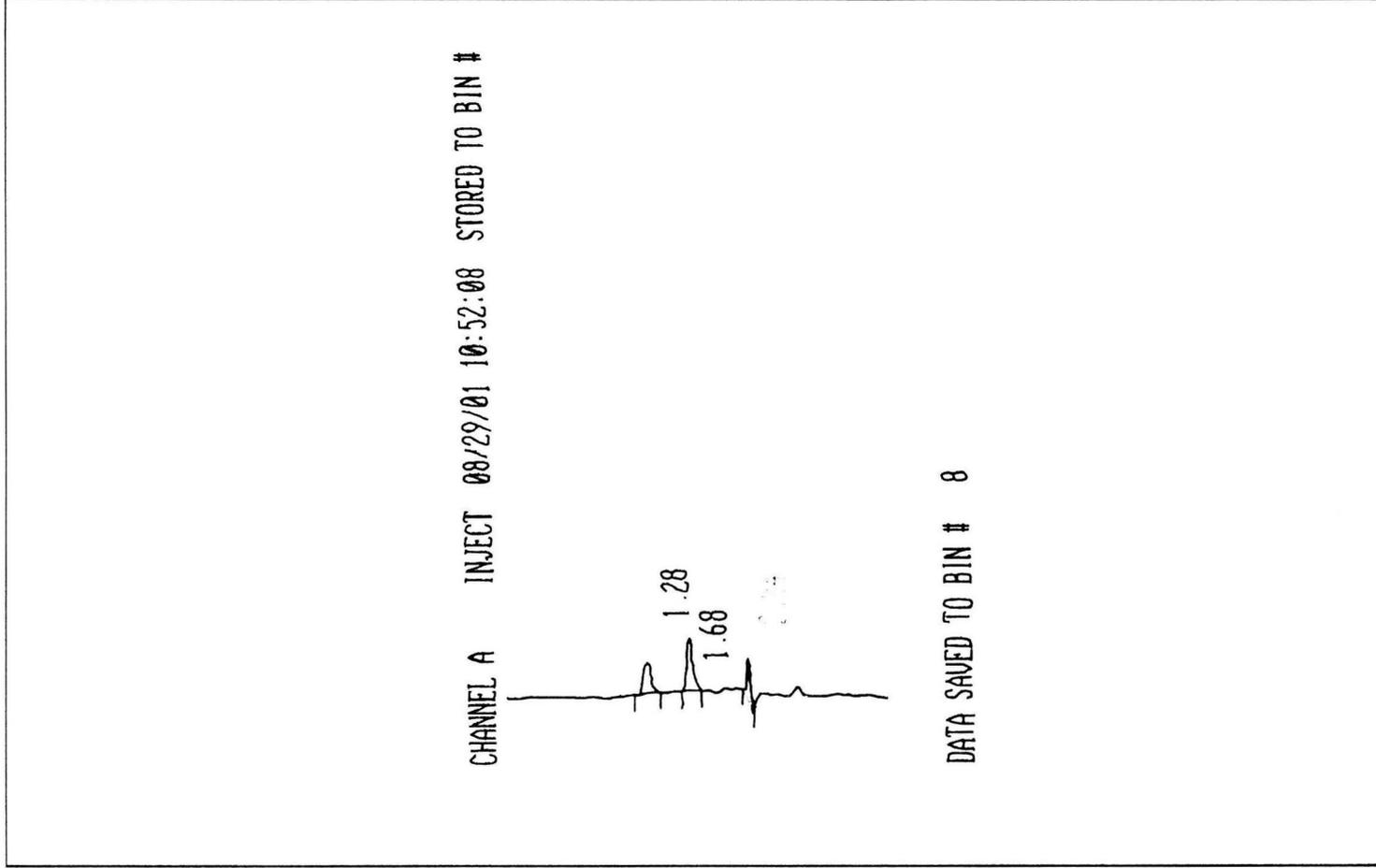


Figura 7.-Prueba de Sensibilidad de Disolventes: Hexano

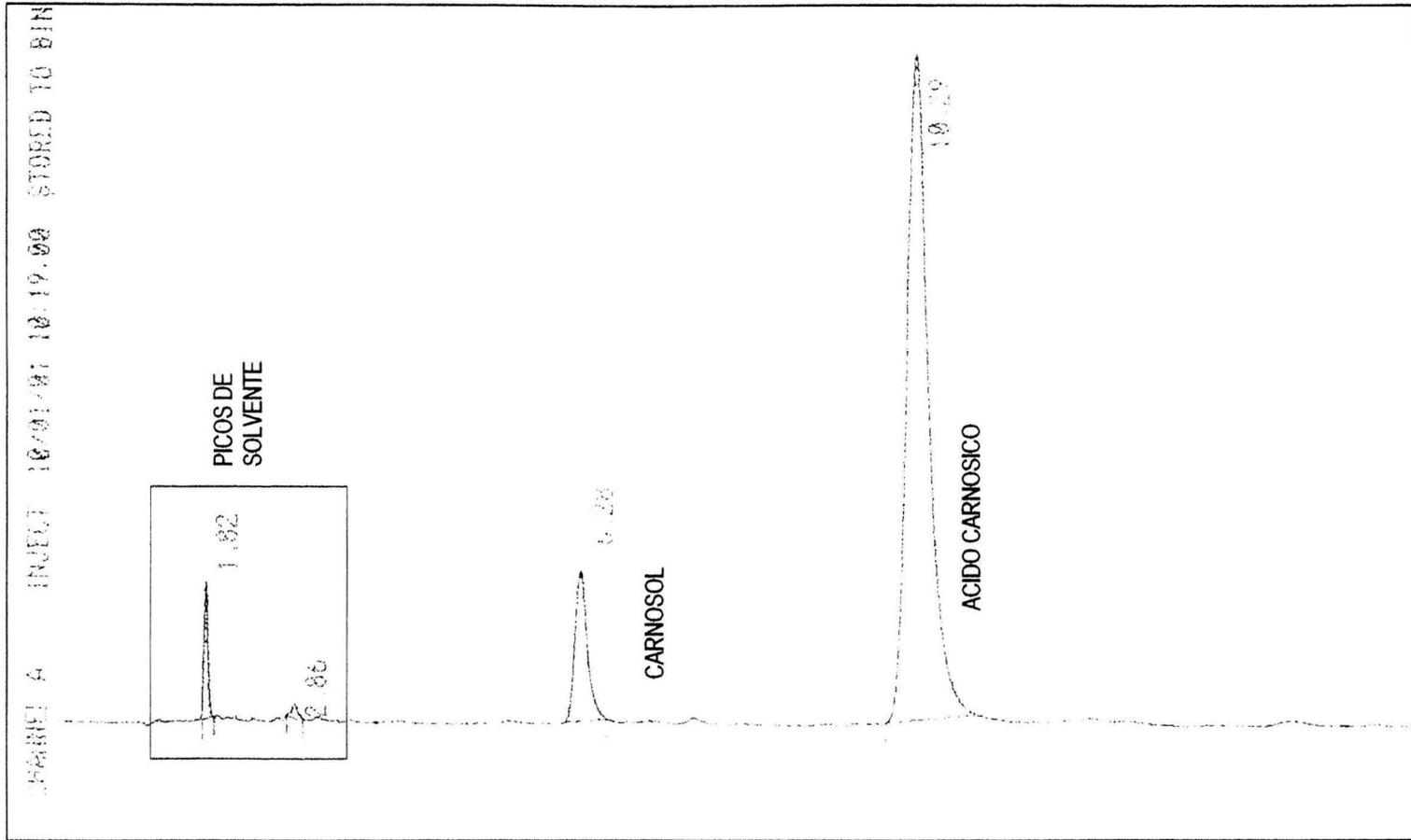


Figura 8.- Cromatograma de Estándar de Ácido Carnósico

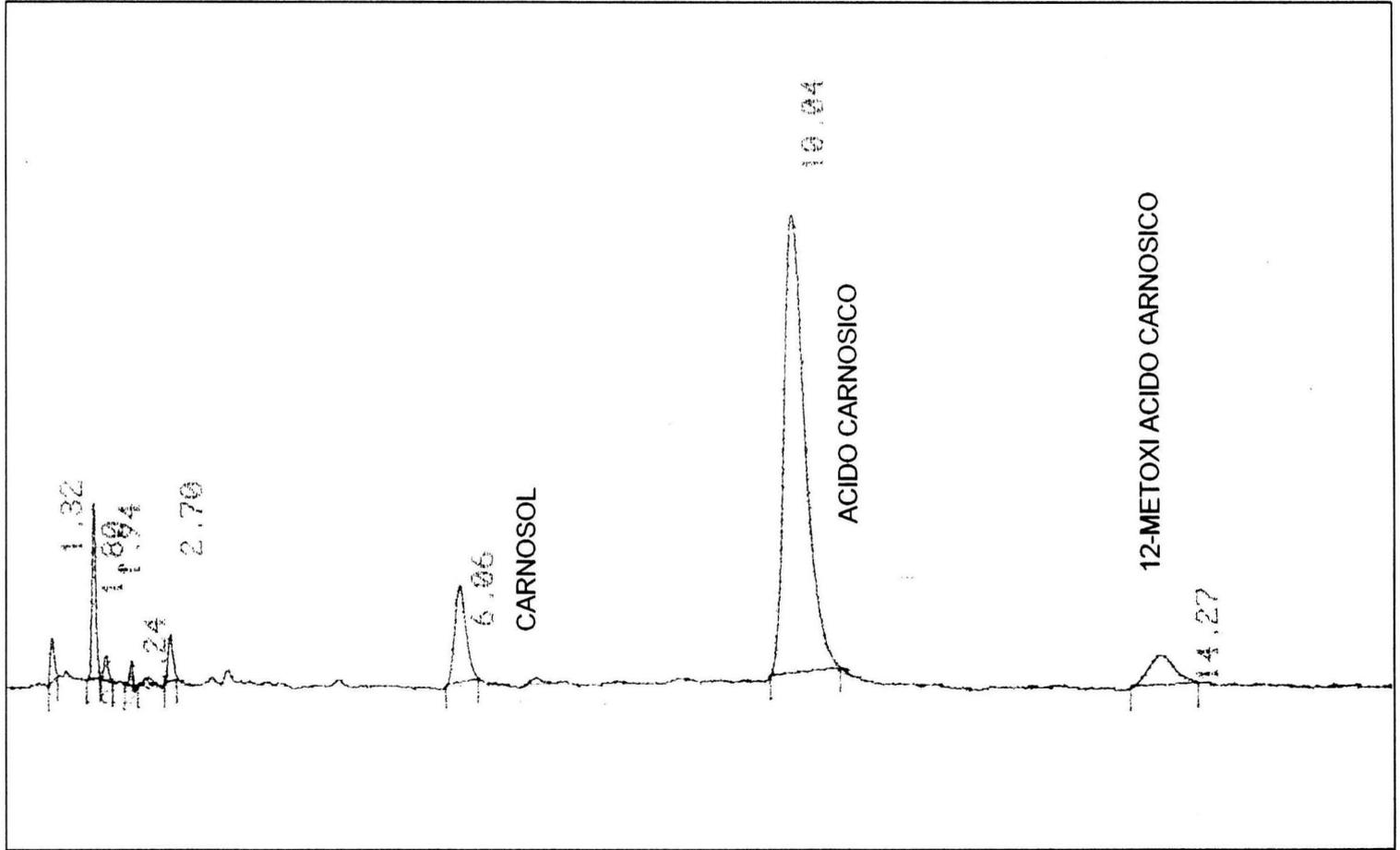


Figura 9.- Cromatograma de Extracto en Polvo

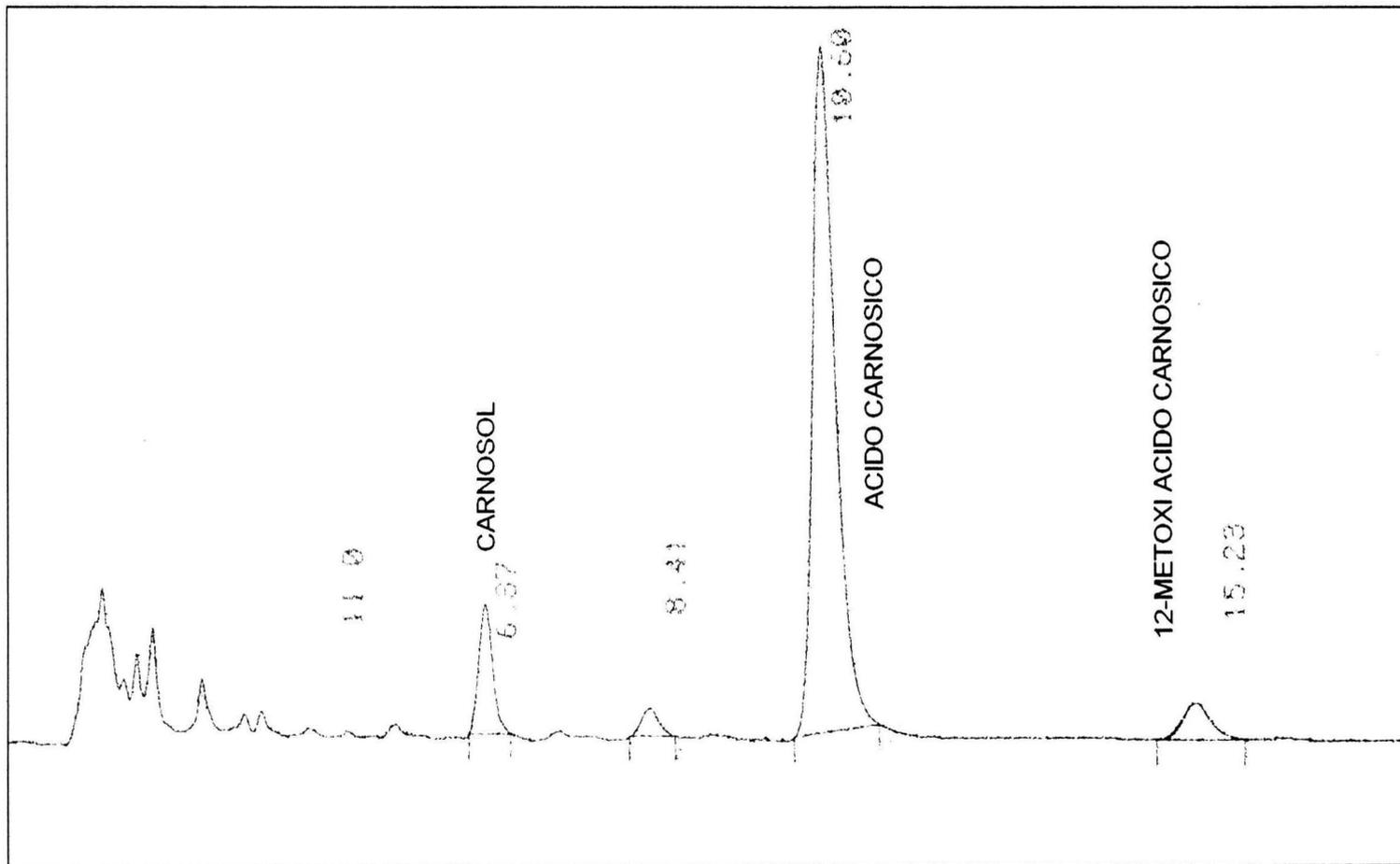


Figura 10.- Solución Etanólica

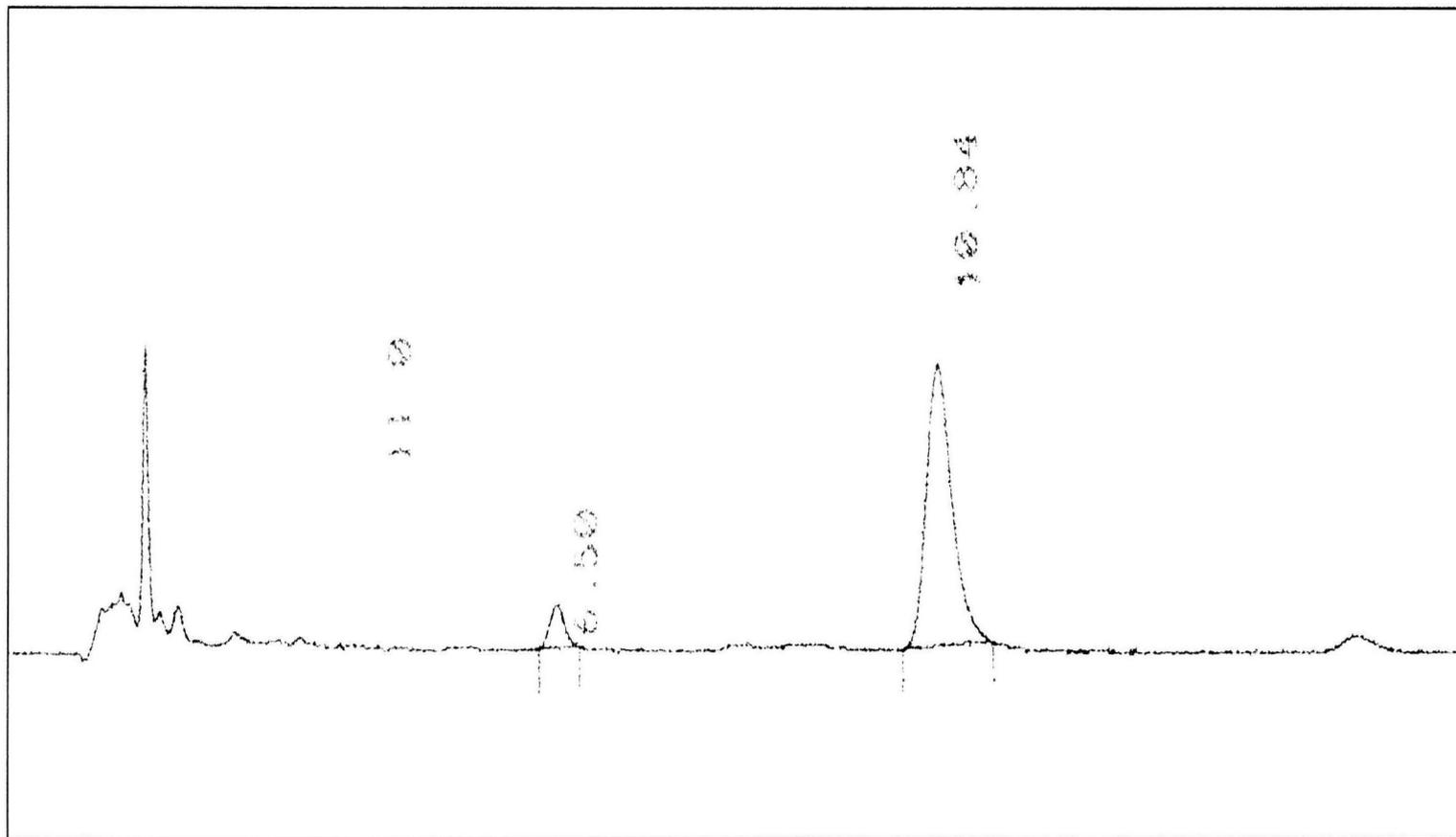


Figura 11.- Cromatograma de Retenido en Filtro

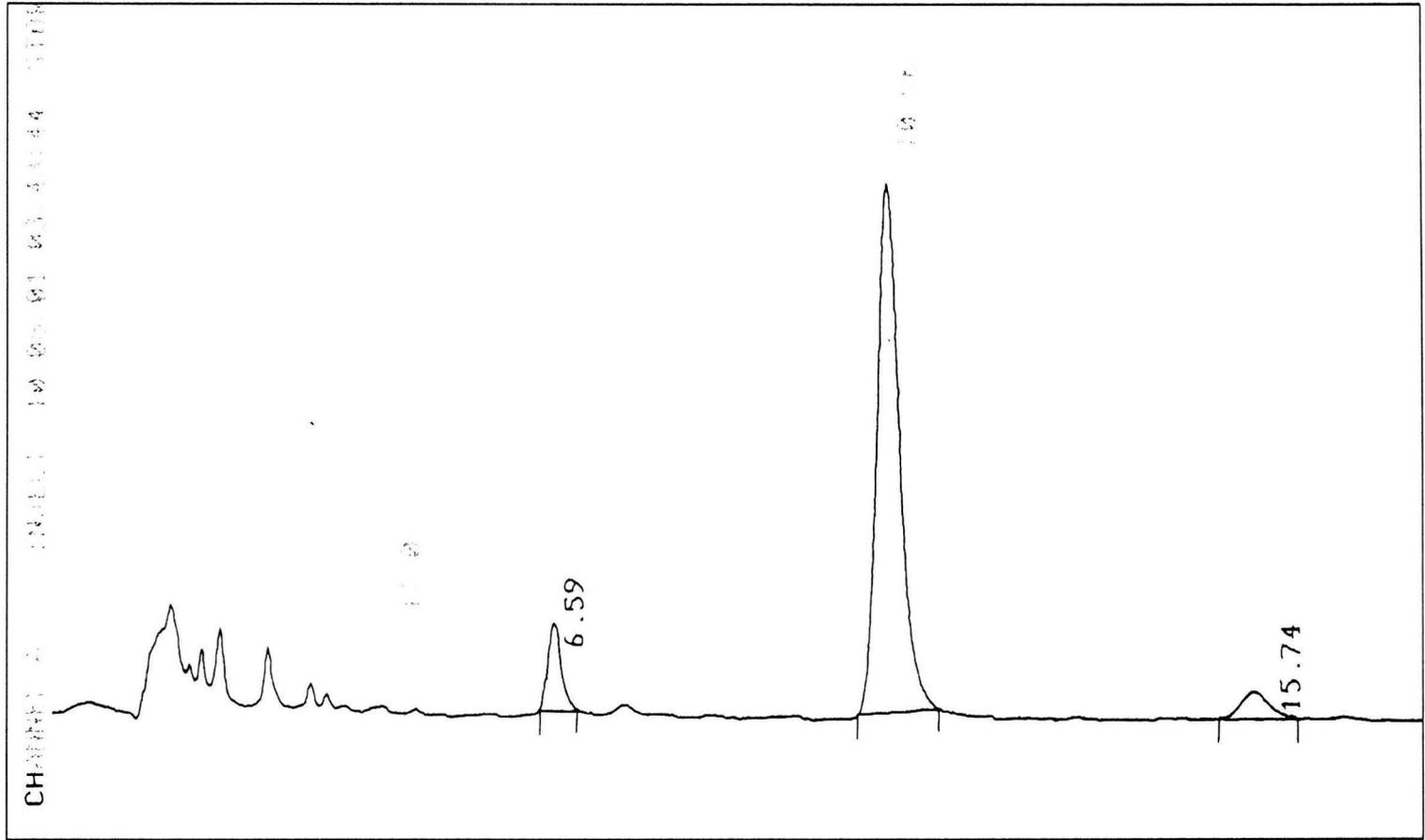


Figura 12.- Cromatograma de Aguas Madres

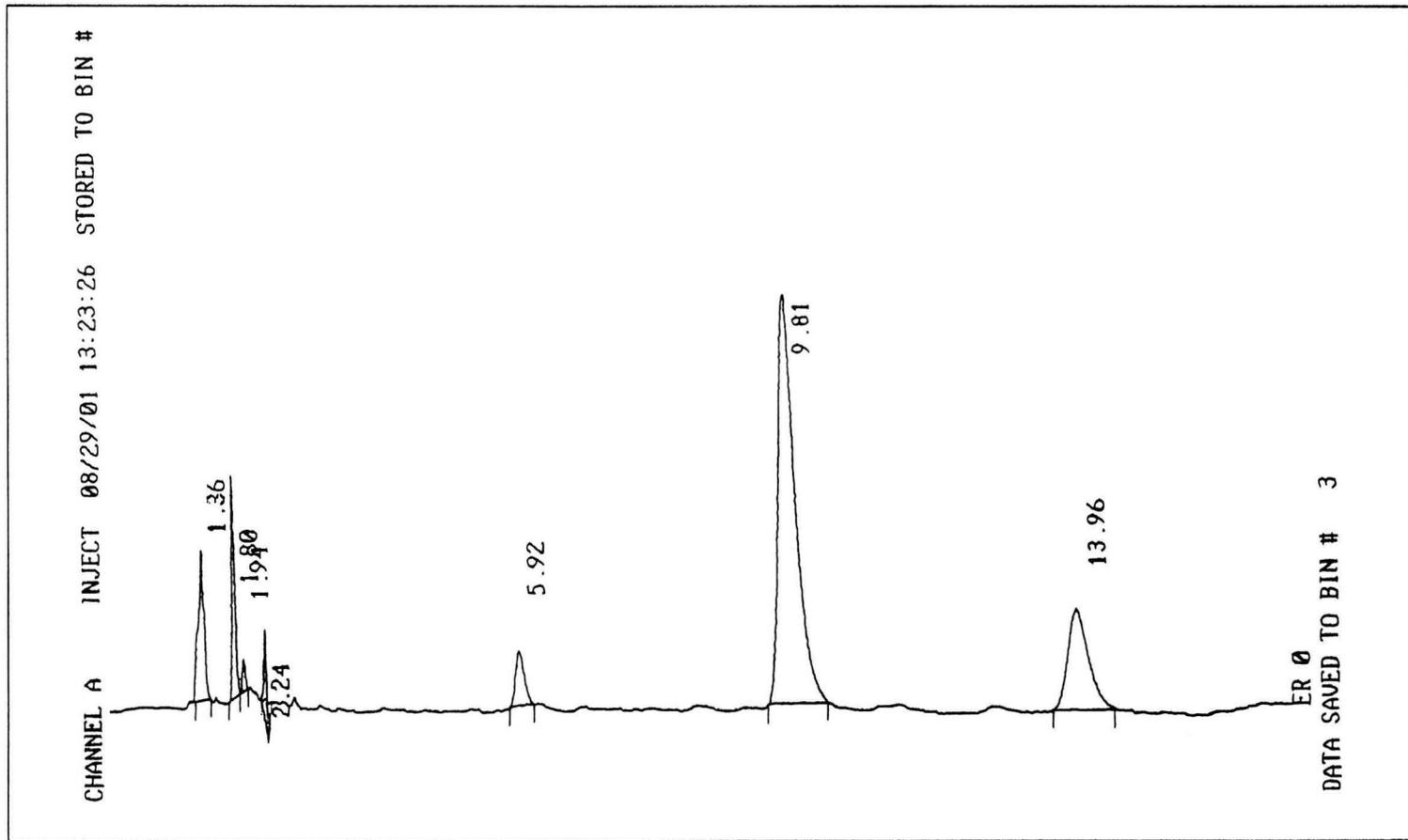
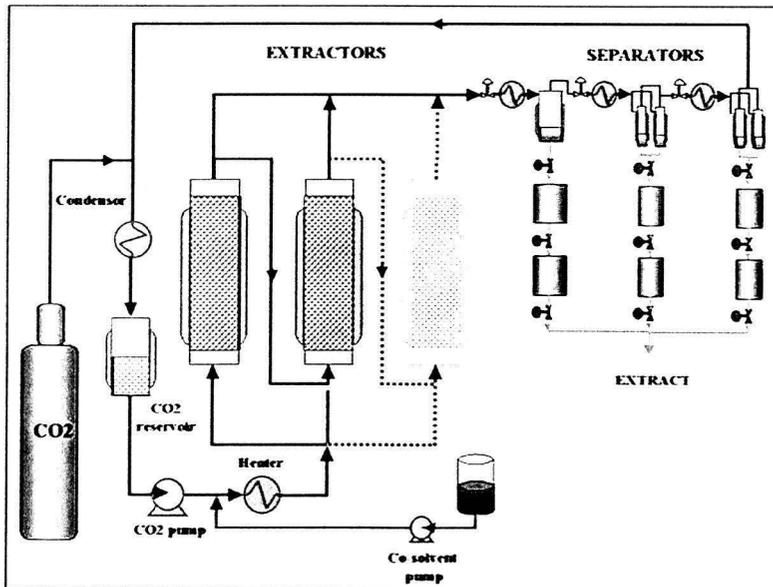
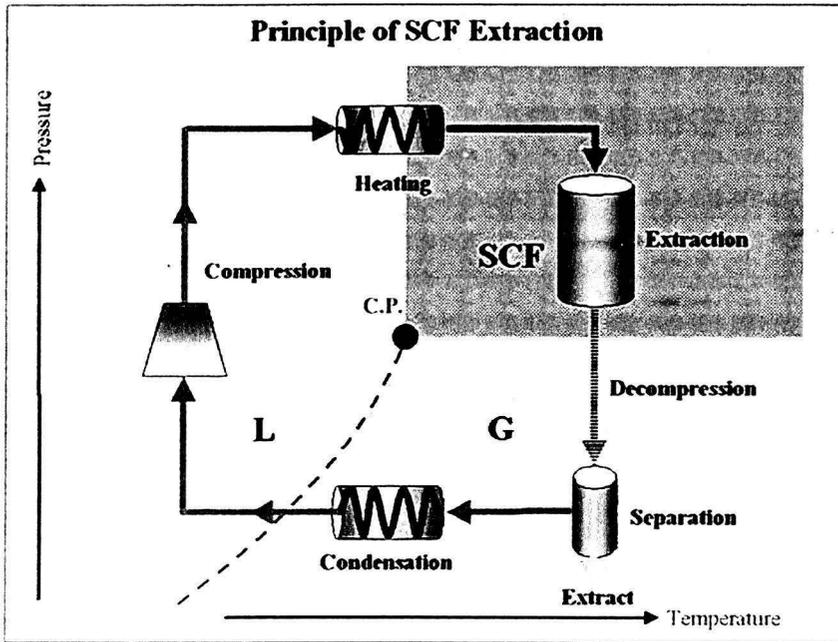


Figura 13.- Cromatograma de Extracto Comercial



Figuras 14 y 15, Diagramas esquemáticos para la extracción por medio de Fluidos Supercríticos.