

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS VARIABLES DE EXTRACCIÓN SOBRE EL
RENDIMIENTO Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS SFE
DE *Salvia Officinalis*.**

LADY JOHANNA ALVAREZ CÁRDENAS



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2011**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS VARIABLES DE EXTRACCIÓN SOBRE EL
RENDIMIENTO Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS SFE
DE *Salvia Officinalis*.**

LADY JOHANNA ALVAREZ CÁRDENAS

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Químico**

Director de proyecto

Dr. JAIRO RENÉ MARTÍNEZ

Químico PhD.

Codirector de proyecto

Dra. ELENA STASHENKO

Química PhD.



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

A Dios, y a la santísima virgen María que con su poder y su infinito amor me dieron la fortaleza y la sabiduría necesaria, a mis padres Jesús Antonio Álvarez y María Luisa Cárdenas por ser los cómplices ideales en todo momento que hicieron de mí una mujer de bien y que día a día fueron el motivo que me impulsó a iniciar este camino para convertirme en una persona mejor, a mi hermano Juan Gabriel Álvarez quien siempre me ayudo y me tendió su mano en los momentos más difíciles, a mi madrina Rosalba Gil por confiar en mí, por tener constantemente una mirada tierna y las palabras adecuadas para no permitirme caer, a mis maestros que pusieron en mi cada grano de conocimiento que esperan ser enriquecidos con la experiencia profesional, a mis amigos Duván, Ruso, Zaid, Willen, Feiry y Julián que estuvieron ahí cada segundo y que hicieron de la universidad la mejor etapa de mi vida que hoy culmina para dar inicio a la profesión.

Lady Johanna Álvarez Cárdenas

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios por todas las bendiciones recibidas durante la universidad.

Al Doctor Jairo René Martínez y la Doctora Elena Stashenko por la oportunidad de trabajar en el grupo de investigación y la confianza y aporte de conocimientos en la realización del trabajo de grado. Así mismo a cada uno de sus integrantes.

Al Ingeniero Alexander Quitián toda la ayuda que me brindó en la comprensión y análisis del proceso

Al Doctor Gustavo Bolaños, por atender mis solicitudes y por tomarse el trabajo de visitar el complejo agroindustrial CENIVAM y conocer el equipo de extracción.

A Carlos Alberto Ruíz Nova, estudiante de maestría en Química, quien amablemente me orientó y me capacitó para el manejo del equipo de extracción.

A Ginna Arias, estudiante de maestría en Química, quien me orientó para analizar los datos de actividad antioxidante (Método ORAC).

A toda mi familia por estar siempre que necesite fuerzas para salir adelante, por confiar siempre en mí y formarme como la persona que soy hoy en día. Porque son lo mejor de mi mundo y sin ustedes no tendría sentido nada. A mi primito consentido Junior por acompañarme y ser un motivo más para salir adelante.

A todos compañeros y amigos, Ruso, Zaid, Duván, Carlos, Feiry, Willen, Sindy, Paola, Yansy, Julio, Julián, John Jairo, Marlon, Selene, Jenny, Fernando y otros que se me escapan por compartir conmigo toda esta etapa y hacerla inolvidable.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	14
2	MARCO TEÓRICO	16
2.1	Estado supercrítico.....	16
2.2	El CO ₂ como fluido supercrítico	17
2.3	Variables del proceso de extracción.	18
2.3.1	Presión.....	18
2.3.2	Temperatura..	19
2.3.3	Humedad y secado del material vegetal.	20
2.3.4	Flujo de solvente.	21
2.3.5	Tiempo de extracción.	21
2.3.6	Condiciones de separación.	21
2.4	Antioxidantes tipo fenólico.	22
2.5	Salvia officinalis.....	23
2.6	Extracciones de S. officinalis con CO ₂ supercrítico.....	23
2.7	DISEÑO DE EXPERIMENTOS	24
2.8	Balance de masa.	24
2.9	Balance de Energía	25
2.10	Estimación de costos.	26
3	METODOLOGÍA.....	26
3.1	Tratamiento postcosecha	26
3.2	Pruebas de secado.....	27

3.3	Extracción con CO ₂ supercrítico).....	27
3.3.1	Condiciones de operación.....	28
3.3.2	Proceso de extracción.....	28
3.3.3	Aplicación del diseño.....	29
3.3.4	Análisis cromatográfico.....	29
3.3.5	Cromatografía líquida.....	29
3.3.6	Identificación y reconocimiento de los analitos de interés.....	30
3.3.7	Método ORAC.....	30
3.4	Balance de Masa.....	31
3.5	Estimación de costos.....	31
4	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	31
4.1	Rendimiento.....	31
4.2	Actividad antioxidante.....	33
4.3	Balance de Masa.....	35
4.4	Balance de energía.....	36
4.5	Estimación del costo de extracción.....	36
5	CONCLUSIONES.....	38
6	RECOMENDACIONES.....	39
7	BIBLIOGRAFÍA.....	40
8	ANEXOS.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama de fases del CO ₂	16
Figura 2.	Isotermas típicas de la solubilidad de un sólido en un fluido supercrítico	20
Figura 4.	<i>Salvia officinalis</i>	23
Figura 5.	Extractor con CO ₂ supercrítico <i>SFE-2000-2-FMC50</i> (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.).	27
Figura 6.	Cromatógrafo líquido con detector de arreglo de diodos <i>Agilent Technologies 1200</i> (Miami, FL, EE.UU.) y sistema de procesamiento de datos.	30
Figura d-1.	Respuesta experimental Vs respuesta calculada con la ecuación lineal.	47
Figura d-2.	Distribución normal de residuos.	48
Figura d-3.	Residuos Vs Rendimiento experimental (Y exp).	48
Figura k-1	Dinámica de las publicaciones (artículos y revisiones) sobre la extracción con fluidos supercríticos.	59
Figura k-2	Número de publicaciones sobre la extracción con fluidos supercríticos de compuestos con actividad antioxidante en <i>S. officinalis</i> .	60
Figura k-3	Revistas con mayor número de publicaciones sobre la obtención de extractos con fluidos supercríticos	61
Figura l- 2.	Principales unidades de un equipo para la extracción con fluido supercrítico	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Algunas propiedades de los disolventes en diferentes estados de agregación de la materia.	17
Tabla 2.	Variación de los parámetros de operación.	28
Tabla 3.	Datos de rendimiento calculado y obtenido experimentalmente y residuos.	32
Tabla 4.	Datos extrapolados de la actividad antioxidante de cada experimento usando la curva de calibración.	34
Tabla 5.	Balance de masa con mayor y menor acumulación	35
Tabla b-1.	Análisis de varianza del rendimiento	45
Tabla e-1.	ANOVA para actividad antioxidante (AA)	50
Tabla f-1	Datos para realizar la curva de calibración.	51
Tabla i-1.	Datos de calor de los equipos utilizados en la extracción	53
Tabla i-2.	Valores de las variables para el balance de energía	54
Tabla i-3.	Balance de energía	55
Tabla j-1.	Costo de inversión fija	56
Tabla j-2.	Costo aproximado de cada experimento	57
Tabla j-3.	Resumen de costos y precio de venta	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo a.	Niveles (+,-) de las variables escogidas para el diseño. experimental fraccionado 2^{7-2} con resolución IV.	43
Anexo b.	Gráfica de distribución normal (rendimiento).	44
Anexo c.	Cálculo del error experimental a partir de las pruebas de tamaño de partícula y sus respectivos duplicados.	46
Anexo d.	Ecuación lineal de rendimiento.	46
Anexo e.	Distribución normal para la actividad antioxidante (AA).	49
Anexo f.	Curva de Calibración y datos extrapolados de la determinación de actividad antioxidante según el método ORAC.	50
Anexo g.	Balance de masa.	51
Anexo h.	Valores de las variables del balance de energía.	52
Anexo i.	Balance de energía.	53
Anexo j	Estimación de costos.	56
Anexo k	Cienciometría	58
Anexo l	Partes del equipo de extracción con fluido supercrítico	62

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS VARIABLES DE EXTRACCIÓN SOBRE EL RENDIMIENTO Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS SFE DE *Salvia officinalis**

AUTORES: LADY JOHANNA ÁLVAREZ CÁRDENAS**

Palabras , *Salvia officinalis*, extracción con fluido supercrítico, antioxidantes, método ORAC, diseño experimental fraccionado.

Debido a las reglamentaciones sanitarias y a las necesidades del consumidor se planteó la necesidad de reemplazar las sustancias sintéticas por las de origen natural especialmente las aisladas como componentes en los extractos de plantas cultivadas bajo buenas prácticas agrícolas como la *salvia officinalis* especie de la familia Labiatae y de hasta 70 cm de altura. Para ello se realizó la extracción con fluido supercrítico (SFE) aplicando un diseño experimental fraccionado 2^{7-2} con resolución IV para calcular el rendimiento de cada extracción y medir actividad antioxidante utilizando para este fin el método ORAC. Se empleó un extractor con CO₂ supercrítico SFE-2000-2-FMC50 (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.). El CO₂ fue empleado como disolvente porque es un gas inerte, de baja toxicidad, económico y no queda como residuo en los extractos puesto que a presión atmosférica vuelve a ser gas. De esta manera se determinaron las variables que influían significativamente en cada una de las respuestas obteniendo para rendimiento una ecuación lineal que modela el proceso y para actividad antioxidante el análisis de las variables más incidentes. Posteriormente se realizaron balances de masa y energía y por último el estudio económico del proceso para obtener 1 kg de extracto natural de *salvia officinalis* de manera que la inversión pudiera ser recuperada en 5 años.

*Proyecto de grado.

**Facultad de Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Jairo René Martínez. Codirectora: Elena E. Stashenko.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF EFFECT OF VARIABLES ON THE EXTRACTION PERFORMANCE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS OF *Salvia* SFE.

AUTORES: LADY JOHANNA ÁLVAREZ CÁRDENAS**

Keywords: *Salvia officinalis*, supercritical fluid extraction, antioxidants, ORAC method, experimental design installment.

Health regulations and consumer needs have prompted the need to replace synthetic substances by compounds of natural origin. The present study employed leaves and stems from *Salvia officinalis* grown under good agricultural practices. This is an aromatic plant from the Labiatae family which grows up to 70 cm in height. A 2^{7-2} fractional factorial design was used to examine the effect of various extraction parameters on yield and antioxidant activity of the extracts obtained with CO₂ under supercritical conditions. A Thar SFE-2000-FMC50 extractor was used (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, USA). CO₂ was used as solvent because it is an inert gas, low toxicity, inexpensive and not left as residue in the extracts since at atmospheric pressure gas is again. Antioxidant capacity was estimated by means of the ORAC method. A linear model for yield prediction was constructed with those variables which were found to have a significant effect. The variables with effect on extract antioxidant activity were determined. Mass and energy balances were performed. Finally, an economic study of production costs for 1 kg of *Salvia officinalis* extract was employed to calculate the price which permitted to recover the investment in 5 years.

**Undergraduate thesis.

**Physicochemical faculty. Chemical Engineering School. Director: Jairo René Martínez.
Codirector: Elena E. Stashenko.

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente los antioxidantes son sustancias muy utilizadas en productos alimenticios, de aseo personal, cosméticos y farmacéuticos, entre otros. Frecuentemente se emplean los antioxidantes cuya síntesis y purificación implica el uso de reactivos y disolventes en su mayoría tóxicos, como el metanol y acetato de etilo que contaminan el producto final y a su vez el ambiente.

Actualmente los antioxidantes son sustancias muy utilizadas en productos alimenticios, de aseo personal, cosméticos y farmacéuticos, entre otros. Frecuentemente se emplean los antioxidantes cuya síntesis y purificación implica el uso de reactivos y disolventes en su mayoría tóxicos, como el metanol y acetato de etilo que contaminan el producto final y a su vez el ambiente.

Debido a las exigencias de los consumidores y las reglamentaciones sanitarias, se plantea la necesidad de reemplazar las sustancias sintéticas por las de origen natural, especialmente las aisladas como componentes en los extractos de plantas cultivadas bajo buenas prácticas agrícolas, como la *Salvia Officinalis*, especie de la familia Labiatae cultivada en el municipio de Sucre, Santander. Esta especie tiene una extensa historia de uso como medicamento, puesto que posee gran potencial en el tratamiento del cáncer, por su actividad antitumoral, y existen reportes de investigaciones que han encontrado en *Salvia officinalis* sustancias con buena capacidad antioxidante e.g., flavonoides, ácidos fenólicos y ácidos diterpénicos.

La extracción con fluido supercrítico (SFE), se ha venido desarrollando desde hace tres décadas aproximadamente, y es tomada como técnica de referencia en el presente proyecto. Si bien presenta desventajas como el alto costo de los equipos y la falta de polaridad del CO₂ que no es muy apto para la extracción de

metabolitos muy polares, presenta ventajas como la baja toxicidad, alta pureza, no inflamabilidad y bajo costo del CO₂ en estado supercrítico empleado como disolvente. Además no exhibe degradación de los compuestos termolábiles de interés puesto que el CO₂ se utiliza a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente. El aumento de la densidad del CO₂ hasta valores cercanos a la de los líquidos consigue rendimientos de extracción más altos, gracias a la alta difusividad que posee el fluido supercrítico, próxima a la de los gases.

El objetivo del presente trabajo fue encontrar la combinación de los parámetros de operación de la extracción con fluido supercrítico (CO₂) de extracto natural de *Salvia officinalis*. Se realizaron balances de masa y energía para determinar la rentabilidad del proceso. El proyecto contó con el respaldo tecnológico y científico del Laboratorio de Cromatografía, las instalaciones y equipos del complejo agroindustrial piloto del CENIVAM que se encuentran ubicados en la Universidad Industrial de Santander y fue financiado con recursos del Ministerio de agricultura y Desarrollo Rural (MADR) y del Laboratorio de Cromatografía.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Estado supercrítico. Los fluidos supercríticos poseen propiedades que están entre las de los gases y los líquidos. Por esta razón el estado "crítico" inicia a partir del punto de convergencia de la densidad entre los estados líquido y gaseoso (Figura 1). Las densidades de los fluidos supercríticos más cercanas a la de los líquidos, les proporciona un mayor poder disolvente, mientras que las viscosidades y difusividades cercanas a la de los gases, elevan la transferencia de masa de los solutos hacia el fluido, a partir de la matriz vegetal [1]. (Véase Tabla 1) De igual manera el amplio rango de densidades que pueden adoptar permite que ésta varíe de forma significativa con pequeños cambios en la temperatura y la presión. Las conductividades térmicas son relativamente altas en el estado supercrítico y tienen valores muy grandes en las cercanías del punto crítico, porque en principio la capacidad calorífica tiende a infinito en el punto crítico [2]. La constante dieléctrica y la densidad muestran tendencias similares respecto a la presión, en cercanías al punto crítico.

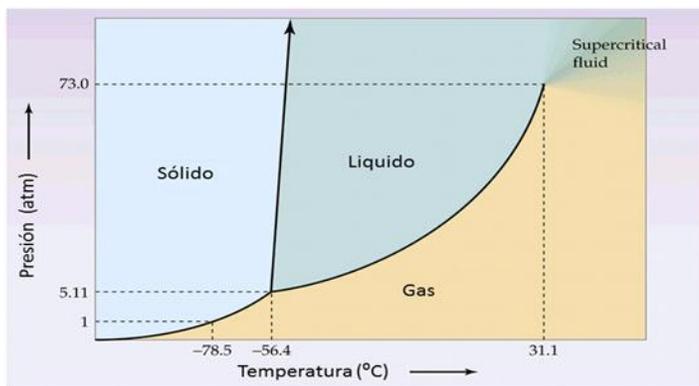


Figura 1. Diagrama de fases del CO₂ [24]

Tabla 1. Algunas propiedades de los disolventes en diferentes estados de agregación de la materia

Propiedad	Estado de agregación		
	Gas	Supercrítico	Líquido
Densidad, g/mL	10^{-3}	0,3	1
Difusividad, cm^2/s	10^{-1}	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-6}$
Viscosidad, g/cm.s	10^{-4}	10^{-4}	10^{-2}

2.2 El CO₂ como fluido supercrítico El CO₂ en estado supercrítico disuelve de manera excelente muchas moléculas orgánicas apolares debido a su momento dipolar, que tiene valor de cero. En este estado se convierte en el disolvente más utilizado en las extracciones de productos naturales con aplicaciones farmacológicas y alimenticias. Es un gas inerte, inodoro, sin sabor, económico y de baja toxicidad que lo hacen ventajoso frente a otros disolventes. Además no queda como residuo en los extractos puesto que a presión atmosférica se convierte en gas. Su presión crítica (P_c) es de 73,1 bares y su temperatura crítica (T_c) es de 31,1 °C. Debido a las condiciones de operación es posible extraer compuestos termolábiles. La energía requerida para llevar el CO₂ a condiciones supercríticas es menor que la asociada a la destilación de disolventes orgánicos convencionales [3].

Las extracciones de CO₂ crítico se usan en procesos para los cuales: [4]

- Las extracciones con disolventes están restringidas por los daños ambientales y en la salud;
- Se dispone de capital para invertir en el equipo de extracción

- Los productos cumplen las expectativas del consumidor, proporcionando de esta manera mayor promoción en el mercado.

2.3 Variables del proceso de extracción. Para el proceso de extracción es necesario tener en cuenta las variables que afectan el proceso.

2.3.1 Presión. Afecta significativamente la densidad y la capacidad solvatante de los fluidos supercríticos. Con el incremento de presión a temperatura constante, la solubilidad de los componentes aumenta. Las condiciones de extracción de antioxidantes tipo fenólico son más extremas que las de extracción de volátiles. El poder solvatante de los SF aumenta con el incremento de la presión por algunas razones como:

- Se aumenta la densidad del gas hasta valores típicos de los líquidos, por ende, su solubilidad volumétrica;
- Aumenta la solubilidad másica por la alta capacidad de retener solutos en espacios más pequeños;
- Se mantiene la difusividad típica de los gases y, con esto, los coeficientes de transferencia de los solutos a la fase del solvente.

La solubilidad de los solutos en los fluidos supercríticos no depende solo de las diferencias en la estructura molecular entre los solutos, sino también de la presión y la temperatura a las que se encuentre el fluido supercrítico. Estos factores pueden hacer que la solubilidad de un soluto varíe muchos órdenes de magnitud [1]. Si se considera la fase fluida como un gas no ideal, la fracción molar de soluto en la fase fluida (solubilidad) viene dada por la siguiente ecuación [5]:

$$y = \frac{P_v}{P} * \frac{1}{\phi} * \exp\left[\frac{v^2(P-P_v)}{RT}\right] \text{ Ecuación 1.}$$

Siendo P_v la presión de vapor y ϕ el coeficiente de fugacidad de la fase gaseosa, que es función de T, P y que se define termodinámicamente como:

$$RT \ln \phi = \int_0^P \left(v_m - \frac{RT}{p} \right) dp \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde v_m es el volumen molar de la fase fluida, y que se calcula con la ecuación de Peng-Robinson:

$$P = \frac{RT}{V_m - b} - \frac{a\alpha}{V_m^2 + 2bV_m - b^2} \quad \text{Ecuación 3.}$$

$R =$ constante de los gases (8,31451 J/mol·K)

$$a = \frac{0,45723553R^2T_c^2}{P_c} \quad \text{Ecuación 4.}$$

$$b = \frac{0,07779607RT_c}{P_c} \quad \text{Ecuación 5.}$$

$$\alpha = \left(1 + \left(0,37464 + 1,54226\omega - 0,26992\omega^2 \right) \left(1 - T_r^{0,5} \right) \right)^2 \quad \text{Ecuación 6.}$$

$$T_r = \frac{T}{T_c} \quad \text{Ecuación 7.}$$

Donde ω es el factor acéntrico del compuesto.

2.3.2 Temperatura. La solubilidad de los compuestos aumenta con la disminución de la temperatura; en contraste, a altas presiones, la solubilidad de los solutos aumenta con los incrementos de temperatura. En la **Figura 2** se observa el comportamiento de la competencia entre dos efectos: la reducción de la densidad del SF y el aumento en la presión que se lleva a cabo a presiones altas, 250-300 bares.

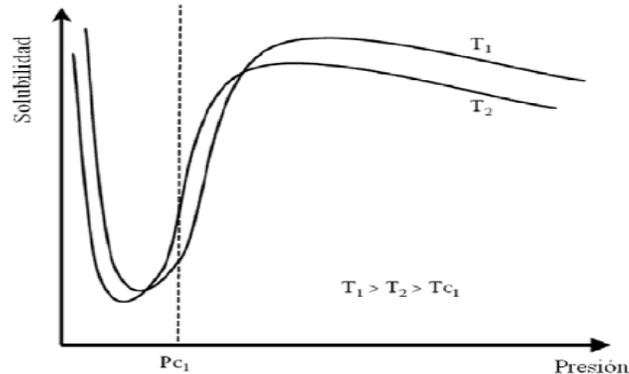


Figura 2. Isotermas típicas de la solubilidad de un sólido en un fluido supercrítico [1].

Algunos compuestos químicos como los fenólicos pueden polimerizarse u oxidarse a temperaturas superiores de los 50°C aunque algunos son más resistentes [2,6]. Bajo esta temperatura se han alcanzado altos rendimientos en la extracción del ácido carnósico a partir del romero [7]. Además, las altas temperaturas actúan negativamente sobre propiedades como la textura y el color de los extractos, como en los del bambú, que fueron evaluados organolépticamente y mecánicamente [8].

2.3.3 Humedad y secado del material vegetal. Contenidos altos de agua no son deseables, debido a que la humedad actúa como una barrera en la transferencia de masa especialmente en los compuestos apolares [2, 9]. Por otro lado, la co-extracción de agua hace que algunos compuestos sufran descomposición hidrolítica [10]. Aproximadamente un 0,3% de agua es soluble en SF-CO₂, lo cual sirve para aumentar la polaridad del fluido. Un exceso de agua en el material hace que los analitos polares o hidrofílicos tiendan a permanecer en la fase acuosa, lo que hace que su recuperación sea muy baja [9]. El secado del material debe realizarse de forma cuidadosa. Si bien el secado en frío influye positivamente en la calidad de los extractos, el secado en horno se hace necesario para reducir la humedad y prevenir las consecuencias anteriormente

mencionadas, pero teniendo en cuenta la posible degradación térmica de algunos compuestos.

2.3.4 Flujo de solvente. Durante el inicio de la extracción flujos altos mejoran los rendimientos [4]. Los flujos altos de disolvente afectan los rendimientos de aceite obtenido a partir de semillas de apio [11]: al disminuir el flujo de 3 a 1 kg/h se aumenta el rendimiento en un 20%. En otros trabajos, *e.g.*, sobre la extracción de compuestos fenólicos a partir de los residuos de la uva [12], flujos altos no tuvieron ningún efecto sobre la cantidad de componentes extraídos; en la extracción de volátiles a partir del tomillo los incrementos en el flujo tampoco tenían efectos estadísticamente significativos [13].

2.3.5 Tiempo de extracción. Los reportes sobre esta variable muestran amplios rangos de operación. Para etapas estáticas-flujo igual a cero-, que suele aplicarse antes de las etapas dinámicas, se encuentran tiempos entre 1 min y 2 h; para las dinámicas se encuentran tiempos entre 15 min y más de 15 h [4]. Esta metodología ha mostrado resultados muy positivos. Tiempos muy prolongados aumentan el costo de extracción debido a que se reduce la dependencia del rendimiento de otras variables operacionales, como en el caso del extracto de caléndula en el que el rendimiento no varió bajo diferentes condiciones de presión. Pourmortazavi y colaboradores [9] encontraron, que operando con un periodo estático de 25 min y fijando periodos dinámicos de 20 y 30 min, la cantidad de compuestos menos volátiles aumentaba durante los 30 min; a su vez, la cantidad de los componentes más volátiles disminuía durante este periodo.

2.3.6 Condiciones de separación. Estas condiciones son comúnmente ignoradas por algunos autores de libros y artículos científicos, aunque son muy importantes para la recuperación cuantitativa y la composición final del extracto.

Actualmente se dispone de algunas opciones como: 1. Restrictores de presión y controles de temperatura, en donde el extracto queda condensado en recipientes cilíndricos y viales; 2. Adsorción para retener el extracto y reciclar el fluido; 3. Disolución del extracto en solventes líquidos y 4. Tecnologías de nanofiltración en membranas u ósmosis inversa [4, 9].

Dentro de la primera opción están los equipos en donde el extracto forma un ciclón dentro del recipiente, lo que permite separar los componentes de mayor peso molecular de los más livianos, además de separarse el CO₂ gaseoso. En estos equipos el control de la presión y la temperatura es importante, sobre todo, en la extracción de metabolitos volátiles, pues estos se arrastran por el CO₂ [14].

2.4 Antioxidantes tipo fenólico.

Los antioxidantes tradicionalmente se han dividido en dos grupos: Los antioxidantes primarios o preventivos que reducen la velocidad de iniciación de oxidación convirtiendo los hidroperóxidos ácidos (ROOH) en sus correspondientes alcoholes (ROH), y los antioxidantes secundarios o interruptores de la cadena, y que generalmente actúan por la adición de un átomo de hidrógeno al radical peroxilo e.g., compuestos fenólicos o vitamina E [15]. Otras clasificaciones pueden ser según el origen del antioxidante: Productos naturales, y sintéticos; ello depende de su estructura química: Fenólicos, quinonas, compuestos de azufre y enzimas [16]. Para que la sustancia se use como antioxidante debe poseer baja volatilidad y alta estabilidad, habilidad para actuar en bajas concentraciones; solubilidad y compatibilidad con otros componentes del sustrato oxidable; deben ser incoloros, no tóxicos y sin sabor ni olor. El término fenólico se refiere a compuestos monoméricos, oligoméricos o poliméricos con un anillo aromático que tiene enlazado uno o más grupos hidroxilo e.g., flavonoides, lignanos, taninos hidrolizables (polifenoles de elevado peso molecular >1000 Da). Los compuestos fenólicos figuran entre las principales clases de metabolitos secundarios de las

plantas y son los responsables de su color, polinización y protección contra los rayos UV e inclusive contra los patógenos.

2.5 *Salvia officinalis*. La salvia es un arbusto de hasta 70 cm de altura que pertenece a la familia Labiatae. Sus flores son de color violeta o azulado agrupadas en grupos de hasta 10. De origen mediterráneo presenta numerosos usos como antiséptico, astringente, antiinflamatorio, carminativo, bacteriostático, eupéptico, antitranspirante, cicatrizante y emenagoga [17].



- ❖ Nombre común: Salvia, Salima fina, Savia
- ❖ Nombre científico: *Salvia officinalis* L.
- ❖ Familia: Labiatae
- ❖ Hábitat: Sitios rocosos y secos

Figura 3. *Salvia officinalis*

2.6 Extracciones de *S. officinalis* con CO₂ supercrítico. *S. officinalis* presenta actividad antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos, como carnosol, ácidos carnósicos y rosmarínico, rosmanol, epi-rosmanol y carnosato de metilo, identificados principalmente en extractos etanólicos, alojados en las partes aéreas

Reverchon y colaboradores [18], trabajaron con hojas de Salvia con un porcentaje de humedad constante del 9,6%, diámetro de partícula de 0,25-3,1 mm, variaron la temperatura entre 45 y 60°C y presión entre 80 y 100 bar. Por otro lado, los compuestos terpénicos oxigenados tienen mayor efecto sobre la agradable fragancia del aceite esencial de *S. officinalis*, por esta razón buscaron las

condiciones experimentales con las cuales se obtuviera un extracto con proporciones mas altas de estos compuestos.

Otra variable evaluada por Reverchon y colaboradores fue el tiempo de extracción; los autores realizaron extracciones repetidas a diferentes tiempos (20-350 min). Concluyeron que los componentes más volátiles (hidrocarburos monoterpénicos y monoterpenos oxigenados) se extraían durante tiempos cortos (ca. 20 min), mientras, que los de peso molecular más alto y de menor volatilidad se obtenían en mayor proporción a tiempos más largos. La fracción colectada a 20 min contenía el 75% de monoterpenoides, mientras que la obtenida a 350 min contenía tan solo el 37%.

En otro trabajo elaborado por Aleksovski y Sovova [19] utilizaron hojas de *S. officinalis* pulverizadas, con una humedad del 9,8%, emplearon un colector a presión atmosférica en forma de U, sumergido en un baño de hielo seco-etanol (-97°C). En este trabajo se encontró que la cantidad de monoterpenoides aumentaba aproximadamente dos veces con el incremento de la presión y la temperatura desde los 9 bares y 40°C a los 12,8 bares y 50°C.

2.7 DISEÑO DE EXPERIMENTOS Se debe determinar cuáles factores afectan de manera significativa la respuesta, para no perder tiempo ni recursos [20]. Para ello se realizan experimentos factoriales o factoriales fraccionados en casos tales como: la cantidad de experimentos excede los recursos, solo se necesita conocer la interacción de los factores principales y las interacciones de bajo orden y se hace la suposición de que solo unos cuantos efectos son importantes. Estos experimentos incluyen variables con niveles altos y bajos que serán establecidos de acuerdo con la experiencia del investigador y las limitaciones operacionales del sistema [21].

2.8 Balance de masa. Una de las leyes de básicas de la física es la ley de la conservación de la masa. Esta expresa en forma simple que la masa no puede

crearse ni destruirse, solo transformarse. Por consiguiente la masa total de todos los materiales que entran en un proceso debe ser igual a la masa total de todos los materiales que salen del mismo, mas la masa de los materiales que se acumulan o permanecen en el proceso.

$$\text{Acumulación} = \text{Entradas} - \text{Salidas} \quad \text{Ecuación 8.}$$

Además se debe definir si durante el proceso ocurre o no reacción química, si ocurre se debe aplicar estequiometria.

2.9 Balance de Energía La energía puede manifestarse de varias maneras. Algunas de sus formas más comunes son la entalpía, energía eléctrica, la energía química (en términos de la entalpía de la reacción), la energía cinética, la energía potencial, el trabajo y el flujo de calor. Un tipo de balance de energía más útil para el flujo de fluidos, en especial de líquidos, es una modificación del balance total de energía que considera la energía mecánica. La energía mecánica es una forma de energía que es, o bien un trabajo, o una forma que puede transformarse directamente en trabajo. La energía que se convierte en calor, o en energía interna, es trabajo perdido o una pérdida de energía mecánica causada por la resistencia friccional al flujo; dicha pérdida es la suma de todas las pérdidas por fricción por unidad de masa. A continuación, las ecuaciones describen el balance de energía general [EC. 9], el calor total [EC: 9] y los calores calculados por conducción a través de un cilindro [Ec. 10-EC 13] [22].

$$f_s h_s - f_e h_e + Q_s = 0 \quad \text{Ec. 9}$$

$$Q_T = Q_s + Q_p \quad \text{Ec. 10}$$

$$Q_s = UA (T_f - T_i) \quad \text{Ec. 11}$$

$$Q_{ps} = \frac{2\pi (T_f - T_i)}{\frac{1}{r_{ip} * K_{acero}} + \frac{\ln \frac{r_{ep}}{r_{ip}}}{K_{acero}} + \frac{\ln \frac{r_{chp}}{r_{ep}}}{K_{acero}} + \frac{1}{r_{chp} * h}} \quad \text{Ec. 12}$$

$$Q_{ec} = \frac{2\pi (T_f - T_i)}{\frac{1}{r_{ic} * K_{vidrio}} + \frac{Ln \frac{r_{ev}}{r_{iv}}}{K_{vidrio}} + \frac{Ln \frac{r_{ic}}{r_{ev}}}{K_{acero} * K_{vidrio}} + \frac{Ln \frac{r_{ec}}{r_{ic}}}{K_{acero}} + \frac{Ln \frac{r_{chc}}{r_{ec}}}{K_{acero}} + \frac{1}{r_{chc} * h}} \quad Ec. 13$$

Donde: Q_{Pe} y Q_{ec} son las velocidades de transferencia de calor que entran al portamuestra y al colector respectivamente, r_{ip} y r_{ep} los radios interno y externo del colector respectivamente, r_{chp} es el radio de la chaqueta de calentamiento del portamuestra, K es la conductividad térmica del material de fabricación, r_{ic} y r_{ec} son los radios interno y externo del colector respectivamente, h es el coeficiente de conducción térmica del aire, T_f y T_i temperaturas final e inicial y L , longitud del portamuestra o colector según el caso. Los valores de cada una se pueden ver en el Anexo a.

2.10 Estimación de costos. Debido a la gran demanda por productos que contengan antioxidantes de origen natural, muchas industrias desean invertir en este tipo de extracciones, pero tomando como referencia el precio actual de algunos de ellos y el elevado costo del equipo utilizado, es importante tener en cuenta los costos de producción total, de manera que el precio por kilogramo obtenido cumpla con las expectativas (productos naturales libres de procesos tóxicos) y se pueda recuperar la inversión en el menor tiempo posible.

3 METODOLOGÍA

3.1 Tratamiento postcosecha La planta de estudio, *S. officinalis* fue cultivada en el municipio de Sucre, Santander. Se recolectó, se pesó y se envió al Complejo Agroindustrial Piloto en el que se continuó el proceso de secado al ambiente. A continuación se picó en una picadora Retsch GM 20 (EE. UU.) Para disminuir un poco el tamaño de partícula y así pasar a otra etapa de picado en una picadora Willey Mill estándar modelo número 3 con la cual se obtuvo un tamaño

de partícula de 2 mm. A continuación se tamizó y se obtuvieron los siguientes rangos: 0,22-0,5 mm, 0,5-1 mm y 1-1,76 mm para las pruebas iniciales de secado.

3.2 Pruebas de secado Se realizaron pruebas de secado en un horno industrial de acero inoxidable de tres bandejas con tapa de vidrio distribuido por INDUMEGAS, Bucaramanga-Colombia, para garantizar que el material vegetal previo a la extracción conservara menos del 10% de humedad según lo reportado en otros trabajos. Se inició con experimentos a 40 °C durante 240 min con los que se obtuvo un porcentaje de humedad del 10,5 %. Posteriormente se probó a 50 °C durante 180 min con lo que se alcanzó una humedad aproximada del 7%. (Tomando como % de agua inicial el de la ficha técnica.)

3.3 Extracción con CO₂ supercrítico El equipo utilizado para la extracción de los antioxidantes fue un Thar SFE-2000-2-FMC50 (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.) (Figura 6.), equipado con un portamuestra en acero inoxidable con capacidad para 2 L, un sistema de separación y colección de los extractos tipo ciclón con capacidad para 0,5 L, regulador automático de presión; bombas de alta presión P-200A (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.), para el CO₂ y P-50 (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.), para el modificador; y un medidor de flujo Sitrans FC Massflo tipo MASS 6000 (Siemens AG, Berlín, Alemania).



Figura 4. Extractor con CO₂ supercrítico *SFE-2000-2-FMC50* (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.).

3.3.1 Condiciones de operación. Para el inicio de cada experimento se fijaron las condiciones de extracción. La tabla 2 muestra los niveles de las 7 variables escogidas para iniciar el diseño.

Tabla 2. Variación de los parámetros de operación.

	Nivel +	Nivel -
Presión (P) (bar)	500	300
Temperatura (T) (°C)	80	40
F lujo(g/min) (F)	60	20
Tiempo Dinámico (D) (min)	120	30
Tiempo Estático (E) (min)	30	0
Presión del colector (G) (bar)	10	1
Temperatura del colector (H) (°C)	48	28

3.3.2 Proceso de extracción. El proceso inicia con el depósito del material vegetal en el portamuestra (462-469 g). A continuación sale el CO₂ del cilindro, que pasa por un intercambiador de calor que se encarga de enfriar la corriente hasta un poco menos de la temperatura ambiente para asegurarse que entre líquido a la bomba (conectada al baño de enfriamiento que garantiza que la temperatura esté entre 2,5 – 5 °C) para incrementar la presión hasta la requerida para la extracción. Posteriormente llega al mezclador que solo estará abierto en los casos en los que se haga extracción simultáneamente con co-solvente. Luego pasa por el intercambiador de calor II que calienta la corriente hasta la temperatura deseada de extracción, sube por el portamuestra para entrar en contacto con el material vegetal depositado previamente y así arrastrar el extracto deseado. En seguida sale del portamuestra y pasa por la válvula reguladora de la presión que la disminuye para que el CO₂ retome su estado inicial de gas, entra al colector donde quedará el extracto depositado y el CO₂ saldrá por el venteo al

ambiente (Ver Anexo I) . Finalmente el extracto se pesó en una balanza analítica *Metler Toledo* (Küsnacht, Suiza) y se envasó en frascos color ámbar, bajo atmósfera de nitrógeno para protegerlos de la luz y minimizar la oxidación por el aire. Hasta su posterior análisis permanecieron a 0°C.

3.3.3 Aplicación del diseño Para determinar cuáles variables (presión, temperatura, flujo, tiempo dinámico, tiempo estático, presión del colector temperatura del colector) son las que tienen incidencia significativa sobre las respuestas deseadas (rendimiento y actividad antioxidante), se utilizó un diseño experimental fraccionado 2^{7-2} con resolución IV que brindó la ventaja de que ningún efecto principal se confundiera con otro efecto principal ni con una interacción de dos factores. Se realizaron 32 experimentos variando las condiciones de operación. (Ver Anexo a). Las contribuciones de cada variable se evaluaron por el análisis de su varianza, ANOVA. De las dos respuestas obtenidas después de aplicar el diseño factorial fraccionado con resolución IV, se planteó un modelo para el rendimiento y la actividad antioxidante que indicó una aproximación de los valores de cada variable para el proceso de extracción. Se recomienda realizar la validación del modelo que en este caso por daños en el equipo no fue posible realizar

3.3.4 Análisis cromatográfico. El análisis cromatográfico comprendió la identificación y reconocimiento de metabolitos no-volátiles y volátiles.

3.3.5 Cromatografía líquida. Análisis por LC-DAD. El análisis cromatográfico de los componentes no volátiles en los extractos fue realizado en un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 (Miami, FL, EE.UU.), que consta de una bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, un inyector manual *Agilent Technologies series* 1200 G1328B y un detector UV-Vis de arreglo de diodos G1315B. El procesamiento de datos se realizó a través del sistema de datos *Agilent ChemStation* LC. **Figura 5.**



Figura 5. Cromatógrafo líquido con detector de arreglo de diodos *Agilent Technologies* 1200 (Miami, FL, EE.UU.) y sistema de procesamiento de datos.

3.3.6 Identificación y reconocimiento de los analitos de interés. La identificación de los componentes no-volátiles de los extractos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención, t_R y los espectros UV-Vis con los de sustancias de referencia certificadas, e.g. ácido rosmarínico, carnósico, caféico y apigenina. Para la reconfirmación de los componentes mayoritarios y reconocimiento de otros componentes presentes en los extractos se recomienda realizar un análisis en un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de masas, LC-MSTOF.

3.3.7 Método ORAC. Este método se basa en la medición de la fluorescencia de una molécula (fluoresceína) a la que se le somete a la acción de un generador de radicales libres. A medida que la molécula fluorescente es atacada y dañada por los radicales va perdiendo su fluorescencia. La labor de los antioxidantes es la de proteger la molécula, y cuanto más capacidad antioxidante tiene un compuesto o alimento, más se preserva la capacidad de emitir luz de la molécula en cuestión. El grado de protección se determina con un medidor de fluorescencia y se cuantifica en "equivalentes de Trolox" (TE). El Trolox es un análogo de la vitamina E que se usa como referencia [1].

3.4 Balance de Masa. El balance de masa se realizó para cada experimento de la siguiente manera. (Ver Ecuación 1)



Como masa de entrada el material vegetal con una humedad aproximada de 7% (por las pruebas de secado, **ver sección 3.2**) y como masa de salida el extracto y el material vegetal restante. Después de cada extracción el material vegetal se dejó en el portamuestra durante 12 h, para su posterior pesado puesto que si se pesaba enseguida, el peso aumentaba considerablemente posiblemente por algunas trazas de CO₂ que quedaban en el material. Debido a esto, el material vegetal ganó humedad, entonces se practicó una nueva prueba de secado para el material vegetal restante de la extracción durante 24 h a 100 °C, para determinar la cantidad de agua que ganó durante la extracción y durante el tiempo que quedó detenido en el portamuestra.

3.5 Estimación de costos. Se estimaron los costos de acuerdo con la inversión fija para adquisición del equipo de extracción y los objetos utilizados para el adecuamiento, el salario que debe pagarse al personal encargado de las extracciones y se calculó el precio aproximado de 1 kg de extracto teniendo en cuenta el dióxido de carbono gastado, la energía consumida (equipo y horno industrial) y gastos varios, de manera que la inversión pueda recuperarse en 5 años.

4 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Rendimiento. Con los resultados experimentales (Ver Anexo b.), se obtuvo que las variables que afectan el rendimiento en la gráfica de distribución normal son: P,T,F,D,H,TF,DG y EG (Ver. Anexo b). Posteriormente con la aplicación del ANOVA (Anexo b, Tabla b-1), se encontró que T,P,F,D,G, tienen una incidencia

significativa, los demás efectos son despreciables. Con este resultado, se planteó una ecuación que modelara el rendimiento de manera que se pudiera comparar gráficamente la respuesta calculada con la que se obtuvo experimentalmente. La mejor ecuación lineal encontrada incluyó P, T, F, D, G ($R^2=0,835$, error total experimental= 3,157 y LOF (Lack of fit) = 3,09). (Ver Tabla 3.) Este tipo de ecuación es utilizada cuando se realizan diseños experimentales con solo dos puntos el nivel superior y el inferior. Los errores experimental y del modelo son muy cercanos por ello se infiere que el modelo propuesto es bueno y que puede servir para una posterior optimización. El experimento 32, fue el que tuvo el mayor rendimiento (3,80 %) y se realizó a presión de 500 bar, (por lo que se aumentó la densidad, por ende la capacidad solvante), temperatura de extracción de 80 °C, que al igual que la presión aumentó la solubilidad por trabajar a presiones altas y que permitió la extracción de volátiles y antioxidantes; Flujo de 60 g/min que incrementó el contacto del solvente con el material vegetal y de este modo arrastró más extracto; tiempo dinámico de 120 minutos suficiente para obtener gran cantidad de extracto y presión del colector de 10 bar, que influyó en el momento del depósito del extracto en el colector auxiliar manteniéndolo comprimido e impidiendo que se fuera al ambiente por el tubo de venteo.

Tabla 3. Datos de rendimiento calculado y obtenido experimentalmente y residuos.

Y experimental	Y calculado	Residuo	Residuo ²
0,66	0,039	0,621	0,386
0,69	0,875	-0,185	0,034
1,04	1,106	-0,066	0,004
1,26	1,381	-0,121	0,015
0,58	1,228	-0,648	0,420
1,22	1,460	-0,240	0,057
2,84	2,296	0,544	0,296
1,22	0,873	0,347	0,120
1,88	1,709	0,171	0,029
1,54	1,940	-0,400	0,160
1,85	2,215	-0,365	0,133

1,39	1,788	-0,398	0,159
2,25	2,294	-0,044	0,002
3,34	3,130	0,210	0,044
0,5	0,039	0,461	0,213
0,83	0,875	-0,045	0,002
0,74	1,106	-0,366	0,134
1,21	1,381	-0,171	0,029
1,12	0,954	0,166	0,028
1,4	1,460	-0,060	0,004
2,4	2,296	0,104	0,011
0,97	0,873	0,097	0,009
1,79	1,709	0,081	0,007
2,15	2,215	-0,065	0,004
1,3	1,788	-0,488	0,238
1,88	2,063	-0,183	0,033
2,66	2,294	0,366	0,134
3,8	3,130	0,670	0,449

4.2 Actividad antioxidante. Con el resultado del método ORAC aplicado para analizar capacidad antioxidante (Ver tabla 4.), se realizó gráfica de distribución normal (Ver Anexo e) para identificar los efectos que tienen mayor incidencia durante la extracción. Con ello se determinó la contribución de cada variable por el análisis de su varianza ANOVA (Ver Anexo e, Tabla e-1) , que reportó que los efectos más significativos durante el proceso son la presión, la temperatura, el tiempo estático, el tiempo dinámico y las interacciones tiempo dinámico- Presión del colector (DG), flujo-tiempo estático (FE), temperatura-temperatura del colector (TH), presión-temperatura (PT). Al igual que con el rendimiento, se buscó la mejor ecuación que modelara el proceso, pero debido al tipo de diseño el cual omite información de muchos experimentos que no se realizaron porque excedían los recursos, no fue posible encontrar una ecuación lineal que describiera el proceso de manera confiable. La mejor ecuación lineal encontrada incluyó presión, temperatura, tiempo estático. flujo y la interacción flujo-tiempo estático (FE) ($R^2=0,41$, error total experimental= 79677 y el LOF=77517). Los errores experimental y del modelo son lejanos y la correlación de la ecuación no es buena,

por ello el modelo ajustado no predice correctamente la actividad antioxidante de los extractos. De esta manera puede inferirse que la superficie de respuesta probablemente no es lineal y que durante el cambio de un punto inicial a uno final pueden existir máximos y mínimos que varían la respuesta. De acuerdo con el resultado del ANOVA, se toma la presión (500 bar), que facilita la extracción de antioxidantes; temperatura de 80 °C a la cual los componentes termolábiles se conservan, tiempo dinámico de 120 minutos en el cual el CO₂ penetró el interior de los poros de la matriz heterogénea para aumentar la extracción por la falta de tensión superficial en este tipo de fluidos, tiempo estático de 20 min para que el CO₂ este mayor tiempo en contacto con el material vegetal y la presión del colector de 10 bar que comprime el extracto en el colector para evitar que éste sea arrojado al ambiente por el sistema de venteo.

Tabla 4. Datos extrapolados de la actividad antioxidante de cada experimento usando la curva de calibración.

Experimento	µM trolox / mg extracto
1	124,495
2	165,819
3	209,351
4	201,934
5	169,969
6	72,674
7	72,134
8	291,064
9	169,174
10	168,928
11	218,500
12	280,697
13	115,302
14	218,780
15	192,821
16	131,196
17	81,145
18	124,615
19	93,634

20	96,474
21	77,707
22	72,109
23	77,555
24	247,079
25	127,357
26	72,320
27	101,275
28	284,229
29	119,619
30	132,936
31	139,755
32	155,028

4.3 Balance de Masa. El balance de masa (Ver Anexo g.) indica que durante la extracción hay acumulación de masa en el material vegetal que corresponde a la humedad que adquiere por factores como: El dióxido de carbono de tipo industrial que posee cerca de 100 ppm de agua, tiempo de carga del material vegetal (5 min en los cuales gana aproximadamente el 2 % de humedad), el tiempo que dura depositado el material en el portamuestra después de la extracción sin que circule CO₂ hasta que es pesado. Sin embargo también puede ser atribuida a la humedad presente en el material vegetal internamente y que es extraída por el CO₂ por la falta de tensión superficial cuando se trabaja con fluidos supercríticos. En la tabla 5. Se presenta el balance del experimento con mayor y menor acumulación y las condiciones a las que se realizó la extracción.

Tabla 5. Balance de masa con mayor y menor acumulación

Experimento	Mve	MVs	E	Macumula
15	465,46	425,8945	10,47	29,10
24	463,81	437,5035	11,14	15,17

Mve: Material vegetal de entrada, Mvs: Material vegetal de salida, E: extracto,
Macumula: Masa que se acumula

El experimento 24, se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 500 bar, 80 °C, 60 g/min, 30 min de extracción, 10 bar de presión en el colector, 28 °C de temperatura en el colector y 20 min de tiempo estático presentó menos acumulación puesto que estuvo menos tiempo expuesto al ambiente, y las presiones de extracción y en el colector fueron suficientes para aumentar la transferencia de los solutos a la fase solvente.

4.4 Balance de energía El balance de energía (Ver Anexos h-i) se realizó para analizar la cantidad de calor que realmente entraba al portamuestra y al colector, de la proporcionada por las chaquetas de calentamiento para cada extracción según las condiciones de operación. Estas chaquetas trabajan a una potencia de 1000 W la del portamuestra y de 900 W la del colector. De este modo dependiendo del tiempo de extracción, una parte se transfiere al sistema y la otra parte se transfiere al ambiente puesto que el sistema no se encuentra aislado. Aproximadamente el 99,6% del calor proporcionado por la chaqueta del portamuestra y el 98,6 % del calor proporcionado por la chaqueta del colector se pierde al ambiente. (Ver Ec 3 y Anexo I). En este caso, el experimento se realizó a las siguientes condiciones: 500 bares, 40 °C, 60 g/min, 30 min de extracción, 20 min de tiempo estático y 1 bar y 28 °C en el colector. De esta manera se concluye que gran parte del calor proporcionado por las chaquetas se pierde puesto que el sistema no está aislado y a que el calor necesario para calentar hasta la temperatura deseada de extracción y separación no es elevado.

4.5 Estimación del costo de extracción La estimación se realizó teniendo en cuenta la inversión fija para adquirir el equipo de trabajo (Ver Anexo j, Tabla j-1) y el costo que tuvo realizar cada extracción según las condiciones de operación (Ver Anexo j, Tabla j-2). El precio de venta se fijó de manera que la inversión se recuperara en 5 años (ver Anexo j, Tabla j-3). Para obtener un kilogramo de extracto, es necesario realizar aproximadamente 56 extracciones a las siguientes condiciones: Presión de separación de 500 bar, temperatura de separación de 80 °C, flujo de CO₂ de 60 g/min, tiempo de extracción de 2 horas, tiempo estático de

20 min, presión del colector de 10 bar y temperatura del colector de 48 °C. Se necesitan 3 extracciones diarias realizadas por personal capacitado (Técnicos, Químicos, Ingenieros entre otros). El precio de venta por kg de extracto es de \$8'194.856. Este precio disminuye con un equipo de recirculación de CO₂ con el que se puede recuperar hasta el 98%. Aunque el precio de venta es elevado, es muy importante recalcar que el tipo de extracto obtenido, no es contaminante y es natural. Se debe tener en cuenta que dependiendo del origen del extracto puede utilizarse desde 0,5 hasta 5 g de extracto por kg de crema antiarrugas [23].(Para 1 kg de crema invertiría desde \$4097 hasta \$40.974 en extracto natural.

5 CONCLUSIONES

- El rendimiento de las extracciones de *Salvia officinalis* con CO₂ supercrítico fue afectado considerablemente por la presión, la temperatura, el flujo, el tiempo dinámico y la presión del colector y la actividad antioxidante de los extractos por la presión, la temperatura, el tiempo dinámico, el tiempo estático y las interacciones tiempo dinámico-presión del colector (DG), flujo-tiempo estático (FE), temperatura de extracción-temperatura del colector (TH) y presión-temperatura (PT)
- Las condiciones de extracción, el tiempo de carga del material vegetal y el tiempo que dura depositado el material vegetal en el portamuestra sin que circule CO₂ hasta que es pesado, incrementan la humedad que fue determinada como masa acumulada en el balance de masa.
- Durante la extracción se pierde aproximadamente el 99,6% del calor proporcionado por la chaqueta del portamuestra y el 98,6% del calor proporcionado por la chaqueta del colector puesto que el sistema no está aislado y el calor necesario para calentar hasta la temperatura deseada de extracción y separación no es elevado.
- El precio de venta de un kilogramo de extracto natural de *salvia officinalis* es de \$8'194.855, de manera que la inversión pueda ser recuperada en 5 años.

6 RECOMENDACIONES

- Verificar la ecuación lineal obtenida para rendimiento e iniciar un proceso de optimización de manera que se puedan determinar las mejores condiciones de operación según el tipo de extracto que se desee.
- Realizar un diseño experimental para la actividad antioxidante que determine una ecuación que modele de manera más precisa el efecto de las variables sobre la actividad antioxidante de los extractos
- Realizar cotizaciones de equipos de recirculación de CO₂ disponibles y viables para el laboratorio de manera que se pueda implementar y así reducir el costo de inversión y por ende el de venta para entrar competitivamente en el mercado de extractos naturales.

7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] LUQUE DE CASTRO, M. D., VALCÁRCEL, M. y TENA, M. T. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Ed. Reverté S.A.: Barcelona, España 1993, p.p. 1-375.
- [2] MARTÍNEZ, J. L. (Ed). Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC: Boca Raton, EE.UU. 2008, p.p. 1-100; 215-336.
- [3] SHI, J. (Ed.). Functional food ingredients and nutraceuticals, processing technologies. CRC Press LLC: Boca Raton, EE.UU. 2007, p.p. 3-20.
- [4] DÍAZ-REINOSO, B., MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H. and PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ Extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, p.p. 2441-2469.
- [5] LICEO, J. Química general. Ed Internet. P 135, consultado el 18 de Enero de 2011. www.freewebs.com/ultrachemistry/diagrama%2520fase%2520CO2.gif&imgrefurl=http://www.freewebs.com/ultrachemistry/herramientasquimica.htm
- [6] UY, N. FRANKMAN, G. and EVANS, D. A. Labiatae derived antioxidant composition. European Patent EP0454097, 1991.
- [7] CARVALHO, R. N., MOURA, L. S., ROSA, P. T. and MEIRELES, A. A. Supercritical fluid extraction of rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition and antioxidant activity. *J. Supercrit. Fluids*. 2005, 35, p.p. 197-204.
- [8] QUITAIN, A. T., KATOH, S. and MORIYOSHI, T. Isolation of antimicrobials and antioxidants from Moso-Bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) by supercritical CO₂

extraction and subsequent hydrothermal treatment of the residues. *Ind. Eng Chem. Res.*, 2004, 43, p.p. 1056-1060.

[9] LEHOTAY, S.J. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. *J. Chromatogr. A*, 1997, 785, p.p. 289-312.

[10] KAISER, C. S., RÖMPP, H. and SCHMIDT, P. C. Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile flowers extraction efficiency, stability, and in/line inclusion of chamomile/carbon dioxide extract in α -cyclodextrin. *Phytochem. Anal.*, 2004, 15, p.p. 249-256.

[11] PAPAMICHAIL, I., LOULI, V. and MAGOULAS, K.J. Supercritical fluid extraction of celery seed oil. *J. Supercrit. Fluids*, 2000, 18 p.p. 213-226

[12] LOULI, V., FOLAS, G., VOUSAS, E. and MAGOULAS, K. Extraction of parsley seed oil by supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids*, 2004, 30, p.p. 163-174.

[13] ZEKOVIC, Z.; LEPOJEVIC, Z. and TOLIC, A. Modeling of the thyme supercritical carbon dioxide extraction system. I. The influence of carbon dioxide flow rate and grinding degree of thyme. *Sep. Sci. Technol.*, 2001, 36, p.p. 3459-3472.

[14] POURMORTAZAVI, S. M. and HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1163, p.p. 2-24.

[15] MACHMUDAH, S.; SHIRAMIZU, Y.; GOTO, M.; SASAKI, M. and HIROSE, T. Extraction of *Nigella sativa* L. using supercritical CO₂: A study of antioxidant activity of the extract. *Sep. Sci. Technol.*, 2005, 40, p.p. 1267-1275.

[16] SASTRE, A. Tratado de nutrición. Ed. Díaz de Santos, Madrid, España 1999 p.p. 159

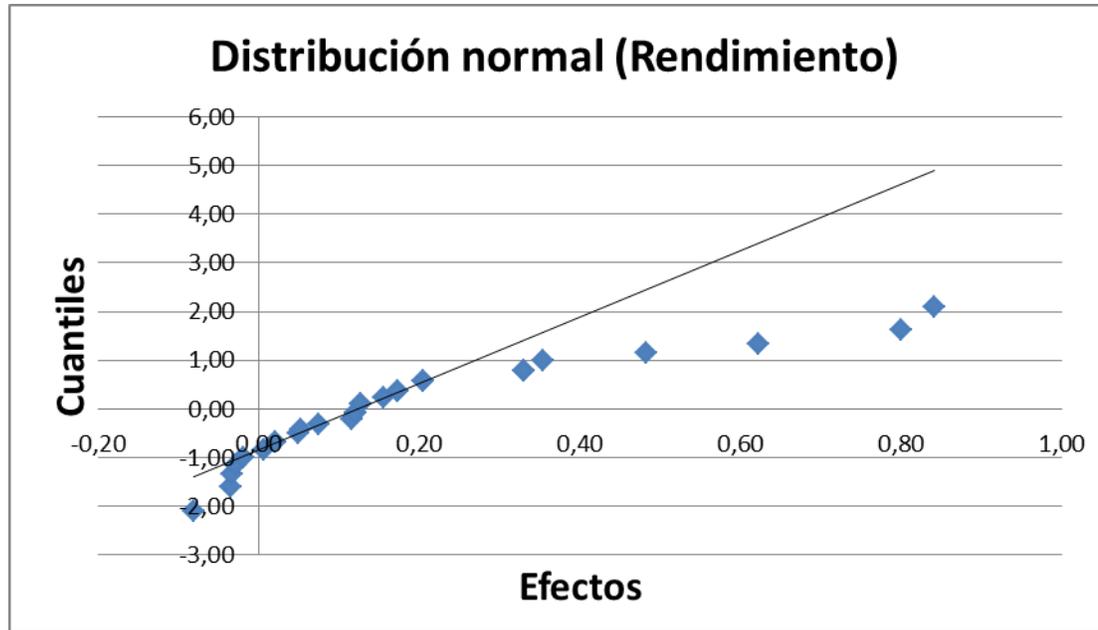
- [17] PRIOR, R. L., WU, X. and SCHAICH, K. Standardization methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, p. p. 4290-4302.
- [18] FONT QUER. P. Plantas medicinales, El Dioscórides renovado. Ed. Labor A.: Madrid, España, 1993, p.p. 398, 412.
- [19] REVERCHON, E. and TADDEO, R. Extraction of Sage oil by supercritical CO₂: influence of some process parameters. *J. Supercrit. Fluids*, 1995, 8, p.p. 302-309.
- [20] ALEKSOVSKI, S.A. and SOVOVÁ, H. Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. *J. Supercrit. Fluids*, 2007, 40, p.p. 239–245.
- [21] KUEHL, R. O. Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2 ed. Interntional Thomson Editores S.A de C.V: México D.F., México. 2001, p.p. 423-453.
- [22] MILLER, J.C. and MILLER, J. N. Estadística y quimiometría para química analítica. 4 Ed, Pearson Educación S. A.: Madrid, España. 2002, p.p. 200-213.
- [23] BIRD, R.B. et al. Fenómenos de Transporte . Ed. Reverte, México 1982, pp 1-31.
- [29] DWCK,A. Aceites esenciales. Ed. Internet. Consultado el 10 de septiembre de 2010. www.dwskdata.com

8 ANEXOS

Anexo a. Niveles (+,-) de las variables escogidas para el diseño experimental fraccionado 2^{7-2} con resolución IV.

Exp	Presión [P]	Temperatura [T]	Flujo [F]	Tiempo dinámico [D]	Tiempo estático [E]	Presión del colector[G]	Temperatura del colector[H]	Rendimiento [R]	Actividad antioxidante [AA]
1	-	-	-	-	-	-	-	0,66	124,49
2	+	-	-	-	-	+	+	0,69	165,82
3	-	+	-	-	-	+	-	1,04	209,35
4	+	+	-	-	-	-	+	1,26	201,93
5	-	-	+	-	-	+	-	1,43	169,97
6	+	-	+	-	-	-	+	0,58	72,67
7	-	+	+	-	-	-	-	1,22	72,13
8	+	+	+	-	-	+	+	2,84	291,06
9	-	-	-	+	-	-	+	1,22	169,17
10	+	-	-	+	-	+	-	1,88	168,93
11	-	+	-	+	-	+	+	1,54	218,50
12	+	+	-	+	-	-	-	1,85	280,70
13	-	-	+	+	-	+	+	1,39	115,30
14	+	-	+	+	-	-	-	2,02	218,78
15	-	+	+	+	-	-	+	2,25	192,82
16	+	+	+	+	-	+	-	3,34	131,20
17	-	-	-	-	+	-	+	0,50	81,14
18	+	-	-	-	+	+	-	0,83	124,61
19	-	+	-	-	+	+	+	0,74	93,63
20	+	+	-	-	+	-	-	1,21	96,47
21	-	-	+	-	+	+	+	1,12	77,71
22	+	-	+	-	+	-	-	1,15	72,11
23	-	+	+	-	+	-	+	1,40	77,55
24	+	+	+	-	+	+	-	2,40	247,08
25	-	-	-	+	+	-	-	0,97	127,36
26	+	-	-	+	+	+	+	1,79	72,32
27	-	+	-	+	+	+	-	2,50	101,27
28	+	+	-	+	+	-	+	2,15	284,23
29	-	-	+	+	+	+	-	1,30	119,62
30	+	-	+	+	+	-	+	1,88	132,94
31	-	+	+	+	+	-	-	2,66	139,76
32	+	+	+	+	+	+	+	3,80	155,03

Anexo b. Gráfica de distribución normal (rendimiento)



Efectos	Cuantiles
-0,08	-2,10
-0,04	-1,61
-0,03	-1,35
-0,03	-1,15
-0,02	-0,99
0,01	-0,85
0,02	-0,67
0,02	-0,67
0,05	-0,51
0,05	-0,41
0,07	-0,32
0,12	-0,23
0,12	-0,09
0,12	-0,09
0,13	0,09
0,13	0,09
0,16	0,23

0,17	0,37
0,17	0,37
0,20	0,57
0,20	0,57
0,33	0,79
0,33	0,79
0,35	0,99
0,48	1,15
0,62	1,35
0,80	1,61
0,84	2,10

En la gráfica de distribución normal se observa que los puntos que no se alinean son las variables que aparentemente influyen más sobre el rendimiento de la extracción. Como se puede observar, aproximadamente 8 de los puntos están fuera de la tendencia lineal, lo que supone realizar el análisis de la variancia ANOVA con éstos para encontrar los que realmente tienen influencia significativa en el rendimiento de la extracción.

Tabla b-1. Análisis de varianza del rendimiento.

Variable	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F (cociente)	F _(1/5) (umbral)
Total	28	20.592			
DH	1	0.003	0.003	0.047	
G	1	0.998	0.998	15.151	
P	1	1.865	1.865	28.333	
F	1	3.092	3.092	46.954	
T	1	5.112	5.112	77.640	6.61
D	1	5.667	5.667	86.068	
H	1	0.054	0.054	0.819	
DG	1	0.010	0.010	0.154	
FH	1	0.020	0.020	0.299	
DE	1	0.117	0.117	1.775	
EH	1	0.129	0.129	1.963	
GH	1	0.003	0.003	0.046	
EG	1	0.009	0.009	0.133	
error	15	3.514	0.066		

Anexo c. Cálculo del error experimental a partir de las pruebas de tamaño de partícula y sus respectivos duplicados

EXP	I	II	P	I - P	II - P	(I - P) ²	(II - P) ²	SUMA
SO150	15,13	15,1	15,115	0,015	0,015	0,0002	0,0002	0,0005
SO250	10,42	9,66	10,04	0,38	0,38	0,1444	0,1444	0,2888
SO350	8,77	8,31	8,54	0,23	0,23	0,0529	0,0529	0,1058
								0,3950
							Error exp	0,06584

Exp: Experimento, I: Prueba inicial, II: Duplicado.

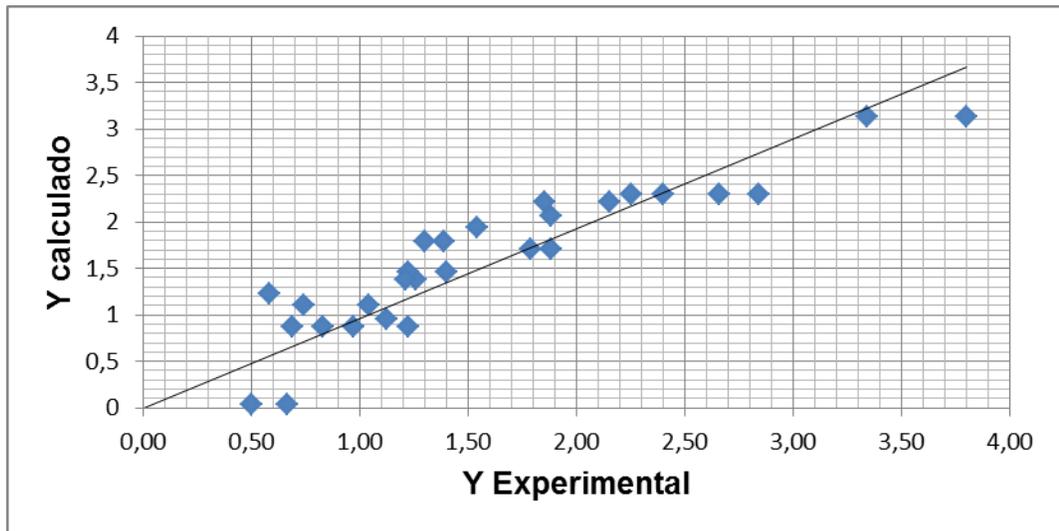
SOx50: Las letras SO corresponden a *Salvia officinalis*, x toma valores de 1,2 y 3 que corresponden a los tamaños de partícula del más pequeño al más grande y 50 es la temperatura de extracción.

Anexo d. Ecuación lineal de rendimiento

$$y = 1,584 + 0,393P + 0,556T + 0,449F + 0,589D + 0,199G$$

$R^2=0,835$; error total experimental= 3,157; LOF (Lack of fit) = 3,09

Figura d-1. Respuesta experimental Vs respuesta calculada con la ecuación lineal



yexp	ycalc
0,66	0,03874267
0,69	0,8747554
1,04	1,10617324
1,26	1,38050463
0,58	1,22833757
1,22	1,4597554
2,84	2,29576814
1,22	0,87291584
1,88	1,70892857
1,54	1,94034641
1,85	2,2146778
1,39	1,78817934
2,25	2,29392857

3,34	3,1299413
0,50	0,03874267
0,83	0,8747554
0,74	1,10617324
1,21	1,38050463
1,12	0,95400618
1,40	1,4597554
2,40	2,29576814
0,97	0,87291584
1,79	1,70892857
2,15	2,2146778
1,30	1,78817934
1,88	2,06251074
2,66	2,29392857
3,80	3,1299413

Figura d-2. Distribución normal de residuos

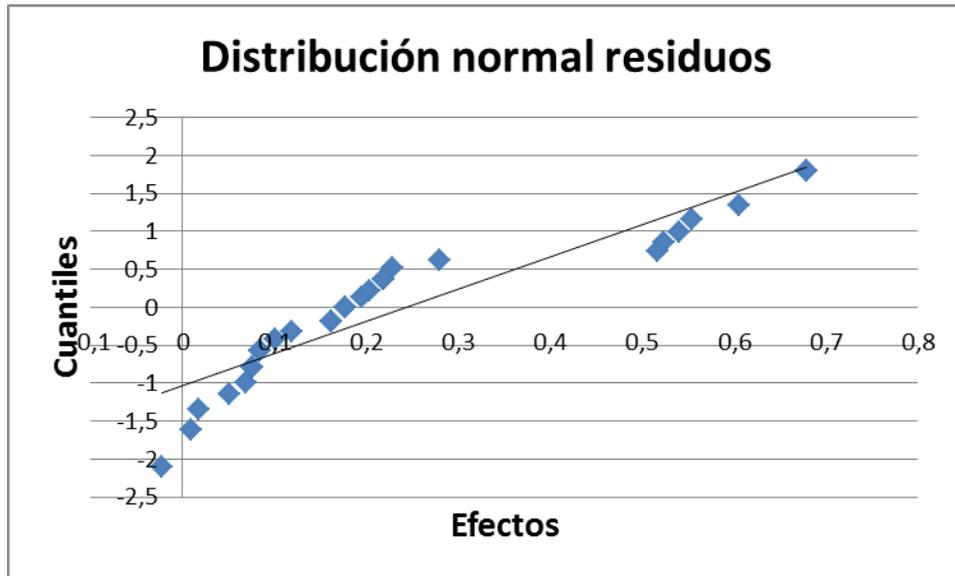
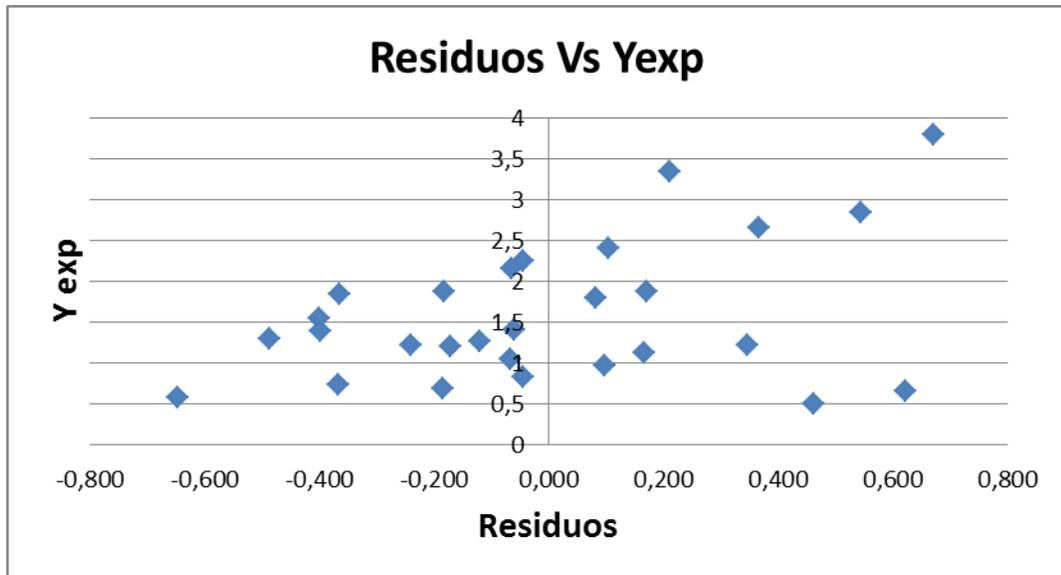
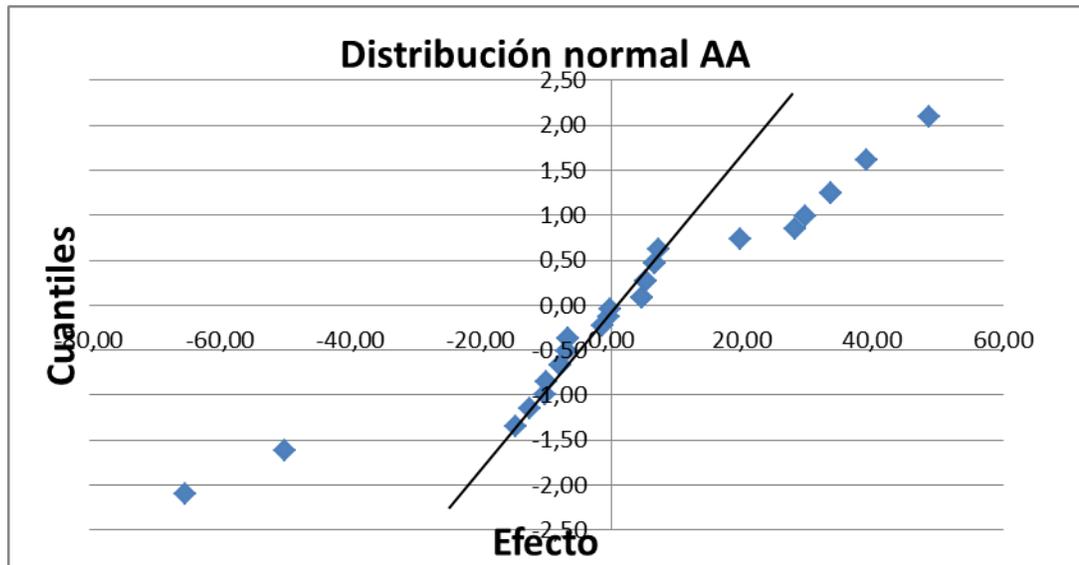


Figura d-3. Residuos Vs Rendimiento experimental (Y exp)



Las figuras d-2 y d-3 comprueban que los residuos están distribuidos aleatoriamente.

Anexo e. Distribución normal para la actividad antioxidante (AA)



En la gráfica de distribución normal se observa que los efectos D,P,T,E y los puntos FE,TH,PT,FG,PH,DE,PD,EH,FH y DG no se alinean, es decir son las variables que aparentemente influyen más sobre la actividad antioxidante de los extractos. Con estos puntos se realizó el análisis de varianza ANOVA para encontrar los que realmente influyeron sobre la actividad antioxidante.

Tabla e.1. ANOVA para actividad antioxidante (AA)

Efecto	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	cociente	F _{1/14} (umbral)
Total	28	128606,37917			
DG	1	34080,07507	34080,075	66,525	
E	1	20000,06446	20000,064	39,040	
P	1	12249,64782	12249,648	23,911	
T	1	19001,52914	19001,529	37,091	
D	1	6332,70400	6332,704	12,361	4,6
FE	1	3114,51716	3114,517	6,080	
TH	1	7068,54222	7068,542	13,798	
PT	1	9087,69526	9087,695	17,739	
FG	1	9087,69526	9087,695	17,739	
PH	1	172,23917	172,239	0,336	
DE	1	172,23917	172,239	0,336	
PD	1	347,61767	347,618	0,679	
EH	1	347,61767	347,618	0,679	
FH	1	372,09352	372,094	0,726	
ERROR	14	7172,102	512,292971		

Anexo f. Curva de Calibración y datos extrapolados de la determinación de actividad antioxidante según el método ORAC.

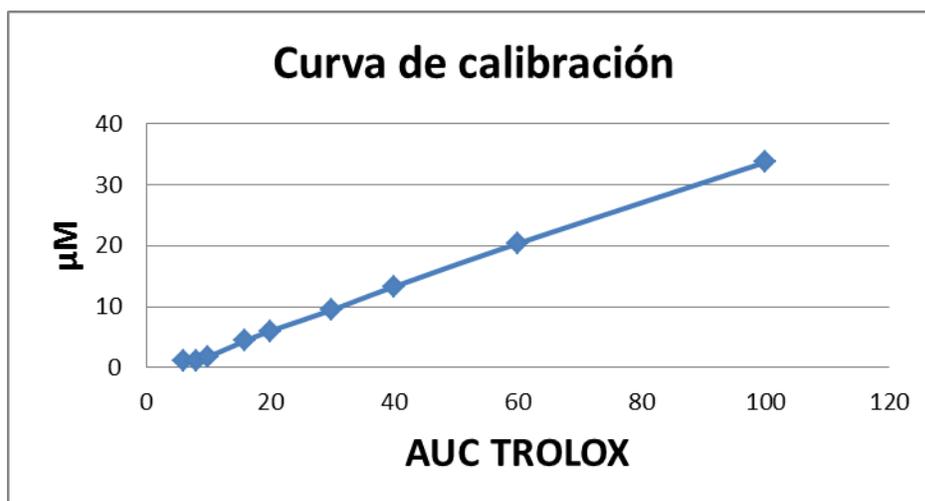


Tabla f-1. Datos para realizar la curva de calibración.

μM	AUC Trolox
6	1,1
8	1,2
10	1,8
16	4,4
20	6,0
30	9,5
40	13,3
60	20,3
100	33,7

Anexo g. Balance de masa

Experimento	Mve (g)	MVs(g)	E(g)	Macumula(g)
29	469,68	446,00	6,1	17,58
4	466,91	441,94	5,86	19,11
3	468,46	445,151	4,88	18,43
6	467,77	438,615	2,72	26,44
1	468,35	446,196	3,1	19,05
14	466,02	430,711	9,43	25,88
28	467,17	438,444	10,05	18,68
20	467,58	445,208	5,65	16,72
26	467,08	437,076	8,37	21,63
27	465,77	432,782	11,63	21,36
8	467,85	431,319	13,3	23,23
30	464,93	432,3165	8,75	23,86
32	464,53	423,035	17,66	23,83
15	465,46	425,8945	10,47	29,10
21	462,53	434,5775	5,19	22,76
22	463,68	432,573	5,33	25,78
24	463,81	437,5035	11,14	15,17
2	462,37	435,9265	3,2	23,24
17	462,80	436,8765	2,3	23,62
18	463,63	437,779	3,83	22,02
9	462,01	430,198	5,65	26,16

10	462,76	431,1955	8,7	22,86
31	462,37	422,9875	12,3	27,08
16	462,71	421,306	15,44	25,96
19	462,36	437,6555	3,43	21,27
23	463,17	436,0405	6,49	20,64
25	464,62	437,5035	4,49	22,63
13	464,37	437,19	6,46	20,72
11	464,43	432,782	7,13	24,52
12	465,95	432,3925	8,6	24,96
7	464,49	434,6155	5,67	24,20
5	463,46	433,5325	6,64	23,29

Mve: Material vegetal entrada, Mvs: Material vegetal de salida, E: Extracto,
Macumula: Masa acumulada

Anexo h. Valores de las variables del balance de energía

Variables	Valor
L. P (cm)	0,42
Tf1(°C)	0,4
Tf2(°C)	0,8
riv (cm)	0,0215
rev (cm)	0,025
ric (cm)	0,03
rec (cm)	0,0375
rchC (cm)	0,0015

rchP (cm)	0,004
rip(cm)	0,039
rep (cm)	0,057
Kacero (W/m.K)	16
h aire(W/m.k)	0,02
Kvidrio(W/m.K)	1
L.C (cm)	0,26
He (40)(J/Kg)	1 776,136
He(80)(J/Kg)	47836,818

Anexo i. Balance de energía

La Tabla I-1 muestra los valores del calor consumido por la bomba (Q bomba), el calor proporcionado por la chaqueta del colector y el del portamuestra (Q chaq.colec, Q chaq.port) respectivamente, y el calor consumido por el horno durante cada experimento.

Tabla I-1. Datos de calor de los equipos utilizados en la extracción.

Experimento	Q bomba (J)	Q chaq.port(J)	Q chaq.colec(J)	Q (J) Horno
29	2502	1800	900	21600
4	2502	1800	900	21600
3	2502	1800	900	21600
6	2502	1800	900	21600
1	2502	1800	900	21600
14	2502	1800	900	21600
28	2502	1800	900	21600
20	2502	1800	900	21600
26	10008	7200	3600	21600
27	10008	7200	3600	21600
8	10008	7200	3600	21600
30	10008	7200	3600	21600
32	10008	7200	3600	21600
15	10008	7200	3600	21600
21	10008	7200	3600	21600
22	10008	7200	3600	21600
24	2502	1800	900	21600
2	2502	1800	900	21600
17	2502	1800	900	21600
18	2502	1800	900	21600
9	2502	1800	900	21600
10	2502	1800	900	21600
31	2502	1800	900	21600
16	2502	1800	900	21600
19	10008	7200	3600	21600
23	10008	7200	3600	21600

25	10008	7200	3600	21600
13	10008	7200	3600	21600
11	10008	7200	3600	21600
12	10008	7200	3600	21600
7	10008	7200	3600	21600
5	10008	7200	3600	21600

Utilizando las ecuaciones vistas en la sección 6.6 se realizó el balance de energía y el resultado se reporta en la Tabla i-2 e i-3

Tabla i-2. Valores de las variables para el balance de energía

Exp	Ti (p y c)	Tf extractor	Tf colector	D(s)	Qep(J/s)	Qep(J)	Qec(J/s)	Qce(J)
29	295	313	301	1800	0,004	6,839	0,007	12,850
4	295	353	301	1800	0,012	22,038	0,007	12,850
3	295	353	301	1800	0,012	22,038	0,007	12,850
6	295	313	321	1800	0,004	6,839	0,031	55,684
1	295	313	301	1800	0,004	6,839	0,007	12,850
14	295	313	301	1800	0,004	6,839	0,007	12,850
28	295	353	321	1800	0,012	22,038	0,031	55,684
20	295	353	301	1800	0,012	22,038	0,007	12,850
26	295	313	321	7200	0,004	27,357	0,031	222,737
27	295	353	301	7200	0,012	88,152	0,007	51,401
8	295	353	321	7200	0,012	88,152	0,031	222,737
30	295	313	321	7200	0,004	27,357	0,031	222,737
32	295	353	321	7200	0,012	88,152	0,031	222,737
15	295	353	321	7200	0,012	88,152	0,031	222,737
21	295	313	321	7200	0,004	27,357	0,031	222,737
22	295	313	301	7200	0,004	27,357	0,007	51,401
24	295	353	301	1800	0,012	22,038	0,007	12,850
2	295	313	321	1800	0,004	6,839	0,031	55,684
17	295	313	321	1800	0,004	6,839	0,031	55,684
18	295	313	301	1800	0,004	6,839	0,007	12,850
9	295	313	301	1800	0,004	6,839	0,007	12,850
10	295	313	301	1800	0,004	6,839	0,007	12,850
31	295	353	301	1800	0,012	22,038	0,007	12,850
16	295	353	301	1800	0,012	22,038	0,007	12,850
19	295	353	321	7200	0,012	88,152	0,031	222,737
23	295	353	321	7200	0,012	88,152	0,031	222,737
25	295	313	301	7200	0,004	27,357	0,007	51,401
13	295	313	321	7200	0,004	27,357	0,031	222,737

11	295	353	321	7200	0,012	88,152	0,031	222,737
12	295	353	301	7200	0,012	88,152	0,007	51,401
7	295	353	321	7200	0,012	88,152	0,031	222,737
5	295	313	301	7200	0,004	27,357	0,007	51,401

P y C: Portamuestra y colector respectivamente, Ti y Tf temperatura inicial y final, D: tiempo dinámico, Qep: Calor que entra al portamuestra, Qec: Calor que entra al colector.

Tabla i-3 Balance de energía

He (40)(J/Kg)	He(80)(J/Kg)	F(Kg/s)	FMAS*hScol	FMAS*hspor	BEP	BEC
12776,14	47836,82	0,000333	4,270	4,263	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	15,965	15,958	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	15,965	15,958	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	4,293	4,263	0	0
12776,14	47836,82	0,001	12,787	12,780	0	0
12776,14	47836,82	0,001	12,787	12,780	0	0
12776,14	47836,82	0,001	47,880	47,849	0	0
12776,14	47836,82	0,001	47,856	47,849	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	4,293	4,263	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	15,965	15,958	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	15,989	15,958	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	4,293	4,263	0	0
12776,14	47836,82	0,001	47,880	47,849	0	0
12776,14	47836,82	0,001	47,880	47,849	0	0
12776,14	47836,82	0,001	12,811	12,780	0	0
12776,14	47836,82	0,001	12,787	12,780	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	15,965	15,958	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	4,293	4,263	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	4,293	4,263	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	4,270	4,263	0	0
12776,14	47836,82	0,001	12,787	12,780	0	0
12776,14	47836,82	0,001	12,787	12,780	0	0
12776,14	47836,82	0,001	47,856	47,849	0	0
12776,14	47836,82	0,001	12,796	12,788	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	4,302	4,271	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	4,302	4,271	0	0
12776,14	47836,82	0,000333	4,270	4,263	0	0

12776,14	47836,82	0,000333	4,293	4,263	0	0
12776,14	47836,82	0,001	47,880	47,849	0	0
12776,14	47836,82	0,001	47,856	47,849	0	0
12776,14	47836,82	0,001	47,880	47,849	0	0
12776,14	47836,82	0,001	12,787	12,780	0	0

He: Entalpía de entrada a 40 y 80 °C, F: flujo, FMas: flujo másico, hspor: entalpía de salida del portamuestra, hscol: entalpía de salida del colector, BEP: balance de energía en el portamuestra, BEC: balance de energía en el colector.

Anexo j. Estimación de costos

La **Tabla j-1**. Muestra el costo del equipo y material utilizado para realizar los experimentos independientemente del tiempo de extracción, y la **Tabla j-2**. muestra el costo total de cada experimento y su posible valor de venta.

Tabla j-1. Costo de inversión fija

Equipo y herramientas	Costo (\$)
Equipo extracción	190'000.000
Herramientas	20.000
Adecuamiento	3'810.000
Mantenimiento (M)	592.000

Tabla j-2. Costo aproximado de cada experimento.

Exp	FCO2 (Kg)	\$ CO2	\$ KW equipo	\$ Mv	\$ agua	\$ Et	\$ extracción
29	0,6	21294,58	446,6	550	300	829	23420,18
4	0,6	21294,58	446,6	550	300	829	23420,18
3	0,6	21294,58	446,6	550	300	829	23420,18
6	0,6	21294,58	446,6	550	300	829	23420,18
1	1,8	30503,05	446,6	550	300	829	32628,65
14	1,8	30503,05	446,6	550	300	829	32628,65
28	1,8	30503,05	446,6	550	300	829	32628,65
20	1,8	30503,05	446,6	550	300	829	32628,65
26	2,4	35107,28	1786,4	550	300	829	38572,68
27	2,4	35107,28	1786,4	550	300	829	38572,68
8	2,4	35107,28	1786,4	550	300	829	38572,68
30	2,4	35107,28	1786,4	550	300	829	38572,68
32	7,2	71941,15	1786,4	225	300	829	75081,55
15	7,2	71941,15	1786,4	550	300	829	75406,55
21	7,2	71941,15	1786,4	550	300	829	75406,55
22	7,2	71941,15	1786,4	550	300	829	75406,55
24	0,6	21294,58	446,6	550	300	829	23420,18
2	0,6	21294,58	446,6	550	300	829	23420,18
17	0,6	21294,58	446,6	550	300	829	23420,18
18	0,6	21294,58	446,6	550	300	829	23420,18
9	1,8	30503,05	446,6	550	300	829	32628,65
10	1,8	30503,05	446,6	550	300	829	32628,65
31	1,8	30503,05	446,6	550	300	829	32628,65
16	1,8	30503,05	446,6	550	300	829	32628,65
19	2,4	35107,28	1786,4	550	300	829	38572,68
23	2,4	35107,28	1786,4	550	300	829	38572,68
25	2,4	35107,28	1786,4	550	300	829	38572,68
13	2,4	35107,28	1786,4	550	300	829	38572,68
11	7,2	71941,15	1786,4	550	300	829	75406,55
12	7,2	71941,15	1786,4	550	300	829	75406,55
7	7,2	71941,15	1786,4	550	300	829	75406,55
5	7,2	71941,15	1786,4	550	300	829	75406,55

Mv: material vegetal, Et: etanol, Ac: análisis cromatográfico

Según los datos de rendimiento, la mayor cantidad de extracto obtenido en una extracción es de aproximadamente 18 g. Para obtener 1 kg de extracto es

necesario realizar 56 extracciones. Con base en estos datos, la tabla k-3 muestra el costo de extracción, los salarios para el personal que realiza el procedimiento y el precio de venta aproximado de manera que la inversión pueda ser recuperada en 5 años.

Tabla j-3. Resumen de costos y precio de venta.

	valor \$
costo de inversión	193'830.000
costo de extracción (1 kg)	4'269.932,05
Salario Técnico en química (anual)	19'912.008
Salario Auxiliar (anual)	10'786.620
N° de kg/año	18
costo de mantenimientos /año	1'184.000
Gastos totales de producción/año	108'741.404,9
tiempo de recuperación de la inversión	5
Ganancia anual	38'766.000
Ganancia anual + gastos totales por/año	147'507.404,9
PRECIO DE VENTA (kg)	8'194.855,828

Anexo k. Cienciometría

La **Figura k-1.** Refleja la dinámica de las investigaciones sobre la extracción con fluidos supercríticos representada principalmente por artículos científicos y revisiones bibliográficas. Aunque es una técnica desarrollada desde los años 70,

no empezó a ser muy importante hasta los 80, debido según la opinión de otros autores principalmente a los siguientes factores: Los costos elevados de los equipos, problemas para extraer compuestos más polares y la falta de protocolos elaborados para recuperar los extractos [24].



Figura k-1. Dinámica de las publicaciones (artículos y revisiones) sobre la extracción con fluidos supercríticos. Base de datos: SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI Período de observación: 2008-2010. Fecha de consulta: 13 de septiembre de 2010. Ecuación de búsqueda: Topic= (supercritical fluid extraction) Timespan=All Years

La **Figura k-2.** Representa el número de publicaciones sobre la extracción con fluidos supercríticos de compuestos con actividad antioxidante en *S. officinalis* durante los años 2002-2009. En general, se observa un pequeño incremento en la actividad científica en este campo, debido a la búsqueda de nuevos antioxidantes, sobre todo, de origen vegetal, que no contengan trazas de disolventes. Sin embargo específicamente sobre esta planta no se encuentran muchos estudios.

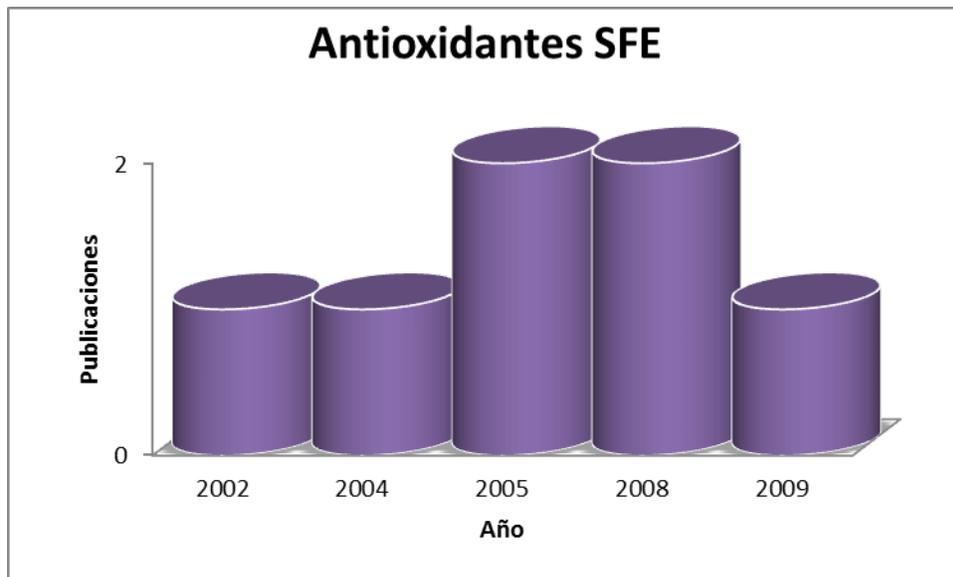


Figura k-2. Dinámica de las publicaciones (artículos y revisiones) sobre la extracción de antioxidantes con fluidos supercríticos de *S.officinalis*. Base de datos: SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI. Periodo de observación: 2002-2009. Fecha de consulta: 13 de septiembre de 2010. Ecuación de búsqueda: Topic= (supercritical fluid extraction) AND Topic= (salvia officinalis) AND Topic= (Antioxidants) Timespan=All Years

En la **Figura k-3**, se presentan las revistas, en donde más artículos sobre la extracción con fluidos supercríticos se han publicado. Se destaca, que el mayor número de trabajos pertenece al área de fluidos supercríticos y de los alimentos ello debido a la búsqueda de fuentes de antioxidantes de origen natural y que no presenten riesgos para la salud. Otra área importante es la cromatografía, en los trabajos de esta área se busca mejorar la extracción, separación, detección y cuantificación de analitos aislados.

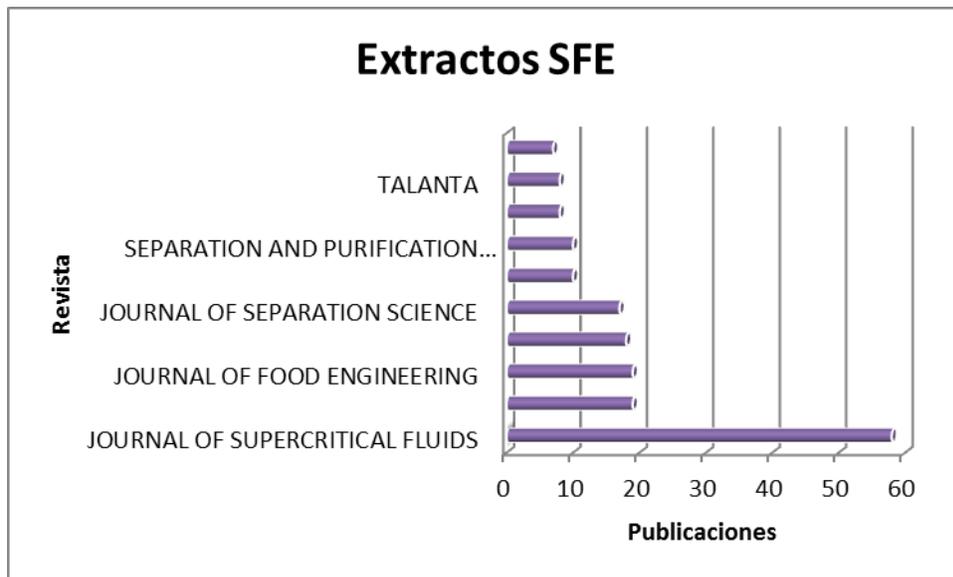


Figura k-3. Revistas con mayor número de publicaciones sobre la obtención de Extractos con fluidos supercríticos. Base de datos: -EXPANDED, SSCI, A&HCI. Periodo de observación: Todos los años. Fecha de consulta: 13 de septiembre de 2010. Ecuación de búsqueda: Topic= (supercritical fluid extraction).

Anexo I. Partes del equipo de extracción con fluido supercrítico

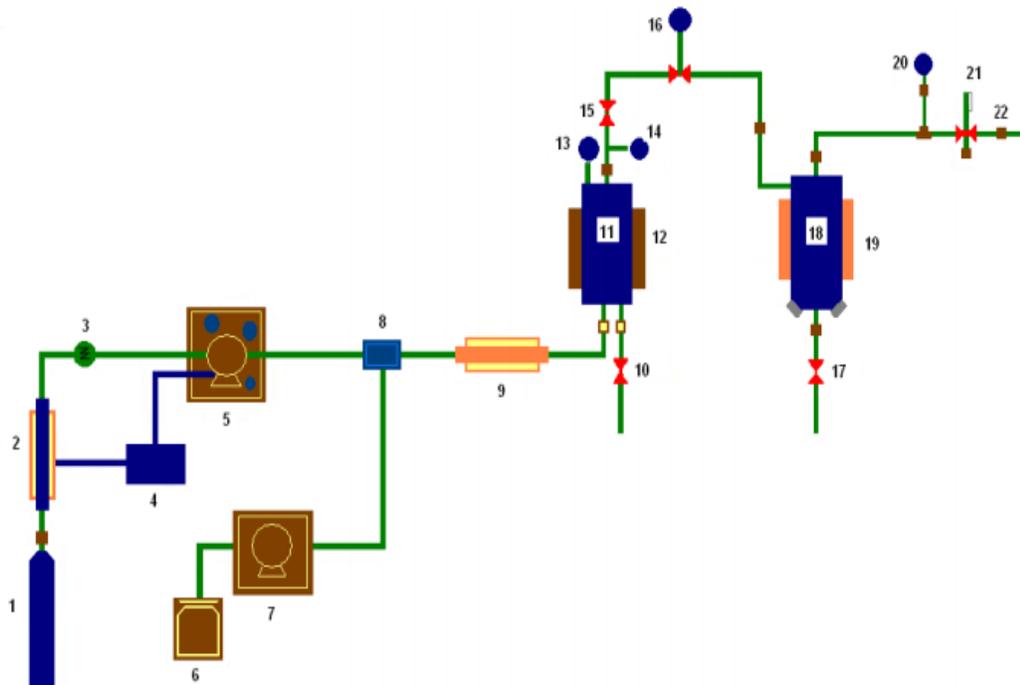


Figura I-2. Principales unidades de un equipo para la extracción con fluido supercrítico: **1-** Cilindro de CO₂, **2-** Intercambiador de calor I, **3-** Flujómetro, **4-** Baño de refrigeración, **5-** Bomba, **6-** Almacenador de solvente, **7-** Bomba para co-solvente, **8-** Mezclador, **9-** Intercambiador de calor II, **10-** Válvula I, **11-** Portamuestra, **12-** Chaqueta de calentamiento I, **13-** Manómetro 1, **14-** Sensor de temperatura, **15-** Válvula II, **16-** Válvula automática de regulación de presión, **17-** Válvula III, **18-** Separador, **19** Chaqueta de calentamiento 2, **20-** Manómetro 2, **21-** válvula manual de regulación de presión, **22-** Válvula de venteo.