



USO DE ULTRASONIDOS EN LA EXTRACCIÓN DE PLANTAS LABIADAS COMBINANDO ETANOL Y CO₂ SUPERCRÍTICO

ULTRASONIC-ASSISTED EXTRACTION IN LABIATE PLANTS COMBINING ETHANOL AND SUPERCRITICAL CO₂

*S. Barrazueta¹, G. Mendoza¹, T. Fornari²

¹Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH)
Riobamba, Ecuador

²Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),
Universidad Autónoma de Madrid (UAM)
Madrid, España

Recibido: 14/03/2015

Aceptado: 06/06/2015

RESUMEN

Varias plantas de la familia de las labiadas, tales como: romero (*Rosmarinus officinalis* L.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y albahaca (*Ocimum basilicum* L.) contienen importantes compuestos fenólicos, sustancias muy apreciadas por su reconocida actividad antioxidante.

El objetivo de la investigación fue combinar una etapa previa de sonicación utilizando etanol como cosolvente, con la posterior extracción supercrítica (US-SFE), para favorecer la extracción de estos compuestos y comparar los resultados obtenidos con la extracción supercrítica (SFE) con CO₂ puro y con cosolvente. En la SFE de hojas de romero el rendimiento de extracción aumentó significativamente de 4,52 % a 7,99 % al utilizar etanol como cosolvente y a 15,03 % con la US-SFE. La etapa previa de sonicación logró que el rendimiento final de extracto obtenido se triplicara en comparación con la SFE. En la extracción de hojas de mejorana se obtuvieron resultados positivos con la US-SFE ya que el incremento del rendimiento de extracción fue del 46 % referente al rendimiento obtenido en la SFE con etanol cosolvente. En las hojas de albahaca la US-SFE no produjo ventaja alguna frente a las otras técnicas en lo que se refiere a rendimiento o contenido de polifenoles totales.

La inclusión de una etapa previa de ultrasonidos aumentó el rendimiento de extracción, redujo el tiempo, el flujo de CO₂ y el consumo de etanol del proceso, y se obtuvo un extracto similar en cuanto a contenido de ácido carnósico.

Palabras clave: romero, mejorana, albahaca, cosolvente, compuestos fenólicos.

ABSTRACT

Several plants of the labiate family, such as rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and basil (*Ocimum basilicum* L.), contain important phenolic compounds, substances prized for its recognized antioxidant activity. The aim of the research was to combine a sonication step prior using ethanol as co-solvent, with subsequent supercritical extraction (US-SFE), to facilitate the extraction of these compounds and comparing the results obtained with supercritical extraction (SFE) with pure CO₂ and co-solvent.

In the SFE rosemary leaves the extraction yield increased significantly from 4,52 % to 7,99 % by using ethanol as co-solvent and 15,03 % with US-SFE. Prior sonication step got the final yield of extract obtained tripled compared to the SFE. In the extraction of marjoram leaves positive results were obtained with the US-SFE, since the increase of extraction yield was 46 % related to the yield obtained in the SFE with ethanol co-solvent. Basil leaves in the US-SFE produced no advantage over the other techniques in terms of performance or total polyphenol content. The inclusion of a previous stage of ultrasonication increased the extraction yield, reduced time, the flow of CO₂ and ethanol consumption process, and a similar extract was obtained in terms of carnosic acid content.

Keywords: rosemary, marjoram, basil, co-solvent, phenolic compounds.

* Autor de correspondencia: Sandra Barrazueta. E-Mail: sbarrazueta@epoch.edu.ec



1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras químicas y actividad, son constituyentes importantes de las plantas y que a su vez les otorga múltiples efectos benéficos. Están presentes generalmente en forma de glucósidos en los extractos de las frutas, hierbas, vegetales, cereales y otros materiales; lo que ha permitido su utilización por la industria alimentaria no solo por las características organolépticas que le confieren a los alimentos, sino porque retardan la oxidación de los lípidos y mejoran la calidad nutricional de los alimentos (Muñoz y Ramos, 2007).

Los compuestos antioxidantes juegan un papel muy importante en los alimentos. La oxidación lipídica es una de las principales causas de deterioro químico, lo que resulta en la rancidez y/o el deterioro de la calidad nutricional, color, sabor y seguridad de los alimentos, los iniciadores para esta oxidación incluyen rayos UV, luz, calor, enzimas, variedades de radicales libres, microorganismos y metales/ metalproteínas (Albu et al., 2004). Además de su papel como estabilizadores de alimentos, pueden proteger las células contra los efectos de los radicales libres y por tanto, tienen un efecto destacado en la prevención de problemas cardíacos, cáncer y otras enfermedades (Suhaj, 2006).

Recientes estudios han indicado el mecanismo fundamental del potencial preventivo de algunos compuestos fenólicos, los cuales juegan un rol importante por su actividad antioxidante (Kähkönen et al., 1999), anti-inflamatorio, aumento del potencial inmune, efecto antihormonal, modificación de enzimas metabolizadoras de drogas, influencia sobre el ciclo celular y diferenciación celular, inducción de apoptosis, supresión y proliferación, angiogénesis, los cuales cumplen roles en la iniciación y modificación del estado secundario del desarrollo neoplásico (Tsuda et al., 2004).

El desarrollo de nuevas técnicas de separación para las industrias química y alimentaria ha recibido mucha atención últimamente debido a las nuevas restricciones del Reglamento para el medio ambiente, salud pública y la necesidad de minimizar los costos de energía (López-Sebastián et al., 1998).

La extracción asistida con ultrasonidos (*Ultrasound Assisted Extraction*, UAE) se considera una prometedora tecnología para la industria de procesamiento de alimentos (Azuola y Vargas, 2007). Son señales de alta intensidad que se utilizan para modificar un proceso o un producto. Con una frecuencia más baja y mayor potencia producen cambios físicos y químicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de

cavitación, las cuales aparecen, crecen y colapsan dentro del líquido.

La ventaja de utilizar ultrasonido en la extracción de plantas ya se ha aplicado a un sin número de compuestos de interés, tanto en la farmacología y la industria alimentaria. La mejora observada en la extracción de compuestos orgánicos por ultrasonido se atribuye a una intensificación de la transferencia de masa debido al fenómeno de cavitación producido en el disolvente por el paso de una onda ultrasónica o sonora y al efecto mecánico que produce el ultrasonido permitiendo una mayor penetración de disolvente en el cuerpo de la planta (Albu, et al., 2004).

Entre las tecnologías de procesos innovadores, la extracción con fluidos supercríticos (SFE) es, en efecto, la aplicación más ampliamente estudiada. En la práctica, la SFE se lleva a cabo generalmente utilizando dióxido de carbono (CO₂) por varias razones prácticas: tiene una presión y una temperatura crítica moderadamente baja (74 bar y 32 °C), no es tóxico, no es inflamable, está disponible en alta pureza a un coste relativamente bajo, es reconocido como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), y se elimina fácilmente a partir del extracto (Fornari et al., 2012).

Uno de los inconvenientes que presenta el CO₂ supercrítico es su baja polaridad lo que dificulta la extracción de solutos polares. Para la extracción de esta clase de compuestos se utiliza un cosolvente que es un disolvente orgánico que se añade al fluido supercrítico en pequeñas cantidades (hasta un 10 % v/v). Algunos cosolventes utilizados son: dimetil sulfóxido, hexanol, 2-propanol, 2-metoxietanol, agua, ácido fórmico, etc. (Fornari, et al., 2012).

Los extractos de hierbas, especias, y otros materiales vegetales ricos en compuestos fenólicos son de creciente interés en la industria alimentaria porque retardan la degradación oxidativa de los lípidos y, por consiguiente, mejoran la calidad y el valor nutricional de los alimentos. Las hierbas se utilizan en muchos dominios, incluyendo la medicina, la nutrición, aromatizantes, bebidas, teñido, repelentes, perfumes o cosméticos (Wojdyło et al., 2007).

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es una planta típica de la región y cocina Mediterránea, que se ha estudiado como un producto natural con diversas actividades biológicas tales como: anti-inflamatoria, anti-tumoral, quimiopreventiva, hepatoprotectora, contra la diabetes, antioxidante, anti-proliferativa, antiviral, antimicrobiana, anticonceptiva y antidepresiva, entre otros (Vázquez et al., 2013; Vicente et al., 2012).

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.) es una planta cuyas hojas que se utilizan muy comúnmente como condimento en la comida. También es muy valiosa debido a sus propiedades farmacéuticas. Muchos



estudios científicos han demostrado que el extracto de albahaca es un fuerte eliminador de radicales y puede considerarse como una buena fuente de antioxidantes naturales (Abas et al., 2006; Javanmardi et al., 2003; Lee y Scagel, 2009, 2010). El aceite esencial obtenido a partir de las hojas de mejorana (*Origanum majorana* L.) posee propiedades antibacterianas, antimicóticas y antioxidantes, por lo que la investigación de la composición y sabor de esta materia prima es de gran interés (Vági et al., 2005). Su aceite esencial y extractos alcohólicos se aplican en productos farmacéuticos, perfumes y los cosméticos (Al-Bandak et al., 2011; Novak et al., 2000).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Las hojas secas de las plantas labiadas utilizadas en el presente estudio son: romero (*Rosmarinus officinalis* L.), albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y mejorana (*Origanum majorana* L.), proceden de Herboristería Murciana (España). La molienda y tamizado de las hierbas se realizó hasta lograr un diámetro final de partícula entre 200 y 500 μm en un molino de cuchillas Grindomix modelo GM200 (Retsch GmbH, Alemania).

2.2 Productos químicos y reactivos

El dióxido de carbono CO_2 (N38) utilizado tuvo una pureza de 99,5 % en relación (w/w) y fue suministrado por Carburos Metálicos (Madrid, España). El disolvente polar utilizado fue etanol de grado espectroscópico.

Los patrones de ácido carnósico (≥ 96 %) y carnosol (≥ 98 %) fueron adquiridos de Bioquímica de Alexis (Madrid, España). El ácido rosmarínico (97 %) provino de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El ácido fosfórico de grado HPLC fue provisto por Panreac (Madrid, España). El acetonitrilo grado HPLC fue provisto por el Laboratorio de Exploración (Gliwice, Polonia).

2.3 Métodos de extracción

2.3.1 Extracción Asistida con Ultrasonidos (UAE)

Las extracciones se realizaron en un baño de ultrasonidos modelo 3000513 (J.P. Selecta, Barcelona, España). 5 g de las hojas secas molidas de cada una de las plantas labiadas, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 cm^3 y se añadieron 100 cm^3 de etanol. El matraz y su contenido se sumergieron en un baño de ultrasonidos y se realizó

el sonicado durante 5, 15 y 30 min. El rango de temperatura se mantuvo a ≤ 30 °C y presión de 1 bar.

Los extractos obtenidos fueron filtrados al vacío y recuperados en viales de vidrio. El disolvente se eliminó mediante un rotavapor y se procedió a su secado mediante una corriente de N_2 . Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Las muestras secas se almacenaron a 4 °C en la oscuridad hasta su análisis

2.3.2 Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

Las extracciones con fluidos supercríticos se llevaron a cabo en una planta a escala piloto modelo SF2000 (Thar Technology, Pittsburgh, PA, USA). La planta tiene una celda de extracción con una capacidad de 2 L y dos separadores diferentes (S1 y S2), de 0,5 L de capacidad, con controladores independientes de presión y temperatura. La celda de extracción tiene una relación altura / diámetro de 5,5 (42 cm de altura, 76 mm de diámetro interior). La planta de extracción también incluye un sistema de recirculación en el cual el CO_2 se condensa y se bombea hasta la presión de extracción deseada.

Las extracciones se realizaron a una temperatura de 40 °C y a una presión de entre 150 y 300 bar. El caudal de inyección de CO_2 utilizado fue de 30 $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ y 60 $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$, dependiendo del tipo de experimento. El tiempo de extracción para los experimentos fue alrededor de 3 horas. Para facilitar la recogida del extracto de las celdas se utilizaron pequeñas cantidades de etanol.

Los extractos obtenidos fueron filtrados al vacío y recuperados en viales de vidrio, el disolvente se eliminó utilizando un rotavapor y se secó en una corriente de N_2 . Las muestras secas se almacenaron a 4 °C en la oscuridad hasta su análisis.

La SFE se llevó a cabo en las tres plantas labiadas del presente estudio utilizando CO_2 puro y combinado con etanol como cosolvente en una proporción alrededor del 5 % para mejorar la extracción de los compuestos fenólicos.

2.3.3 Extracción con fluidos supercríticos combinada con etapa previa de ultrasonidos (US-SFE)

Las hojas secas de romero, albahaca y mejorana, previamente molidas, se mezclaron en un vaso de precipitación con etanol en una relación 2:3 (peso de materia prima: volumen de disolvente). Esta mezcla fue sometida a sonicado durante 30 min, cuidando que la temperatura del baño se mantuviese a menos de 30 °C. El pastiche obtenido se sometió a SFE utilizando únicamente CO_2 puro sin adición de cosolvente.



2.4 Análisis por HPLC

La cuantificación de ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico de los extractos se analizó empleando un HPLC equipado con un MICROSORB-MV-100, columna C18 (Varian) de 250 mm x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil consistió en acetonitrilo (disolvente A) y 0,1 % de ácido fosfórico en agua (disolvente B) aplicando el siguiente gradiente: 0-8 min, 23 % de disolvente A y 8-25 min, 77 % de disolvente A. Esta última composición se mantuvo durante 15 minutos y las condiciones iniciales fueron alcanzadas en 5 min.

El tiempo total de análisis fue de 45 minutos. La velocidad de flujo fue constante a 0,7 mL·min⁻¹. El volumen de inyección fue de 20 µL y la detección se llevó a cabo mediante el uso de una red de diodos de detección del sistema de Varian, la misma que almacenó la señal a una longitud de onda de 230, 280 y 350 nm.

2.5 Estimación del contenido de Polifenoles Totales

Se utilizó el método colorimétrico Folin-Ciocalteu. En tubos de ensayo se mezclan en el siguiente orden: 3 mL de H₂O de Tipo 1 (Milli-Q), 50 µL muestra o patrón y 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se incubaron a temperatura ambiente durante 3 min. Luego se añadieron a la mezcla 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 % y 0,95 mL de H₂O Tipo 1. Las muestras se agitaron en el vórtex y se dejaron en reposo durante dos horas en la oscuridad. La absorbancia del color azul resultante fue medida en un espectrofotómetro a 760 nm. La cuantificación se hizo con respecto a las curvas de concentración de ácido gálico, siendo los resultados finales expresados como mg de ácido gálico / mg muestra (Wojdyło, et al., 2007).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis comparativo de la eficiencia de la extracción de compuestos fenólicos en las plantas en estudio.

Las Tablas 1 y 2, corresponden a la extracción utilizando CO₂ puro (Tabla 1) y CO₂ con etanol como cosolvente (Tabla 2).

Tabla 1. Eficiencia de la extracción utilizando CO₂ puro

Planta	Tiempo (min)	R (%)	% peso AC	% peso CAR	Total AC extraído (mg·g ⁻¹ planta)
Romero	360	4,52	10,89	-	4,92
Romero*	420	2,83	16,90	3,12	5,26
Albahaca	300	1,96	-	-	-
Mejorana	300	2,06	-	-	-

AC: ácido carnósico; R: rendimiento g extracto·g⁻¹ materia prima); *SFE con fraccionamiento del extracto en dos separadores en línea

Tabla 2. SFE con etanol como cosolvente a 40 °C, 15 MPa y 60 g·min⁻¹ CO₂

Planta	Tiempo (min)	R (%)	% peso AC	% peso CAR	Total AC extraído (mg·g ⁻¹ planta)
Romero	210	7,99	30,64	4,77	12,38
Albahaca	210	3,23	-	-	-
Mejorana	190	3,16	-	-	-

AC: ácido carnósico; CAR: carnosol; R: rendimiento (g extracto·g⁻¹ materia prima)

La extracción SFE combinada con etanol como cosolvente (en bajas concentraciones, < 5 %) mejoró los rendimientos de extracción para todas las plantas estudiadas en comparación con la SFE utilizando CO₂ puro. El rendimiento de extracción de las hojas de romero aumentó significativamente de 4,52 % a 7,99 %; el incremento fue de alrededor de un 77 %. El contenido de ácido carnósico mejoró ya que los valores pasaron de 4,92 a 12,38 mg·g⁻¹ de extracto, prácticamente duplicando el total de ácido carnósico presente en el extracto final.

La albahaca y la mejorana también presentaron mejoría en cuanto al porcentaje de extracción ya que sus valores aumentaron de 1,96 a 3,23 y de 2,06 a 3,16 mg·g⁻¹ respectivamente. Esto supuso un incremento del 65 % en el caso de la albahaca y un 53 % en el de la mejorana.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriormente citadas se verificó que el uso de etanol como cosolvente mejoró considerablemente la recuperación de antioxidantes como el ácido carnósico presente en el romero. Teniendo en cuenta los resultados de eficiencia obtenidos en la



SFE al utilizar etanol como cosolvente, se investigó el efecto de combinar una etapa previa de sonicación con la posterior extracción por SFE

(US-SFE). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Extracción combinada US-SFE a 40 °C y 15 MPa

Planta	CO ₂ (g·min ⁻¹)	Tiempo (min)	% etanol en el CO ₂	R (%)	% peso AC	% peso CAR	mg AC / mL etanol
Romero	60	210	3,81	11,48	23,69	2,86	18,12
Romero	30	180	4,44	15,03	23,15	2,70	23,19
Albahaca	60	180	4,44	2,47	-	-	-
Mejorana	60	180	3,33	4,61	-	-	-

AC: ácido carnósico; CAR: carnosol; R: rendimiento (g extracto·g⁻¹ materia prima)

En cuanto a los rendimientos obtenidos se obtuvieron las siguientes consideraciones: las hojas de romero con la extracción combinada (US-SFE) presentó valores similares a la SFE con cosolvente. La mejorana presentó un aumento del 45 % ya que sus valores pasaron de 3,16 mg·g⁻¹ con la SFE con cosolvente a 4,61 mg·g⁻¹ con la (US-SFE). La albahaca no presento mejoría en los resultados obtenidos.

Particularmente, en el caso del romero, se observó una disminución en el % en peso de antioxidantes (ácido carnósico y carnosol) pero un aumento de la cantidad de ácido carnósico recuperado por mL de etanol empleado, cuando se comparó la US-SFE con la SFE con etanol. Asimismo, la reducción del flujo de CO₂ de 60 g·min⁻¹ a 30 g·min⁻¹, permitió obtener un extracto de romero con un rendimiento considerablemente mayor (15,03 % vs 7,99 %) y mejor eficacia en términos de la cantidad de etanol empleada (23,19 mg vs 12,38 mg de ácido carnósico por mL de etanol empleado).

A pesar de la etapa previa de ultrasonificación que se aplicó a las plantas en estudio, la extracción de ácido rosmarínico no se logró en ninguna de las hierbas. Esto podría llevarse a cabo, empleando mayores cantidades de cosolvente polar y, posiblemente, mayores densidades de CO₂ para recuperar dicho compuesto mediante SFE.

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos con la extracción asistida con ultrasonidos (UAE). En el caso del romero, el rendimiento global de extracción a los 30 min, fue de 25,6 %, resultando el mejor valor refiriéndose a las técnicas de extracción utilizadas en el presente estudio. En cuanto al % en peso de ácido carnósico (AC) se observó que disminuyó a mayor tiempo de extracción (20,44 % en 5 min y 12,94% en 30 min). En cuanto a la eficiencia en consumo de etanol, el mejor resultado correspondió a la extracción UAE durante 30 min (1,66 mg AC / mL etanol).

Tabla 4. UAE con etanol a temperatura ≤ 30°C y presión de 100 kPa

Planta	Tiempo (min)	R (%)	% peso AC	% peso CAR	% peso AR	mg AC / mL etanol	mg AR / mL etanol
Romero	5	9	20,44	2,20	1,25	0,92	0,06
	15	12,8	18,52	1,76	1,36	1,19	0,09
	30	25,6	12,94	0,59	2,09	1,66	0,27
Albahaca	5	1,50	-	-	1,66	-	0,01
	15	1,84	-	-	1,74	-	0,02
	30	1,66	-	-	1,51	-	0,01
Mejorana	5	2,19	-	-	3,89	-	0,04
	15	7,12	-	-	2,13	-	0,08
	30	10,99	-	-	1,85	-	0,10

AC: ácido carnósico; CAR: carnosol; R: rendimiento (g extracto·g⁻¹ materia prima); AR: ácido rosmarínico

Los extractos de hojas de albahaca obtenidos por UAE presentaron valores de rendimiento de extracción considerablemente inferiores en comparación a las otras técnicas en estudio. El % en peso de ácido rosmarínico (AR) no se vio afectado al aumentar el tiempo, tal como se pudo observar en las otras dos plantas en estudio. Los resultados

obtenidos en los tres tiempos 5, 15 y 30 min se mantuvieron prácticamente constantes.

La extracción UAE de mejorana presentó el mayor valor en cuanto al rendimiento, con un total de 10,99 %. El rendimiento de extracción se incrementó al aumentar el tiempo de experimentación aunque el % en peso de AR disminuyó. La mayor cantidad de AR se extrajo en



30 min con una concentración de 1,85 % en peso, equivalente a $2 \text{ mg AR} \cdot \text{g}^{-1}$ planta.

Las Figuras 1 a 3 muestran los cromatogramas correspondientes al análisis por HPLC de las muestras obtenidas mediante la extracción con ultrasonidos (30 min) de cada una de las plantas estudiadas. Se indicó en las correspondientes figuras el pico correspondiente al ácido rosmarínico, antioxidante objetivo en el estudio. En el cromatograma correspondiente al extracto de romero se indicaron los picos del ácido carnósico y carnosol (antioxidantes reconocidos como los mayoritarios).

Asimismo, en los cromatogramas de albahaca y mejorana pudieron observarse otros picos importantes, muy posiblemente correspondientes a otros compuestos fenólicos que no fue posible identificar en este trabajo.

Por esto, se consideró utilizar la determinación del contenido de polifenoles totales como medida de la recuperación de antioxidantes fenólicos presentes en los extractos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para el romero. El valor más alto en concentración

de polifenoles totales correspondió a la extracción realizada con fluidos supercríticos con etanol como cosolvente (aproximadamente un 5 % de etanol) con un valor del $0,25 \text{ mg de ácido gálico (AG)} \cdot \text{mg}^{-1}$ de muestra. Los datos obtenidos para la US-SFE fueron ligeramente menores. Asimismo, se observó una correlación entre el valor Folin resultante y el contenido de antioxidantes determinado para las distintas muestras.

Los valores Folin obtenidos para las hojas de albahaca fueron de la misma magnitud tanto en la extracción UAE, SFE con etanol cosolvente y US-SFE. En cambio, para la mejorana el valor más alto correspondió al extracto US-SFE con un total del $0,16 \text{ mg de AG} \cdot \text{mg}^{-1}$ muestra, como se puede observar en las Tablas 6 y 7.

Finalmente, los valores Folin de los extractos de romero fueron mayores que los de mejorana, y éstos, mayores que los de albahaca. Esto concuerda con el orden de actividad antioxidante (romero > mejorana > albahaca) determinada por Vázquez et al. (2013) utilizando extracción acelerada con disolventes (ASE) para estas variedades de plantas.

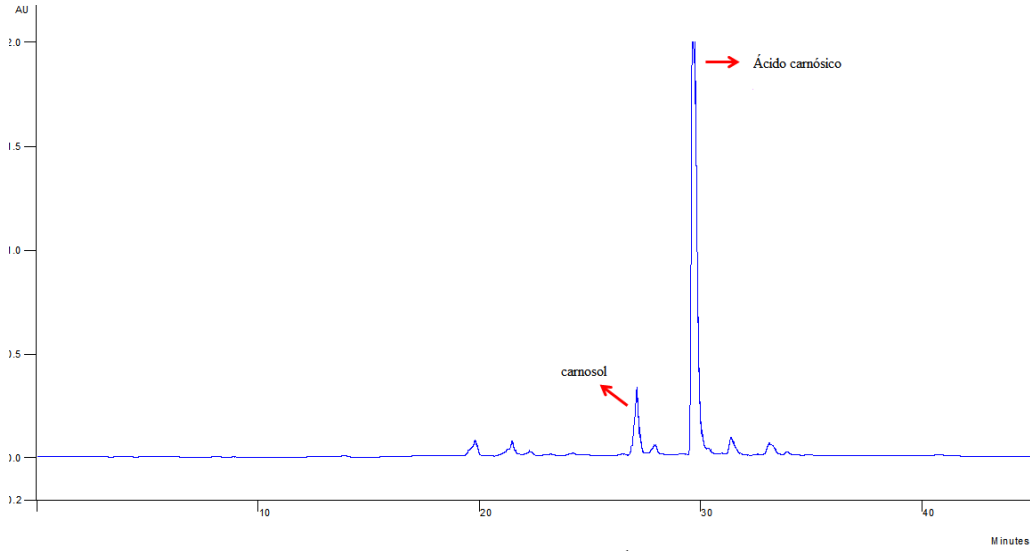


Figura 1. Cromatograma del extracto UAE de romero ($2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

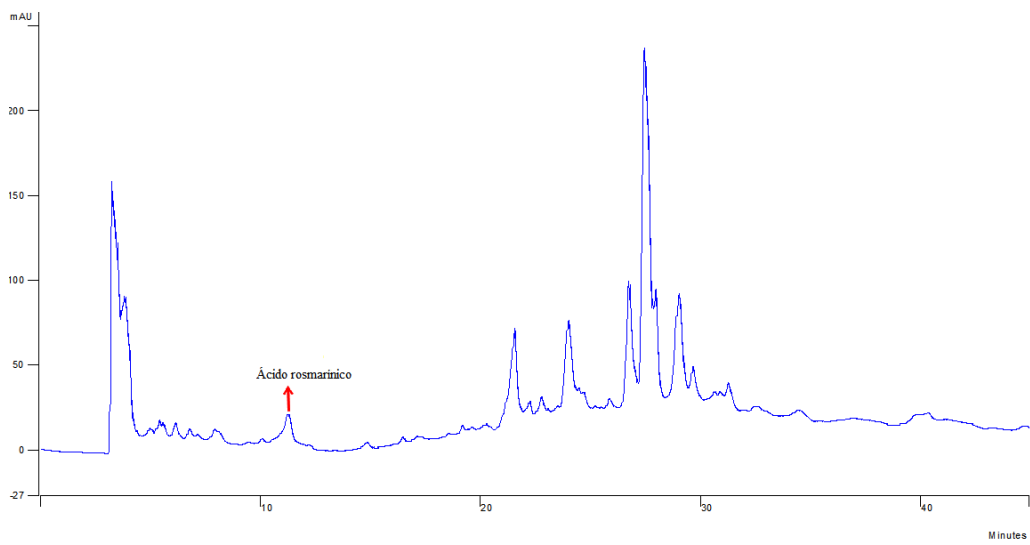


Figura 2. Cromatograma del extracto UAE de albahaca ($2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

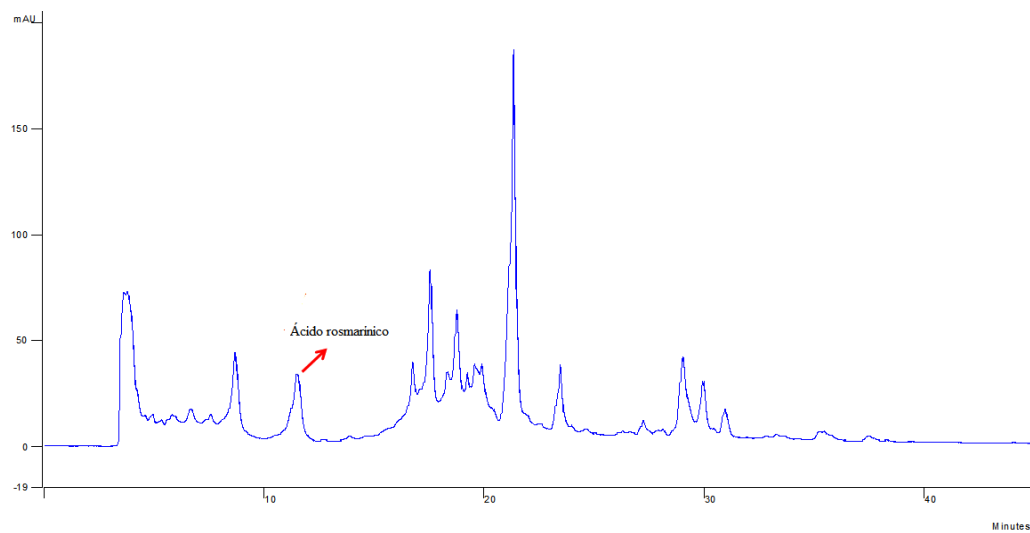


Figura 3. Cromatograma del extracto UAE de mejorana ($2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).



Tabla 5. UAE con etanol a temperatura $\leq 30^\circ\text{C}$ y presión de 100 kPa

Planta	Tiempo (min)	R (%)	% peso AC	% peso CAR	% peso AR	mg AC / mL etanol	mg AR / mL etanol
Romero	5	9	20,44	2,20	1,25	0,92	0,06
	15	12,8	18,52	1,76	1,36	1,19	0,09
	30	25,6	12,94	0,59	2,09	1,66	0,27
Albahaca	5	1,50	-	-	1,66	-	0,01
	15	1,84	-	-	1,74	-	0,02
	30	1,66	-	-	1,51	-	0,01
Mejorana	5	2,19	-	-	3,89	-	0,04
	15	7,12	-	-	2,13	-	0,08
	30	10,99	-	-	1,85	-	0,10

AC: ácido carnósico; CAR: carnosol; AR: ácido rosmarínico

Tabla 6. Comparación de polifenoles totales de los extractos de hojas de romero obtenidos por SFE con etanol cosolvente y US-SFE.

Planta	Técnica	mg AG / mg muestra	% peso antioxidantes (AC + CAR + AR)
Romero	SFE con etanol cosolvente ($\approx 5\%$)	0,25	35,41
	US-SFE caudal CO_2 30 g/min	0,20	26,55
	US-SFE caudal CO_2 60 g/min	0,21	25,85

AC: ácido carnósico; CAR: carnosol; AR: ácido rosmarínico; AG: ácido gálico

Tabla 7. Comparación de polifenoles totales de los extractos de hojas de albahaca y mejorana obtenidos por SFE con etanol cosolvente y US-SFE

Planta	Técnica	Concentración mg de AG / mg muestra
Albahaca	UAE (30 min)	0,11
	SFE con etanol cosolvente ($\approx 5\%$)	0,12
	US-SFE caudal CO_2 60 $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$	0,11
Mejorana	UAE (30 min)	0,09
	SFE con etanol cosolvente ($\approx 5\%$)	0,13
	US-SFE caudal CO_2 60 $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$	0,16

AG: ácido gálico



4. CONCLUSIONES

La extracción supercrítica de hojas de romero combinada con una etapa previa de ultrasonidos (US-SFE) optimizó la cantidad de etanol empleada en el proceso, la concentración de antioxidantes en el extracto y el rendimiento de extracción debido a que los efectos físicos como turbulencia, aglomeración de partículas y la alteración de la célula que producen los ultrasonidos favoreció la liberación de ácido carnósico de la matriz vegetal, que luego fue más fácilmente extraído con CO₂ supercrítico.

En la extracción de hojas de mejorana se obtuvieron resultados positivos con la US-SFE ya que el incremento del rendimiento de extracción fue de 46 % referente al rendimiento obtenido en la SFE con etanol cosolvente. Además, los resultados del análisis de polifenoles totales indicaron que los extractos US-SFE fueron los que tuvieron mayor contenido de compuestos fenólicos, con un total de 0,16 mg ácido gálico·mg⁻¹ de extracto.

En el caso de la extracción de hojas de albahaca, la técnica US-SFE no produjo ventaja alguna en lo que se refiere a rendimiento o contenido de polifenoles totales. Por el contrario, la técnica US-SFE pareció producir una pequeña disminución del rendimiento de extracción respecto de la técnica SFE con cosolvente, siendo el contenido de polifenoles totales similar en todos los extractos analizados.

La extracción supercrítica (SFE) con CO₂ puro o utilizando etanol como cosolvente, y combinada con ultrasonidos, no fue capaz de extraer ácido rosmarínico de ninguna de las plantas labiadas estudiadas. Esto afectó negativamente a la calidad antioxidante de los extractos obtenidos, puesto que el ácido rosmarínico es reconocido como un potente antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España (proyecto INNSAMED IPT-300000-2010-34) y por la Comunidad Autónoma de Madrid (proyecto ALIBIRD-S2009/AGR-1469) y al Gobierno de la República del Ecuador por la beca otorgada a través de la SENESCYT en la convocatoria abierta de becas 2011 que permitió a la autora principal desarrollar los estudios de Maestría en la Universidad Autónoma de Madrid.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abas, F., Lajis, N. H., Israf, D. A., Khozirah, S., y Kalsom, Y. U. (2006). Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables. *Food Chemistry*, 95(4), 566-573. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.034
- Al-Bandak, G., Dermesonlougrou, E. K., Taoukis, P. S., y Oreopoulou, V. (2011). Antioxidant effect of *Majorana syriaca* extract in bulk corn oil and o/w emulsion after applying high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 125(4), 1166-1170. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.10.022
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., y Mason, T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3-4), 261-265. doi: 10.1016/j.ultsonch.2004.01.015
- Azuola, R., y Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología En Marcha*, 20, 30-40.
- Fornari, T., Ruiz-Rodriguez, A., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., y Reglero, G. (2012). Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from *Lamiaceae* family. *Journal of Supercritical Fluids*, 64, 1-8. doi: 10.1016/j.supflu.2012.01.006
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., y Vivanco, J. M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83(4), 547-550. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00151-1
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., et al. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962. doi: 10.1021/jf990146l
- Lee, J., y Scagel, C. F. (2009). Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, 115(2), 650-656.
- Lee, J., y Scagel, C. F. (2010). Chicoric acid levels in commercial basil (*Ocimum basilicum*) and *Echinacea purpurea* products. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 77-84. doi: 10.1016/j.jff.2009.11.004



López-Sebastián, S., Ramos, E., Ibáñez, E., Bueno, J. M., Ballester, L., Tabera, J., et al. (1998). Dearomatization of antioxidant rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 13-19. doi: 10.1021/jf970565n

Muñoz, A., y Ramos, F. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomédicas. *Horizonte Médico*, 7(1), 23-31.

Novak, J., Bitsch, C., Langbehn, J., Pank, F., Skoula, M., Gotsiou, Y., et al. (2000). Ratios of cis- and trans-sabinene hydrate in *Origanum majorana* L. and *Origanum microphyllum* (Benth) Vogel. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 697-704. doi: 10.1016/S0305-1978(99)00098-8

Suhaj, M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 531-537. doi: 10.1016/j.jfca.2004.11.005

Tsuda, H., Ohshima, Y., Nomoto, H., Fujita, K., Matsuda, E., Iigo, M., et al. (2004). Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 19(4), 245-263. doi: 10.2133/dmpk.19.245

Vági, E., Simándi, B., Suhajda, Á., y Héthelyi, É. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, 38(1), 51-57. doi: 10.1016/j.foodres.2004.07.006

Vázquez, E., García-Risco, M. R., Jaime, L., Reglero, G., y Fornari, T. (2013). Simultaneous extraction of rosemary and spinach leaves and its effect on the antioxidant activity of products. *Journal of Supercritical Fluids*, 82, 138-145. doi: 10.1016/j.supflu.2013.07.004

Vicente, G., Molina, S., González-Vallinas, M., García-Risco, M. R., Fornari, T., Reglero, G., et al. (2012). Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. *Journal of Supercritical Fluids*, 79, 101-108. doi: 10.1016/j.supflu.2012.07.006

Wojdyło, A., Oszmiański, J., y Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940-949. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.038