

**DESARROLLO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN LIMPIA DE
COLORANTES A BASE DE CURCUMINA**

ÁLVARO DE JESÚS ARANGO RUIZ

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
DOCTORADO EN INGENIERÍA**

MEDELLÍN, ANTIOQUIA

2016

**DESARROLLO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN LIMPIA DE
COLORANTES A BASE DE CURCUMINA**

ÁLVARO DE JESÚS ARANGO RUIZ

Tesis de grado para optar por el título de Doctor en Ingeniería

Director

CLAUDIO JIMÉNEZ CARTAGENA

Químico Farmacéutico; PhD. en Ingeniería Ambiental

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

DOCTORADO EN INGENIERÍA

MEDELLÍN, ANTIOQUIA

MARZO DE 2016

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Medellín, 5 de agosto de 2016

Yo, Álvaro de Jesús Arango Ruiz

“Declaro que esta tesis de grado no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad” Art 82 Régimen Discente de Formación Avanzada.

Firma



CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
LISTA DE ABREVIATURAS	16
CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE CURCUMINOIDES POR EL MÉTODO DE SOXHLET COMPARADAS CON LAS TÉCNICAS, EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS	17
1.1 Introducción	17
1.2 Extracción asistida por microondas	18
1.3 Extracción por fluidos supercríticos	20
1.4 Extracción soxhlet.....	21
1.5 Materiales y métodos	23
1.5.1 Materiales y reactivos.....	23
1.5.2 Método de HPLC para análisis de curcuminoides.....	23
1.5.3 Extracción soxhlet	24
1.5.4 Extracción asistida por microondas.....	25
1.5.5 Extracción por fluidos supercríticos.....	25
1.5.6 Tratamiento estadístico de resultados.....	28
1.6 Resultados y discusión	28
1.6.1 Extracción por soxhlet.....	28
1.6.2 Extracción asistida por microondas.....	30
1.6.3 Extracción por fluidos supercrítico.....	32
1.7 Conclusiones	36
1.8 Referencias.....	36
CAPITULO 2. ENCAPSULACIÓN DE CURCUMINA POR LA TECNOLOGÍA DE ANTISOLVENTE SUPERCRÍTICO-SAS PARA MEJORAR SU ESTABILIDAD Y SOLUBILIDAD EN AGUA	40
2.1 Introducción	40
2.2 Materiales y métodos	45

2.2.1 Materiales y reactivos.....	45
2.2.2 Preparación de soluciones	45
2.2.3 Experimentación SAS	46
2.2.4 Pruebas de solubilidad y estabilidad	49
2.2.5 Caracterización fisicoquímica.....	50
2.2.6 Tratamiento estadístico de resultados.....	51
2.3 Resultados y discusión	52
2.4 Conclusiones	62
2.5 Referencias.....	63
CAPÍTULO 3. ESCALADO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE CURCUMINA POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS: CONSIDERACIONES ECONÓMICAS Y AMBIENTALES	71
3.1 Introducción	71
3.2 Materiales y métodos	73
3.2.1 Materiales y reactivos	73
3.2.2 Cuantificación de curcuminoides	73
3.2.3 Caracterización morfológica de harina de cúrcuma	74
3.2.4 Determinación de la curva global de extracción.....	74
3.2.5 Extracción por fluidos supercríticos y condiciones para el escalado	75
3.2.6 Estimación de costos	76
3.2.7 Diagnóstico ambiental para proceso de extracción y lavado del equipo	79
3.3 Resultados y discusión	81
3.3.1 Caracterización morfológica de harina de cúrcuma	81
3.4 Escalado	82
3.5 Estimación de costos	84
3.6 Diagnóstico ambiental para proceso de extracción y lavado del equipo	87
3.7 Conclusiones	91
3.8 Referencias.....	91

CONCLUSIONES GENERALES	96
RECOMENDACIONES	98

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Experimentación para el estudio de extracción de curcuminoides por el método de extracción asistida por microondas.	25
Tabla 2. Variables Independientes codificadas y naturales usadas para la generación del diseño experimental.	27
Tabla 3. Plan experimental para la extracción de cucuminoides con CO ₂ supercrítico (corridas generadas arrojadas por el software <i>Statgraphics</i>).	27
Tabla 4. Caracterización de la harina de cúrcuma	28
Tabla 5. Análisis ANOVA de doble vía para determinar el efecto de las variables (solvente y tiempo) sobre el porcentaje de curcuminoides extraídos por microondas.....	31
Tabla 6. Porcentajes de extracción de acuerdo a la combinación de los factores del diseño experimental.	33
Tabla 7. Análisis de Varianza (Curcuminoides y curcumina)*.....	34
Tabla 8. Ensayos realizados para la microencapsulación de curcuminoides por el método de antisolvente supercrítico SAS.	47
Tabla 9. Diseño experimental para el estudio de estabilidad de la formulación de curcumina encapsulada.....	49
Tabla 10. Diámetro de partícula promedio y potencial Z para la formulación 1 y formulación 2.	54
Tabla 11. Resultados de análisis de color para la formulación de colorante de cúrcuma y una solución de tartrazina de 30 µg/mL.....	61
Tabla 12. Condiciones experimentales para el escalado-escala laboratorio a escala piloto	75
Tabla 13. Valores para estimación del costo del equipo de fluidos supercríticos.....	77
Tabla 14. Insumos y energía asociados al proceso de extracción de curcumina y lavado del equipo a escala piloto.....	80

Tabla 15. Condiciones experimentales para el escalado - escala piloto a escala industrial	82
Tabla 16. Parámetros cinéticos obtenidos para la extracción de curcuminoides por fluidos supercríticos	84
Tabla 17. Estimación de costos por fracciones, para la extracción por fluidos supercríticos a escala industrial a 50 MPa y 90°C.....	86
Tabla 18. Matriz de lista de chequeo descriptiva para el diagnóstico ambiental en el proceso de extracción de cúrcuma y lavado del equipo ...	88
Tabla 19. Acciones de mitigación y control de las emisiones de dióxido de carbono en el proceso de extracción de curcumina por fluidos supercríticos.....	89
Tabla 20. Acciones de mitigación y control de otras afectaciones al ambiente generadas por el proceso de extracción de curcumina por fluidos supercríticos	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras moleculares de los curcuminoides presentes en la cúrcuma.	17
Figura 2. Diagrama del sistema de extracción por fluidos supercrítico	26
Figura 3. Cinética de extracción de curcuminoides totales por soxhlet.....	29
Figura 4. Porcentajes de extracción de curcuminoides en la extracción asistida por microondas, a diferentes combinaciones de concentración de solvente (% v/v) y relación muestra-solvente (% w/v).....	31
Figura 5. Superficies de respuesta que relaciona la temperatura, el flujo y la presión con los porcentajes de extracción de curcuminoides totales (izquierda) y la curcumina (derecha).....	35
Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de encapsulación de curcumina por antisolvente supercrítico SAS.	48
Figura 7. Micrografías SEM	53
Figura 8. Perfil de solubilidad para la formulación 1 y formulación 2 a pH de 4 y 8.	55
Figura 9. Curvas de degradación de curcumina por efectos de pH y temperatura para la formulación 1.	56
Figura 10. Curvas de degradación de curcumina por efectos de pH y luz para la formulación 1.	57
Figura 11. Difracción de rayos-X para cristales de curcumina y para la formulación 1 de colorante a base de cúrcuma obtenida por SAS.	59
Figura 12. Análisis por DSC: a) Curcumina, Eudragit® L100 y Pluronic® F127 b) Formulación 1 del colorante obtenida por SAS.	60
Figura 13. Comparación entre una solución del colorante a base de curcuminoides con una concentración de 200 µg/mL, con una solución de tartrazina a 30 µg/mL y una mezcla de harina de <i>Cúrcuma Longa</i> sin proceso.	62

Figura 14. Diagrama de flujo del proceso de extracción de curcuminoides a escala piloto	76
Figura 15. Flujograma de consumo y emisiones de masa y energía durante la extracción de curcumina por fluidos supercríticos.....	80
Figura 16. Micrografías SEM de la harina de cúrcuma	81
Figura 17. Curva global de extracción de curcuminoides a escala de laboratorio y a escala piloto	83
Figura 18. Costo unitario para la extracción de curcuminoides por fluidos supercríticos a 5 MPa y 90°C.....	86
Figura 19. Porcentajes por fracción con respecto al costo global.	87

RESUMEN

Actualmente, a nivel mundial se está experimentando un auge de los colorantes naturales dado a sus beneficios en la salud y a que su uso no está asociado a impactos importantes sobre el medio ambiente. La curcumina es un colorante natural extraído de la *Cúrcuma longa* que se presenta como alternativa para sustituir algunos colorantes sintéticos, pese a ello tiene algunas limitaciones para su aplicación como son su baja solubilidad en agua y su inestabilidad a factores externos.

En este trabajo se desarrollan extrategias de extracción de dicho componente activo, en las cuales se evalúa la eficiencia de extracción de curcuminoides por el método de soxhlet comparadas con las técnicas, extracción con fluidos supercríticos y extracción asistida por microondas, obteniendo altos rendimientos de extracción en cortos tiempos y haciendo uso de solventes inocuos al ambiente.

Posteriormente, se desarrolla la formulación de un colorante a partir del extracto de cúrcuma, haciendo uso de la tecnología de Antisolvente Supercrítico-SAS utilizando diferentes polímeros como encapsulantes, para mejorar la estabilidad y solubilidad de la curcumina en agua. La caracterización y cuantificación de la curcumina en las muestras de extracto y del producto de la encapsulación se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia-HPLC. Las propiedades del colorante se determinaron utilizando SEM, DSC, rayos-X, tamaño de partícula, potencial Z y capacidad antioxidante ORAC. La formulación del colorante mostró un contenido de curcumina de 4.45 µg/mL con mayor estabilidad y solubilidad en agua a pH 4.

Finalmente se presenta el escalado del proceso de extracción de curcumina por fluidos supercríticos, en las que se tienen en cuenta consideraciones económicas y ambientales, obteniendo un escalado 60 veces mayor, desde condiciones de laboratorio hasta industrial, en el cual se tuvo como criterios de escalado mantener las relaciones de flujo de dióxido de carbono a harina de cúrcuma constante e igualmente la relación diámetro- altura del extractor. Como resultado de la estimación de costos, se encontró que el costo de extracción de curcuminoides por

fluidos supercríticos representa un 60% del valor de venta, con lo cual el proceso es viable.

El diagnóstico ambiental que se realizó para el proceso de extracción de curcumina, permitió identificar las principales afectaciones que genera la extracción sobre el ambiente y representa un aporte importante para la evaluación ambiental del proceso de extracción por fluidos supercríticos.

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se presentan los resultados del estudio para el desarrollo de un proceso de extracción limpia de colorantes a base de curcumina. Para una mejor comprensión del documento, éste se estructuró en tres capítulos, en cada uno de los cuales, se hace una introducción al tema tratado y se plantea el objetivo para el desarrollo de la temática; de igual forma, se presenta la metodología, resultados obtenidos, análisis de resultados, conclusiones y referencias. Al final del documento se presentan las recomendaciones.

Esquema de la tesis:

Capítulo 1. Evaluación de la eficiencia de extracción de curcuminoides por el método de soxhlet comparadas con las técnicas, extracción con fluidos supercríticos y extracción asistida por microondas. El objetivo de este capítulo es evaluar la eficiencia de extracción de curcuminoides por el método soxhlet comparadas con las técnicas de extracción con fluidos supercríticos y extracción asistida por microondas.

Capítulo 2. Encapsulación de curcumina por la tecnología de antisolvente supercrítico-SAS para mejorar su estabilidad y solubilidad en agua. El objetivo del capítulo es desarrollar la formulación de un colorante a partir del extracto etanólico de cúrcuma, haciendo uso de la tecnología de antisolvente supercrítico-SAS para encapsular la curcumina mejorando su estabilidad y solubilidad en agua.

Capítulo 3. Escalado de un proceso de extracción de curcumina por fluidos supercríticos: consideraciones económicas y ambientales. El objetivo de este capítulo es realizar el escalado a nivel piloto e industrial de un proceso de extracción por fluidos supercríticos para la extracción de colorantes a partir de cúrcuma, teniendo en cuenta criterios de factibilidad técnica, económica y ambiental.

Esta investigación nace del interés por contribuir a la solución de la problemática mundial asociada a la producción y uso de colorantes artificiales, toda vez que estos están vinculados a la generación de impactos negativos sobre el medio ambiente durante las etapas de

fabricación y a problemas de salud por su consumo como aditivos en alimentos. En ese sentido, cobran importancia los colorantes naturales, los cuales tienen propiedades nutricionales y permiten el uso de productos eco-seguros, ambientalmente inocuos y no tóxicos. Sin embargo, los colorantes naturales tienen algunas desventajas, como son: la inestabilidad, la disminución de la intensidad de color y la baja solubilidad en agua, entre otras, esto hace que se vea la necesidad de proponer alternativas tanto de extracción limpia como procesos que permitan mejorar la solubilidad en agua y la estabilidad del colorante.

Uno de los colorantes sintéticos, en la gama de los amarillos, más utilizados en la industria de los alimentos es la tartrazina, la cual tiene asociadas problemáticas, debido a sus efectos adversos sobre la salud humana y el impacto ambiental que genera. La cúrcuma es una sustancia natural que tiene propiedades terapéuticas y nutraceuticas, cuyo principio activo más importante es la curcumina, con tonalidades amarillo-naranja, que la hacen más deseable en las aplicaciones como colorante en alimentos. De este modo la cúrcuma se convierte en un colorante natural con un potencial uso en diferentes productos y un alternativo sustituto de la tartrazina. A su vez para Colombia, resulta importante el desarrollo de este colorante ya que estimula el cultivo de la *Cúrcuma longa*, planta de la cual se extrae la curcumina y que puede ser cultivada en diferentes pisos térmicos del país, incentivando el desarrollo de un sector agriindustrial con gran potencial tanto regional como nacional.

Por lo anterior, y debido a las tendencias actuales del mercado, existe interés en incursionar en proyectos de investigación que permitan la extracción de colorantes naturales, específicamente de curcumina. A partir de la integración de procedimientos y condiciones adecuadas para la producción del colorante natural extraído de la *Cúrcuma longa*, con las cualidades necesarias para su uso en las industrias de alimentos. En este sentido se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible producir un colorante natural a base de curcumina a través de tecnologías limpias, que pueda ser empleado en la industria alimentaria y que permita potencializar al país como productor en este mercado en crecimiento?

Para dar respuesta a la pregunta de investigación se plantean los siguientes objetivos de la tesis:

Objetivo general: obtener a través de tecnologías limpias un colorante a base de cúrcuma, soluble en agua, y con propiedades en matiz comparables a las de los colorantes sintéticos usados tradicionalmente.

Objetivos específicos

- Evaluar la eficiencia de metodologías de extracción tradicionales de curcuminoides comparadas con técnicas de extracción limpia.
- Desarrollar una formulación a base de curcuminoides, soluble en agua, empleando diferentes estrategias de microencapsulación.
- Diseñar una metodología escalable a nivel piloto e industrial para la extracción de colorantes a partir de cúrcuma, teniendo en cuenta criterios de factibilidad técnica, económica y ambiental.
- Evaluar la estabilidad natural y acelerada del colorante frente a condiciones como pH, luz, y temperatura.

LISTA DE ABREVIATURAS

% E Sx: porcentaje de curcuminoides totales extraídos

% REE: porcentaje relativo de extracción de curcuminoides

DSC: calorimetría de barrido diferencial

MAE: extracción asistida por microondas

ORAC: capacidad de absorción de radicales libres

PVP: Polyvinilpyrrolidone

SAS: antisolvente supercrítico

SEM: microscopía electrónica de barrido

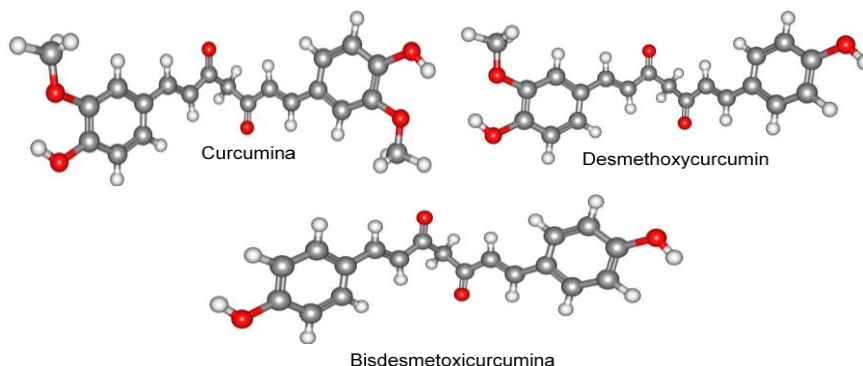
SFE: extracción por fluidos supercríticos

CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE CURCUMINOIDES POR EL MÉTODO DE SOXHLET COMPARADAS CON LAS TÉCNICAS, EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

1.1 Introducción

La cúrcuma (*Cúrcuma longa* L) es una planta ampliamente cultivada en regiones con clima tropical y subtropical, es conocida por sus rizomas aromáticos y es comúnmente usada como condimento, conservante, aromatizante y colorante, o en la medicina popular. La cúrcuma se ha investigado por su actividad biológica asociada con la presencia de compuestos fenólicos clasificados como curcuminoides. El color amarillo característico del rizoma de cúrcuma se debe a la presencia de un 3-5 % de curcuminoides, los cuales incluyen la curcumina, demethoxycurcumina, y bisdemetoxicurcumina, siendo la curcumina el principal constituyente bioactivo (Wakte, P. S. et al, 2011), las estructuras moleculares de los curcuminoides son mostrados en la Figura 1.

Figura 1. Estructuras moleculares de los curcuminoides presentes en la cúrcuma.



Fuente: Autor, construida con el software Advanced Chemistry Development, Inc., (ACD/Labs)

Para la extracción de los curcuminoides se han utilizado tecnologías tradicionales como la extracción con solventes, percolación en frío y en caliente, uso de soluciones alcalinas, sales insolubles y enzimas (Priyadarsini, 2014; Wakte et al., 2011). Muchas de estas tecnologías se utilizan a nivel industrial en procesos y equipos inadecuados, poco eficientes y con altos consumos de energía.

En los procesos industriales de extracción y purificación de curcumina se usan solventes tóxicos como acetato de etilo, acetona, diclorometano, n-butanol, metanol o hexano (Priyadarsini, 2014), gran parte de estas sustancias peligrosas son descargadas a los cuerpos de agua, en los efluentes líquidos de dichos procesos y sus vapores tóxicos son emitidos a la atmósfera con los consecuentes impactos sobre el ambiente y la salud humana.

Por otro lado, las extracciones con solventes demandan de largos periodos de tiempo para lograr la extracción completa, tienen baja selectividad de los principios activos, también dan lugar a extractos diluidos que requieren de operaciones de concentración de los solutos extraídos, que no siempre generan los porcentajes de recuperación deseados (da Silva, Rocha-Santos, & Duarte, 2016). Fuera de ello, los curcuminoides extraídos pueden contener residuos de solventes tóxicos, haciendo que los mismos sean nocivos para la salud.

Frente a la creciente demanda de componentes naturales y principios bioactivos seguros para el consumidor y a la necesidad de utilización de tecnologías de extracción y purificación amigables con el medio ambiente, se han venido desarrollando tecnologías limpias y de bajo costo, con ventajas técnicas, ambientales y económicas frente las tecnologías de extracción convencionales (Herrero, Sánchez-Camargo, Cifuentes, & Ibáñez, 2015). En ese sentido, el trabajo realizado en el presente capítulo se enfoca en el análisis, selección, adaptación y aplicación de tecnologías limpias para la extracción de curcuminoides. Se proponen extracciones con solventes inocuos de manera tal que se eliminen los riesgos por el uso de solventes tóxicos, tanto para el medio ambiente como para la salud humana. Obteniendo como resultado un colorante que cumpla criterios de bioseguridad y inocuidad.

1.2 Extracción asistida por microondas

Esta tecnología de extracción se basa en la irradiación con microondas del medio a extraer. Las microondas son ondas electromagnéticas compuestas por un campo magnético y un campo eléctrico que oscilan perpendicularmente entre sí con frecuencias entre 0,3 y 300 GHz. Las microondas tienen la capacidad de penetrar en ciertos materiales e interactuar con los componentes polares, para hacer vibrar sus moléculas generando calor, lo que es selectivo y dirigido a ciertos materiales que

pueden calentarse basados en sus constantes dieléctricas (Chan, Yusoff, Ngoh, & Kung, 2011).

El calentamiento dado por la energía de las microondas, actúa directamente sobre las moléculas como resultado de las colisiones entre partículas y se produce mediante dos mecanismos, la conducción iónica y la rotación dipolo. La conducción iónica es la migración electroforética de los componentes portadores de carga, iones y electrones, bajo la influencia del campo eléctrico producido por las microondas y la rotación dipolo es el movimiento de las moléculas polares que tratan de alinearse con el campo eléctrico generando colisiones (Wang, Ding, & Ren, 2015).

Durante la extracción asistida por microondas de componentes naturales, la energía producida por las microondas, es absorbida por algunas sustancias del material vegetal, principalmente el agua y las sustancias polares, por consiguiente la temperatura interna de las células vegetales aumenta drásticamente, generando un sobrecalentamiento que evapora los líquidos presentes y rompe las paredes celulares y/o las membranas plasmáticas, liberando los componentes a ser extraídos, lo que propicia la transferencia de masa hacia los solventes permitiendo así la extracción eficaz (Zhang, Yang, & Wang, 2011).

La extracción asistida por microondas es una tecnología que se ha desarrollado en los últimos años, convirtiéndose en una alternativa muy atractiva para la extracción de compuestos bioactivos, sustancias orgánicas de alimentos y aplicaciones ambientales (Felkai-Haddache et al., 2016; Franco-Vega, Ramírez-Corona, Palou, & López-Malo, 2015; H. Wang et al., 2015; Yedhu Krishnan & Rajan, 2016; Chen, Hu, Yao, & Liang, 2016). Además, es atractiva para la extracción de componentes de alto interés industrial, debido al poco consumo de solventes y a su alto rendimiento en cortos tiempos (Farhadpour et al., 2015). El auge de la tecnología de extracción asistida por microondas, radica principalmente en las ventajas que ofrece en comparación a tecnologías de extracción tradicionales. Entre las ventajas podemos encontrar principalmente las siguientes (Wang et al., 2015):

- Disminuye el tiempo de extracción, con el consecuente ahorro de energía
- El uso de menos solventes o disolventes más seguros, lo que reduce la generación de residuos evitando la contaminación
- Disminuye los costos con el aumento de la productividad

- Prevé la posibilidad de acoplamiento en línea con otros pasos analíticos
- Permite la automatización parcial o total del proceso, reduce el tiempo de análisis, disminuye la pérdida de analito, y aumenta la seguridad personal.

La tecnología de extracción asistida por microondas se ha aplicado para la extracción de curcumina. Se han reportado varios estudios en los cuales se buscan las condiciones óptimas para la extracción y los efectos de los diferentes parámetros del proceso sobre el porcentaje de extracción (Li, Ngadi, & Ma, 2014; Mandal, Mohan, & Hemalatha, 2008; Wakte et al., 2011).

1.3 Extracción por fluidos supercríticos

Una de las tecnologías que se ha venido desarrollando en las últimas décadas como alternativa a las técnicas tradicionales de extracción con solventes, es la tecnología de extracción con fluidos supercríticos, la cual permiten superar muchas de las dificultades que presentan las técnicas de separación tradicionales. Esta tecnología utiliza disolventes en estado supercrítico, con diferentes propiedades fisicoquímicas tales como densidad, difusividad, viscosidad y constante dieléctrica, las cuales influyen en los resultados de la extracción y propician varias ventajas.

En la extracción con fluidos supercríticos se usan diferentes sustancias químicas como solventes en estado supercrítico, entre las que se encuentran el dióxido de carbono, etano, propano, benceno, tolueno, amonio y agua entre otros. El dióxido de carbono es el solvente supercrítico más ampliamente usado, dado a su bajo costo, no es tóxico ni inflamable y está disponible en abundancia con un alto grado de pureza (Mukhopadhyay, M., 2000). Por otro lado, su temperatura crítica moderada (31,2°C), permite la preservación de compuestos bioactivos en los extractos. Por último, el extracto se protege del contacto con el aire, evitando las reacciones de oxidación catalizadas por la luz (Barbosa, De Melo, Coimbra, Passos, & Silva, 2014).

El dióxido de carbono es un gas a temperatura ambiente, por lo cual, una vez terminada la extracción y descomprimido el sistema, se propicia su eliminación sin ningún residuo, produciendo un extracto libre de disolvente. A escala industrial, cuando el consumo de dióxido de carbono

es alto, éste puede ser reciclado. Sin embargo, como la polaridad del dióxido de carbono supercrítico es baja, es menos eficaz en la extracción de compuestos más polares. Para superar este problema, se utilizan algunas sustancias, como modificadoras de la polaridad, llamadas cosolventes. Los modificadores son compuestos altamente polares que adicionados en pequeñas cantidades, puede producir cambios importantes en las propiedades disolventes de dióxido de carbono supercrítico (Reverchon & De Marco, 2006; Herrero et al., 2006).

La extracción por fluidos supercríticos, se emplea tanto para la extracción de curcumina como para la extracción de aceites volátiles a partir de la *Cúrcuma longa*. En la literatura se reportan varios estudios en los cuales se realiza la extracción de curcumina bajo diferentes condiciones de operación, para los cuales se reportan las condiciones para los mayores rendimientos de extracción (Began, Goto, Kodama, & Hirose, 2000; Wakte et al., 2011; Mukhopadhyay, M., 2000).

Braga y otros (Braga, Leal, Carvalho, & Meireles, 2003) encontraron que es posible modificar la solubilidad de un soluto empleando un cosolvente como el etanol, el cual puede generar interacciones con el soluto y/o puede variar la densidad de la fase fluida, lo que afecta el rendimiento del proceso; para el caso del etanol, se encontró que los rendimientos de extracción aumentan considerablemente cuando se emplea como cosolvente.

1.4 Extracción soxhlet

Diferentes autores han realizado estudios sobre la extracción de curcuminoides con un solvente orgánico, empleando equipos soxhlet y han encontrado que a pesar de ser un método que requiere largos tiempos de extracción y grandes cantidades de solvente, es un método eficiente, sencillo y comúnmente empleado como referencia con la que se compara el rendimiento de extracción de otros métodos Wakte et al., 2011; Mandal et al., 2008).

Braga et al, realizó la comparación de extracciones de curcumina por fluidos supercríticos, a baja presión, soxhlet e hidrodestilación, y encontró que los mayores rendimientos se obtienen por el método soxhlet (Braga et al., 2003).

En la literatura se reporta una gran cantidad de solventes orgánicos e inorgánicos en las extracciones tipo soxhlet, sin embargo muchos de estos solventes no se pueden utilizar en la obtención de curcuminoides a partir de la *Cúrcuma longa*, en especial si estos se van a emplear como aditivo colorante alimentario. Los solventes más empleados en este tipo de extracción son la acetona, el etanol y el hexano (Wakte et al., 2011); el rendimiento y eficiencia de la extracción dependen directamente del tiempo de residencia del proceso y de la relación soluto/solvente, la cual varía considerablemente según el tipo de solvente.

Para el etanol la relación peso de muestra/volumen de solvente varía entre 1/10 y 1/100, y los tiempos de residencia entre 2 y 24 h. Braga et al, obtuvo el mayor rendimiento de extracción y la mayor concentración de curcumina cuando empleo una relación soluto/solvente de 1/100, por un periodo entre 2 y 30 h (Braga et al., 2003). Para la acetona las relaciones comunes soluto/solvente son alrededor de 1/150 (Mandal et al., 2008) y los tiempos de residencia varían entre 2 y 24 h, según el rendimiento de extracción deseado; el hexano se emplea en menores relaciones de 1/5 a 1/10 y los tiempos de residencia son por lo general alrededor de 3h (Echeverri L., A. M., Restrepo Araque, Y., 1993).

En algunas investigaciones se realiza un proceso de desengrasado de la harina de *Cúrcuma longa*, en el que se emplea como solvente el hexano en una extracción soxhlet, posteriormente la muestra desengrasada se lleva a un soxhlet con etanol, con el fin de solubilizar los curcuminoides y obtener un extracto sin aceites, lo cual facilita en gran medida la purificación de los curcuminoides (Echeverri L., A. M., Restrepo Araque, Y., 1993).

La extracción de curcuminoides y oleorresina por el método soxhlet se realiza en diferentes etapas. Inicialmente se ubica la muestra en un cartucho o dedal poroso el cual consiste de un recipiente cilíndrico que se apoya en la base del equipo extractor, posteriormente se adiciona el solvente en un balón de extracción y es calentado hasta ebullición, los vapores de solvente pasan a un condensador ubicado en la parte superior del equipo extractor, los vapores de solvente condensado caen y llenan gradualmente el volumen donde se encuentra el dedal, lixiviando la muestra, hasta sobrepasar el nivel de desborde, posteriormente el lixiviado es conducido por un sifón que lo descarga en el balón de extracción. Esta operación es repetida hasta completar la extracción de curcuminoides (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998).

El proceso de lavados repetitivos pone en contacto a los curcuminoides con porciones frescas del solvente, permitiendo el agotamiento de estos en la harina, beneficiando el rendimiento de extracción al punto que es posible obtener prácticamente todos los curcuminoides extraíbles de la harina. En ese sentido, el método soxhlet suele utilizarse como referencia frente a otros métodos de extracción (Li et al, 2014).

Pese a los beneficios de la extracción por soxhlet, es importante sobre todo a nivel industrial, desarrollar, adaptar e implementar otras tecnologías de extracción que tengan ventajas técnicas, operacionales y ambientales. En este orden de ideas, el objetivo de este capítulo es evaluar la eficiencia de extracción de curcuminoides por el método soxhlet comparadas con las técnicas de extracción con fluidos supercríticos y extracción asistida por microondas.

1.5 Materiales y métodos

1.5.1 Materiales y reactivos

La harina de *Cúrcuma Longa* fue comprada a un cultivador y productor de materia prima en Uramita (Antioquia). Todos los solventes y reactivos utilizados para las extracciones fueron grado reactivo y para las pruebas cromatográficas se utilizaron solventes grado HPLC LiChrosolv® adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania) y estándares de curcumina, bisdesmetoxicurcumina y desmetoxicurcumina CromaDex (Irvine, CA, USA). La harina de cúrcuma fue caracterizada en cuanto a sus parámetros fisicoquímicos: granulometría, densidad aireada, densidad empacada y humedad.

1.5.2 Método de HPLC para análisis de curcuminoides

La determinación de los curcuminoides en las muestras de extracto y del producto de las extracciones se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC. basado en el método reportado por Li y otros (Li et al., 2014). Estas pruebas se realizaron en un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific con una columna de fase reversa C18 Acclaim™ 120 Thermo (250 mm x 4,6 mm, tamaño de poro de 5 µ; Thermo). La fase móvil se programó isocrática con proporciones de A:B 50:50 siendo A: ácido acético 0,05% y B: acetonitrilo, durante 10 min, con una velocidad

de flujo de 2mL/min. El sistema se dejó estabilizar durante 2 min entre inyecciones consecutivas. La temperatura de la columna fue mantenida a 25°C. La detección UV de las muestras fue realizada a una longitud de onda de 427 nm y el volumen de inyección fue de 10µL. Para la cuantificación, se construyó una curva de calibración con estándares individuales y en mezcla de los curcuminoides.

1.5.3 Extracción soxhlet

Se colocaron 5 g de harina de *Cúrcuma longa* en un dedal y se extrajeron con 200 mL de etanol del 95% de pureza (relación 1/40 w/v) en un equipo soxhlet, la extracción se realizó durante 8 h. Luego de la extracción, el extracto fue centrifugado a 8000 r.p.m por 10 minutos, para eliminar los sólidos y el sobrenadante se analizó por HPLC para determinar el contenido de curcuminoides de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. Esta extracción se realizó por triplicado. El porcentaje de extracción se halló utilizando la siguiente expresión:

$$\%E_{Sx} = \frac{\text{masa de curcuminoides determinados por HPLC}}{\text{masa de harina de } \textit{Cúrcuma loonga} \text{ base seca}} * 100 \quad (1)$$

Dónde % E Sx es el porcentaje de curcuminoides totales extraídos.

El contenido de curcuminoides obtenido por extracción sohxlet se consideró como el cien por ciento de curcuminoides presentes en la harina de *Cúrcuma longa* y se usó como referencia para determinar los porcentajes de curcuminoides extraídos tanto por fluidos supercríticos como por microondas (Wakte et al., 2011), de acuerdo a la ecuación:

$$\%REE = \frac{\% \text{ de extracción curcuminoides (w/w) obtenidos por MAE o SFE}}{\% \text{ curcuminoides (w/w) obtenida por 8h extrac. soxhlet}} * 100 \quad (2)$$

Dónde % REE es el porcentaje relativo de extracción de curcuminoides.

1.5.4 Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas se realizó en un equipo para microondas SIMPLY-MO71W que opera a una potencia máxima de 700 W y una frecuencia de 2450 MHz. La extracción se realizó utilizando como solvente soluciones de tween 20 a diferentes concentraciones y a diferentes relaciones peso a volumen de harina de *Cúrcuma longa* y solvente, manteniendo la potencia al 20% del valor máximo y con intervalos de tiempo entre 30 y 210 s, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Experimentación para el estudio de extracción de curcuminoides por el método de extracción asistida por microondas.

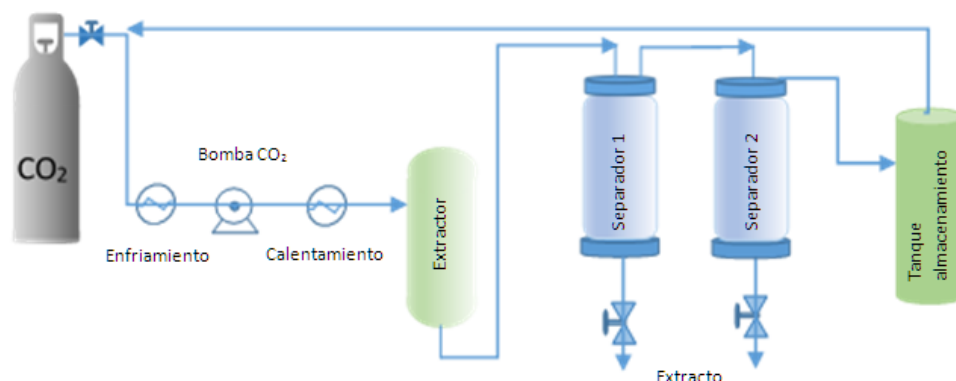
Factores		Niveles			
Solución de tween 20 (%v/v)	5			10	
Relación harina solución (%w/v)	1			5	
Tiempo (s)	30	90	150	210	

Se tomaron muestras de 10 mL que se depositaron en tubos de vidrio y fueron sometidas a irradiación por microondas, de forma intermitente con tiempos de enfriamiento. Es decir, ciclos de irradiación-enfriamiento-irradiación (Mandal et al., 2008). Cada período de irradiación fue de 30 s hasta completar el tiempo de exposición a las microondas, de acuerdo a la Tabla 1. Después de la extracción, los extractos fueron centrifugados a 8000 r.p.m durante 10 minutos y analizados por HPLC para determinar su contenido de curcuminoides.

1.5.5 Extracción por fluidos supercríticos

La extracción por fluidos supercríticos se realizó en un equipo a escala de laboratorio Thar-P200 con una capacidad de extracción de 1L, el cual consta de un extractor y dos separadores con capacidad de 500 mL cada uno. El equipo está acoplado a un ordenador que cuenta con un software ICM para controlar la presión y el flujo de CO₂. Un diagrama del sistema se presenta en la Figura 2.

Figura 2. Diagrama del sistema de extracción por fluidos supercríticos



La extracción se llevó a cabo con 100 g de harina de *Cúrcuma longa* que fueron depositados en el extractor. Posteriormente, se fijaron la temperatura del separador, del extractor y del CO₂ en el controlador de temperatura. A continuación, se programó la presión y el flujo de CO₂ y se abrió la válvula del cilindro de CO₂ y se encendió la bomba para llegar a la presión requerida. Ésta es la etapa de funcionamiento en la cual el sistema está en condiciones estáticas, una vez se alcanza la presión, se cambió el perfil del sistema de presión a flujo, a través del software de control, es decir, de modo estático a dinámico.

En este modo de operación se realizó la extracción durante 120 min, utilizando 10% de etanol como cosolvente. Una vez transcurrido este tiempo, se cerró la válvula de CO₂, se apagó y se despresurizó el sistema hasta presión atmosférica. Finalmente, se recolectó el extracto para su análisis por HPLC.

Para la extracción de los curcuminoides, se corrió un diseño experimental factorial 2^3 con replica al centro con las variables de proceso: temperatura (°C), presión (bar) y flujo CO₂ (g/min) cuyos niveles se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Variables Independientes codificadas y naturales usadas para la generación del diseño experimental.

Variables independientes	Variable Codificada			Variable Natural		
	Niveles			Niveles		
Temperatura (°C)	-1	0	+1	-1	0	+1
Presión (bares)	-1	0	+1	-1	0	+1
Flujo CO2 (g/min)	-1	0	+1	-1	0	+1

El diseño se conformó con una porción factorial constituida por $2^k=2^3=8$ tratamientos, los que constituyen todas las combinaciones posibles de los niveles de las variables, una porción central, constituida por 4 réplicas conformadas por el punto medio entre el nivel bajo y alto de cada variable de proceso, $2k=2(2)=4$. Por lo anterior, el número de experimentos fue $2^3 + 4$ para un total de 12 corridas.

En la Tabla 3, se presentan los experimentos corridos para la extracción, con diferentes combinaciones de temperatura, presión y flujo de CO₂ de acuerdo al diseño experimental. Para el análisis de los datos, se empleó el programa *Statgraphics* 16.1.

Tabla 3. Plan experimental para la extracción de cucuminoides con CO₂ supercrítico (corridas generadas arrojadas por el software *Statgraphics*).

Corridas	Temperatura (°C)	Presión (bares)	Flujo CO2 (g/min)
1	90	500	40
2	80	450	120
3	80	450	120
4	90	400	200
5	80	450	120
6	70	400	200
7	90	500	200
8	90	400	40
9	70	400	40
10	80	450	120
11	70	500	200
12	70	500	40

1.5.6 Tratamiento estadístico de resultados

Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar. La significación estadística de las diferencias entre grupos se evaluó mediante un ANOVA de una vía, utilizando Statgraphics versión 16.1. Las diferencias entre las medias se evaluó a través de comparaciones múltiples post-test (Newman-Keuls) y la significancia se identificó a nivel de 5%. Las gráficas se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

1.6 Resultados y discusión

1.6.1 Extracción por soxhlet

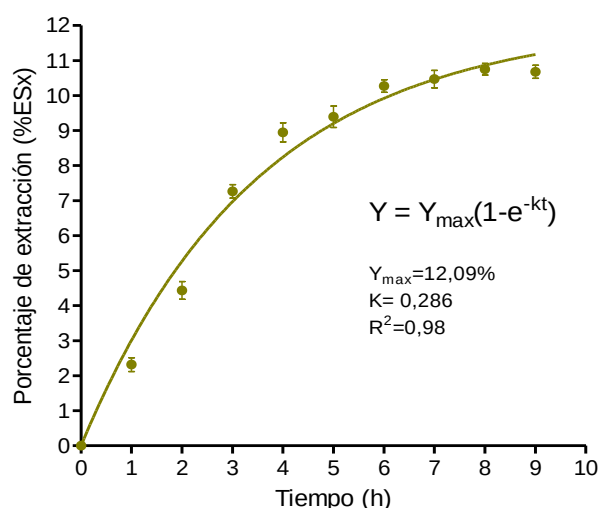
La harina de *Cúrcuma longa* de partida fue caracterizada midiendo los siguientes parámetros: humedad, granulometría, densidad aparente y densidad empacada, tal y como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Caracterización de la harina de cúrcuma

Tamaño μm		Malla	%
Granulometría	425	40	8,0
	180	80	16,4
	150	100	10,0
	90	170	49,6
	75	200	17,6
	53	270	0,0
	38	400	0,0
	Colector		0,0
Densidad aireada (g/mL)		0,456	
Densidad empacada(g/mL)		0,5919	
Humedad (%)		10.47	

La experimentación por soxhlet de harina de *Cúrcuma longa* se llevó a cabo teniendo en cuenta que por este método se obtiene la máxima cantidad de curcuminoides extraíbles de la harina, este valor se asume como la máxima recuperación de los curcuminoides presentes en la harina y sirve de referencia para calcular el porcentaje de extracción de curcuminoides por las otras tecnologías de extracción. En la Figura 3 se presenta la cinética de extracción de curcuminoides a partir de la harina de *Cúrcuma longa*.

Figura 3. Cinética de extracción de curcuminoides totales por soxhlet.



En la Figura 3, se puede observar que durante las primeras cuatro horas del proceso, se extrae aproximadamente el 83% de los curcuminoides extraíbles de la harina. Este periodo de tiempo corresponde a la extracción de la fracción de fácil separación, a partir de ese tiempo las cantidades de curcuminoides son cada vez menor por unidad de tiempo, hasta llegar a agotar los curcuminoides extraíbles y el porcentaje extraído se vuelve constante. En este sentido, el porcentaje de extracción de curcuminoides es alrededor de 10,80 mg de curcuminoides /100 g de harina (10,75 %±0,29), en un proceso que dura 8 horas.

Desde el punto de vista cinético, la extracción soxhlet de curcuminoides sigue un modelo exponencial con una velocidad de 0,286 gramos de curcuminoides por cada 100 gramos de harina de cúrcuma en 1 hora de extracción, hasta alcanzar una extracción máxima teórica en tiempo infinito de 12,09%±0,40, lo cual se acerca al resultado experimental obtenido en las 8 horas de extracción. Este valor es muy superior al

encontrado por Wakte y otros en su estudio de optimización de la extracción de curcumina por diferentes técnicas cuyo valor fue de $2,1 \pm 0,1\%$ para la extracción por soxhlet utilizando como solvente acetona (Wakte et al., 2011).

1.6.2 Extracción asistida por microondas

En la Figura 4 se presentan los resultados de la experimentación realizada para la extracción asistida por microondas, mostrando los porcentajes de extracción de curcuminoides a diferentes combinaciones de concentraciones de solvente y relación masa de harina de *Cúrcuma longa*-solvente. De estos resultados se puede observar que para todas las condiciones, el porcentaje de extracción aumenta con el tiempo de exposición, aunque para la relación 5% W/v no es significativo el aumento en el porcentaje de extracción.

Los mayores porcentajes de extracción se obtuvieron cuando se utilizó la menor relación harina de *Cúrcuma longa* solvente (w/v), es decir las extracciones en las que se utilizó la relación de 1% (w/v) tanto para tween al 5% (v/v) como para la de 10% (v/v). De hecho, el mayor porcentaje de extracción se obtuvo con tween del 10%(v/v) y relación harina-solvente de 1%(w/v) logrando una extracción de 70,86 %, en un tiempo de 210 s. Sin embargo, al aplicar un análisis estadístico ANOVA de doble vía para determinar el efecto del tiempo (30 a 210 s) y la concentración del solvente (tween 5 y 10% v/v, manteniendo fija la proporción soluto/solvente en 1% w/v) sobre la extracción de curcuminoides, se puede apreciar (Tabla 5) que no existe una interacción entre las variables ($P > 0,05$) y que la mayor contribución al porcentaje de extracción de curcuminoides lo tiene el tiempo ($P < 0,001$) y no así el solvente ($P < 0,05$). De hecho, al comparar el porcentaje de extracción entre tween al 5 y 10% v/v en todos los tiempos evaluados, no existe una diferencia estadísticamente significativa ($P > 0,05$).

Figura 4. Porcentajes de extracción de curcuminoides en la extracción asistida por microondas, a diferentes combinaciones de concentración de solvente (% v/v) y relación muestra-solvente (% w/v).

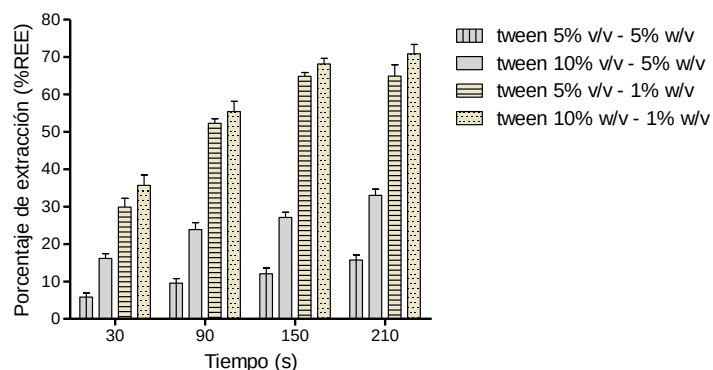


Tabla 5. Análisis ANOVA de doble vía para determinar el efecto de las variables (solvente y tiempo) sobre el porcentaje de curcuminoides extraídos por microondas

Fuente de variación	Porcentaje de la variación total	Valor P
Interacción	0,21	0,8743
Solvente	2,42	0,0117
Tiempo	92,59	P<0,0001

Los resultados obtenidos para la extracción asistida por microondas durante el presente estudio y las condiciones del proceso, pueden ser comparadas con otros estudios similares en los que se obtienen mayores rendimientos, pero de igual manera, mayores tiempos de extracción y diferentes solventes:

Wakte y otros (Wakte et al., 2011) realizaron un estudio en el que analizaron el efecto de una operación de remojo previo a la extracción asistida por microondas, utilizando varios solventes tanto para el remojo como para la extracción. El mayor porcentaje de extracción de curcumina fue de 90,69% obtenido en un proceso en el cual se realizó inicialmente un remojo de la harina de *Cúrcuma longa* en agua, durante 24 horas, en relación 1:2 (w/v) y posteriormente la extracción con acetona a 270 W de potencia por 5 minutos.

Mandal y otros (Mandal et al., 2008) realizaron la extracción de curcumina utilizando un diseño experimental de Taguchi L9 para determinar los efectos de diferentes factores tales como tamaño de partícula de la harina de *Cúrcuma longa*, potencia aplicada de microondas, tiempo y volumen de modificador. Se utilizaron tamaños de malla de 10, 20 y 40 para el tamaño de partícula, para la potencia 20, 40 y 60 % de la potencia total (700W); 1, 2 y 4 minutos de extracción y como modificador se utilizó metanol en una etapa de remojo por 10 minutos, previa a la extracción en la que se usó acetona como solvente. En este estudio se concluye que el mecanismo que actúa en la extracción es el calentamiento simultáneo de muestra y solvente, lo que aumenta la solubilidad de la curcumina, además cuando el tiempo de radiación aumentó a 5 minutos, el calentamiento resultó perjudicial para la extracción reduciendo su porcentaje. El mayor porcentaje de extracción de curcumina en este trabajo fue de 98,16 % con relación al total de curcuminoides extraídos por soxhlet.

Otro estudio a considerar es el realizado por Li y otros (Li et al., 2014), en el cual se determinaron las condiciones óptimas de extracción de curcuminoides por la metodología de superficie de respuesta, encontrando que dichas condiciones son 72% de etanol como solvente, 10 % de la potencia del equipo (800 W potencia total del equipo) y 7 minutos de extracción, bajo estas condiciones se obtuvo un rendimiento de extracción de curcuminoides de $1,01 \pm 0,02$ g/100 g de masa seca.

Los estudios están mostrando que las extracciones con acetona y etanol tienen mayores porcentajes de extracción, pero debido a los solventes orgánicos utilizados, estos dejan residualidad en el material obtenido, por el contrario las extracciones realizadas en este estudio se hicieron con un solvente que permite el uso del producto en alimentos que aunque tenga residualidad del solvente, este no es tóxico, Adicionalmente, es un solvente inocuo para el consumidor y para el medio ambiente que permite superar la desventaja del uso de solventes en los métodos de extracción.

1.6.3 Extracción por fluidos supercrítico

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para los porcentajes de extracción correspondientes al desarrollo experimental. Mediante el análisis de varianza, la única variable significativa que se determinó en el experimento fue el flujo $p < 0,05$. Los demás factores, así como las

interacciones entre los factores, no son significativos, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 6. Porcentajes de extracción de acuerdo a la combinación de los factores del diseño experimental.

Corridas	Temperatura (°C)	Presión (bares)	Flujo CO ₂ (g/min)	Curcuminoides totales (mg)	Curcumina (%)
1	90	500	40	11,4881	15,3456
2	80	450	120	22,9646	31,8950
3	80	450	120	22,0271	33,1237
4	90	400	200	12,1411	17,2450
5	80	450	120	23,0302	31,7769
6	70	400	200	19,7602	23,4050
7	90	500	200	55,5106	65,3317
8	90	400	40	9,0077	11,8970
9	70	400	40	8,1572	10,9899
10	80	450	120	22,0287	29,8363
11	70	500	200	13,7337	18,0873
12	70	500	40	9,8704	12,6455

Corridas generadas por el software estadístico *Statgraphics*

A continuación se presenta la ecuación de cada uno de los modelos ajustados, para las variables respuestas consideradas en el estudio (Curcuminoides totales y Curcumina):

$$Y_1 = 567,551 - 6,80857X_1 - 1,2069X_2 - 0,979515X_3 + 0,0147569X_1X_2 + 0,00645425X_1X_3 + 0,00129671X_2X_3 \quad (3)$$

$$Y_2 = 481,569 - 5,81047X_1 - 1,02924X_2 - 0,770911X_3 + 0,0126056X_1X_2 + 0,00499197X_1X_3 + 0,00104401X_2X_3 \quad (4)$$

Donde:

X₁: Temperatura.

X₂: Presión.

X₃: Flujo.

Y₁: Curcumina

Y₂: Curcuminoides totales

Tabla 7. Análisis de Varianza (Curcuminoides y curcumina)*.

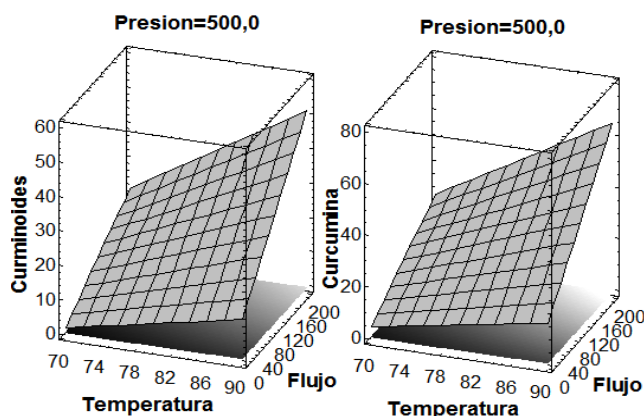
Respuesta	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Curcuminoides $r^2 = 79,99\%$	A:Temperatura	170,063	1	170,063	2,32	0,1884
	B:Presion	218,359	1	218,359	2,98	0,1451
	C:Flujo	494,256	1	494,256	6,73	0,0485
	AB	317,8	1	317,8	4,33	0,0919
	AC	127,589	1	127,589	1,74	0,2445
	BC	139,515	1	139,515	1,90	0,2265
	Error total	366,939	5	73,3879		
	Total (corr.)	1834,52	11			
Curcumina $r^2 = 78,25\%$	A:Temperatura	294,293	1	294,293	2,37	0,1843
	B:Presion	334,153	1	334,153	2,69	0,1619
	C:Flujo	741,529	1	741,529	5,97	0,0494
	AB	435,529	1	435,529	3,51	0,1200
	AC	213,286	1	213,286	1,72	0,2470
	BC	215,227	1	215,227	1,73	0,2451
	Error total	620,934	5	124,187		
	Total (corr.)	2854,95	11			

*Diferenciando el contenido de curcuminoides totales (como la suma de curcumina, desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina) del contenido de curcumina individual.

Con la metodología de la pendiente ascendente se obtuvieron los valores de los factores que optimizan cada una de las variables respuestas (curcuminoides totales y curcumina). El máximo en cada una de las variables respuestas se obtiene en los niveles altos de cada factor empleado. La superficie de respuesta para cada una de las variables dependientes estudiadas se presenta en la Figura 5.

De acuerdo al análisis de varianza Tabla 7, el factor estadísticamente significativo predominante en el proceso de extracción de curcuminoides fue el flujo de solvente ($P < 0,05$), de tal forma que independientemente de la temperatura y la presión de operación, un aumento en el flujo, genera un aumento significativo en el porcentaje de extracción (corridos 1 y 7; 6 y 9; y 11 y 12, Tabla 6).

Figura 5. Superficies de respuesta que relaciona la temperatura, el flujo y la presión con los porcentajes de extracción de curcuminoides totales (izquierda) y la curcumina (derecha).



Mientras que la presión y la temperatura tienen una afectación termodinámica en el solvente (densidad y solubilidad) y de sus propiedades de transporte (viscosidad y difusividad) la velocidad del solvente es una variable independiente que influye directamente en la dispersión axial y el coeficiente de transferencia de masa convectiva. Por lo cual sería racional concluir que para mejorar el rendimiento de extracción debe reducirse la resistencia de película, lo que aumentaría la transferencia de masa (Sovová & Stateva, *Supercritical Fluid Extraction From Vegetable Materials*, 2011). Lo anterior explica el fenómeno observado en la extracción de los curcuminoides, mostrando que no fueron las variables termodinámicas las que controlaron la extracción, esto se corrobora en el análisis estadístico ($P > 0,05$ Tabla 6), sino que éste fue un proceso convectivo que varió el tiempo de retención, el cual depende directamente del flujo del solvente, haciendo del mismo el responsable de los rendimientos.

Para los curcuminoides totales el porcentaje máximo de extracción (55,5 %) se obtiene para una temperatura de 90°C, una presión de 500 bar (50 MPa), un flujo de 200 g/min (12 kg/h) y 10 % de etanol como cosolvente, durante 120 min de operación. Lo mismo ocurre para la curcumina con un porcentaje máximo de extracción de 65,3 %. Comparando estos resultados con otras investigaciones previas, se encuentran porcentajes similares de extracción de curcumina, pero obtenidos bajo condiciones de operación diferentes, como es el caso de Wakte y otros (Wakte et al., 2011) que obtuvieron 69,37% de rendimiento en la extracción, operando el proceso a una presión de 30 MPa, una temperatura de 50°C, un flujo de

CO₂ de 5 mL/min, utilizando 10% de etanol como cosolvente y un tiempo de extracción de 240 min.

Unas condiciones de operación similares a las obtenidas en este estudio, son reportadas por Mukhopadhyay (Mukhopadhyay, M., 2000) para la extracción de curcumina a partir de los rizomas de cúrcuma, estas condiciones son: 500 bar y 80°C, en este trabajo se obtuvo un rendimiento de 0.35% w/w (con base en la masa de rizomas frescos).

1.7 Conclusiones

Al comparar los rendimientos y tiempos necesarios en la extracción para las cuales soxhlet se usó como referencia, de las dos tecnologías utilizadas; microondas y fluidos supercríticos, se obtuvieron los siguientes valores: 70,86% 120 s y 55,5%, 120 min respectivamente.

En la extracción asistida por microondas se utilizó como solvente una solución de tween 20, lo cual es una alternativa para la sustitución de solventes orgánicos tóxicos como la acetona, haciendo que esta tecnología sea más amigable con el ambiente.

Se determinó que la extracción por fluidos supercríticos está controlada por el flujo de dióxido de carbono, de forma tal que al aumentar la velocidad del solvente se mejora la transferencia de masa, mostrando un aumento del rendimiento de extracción con aumentos del mismo. Las variables presión y temperatura no causan efectos significativos en el proceso de extracción.

1.8 Referencias

Barbosa, H. M. A., De Melo, M. M. R., Coimbra, M. A., Passos, C. P., & Silva, C. M. (2014). Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. *Journal of Supercritical Fluids*, 85, 165–172. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.011>

- Began, G., Goto, M., Kodama, A., & Hirose, T. (2000). Response surfaces of total oil yield of turmeric (*Curcuma longa*) in supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, 33(5), 341–345. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00053-3](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00053-3)
- Braga, M. E. M., Leal, P. F., Carvalho, J. E., & Meireles, M. A. a. (2003). Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6604–6611. <http://doi.org/10.1021/jf0345550>
- Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., & Kung, F. W.-L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213–6225. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040>
- Chen, Q., Hu, Z., Yao, F. Y.-D., & Liang, H. (2016). Study of two-stage microwave extraction of essential oil and pectin from pomelo peels. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 538–545. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.019>
- da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40–51. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>
- Farhadpour, M., Hashempour, H., Talebpour, Z., A-Bagheri, N., Shushtarian, M. S., Gruber, C. W., & Ghassempour, A. (2015). Microwave-assisted extraction of cyclotides from *Viola ignobilis*. *Analytical Biochemistry*, (January), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2015.12.001>
- Felkai-Haddache, L., Dahmoune, F., Remini, H., Lefsih, K., Mouni, L., & Madani, K. (2016). Microwave optimization of mucilage extraction from *Opuntia ficus indica* Cladodes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 24–30. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.090>

- Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Estimation of mass transfer coefficients of the extraction process of essential oil from orange peel using microwave assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, 170, 136–143. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.025>
- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibanez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgaeA review. *Food Chemistry*, 98(1), 136–148. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>
- Herrero, M., Sánchez-Camargo, A. del P., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2015). Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 26–38. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.018>
- Li, M., Ngadi, M. O., & Ma, Y. (2014). Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.115>
- Luque de Castro, M. ., & García-Ayuso, L. . (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00233-5](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5)
- Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2008). Microwave assisted extraction of curcumin by sample–solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(2), 322–327. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.10.020>
- Mukhopadhyay, M. (2000). Natural extracts using supercritical carbon dioxide. CRC Press Taylor & Francis Group.U.S.A. p.339. (2000), 2000.

- Priyadarsini, K. (2014). The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*, 19(12), 20091–20112. <http://doi.org/10.3390/molecules191220091>
- Reverchon, E., & De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146–166. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>
- Sovová, H., & Stateva, R. P. (2011). Supercritical Fluid Extraction From Vegetable Materials. *Chemical Engineering*, 79-156.
- Wakte, P. S., Sachin, B. S., Patil, A. A., Mohato, D. M., Band, T. H., & Shinde, D. B. (2011). Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Separation and Purification Technology*, 79(1), 50–55. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.03.010>
- Wang, H., Ding, J., & Ren, N. (2015). Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 75, 197–208. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.005>
- Yedhu Krishnan, R., & Rajan, K. S. (2016). Microwave assisted extraction of flavonoids from *Terminalia bellerica*: Study of kinetics and thermodynamics. *Separation and Purification Technology*, 157, 169–178. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.11.035>
- Zhang, H.-F., Yang, X.-H., & Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(12), 672–688. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.07.003>

CAPITULO 2. ENCAPSULACIÓN DE CURCUMINA POR LA TECNOLOGÍA DE ANTISOLVENTE SUPERCRÍTICO-SAS PARA MEJORAR SU ESTABILIDAD Y SOLUBILIDAD EN AGUA

2.1 Introducción

El color es una de las propiedades organolépticas más importantes en los alimentos, este permite juzgar su calidad y aceptación por parte de los consumidores (X. Q. Li, Zhang, Ma, Li, & Guo, 2015; Sorouraddin, Saadati, & Mirabi, 2015). Los colorantes son ampliamente utilizados como aditivos en los alimentos para compensar y realzar el color de los productos terminados, dado a pérdidas del mismo durante los procesos de producción y almacenamiento, mejorando su estética y dándoles una apariencia fresca, permitiendo estandarizar los productos (Dotto, Pinto, Hachicha, & Knani, 2015; Tan, Lim, & Lee, 2014; Zhu et al., 2016; Liu, Liu, Li, & Tang, 2015).

Los colorantes que se adicionan a los alimentos pueden ser naturales o sintéticos. Los colorantes naturales tienen menor intensidad de color, son más sensibles a la luz, al pH, a la temperatura y a los agentes redox, en comparación con los colorantes sintéticos (X. Q. Li et al., 2015), que son más estables a los factores externos y producen una coloración más intensa y brillante. Por esta razón los colorantes sintéticos son más utilizados, aunque en los últimos años se ha revaluado su uso dado a sus efectos tóxicos para la salud humana (Desanti & Cahyono, 2015), los daños al ambiente y a los ecosistemas (Gautam et al., 2015; González, Villanueva, Piehl, & Copello, 2015), al punto de ser prohibidos en muchos países. Se estima que durante la producción y uso de los colorantes sintéticos son descargados al ambiente entre el 10 y 15% de estos (Gajera, Bambharolia, Hirpara, Patel, & Golakiya, 2015; Safdar, Junejo, & Balouch, 2015).

Los colorantes naturales son extraídos de animales, plantas, hongos o microorganismos, su uso ha cobrado importancia por conferir propiedades nutricionales y nutraceuticas a los alimentos (Wada et al., 2007), entre estos se encuentran las antocianinas, los carotenoides y las antraquinonas (Wada et al., 2007). Por su parte, los colorantes sintéticos se obtienen por síntesis química, los principales grupos de colorantes sintéticos son los azoicos, los trifenilmetanos, los xantenos, indigotinas y la quinolina. Los colorantes azoicos con el grupo cromóforo azo en la estructura molecular, representan más de la mitad de la producción de

colorantes a nivel mundial (Matouq, Al-Anber, Susumu, Tagawa, & Karapanagioti, 2014). Sin embargo, se ha confirmado la toxicidad de algunos de ellos (X. Q. Li et al., 2015).

Uno de los colorantes azoicos más conocido es la tartrazina, ampliamente usado como aditivo para alimentos, el cual se encuentra en bebidas, vinos, sopas, gelatinas, helados, confites, cereales, tortas, postres y salsas, entre otros (Zhao, Zeng, & Zhao, 2014). La tartrazina también es usada en la industria cosmética, en productos como jabones, cosméticos y productos para el cuidado personal (Oancea & Meltzer, 2013). Adicionalmente, en productos farmacéuticos como vitaminas, antiácidos y en las capsulas para medicamentos.

La tartrazina puede ser potencialmente sustituida por la curcumina, 1,7- bis (4 - hidroxí 3 - metoxifenil) -1,6 - heptadiona - 3,5 – diona (Osorio-Tobón, Carvalho, Rostagno, Petenate, & Meireles, 2016), un colorante natural que se extrae de los rizomas de la *Cúrcuma longa* L, planta originaria de la región tropical del sur de Asia (Wakte et al., 2011), ampliamente usada en la medicina tradicional de varios países asiáticos (Euterpio, M .A., et al, 2011), en la medicina Ayurveda (sistema de medicina indio) se ha documentado su uso en el tratamiento de diferentes enfermedades como artritis, heridas, fiebre, úlceras, ictericia y psoriasis entre otras (Anderson, 2003 ; Mohajeri, Sadeghizadeh, Naja, & Javan, 2015).

El color amarillo característico del rizoma de cúrcuma se debe a la presencia de un 3-5 % de curcuminoides, los cuales incluyen la curcumina, demethoxycurcumina, y bisdemetoxicurcumina, siendo la curcumina el principal constituyente bioactivo (Wakte, P. S. et al, 2011). Los curcuminoides tienen aplicaciones médicas por sus efectos antioxidantes, anticancerígenos, antimutagénicos, antiinflamatorios y antifúngica entre otros (Patil, Choudhary, Rathore, Roy, & Mahadik, 2015; Yadav & Kumar, 2014). Además, son usados en alimentos (Jia, Wang, Gao, & Zhao, 2015), como condimento, especia y colorante (Paulucci, Couto, Teixeira, & Freitas, 2013) en diferentes preparaciones como salsas, encurtidos, mostaza, mantequilla y quesos. La curcumina tiene propiedades como colorante de tonalidades amarillo-naranjas, nombrado como E100 bajo el Código Alimentario de la Unión Europea.

La curcumina es insoluble en agua y éter, pero soluble en etanol, sulfóxido de dimetilo y otros solventes orgánicos (Aggarwal, Kumar, & Bharti, 2003). El uso de la curcumina como colorante o producto

farmacéutico se ve limitado por su baja solubilidad en agua y por la afectación del color y estabilidad química por factores como la luz, el pH, la temperatura, los oxidantes químicos, los iones metálicos, las enzimas y los solventes (Tønnesen, Másson, & Loftsson, 2002). Además de su rápida hidrólisis bajo condiciones alcalinas y su susceptibilidad a la degradación fotoquímica (Wikene, Bruzell, & Tønnesen, 2015; W. Liu, Chen, Cheng, & Selomulya, 2016; Yadav & Kumar, 2014).

Para contrarrestar estos efectos, se han aplicado diferentes métodos que permiten estabilizar la curcumina con el fin de evitar cambios significativos de color y aumentar su solubilidad en agua. Entre estos métodos se encuentra la encapsulación (Leshik, R. R.; Magnolia, D. E. ,1981), la adición de diluyentes (Delgado V. F., Paredes L., O., 2002) y la formación de complejos con compuestos como ciclodextrinas (Tønnesen et al., 2002; Mohan, Sreelakshmi, Muraleedharan, & Joseph, 2012), gelatinas (Schrantz, J. L. & Palos, H. ,1983) o propilenglicol (Blasco Piquer, M. et al.,1999).

Una de las tecnologías más utilizadas y estudiadas para proteger y dar propiedades deseadas a los principios activos es la encapsulación y entre ellas la alternativa de usar fluidos supercríticos. La encapsulación es una técnica que se ha desarrollado en las últimas décadas con numerosas aplicaciones en la industria farmacéutica, agrícola y de los alimentos (López-Tobar, Blanch, Ruiz del Castillo, & Sanchez-Cortes, 2012).

Esta técnica permite dar diferentes propiedades a los principios activos, tales como mejorar su solubilidad en agua, conservarlos de factores externos y liberarlos de manera controlada (Chen, Bai, Yang, Yang, et al., 2014; Chen, Bai, Yang, Zang, et al., 2014; De Marco, Rossmann, Prosapio, Reverchon, & Braeuer, 2015), lo cual se consigue mediante la formación de una matriz polimérica que protege los ingredientes de la degradación térmica y química como son la oxidación y la hidrólisis (de Vos, Faas, Spasojevic, & Sikkema, 2010) y le confiere las propiedades deseadas durante los procesos de fabricación y almacenamiento de los productos (Sowasod, Nakagawa, Tanthapanichakoon, & Charinpanitkul, 2012).

En los procesos convencionales de encapsulación se realiza una atomización de las partículas de recubrimiento, disueltas en un solvente líquido sobre un lecho fluidizado que contiene los componentes activos en forma de diminutas partículas sólidas o líquidas. Después de la

atomización, las gotas de material de recubrimiento impregnan las partículas del lecho y el solvente es evaporado rápidamente (Kröber & Teipel, 2005).

Como alternativa a las tecnologías tradicionales de encapsulación, se propone el uso de antisolvente supercrítico (SAS), tecnología que permite producir en un solo paso co-precipitación y microencapsulación, utilizando dióxido de carbono supercrítico, en este proceso el material de interés es disuelto en un solvente convencional. Esta mezcla es pulverizada por medio de una boquilla en co-corriente con el dióxido de carbono supercrítico a condiciones de temperatura y presión moderadas. La alta presión del dióxido de carbono hace disminuir la solubilidad del soluto en la mezcla, actuando como antisolvente, lo que produce una sobresaturación que desencadena la nucleación y la formación de nanopartículas o micropartículas (Cocero, Martín, Mattea, & Varona, 2009; Visentin, Rodríguez-Rojo, Navarrete, Maestri, & Cocero, 2012).

El uso de fluidos supercríticos en el proceso de microencapsulación tiene la ventaja de encapsular partículas submicrónicas por atomización, mejorando la deposición sobre las partículas, dejando una capa de recubrimiento más delgada, en este proceso las fuerzas de cohesión y adhesión son mucho más pequeñas que las presentadas con un solvente orgánico, se facilita la encapsulación de partículas menores de 100 μm . Adicionalmente, este proceso es limpio para el producto, dado las propiedades del dióxido de carbono supercrítico, presentando condiciones medias de temperatura y presión (T_c 304,1 K, P_c 7,38 MPa), es químicamente estable, no tóxico, no inflamable, de fácil disposición, relativamente barato, fácilmente recuperable después del proceso y produce partículas más homogéneas en comparación con las obtenidas con solventes orgánicos (Almeida et al., 2013; Causa, Filippone, Acierno, Domingo, & Salerno, 2015; Visentin et al., 2012).

La tecnología SAS se ha estudiado y aplicado en el tratamiento de la curcumina bien sea para la micronización de partículas, como para la nanoencapsulación o microencapsulación de la misma con aplicaciones principalmente en el área farmacéutica, mejorando su estabilidad, disponibilidad y solubilidad en agua. Varios trabajos se han reportado en este sentido:

Zabihi y otros (Zabihi et al., 2014a) obtuvieron por antisolvente supercrítico-SAS nanopartículas de curcumina encapsuladas con ácido

poli láctico-co-glicólico. Las nanopartículas de curcumina fueron fluidizadas aplicando ultrasonido durante el proceso, obteniendo partículas entre 40 y 63 nm. Los estudios in vitro demostraron que este método tiene éxito en la preparación de sistemas de liberación sostenida. Yadav y Kumar, (Yadav & Kumar, 2014) obtuvo por el método de precipitación antisolvente, partículas amorfas de curcumina con un alto contenido de curcumina, en el rango de 100-200 nm. El tamaño y morfología fue controlado mediante el uso de gelatina como estabilizador, en este estudio, las partículas de curcumina liofilizadas con D-sorbitol como lioprotector mostraron buena dispersión en solución y hasta 4 veces mayor tasa de liberación de curcumina que la de la curcumina no procesada.

Kakran, Sahoo y otros (Kakran, Sahoo, Tan, & Li, 2012), mejoraron la solubilidad y disolución de curcumina en agua mediante la fabricación de partículas por dos métodos: la precipitación antisolvente con una bomba de jeringa (APSP) y evaporación precipitación de nanosuspensión (EPN). En este estudio se analizaron para APSP, se estudió la influencia del caudal, la velocidad de agitación, la relación de disolvente a anti-disolvente (SAS) y la concentración de curcuma en la formación y tamaño de las partículas. Por el método APSP se obtuvieron partículas de 330 nm mientras que por EPN se obtuvieron partículas de 150 nm. Este estudio demostró que los dos métodos pueden producir nanopartículas. Sin embargo, las partículas de curcumina obtenidas por EPN fueron más pequeñas que las de APSP y, por tanto, mostraron mayor solubilidad, velocidad de disolución, y actividad antioxidante que las obtenidas por APSP.

Otras aplicaciones tales como el desarrollo de un aditivo para alimentos en las que se aproveche los beneficios de la tecnología SAS para mejorar las propiedades de solubilidad en agua y estabilidad de la curcumina para el desarrollo de un colorante no han sido exploradas, en ese sentido el objetivo de este capítulo es desarrollar la formulación de un colorante a partir del extracto etanólico de cúrcuma, haciendo uso de la tecnología de antisolvente supercrítico-SAS para encapsular la curcumina mejorando su estabilidad y solubilidad en agua.

Los materiales de recubrimiento usados como encapsulantes deben cumplir varias condiciones para ser adecuados en el proceso de encapsulación por la tecnología de antisolvente supercrítico-SAS, entre las que se encuentran su biocompatibilidad con el principio activo, no ser tóxicos, ser biodegradables, conservar sus propiedades físicoquímicas en

el rango de condiciones del proceso de encapsulación, ser soluble en los solventes utilizados en el proceso, deben proporcionar un medio adecuado para la conservación de las propiedades y actividad del principio activo, deben ser fáciles de procesar por esta técnica. Los biopolímeros naturales o sintéticos se utilizan como revestimiento. La propiedad clave que diferencia a los biopolímeros de los materiales con los que estos degradan in vivo o en el ambiente produciendo productos biocompatibles o no tóxicos (Cocero, et al., 2009).

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Materiales y reactivos

La harina de cúrcuma fue comprada a un proveedor de especias y condimentos de España. Se utilizaron como solventes etanol absoluto y acetona del 95% de pureza, como encapsulantes los polímeros Polyvinilpyrrolidone (PVP), Eudragit® L100 y Pluronic® F127 y como surfactante tween 20, los cuales fueron comprados a Panreac Química (España). El CO₂ del 95% fue suministrado por Carburos Metálicos S.A (España). Para las pruebas cromatográficas se utilizaron solventes grado HPLC y estándares de curcumina, bisdesmetoxicurcumina y desmetoxicurcumina CromaDex adquiridos en Grupo Químico S.A.S Bogotá, Colombia.

2.2.2 Preparación de soluciones

El extracto de cúrcuma (oleorresina), fue disuelto en una solución del polímero encapsulante (PVP, Eudragit® L100 y Pluronic® F127) en etanol absoluto. Estos materiales encapsulantes se seleccionaron ya que son de uso farmacéutico o de alimentos, liberan el principio activo dependiendo del pH, específicamente el Eudragit® L100 se solubiliza por encima de pH 6, son sustancias no tóxicas, ampliamente utilizadas como material de recubrimiento, son solubles en solventes orgánicos como el etanol, solvente utilizado para la encapsulación por SAS.

Las soluciones se prepararon manteniendo una relación másica de extracto seco a encapsulante como se presenta en la Tabla 8. En el caso del extracto de cúrcuma desengrasado, se eliminó la mayor cantidad de lípidos, realizando una separación de los mismos con hexano en relación

1/2 v/v extracto a hexano. Para la prueba de solubilidad y estabilidad se prepararon soluciones buffer de pH 4 y 8 a partir de fosfato ácido de potasio y fosfato dipotásico.

2.2.3 Experimentación SAS

La encapsulación de la curcumina se realizó en un equipo piloto de antisolvente supercrítico -SAS cuyo diagrama de flujo se muestra en la Figura 6. El equipo consta de un recipiente para la precipitación con capacidad para 1,5 L, construido en acero inoxidable AISI 316, aislado y provisto de chaqueta. Para medir las condiciones de operación, este recipiente posee una termorresistencia Pt-100 con una precisión de $\pm 0,1K$ y un medidor de presión de membrana digital con una precisión de $\pm 0,25$ bar.

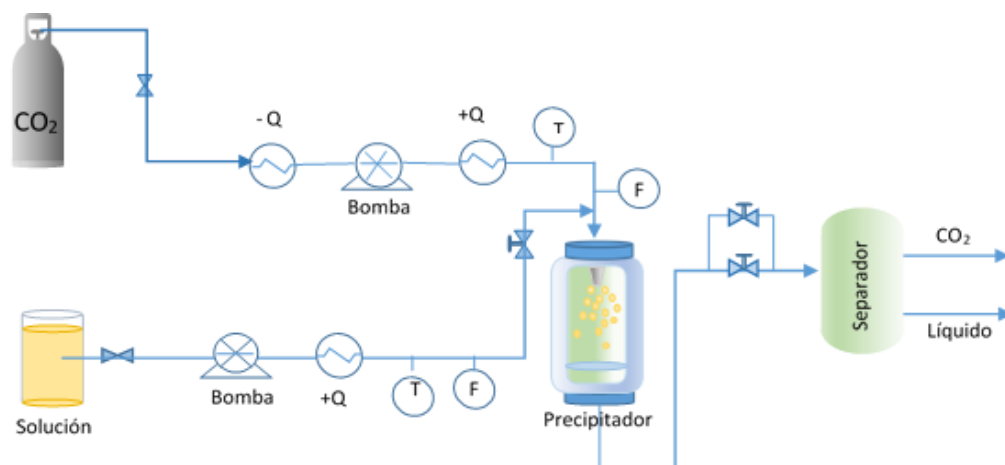
Una bomba de diafragma suministra el CO₂ supercrítico al recipiente de precipitación, previo acondicionamiento a la temperatura deseada. El flujo másico de CO₂ es medido con un flujómetro de coriolis. Una vez se estabilizan la presión y la temperatura del sistema y el flujo de CO₂ permanece constante, es bombeada la solución orgánica al recipiente para precipitación por medio de una bomba cromatográfica (Jasco PU 2080-Plus).

Tabla 8. Ensayos realizados para la microencapsulación de curcuminoides por el método de antisolvente supercrítico SAS.

Exp.	Relación Másica (g extracto seco/g polímero/ g otros)	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Flujo de CO ₂ (kg/h)	Flujo de extracto (mL/min)	Morfología
EUDRAGIT® L100						
1	Extracto sin polímero	40	100	2	2	película
2	Extracto sin polímero	40	100	2	1	partículas + fibras
3	sólo polímero	40	100	2	2	partículas
4	1:2	40	100	2	2	partículas
5	1:2	40	140	2	2	película
6	1:2	35	100	2	2	partículas + fibras
7	1:2	35	140	2	2	película
8	1:2	35	140	2	1	película
9	1:2 extracto desengrasado	40	100	2	2	partículas
10	1:2:0,5 tween 20	40	100	2	2	película
11	1:1:0,5 F127	40	100	2	2	partículas + fibras
12	1:1:0,1 tween: 0,2 F127	40	100	2	2	partículas ^a
13	1:1: 0,1 tween: 0,2 F127	40	100	2	1	partículas ^b
14	1:2: 0,1 tween:0,2 F127	40	100	2	1	partículas ^c
15	1:3: 0,1 g tween:0,2 F127	40	100	2	1	Partíc. + película
PLURONIC® F127						
16	1:1	40	100	2	2	película
17	1:1	40	100	2	1	película
18	1:2	40	100	2	2	película
19	1:2	40	100	2	1	película
20	1:3	40	100	2	2	película
21	1:4	40	100	2	1	película
Polyvinil pyrrolidone (P.V.P)						
22	1:2	40	100	2	2	película
23	1:3	40	100	2	1	película

a) baja b) alta y c) media

Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de encapsulación de curcumina por antisolvente supercrítico SAS.



La inyección de los fluidos se realiza a través de una boquilla de tubos concéntricos ubicada en la parte superior del recipiente de precipitación. La boquilla consiste de un tubo de 1/16 in (diámetro interno de 1 mm) para la solución orgánica, dispuesta dentro de un tubo de 1/4 in (diámetro interno de 3,2 mm) para el CO_2 . En el fondo del recipiente se cuenta con un sistema de retención de sólidos consistente de una malla metálica con tamaño de poro de $1\mu\text{m}$.

Por razones de seguridad, la presión del recipiente de precipitación es regulada con dos válvulas de aguja puestas en paralelo. De igual manera, tanto las válvulas como el tubo de salida son protegidos de taponamiento por congelación por medio de un sistema de calentamiento eléctrico. Después de liberar la presión del sistema el efluente es llevado a un recipiente para separar el CO_2 del solvente.

Durante el proceso son inyectados entre 80 y 100 mL de la solución de curcumina en etanol, una vez se termina de inyectar toda la solución el equipo es operado con solvente puro durante 10 minutos, con la finalidad de hacer un lavado de la solución remanente en los ductos y válvulas, luego se deja pasar sólo CO_2 durante 20 minutos para remover todo el solvente del recipiente de precipitación. Finalmente, el sistema es despresurizado y las partículas son removidas y almacenadas a 8°C protegidas de la luz. En la Tabla 8 se presenta la experimentación que se

llevó a cabo para obtener una formulación de un colorante a base en curcumina soluble en agua.

2.2.4 Pruebas de solubilidad y estabilidad

La prueba de solubilidad se realizó preparando soluciones de 1000 µg/mL a pH 4 y 8. Solo se evaluaron aquellas formulaciones que presentaron la formación de partículas, estas soluciones fueron sometidas a agitación durante dos horas a 3000 rpm. Las soluciones fueron almacenadas a 8°C y protegidas de la luz. Se realizó un seguimiento en el tiempo a las diferentes soluciones, tomando muestras del sobrenadante. La concentración de curcumina disuelta fue determinada por método espectrofotométrico a 427 nm en un espectrofotómetro UV. Las pruebas fueron realizadas por triplicado.

La prueba de estabilidad se le realizó a la formulación con la mayor solubilidad en agua, para ello se prepararon soluciones saturadas del colorante que se sometieron a diferentes tratamientos de pH y temperatura, de acuerdo al diseño experimental que se presenta en la Tabla 9. Igualmente se realizaron pruebas de exposición a la luz emitida por un panel de cuatro lámparas tubulares fluorescentes de 600 mm-T8 de General Electric Estándar, cada tubo con una potencia de 18 W y flujo luminoso de 1050 lm.

Las muestras de 100 mL del colorante a 211 µg/ml y pH de 4 y 8, fueron ubicadas de forma vertical debajo del panel a 1 m de distancia, se realizó un seguimiento del contenido de colorante de las muestras haciendo mediciones de curcumina por HPLC en el tiempo.

Tabla 9. Diseño experimental para el estudio de estabilidad de la formulación de curcumina encapsulada.

Factores			Niveles								
pH			4,0						6,0		
Temperatura (°C)			40			22			60		
Tiempo (días)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Para estudiar el efecto acelerado de la exposición de las muestras a la radiación ultra violeta, se irradiaron muestras a los pH anteriores a la luz

UV de una lámpara ElectroH T5 de 4W y longitud de onda entre 120 y 380 nm, durante el proceso se realizó seguimiento al contenido de curcumina por HPLC.

2.2.5 Caracterización fisicoquímica

La caracterización y cuantificación de los curcuminoides en las muestras de extracto y del producto de la encapsulación se determinó por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC. basado en el método reportado por Li y otros (M. Li, Ngadi, & Ma, 2014). Estas pruebas se realizaron en un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific con una columna de fase reversa C18 AcclaimTM 120 Thermo (250 mm x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5μ). La fase móvil se programó isocrática con proporciones de A:B 50:50 con A: ácido acético 0.05% y B: acetonitrilo durante 10 min, con una velocidad de flujo de 2mL/min. El sistema se dejó estabilizar durante 2 min entre inyecciones consecutivas. La temperatura de la columna fue mantenida a 25°C.

La detección fue realizada a una longitud de onda de 427 nm y el volumen de inyección fue de 10 μL. Para la cuantificación, se construyó una curva de calibración con estándares individuales y en mezcla de los curcuminoides (CromaDex).

La caracterización morfológica de las partículas de curcumina se realizó por microscopía electrónica de barrido SEM. Las micrografías fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-820. Las partículas de las muestras fueron recubiertas de oro a temperatura ambiente en una atmósfera de Argón.

La calorimetría diferencial de barrido DSC de las muestras de las partículas encapsuladas se llevaron a cabo con un equipo DSC-30 METTLER. Los análisis se realizaron entre 25 y 270° C, a una velocidad de calentamiento de 10° C / min y 60 mL N₂ / min.

El tamaño de partículas se analizó utilizando un equipo NanoPlus-Micromeritics. Para esto, 5 mg de muestra fueron adicionados en 5 mL de agua desionizada tipo I y agitados mecánicamente a 2000 rpm previo a su posterior medición de potencial Z y tamaño de partículas. Las pruebas se realizaron por triplicado.

El análisis por rayos-X de las partículas se realizó con un difractómetro de Rayos-X (DRX) XPert PANalytical Empyrean Serie II -Alpha1. La radiación se generó a 40 mA y 45 kV y fue monocromatizada por un filtro de níquel, los rayos fueron en modo reflexión sobre polvos. Los patrones de difracción registraron la intensidad de los rayos-X como una función del ángulo 2θ en un rango de 5 a 70° .

Tanto a la formulación del colorante como a una muestra comercial de cúrcuma encapsulada del 6% (w/w) se les determinó la capacidad antioxidante por el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno ORAC. Para ello se realizó una curva de calibración (10 – 200 $\mu\text{g/mL}$) preparando una solución de 200 μM a partir de 5 mg de trolox en solución buffer de fosfato. Las muestras del colorante se prepararon por dilución de agua de 1:10 y filtradas a través de membrana de nylon de 0,45 μm . La intensidad de la fluorescencia se midió cada 2 min durante 2 horas con longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente. La curva de calibración obtenida fue $Y = 8408,1536X + 181177,6812$, con $r^2 = 0,9948$.

El color de la formulación del colorante y el de una solución de tartazina, se analizaron con un NANOCOLOR UV / VIS Macherey - Nagel ajustado a D65 el iluminante y un ángulo de observación de 10° . El espacio de color CIELAB se utilizó para determinar los parámetros: L^* [negro (0) al blanco (100)], a^* [verdes (-) a la rojos (+)] y b^* [azules (-) a amarillos (+)]. En este ensayo se preparó una solución del colorante (formulación1) que se corresponde con la solubilidad obtenida para dicha formulación en el estudio de solubilidad, la cual fue de 200 $\mu\text{g/mL}$ y se prepararon diferentes soluciones de tartrazina haciendo medición de color hasta encontrar una concentración con una medición del parámetro color lo más cercana posible a la muestra de la formulación 1.

2.2.6 Tratamiento estadístico de resultados

Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar. La significación estadística de las diferencias entre grupos se evaluó mediante un ANOVA de una vía, utilizando Statgraphics versión 16.1.

Las diferencias entre las medias se evaluó a través de comparaciones múltiples post-test (Newman-Keuls) y la significancia se identificó a nivel

de 5%. Las gráficas se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 5,0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

2.3 Resultados y discusión

En el desarrollo de la formulación de un colorante a base de curcumina por la tecnología de antisolvente supercrítico, se estudiaron los efectos de diferentes parámetros asociados al proceso como: temperatura, presión, flujo del extracto y polímero encapsulante, en la producción de microcápsulas que permitan mejorar la solubilidad en agua y la estabilidad de la curcumina ante factores como pH y radiación.

En la Tabla 8 se presentan los diferentes experimentos que se llevaron a cabo. La temperatura se trabajó en los niveles de 35 y 40°C, la presión a 100 y 140 bar y el flujo de extracto a 1 y 2 mL/min, estos valores que se aplicaron en el proceso se ajustan en gran medida a los rangos trabajados por Zabihi y otros en la encapsulación de curcumina para una aplicación farmacológica (Zabihi et al., 2014). El flujo de CO₂ se mantuvo fijo en 2 kg/h durante todos los experimentos y se probaron tres polímeros encapsulantes: Eudragit® L100, Pluronic® F127 y polivinilpirrolidona o mezclas de algunos de ellos. Adicionalmente, se variaron las relaciones másicas extracto/polímero y se consideró el extracto con y sin desengrase.

Para cada una de las experimentaciones se registró la apariencia presentada por el producto del proceso de encapsulación, que se describió como partículas, película o partículas con fibras. Por otro lado, para las formulaciones que presentaron partículas se realizó una prueba cualitativa de solubilidad en agua, la cual permitió seleccionar aquellas formulaciones para ser consideradas para el estudio definitivo de solubilidad y estabilidad.

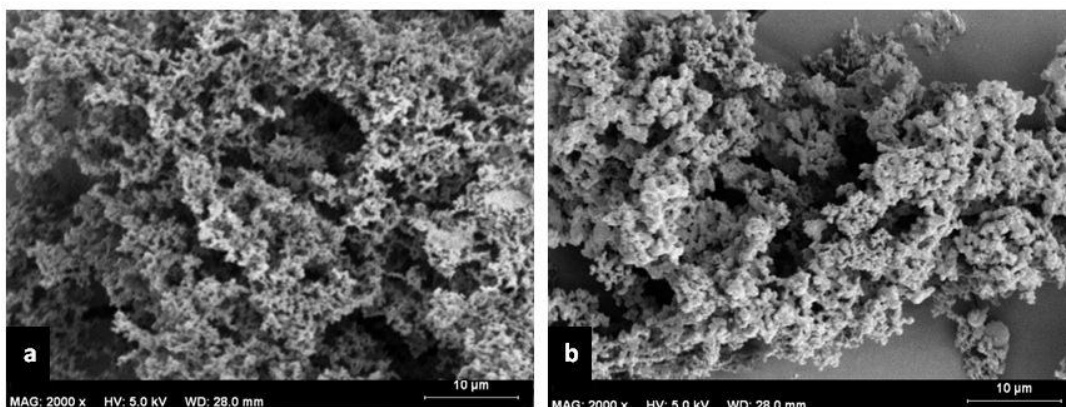
En la Tabla 8 se puede observar que para 140 bar (experimentos 5, 7 y 8) el material es depositado sobre las paredes del recipiente de encapsulación en forma de película y no hay formación de partículas. Independiente de la temperatura y del flujo de extracto. Por el contrario para 100 bar de presión indistintamente de la temperatura y del flujo de extracto, se observa la formación de partículas.

Una combinación de Eudragit® L100 y Pluronic F®127 como material encapsulante; y tween 20 como surfactante, con diferentes relaciones másicas de extracto produjeron formulaciones que presentaron una apariencia de partículas, mostrando algún tipo de solubilidad en agua, experimentos 12 a 15. Para las formulaciones resultantes de los experimentos 13 (formulación 1) y 14 (formulación 2) se les realizó el estudio de solubilidad en agua, por presentar los mayores indicios de solubilidad en la prueba cualitativa de selección, como se explicó anteriormente, descartando las formulaciones correspondientes a los experimentos 12 por su baja solubilidad cualitativa y 15 por presentar una combinación de partículas con película en su apariencia.

En la Figura 7, se presentan las micrografías SEM para las dos formulaciones de encapsulación SAS seleccionadas para pruebas de estabilidad y solubilidad en agua, las cuales corresponden con las relaciones másicas b).1:1:0,1:0,2 (formulación 1) y c).1:2:0,1:0,2 (formulación 2) extracto seco, Eudragit® L100, Tween 20 y Pluronic® F127 respectivamente, ambas a 100 bar, 40°C y flujo de extracto 1mL/min. En la Tabla 2 se muestra el diámetro de partícula promedio y el potencial Z para la formulación 1 y formulación 2.

Figura 7. Micrografías SEM

a). Formulación 1: encapsulación SAS en relación másica 1:1:0,1:0,2 extracto seco, Eudragit® L100, Tween 20, Pluronic®F127 respectivamente a 100 bar, 40°C y flujo extracto 1mL/min. **b).** Formulación 2: encapsulación SAS en relación másica 1:2:0,1:0,2 extracto seco, Eudragit® L100, Tween 20, Pluronic® F127 respectivamente a 100bar, 40°C y flujo extracto 1mL/min.



De acuerdo a la Figura 7, se observa que las dos formulaciones poseen un tamaño de partícula menor a $10\ \mu\text{m}$; sin embargo, un aumento en la relación másica de Eudragit® L100, de uno a dos, aumenta el tamaño de las partículas, siendo más pequeñas las partículas de la formulación 1 (Figura 7a), para la cual el diámetro de promedio es de 5667.4 nm (Tabla 10), en comparación con las partículas de la formulación 2 (Figura 7b), cuyo diámetro promedio es de 8714.2 nm (Tabla 10). El aumento del tamaño de partícula con un aumento en la proporción másica del encapsulante puede ser explicada como un exceso de material encapsulante que propicia la formación de partículas de mayor tamaño, toda vez que las condiciones de encapsulación y las relaciones másicas de los demás componentes de las dos formulaciones permanecen constantes, como se puede apreciar en los experimentos 13 (formulación 1) y 14 (formulación 2) de la Tabla 8.

Tabla 10. Diámetro de partícula promedio y potencial Z para la formulación 1 y formulación 2.

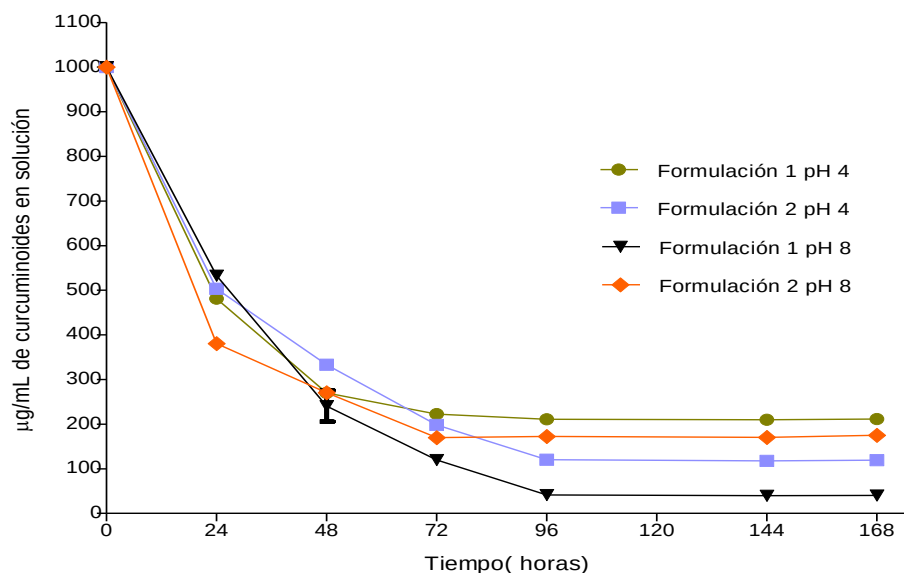
Formulación	Diámetro de partícula promedio (nm)	Potencial Z (mV)
1	5667,4	11,21
2	8714,2	-27,71

En la Figura 8 se presentan los perfiles de solubilidad para la formulación 1 y la formulación 2, cada una a pH de 4 y 8. En ésta Figura se observa que la solubilidad de las formulaciones a los diferentes pH se hace constante a partir de 96 horas. Para la formulación 1 la mayor solubilidad en agua se presenta a pH 4 y la menor a pH 8. Este comportamiento se puede explicar haciendo un análisis de su potencial Z, con un valor de 11,21mV (Tabla 10), lo que significa que las partículas suspendidas o en solución poseen cargas positivas, por lo cual se mantienen en suspensión o disueltas en soluciones con pH ácidos, debido a las fuerzas de repulsión que se establecen entre las partículas con los iones positivos (H^+) del medio acuoso.

Adicionalmente, el menor tamaño de partícula de esta formulación (5667,4 nm, Tabla 10) en comparación con la formulación 2 (8714,2 nm, Tabla 10) podría contribuir a mejorar la solubilidad. Por el contrario, las partículas de la formulación 1 al estar cargadas positivamente, generan fuerzas de atracción con los iones negativos (OH^-) de las soluciones básicas,

propiciando la formación de agregados de partículas que al crecer en tamaño se precipitan, disminuyendo su solubilidad.

Figura 8. Perfil de solubilidad para la formulación 1 y formulación 2 a pH de 4 y 8.



Por otro lado, la formulación 2 tiene menor solubilidad a pH 4 que a pH de 8, ésta formulación tiene un potencial Z negativo con un valor de -27.71 mV (Tabla 10) por lo tanto, las partículas en soluciones acuosas están cargadas negativamente, lo que explica la mayor solubilidad en soluciones básicas, debido a las fuerzas de repulsión que se establecen entre las partículas con los iones negativos (OH^-) de la solución y la menor solubilidad en soluciones ácidas por las fuerzas de atracción que se establecen con los iones positivos (H^+) de las soluciones ácidas, como se explicó anteriormente.

En general, comparando los perfiles de solubilidad, la formulación 1 tiene la mayor solubilidad en soluciones ácidas, con un valor alrededor de 210 µg/mL y la menor solubilidad en soluciones básicas, con un valor de 40 µg/mL, en tanto que la formulación 2 posee una solubilidad en soluciones ácidas, cercana a 120 µg/mL y en soluciones básicas, cercana a 175 µg/mL. Los resultados del análisis estadístico arrojaron que las solubilidades de las dos formulaciones tratadas a pH de 4 y 8 poseen

diferencias significativas con un factor de correlación R^2 de 0,9977 y un valor $P < 0,0001$.

El estudio de estabilidad consideró la medición a través del tiempo, del contenido de curcuminoides, para soluciones saturadas del colorante de la formulación 1, que fueron sometidas a diferentes combinaciones de pH y temperatura. De igual forma, se realizaron mediciones cuando las soluciones fueron tratadas a diferentes pH y exposiciones a la luz y radiación UV. Las curvas de degradación de los curcuminoides en soluciones a diferentes pH y temperaturas se presentan en la Figura 9 y las curvas de degradación de curcuminoides en soluciones a diferentes pH expuestas a la luz en la Figura 10.

Del estudio de estabilidad del colorante que relaciona pH y temperatura, se observa que el porcentaje de degradación de la curcumina a pH 8, muestra una tendencia a permanecer constante entre 7,5 y 11 %, siendo mayor que el presentado para pH 4, que muestra una tendencia a permanecer constante entre 3 y 5%, Figura 9. Esto se puede explicar dado a la mayor estabilidad química de la curcumina en medio ácido que en medio básico (Anderson, 2003).

Figura 9. Curvas de degradación de curcumina por efectos de pH y temperatura para la formulación 1.

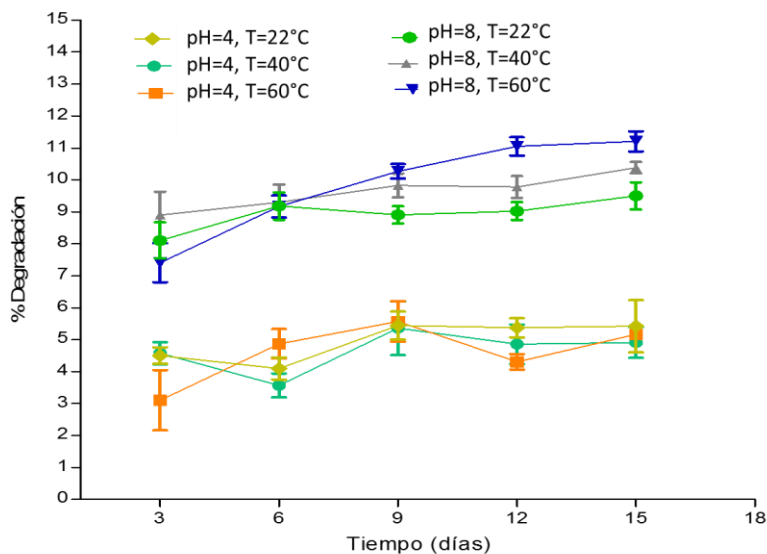
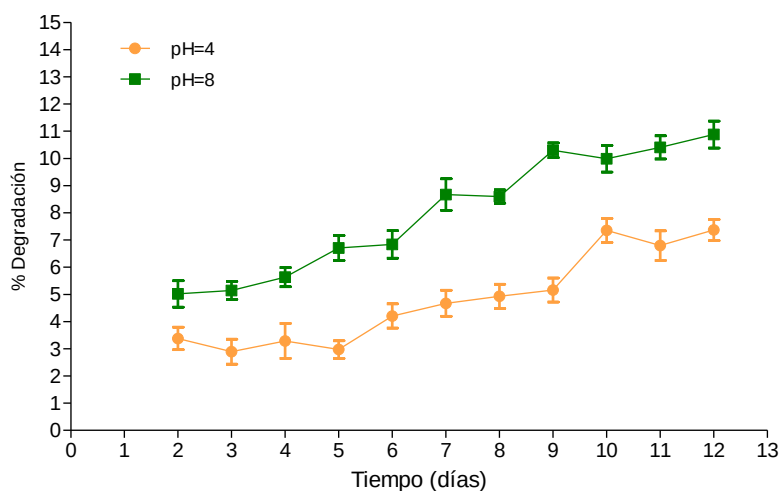


Figura 10. Curvas de degradación de curcumina por efectos de pH y luz para la formulación 1.



En cuanto al efecto de la temperatura se observa que para pH 8, los porcentajes de degradación son directamente proporcionales a la temperatura, es decir, para una mayor temperatura se tiene un mayor porcentaje de degradación, este comportamiento se observa más claramente a partir del sexto día de experimentación. Por otro lado, para un pH 4 no se observa un efecto de la temperatura sobre la degradación de la curcumina (Chen, 2014), fenómeno que también se puede explicar debido a la estabilidad química de la curcumina en medio ácido.

Los resultados del análisis estadístico practicado a estas pruebas de estabilidad indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos de pH 4 respecto a los de pH 8 independiente de la temperatura, con un factor de correlación R^2 de 0.8366 y un valor $P < 0,0001$.

En cuanto a la estabilidad de los curcuminoides a la luz se ha encontrado que estos no son estables a la luz, especialmente en soluciones. En estudios previos la curcumina presenta fotodescomposición cuando se expone a radiación de UV/Visible, tanto en solución como en estado sólido. Se han reportado varios productos de degradación incluyendo productos de ciclación de la curcumina (Tønnesen, Karlsen, & van Henegouwen, 1986).

Los resultados obtenidos del estudio de fotodegradación de curcumina para la formulación del colorante a diferentes pH, (Figura 10), se observa que hay un mayor porcentaje de degradación para la solución a pH 8 en comparación con la solución a pH 4. Esto es, para la solución a pH 8 se tiene una degradación 10,5% mientras que para la solución a pH 4 se tiene una degradación de 7,5% en los doce días de observación.

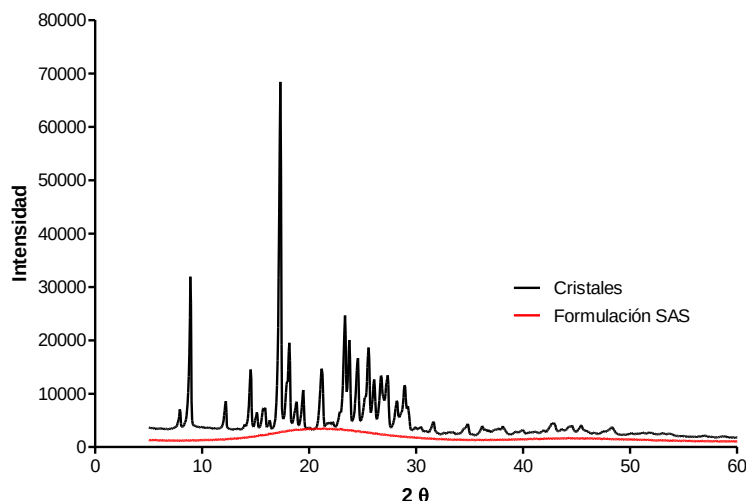
La mayor fotodegradación del colorante se explica con base en la protección que ofrece el polímero encapsulante, en este caso el Eudragit® L100 el cual se disuelve por encima de pH 6 (Almapal Colombia, s.f.). Por lo tanto, es de esperarse que a pH 8, dicho encapsulante haya sufrido un proceso de disolución, dejando las partículas de curcumina expuestas a la luz, favoreciendo la fotodegradación. Por el contrario, el colorante en disolución de pH 4, conservará la capa de polímero encapsulante no disuelta, ofreciendo mayor protección a los procesos fotosintéticos y presentando menor degradación.

Por otro lado, en cuanto a la estabilidad del colorante a la exposición a la luz UV, las soluciones a pH 4 y 8 presentaron una degradación del 93 % en un tiempo de 45 minutos. Lo que muestra que el colorante es inestable a la radiación UV y que el encapsulante es ineficiente en la protección del principio activo frente a esta radiación.

Para estudiar los efectos de la encapsulación sobre la cristalinidad de la curcumina, se midió la difracción de rayos-X en la formulación 1 de la encapsulación de curcumina por SAS. El patrón de difracción de rayos-X es presentado en la Figura 11.

Como se puede observar en la Figura 11, para una muestra de curcumina se presenta un patrón con varias reflexiones, debido a su estructura cristalina, en la figura se presentan picos que sobresalen aproximadamente para valores (2θ) de: 8° , 15° , 18° , 19° , 25° y 29° ; la bibliografía reporta planos cristalográficos en el rango de 8° a 30° (2θ): $8,74^\circ$, $14,42^\circ$, $17,18^\circ$, $21,14^\circ$ y $24,48^\circ$, $28,84^\circ$ (Lv, Li et al 2013; Liu, W. et al., 2016). Mientras que la imagen para las partículas de curcumina encapsulada (formulación SAS) no muestra ninguna reflexión característica de estructuras cristalinas de curcumina. Por el contrario, se observa un patrón XRD típico de partículas amorfas.

Figura 11. Difracción de rayos-X para cristales de curcumina y para la formulación 1 de colorante a base de cúrcuma obtenida por SAS.



Adicionalmente, Se observa una intensidad mayor para los cristales que para la formulación. Todo lo anterior constituye un claro indicio de la formación de partículas amorfas, que puede favorecer el proceso de disolución de la curcumina de la formulación del colorante obtenida por SAS. Esto es coherente con el proceso de co-precipitación que ocurre en el tratamiento por SAS, en el cual se forman partículas amorfas por el recubrimiento de los curcuminoides por el polímero encapsulante.

La afinidad entre el principio activo y el material encapsulante juega un papel importante en la formación de material amorfo en el proceso SAS. Si hay una alta afinidad entre estos dos compuestos, es posible incorporar el principio activo como núcleo en el polímero encapsulante, generando una partícula amorfa; si no existe afinidad, no se generaran cápsulas y los dos materiales precipitarán por separado. Para generar afinidad entre dichos materiales se hace necesario adicionar un agente tensoactivo.

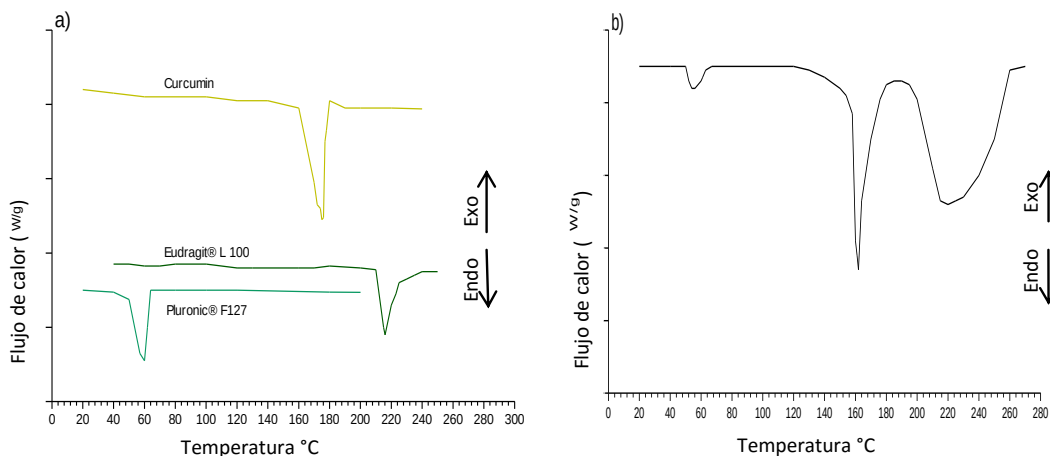
Otro parámetro importante en la morfología de las partículas es la cantidad inicial del principio activo y el encapsulante, si el principio activo se incorpora con eficiencia en estado amorfo en el material encapsulante, las partículas de material combinado pueden ser más pequeñas que las del principio activo puro bajo las mismas condiciones (Cocero et al, 2009). En el presente estudio se adicionó tween con la finalidad de mejorar la

afinidad entre los curcuminoides y el encapsulante, dando como resultado la formación de partículas amorfas.

En la Figura 12 se presentan los termogramas del análisis por Calorimetría de Barrido Diferencial-DSC de los polímeros encapsulantes y de la curcumina sin procesamiento; y el de la formulación 1 del colorante obtenido por SAS.

En la Figura 12 a) se observan los picos endotérmicos de los puntos de fusión de las estructuras de la curcumina, Eudragit® L100 y Pluronic® F127 y en la Figura 12 b) se observan tres picos endotérmicos correspondientes a los puntos de fusión de Pluronic® F127, curcumina y Eudragit® L100 con valores de 56°C, 161°C y 220 °C respectivamente.

Figura 12. Análisis por DSC: a) Curcumina, Eudragit® L100 y Pluronic® F127 b) Formulación 1 del colorante obtenida por SAS.



La señal endotérmica correspondiente a la curcumina en la Figura 12 b) podría estar indicando que ésta no se encuentra dispersa sino probablemente encapsulada. Adicionalmente, los picos endotérmicos amplios y poco definidos indican la naturaleza amorfa de la formulación del colorante. Tanto el análisis de rayos-X como por DSC muestran que la formulación del colorante está formada por partículas amorfas.

La capacidad antioxidante determinada por la Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno-ORAC, de la formulación del colorante resultó de 22348 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ muy similar a la del producto comercial que fue de 23390 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$. Mientras que el reportado para la harina de cúrcuma es de 127068 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (Haytowitz & Bhagwat, 2010).

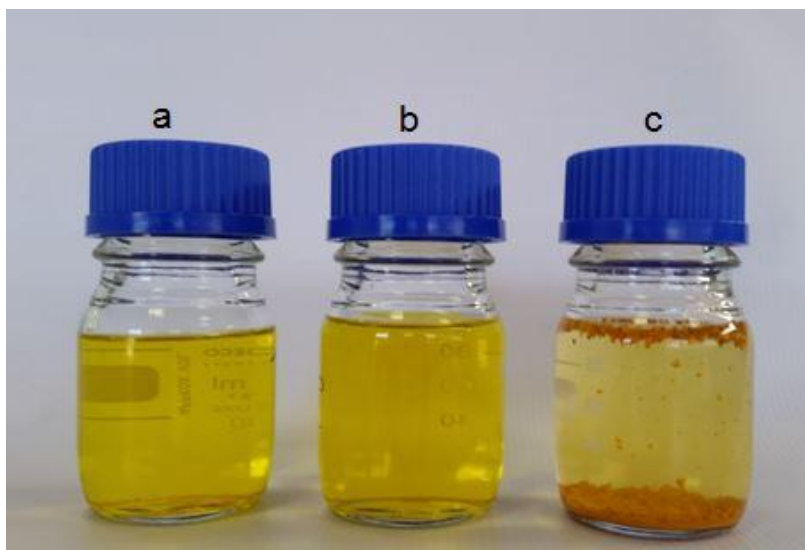
Los resultados del análisis del color se presentan en la Tabla 11 y en la Figura 13 se muestra la comparación entre una solución de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del colorante a base de curcuminoides (formulación 1, obtenida por encapsulación), una solución de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tartrazina obtenida de la prepararon de diferentes soluciones de tartrazina haciendo medición de color hasta encontrar una concentración con una medición del parámetro color lo más cercana posible a la muestra de la formulación 1 y una mezcla de harina de *Cúrcuma Longa* sin proceso. La concentración del colorante a base de curcuminoides se corresponde con la solubilidad encontrada en el estudio de solubilidad.

Tabla 11. Resultados de análisis de color para la formulación de colorante de cúrcuma y una solución de tartrazina de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Muestra	Análisis de color		
	L*	a*	b*
Formulación del colorante (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	89,9 ($\pm 0,2$)	-9,8 ($\pm 0,1$)	124,6 ($\pm 0,4$)
Solución de tartrazina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	93,9($\pm 0,1$)	-10,5($\pm 0,9$)	131,5 ($\pm 0,4$)

Como se observa no existen muchas diferencias entre los parámetros L*, a* y b* para las dos soluciones, estos resultados de color indican que una solución de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la formulación del colorante a base de curcuminoides equivale a una solución aproximadamente de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tartrazina, esta situación puede observarse en la Figura 13 en la que la apariencia en color es muy semejante. A la mezcla de harina de *Cúrcuma Longa* sin proceso no se le midió el color, ya que la harina no es soluble en agua por lo cual no forma una solución en la cual se pueda medir este parámetro.

Figura 13. Comparación entre una solución del colorante a base de curcuminoides con una concentración de 200 µg/mL, con una solución de tartrazina a 30 µg/mL y una mezcla de harina de *Cúrcuma Longa* sin proceso.



a-solución del colorante a base de curcuminoides 200 µg/mL(formulación 1); b- solución de tartrazina 30 µg/mL; c-mezcla de harina de *Cúrcuma Longa* sin proceso 200 µg/mL.

2.4 Conclusiones

A través de este trabajo se desarrolló la formulación de un colorante natural en la cual se mejoran la estabilidad y solubilidad en agua de la curcumina a través de la encapsulación, dicha encapsulación se logró haciendo uso de la tecnología de antisolvente supercrítico a 100 bares de presión, una temperatura de 40° C, un flujo de extracto de 1 mL/min y manteniendo un flujo de CO₂ de 2 kg/h, se utilizó como encapsulante una mezcla de Eudragit L®100 y Pluronic®127 y se incorporó tween 20 como surfactante, en una relación másica de extracto: Eudragit: Pluronic: tween de 1:1:0,2:0,1.

La mayor solubilidad del colorante se obtuvo a pH4, alcanzando un valor de 211 µg/mL de curcuminoides totales (con una concentración de 4,45 µg/mL de curcumina). Los resultados del estudio de estabilidad indicaron que la curcumina es más estable a pH 4 (3- 5% de degradación) que a pH 8 (7,5 a 11 de degradación). A pH 4, no se observó dependencia de la degradación con la temperatura, mientras que a pH 8 el colorante

presenta una tendencia a aumentar su degradación con aumentos de temperatura. De los resultados del estudio de fotodegradación utilizando luz y radiación UV se concluye que la radiación luminosa es un factor crítico para la estabilidad del colorante obtenido por SAS. La formulación del colorante mostró una capacidad antioxidante de 22348 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ y una eficiencia de encapsulación (% EE) de 16%.

De los resultados del análisis de color se concluye que una solución de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la formulación del colorante a base de curcuminoides equivale a una solución aproximadamente de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tartrazina.

2.5 Referencias

Aggarwal, B. B., Kumar, A., & Bharti, A. C. (2003). Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Research*, 398(1 A), 363–398.

Almapal Colombia.com. (s.f.). Eudragit L100. Recuperado de <http://www.almapal.com.co/catalogo/detalle/Eudragit%20l100.html>

Almeida, A. P., Rodríguez-Rojo, S., Serra, A. T., Vila-Real, H., Simplicio, A. L., Delgadilho, I., ... Duarte, C. M. M. (2013). Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 140–145. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.009>

Anderson, T. M. D. (2003). Anticancer Potential of Curcumin Preclinical and Clinical Studies, 398, 363–398.

Blasco Piquer, M. et al. (1999). Procedimiento para la obtención de un colorante alimentario a base de curcumina. Asociación de Investigación de la Industria Agroalimentaria Parque Tecnológico. Patente de invención No. 2121538. España (1999). (1999), (2121538), 2121538.

Causa, A., Filippone, G., Acierno, D., Domingo, C., & Salerno, A. (2015).

Supercritical CO₂ antisolvent precipitation from biocompatible polymer solutions: A novel sustainable approach for biomaterials design and fabrication. *The Journal of Supercritical Fluids*, 105, 9–20. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.03.021>

Chen, L., Bai, G., Yang, R., Zang, J., Zhou, T., & Zhao, G. (2014). Encapsulation of β -carotene within ferritin nanocages greatly increases its water-solubility and thermal stability. *Food Chemistry*, 149, 307–312. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.115>

Chen, L., Bai, G., Yang, S., Yang, R., Zhao, G., Xu, C., & Leung, W. (2014). Encapsulation of curcumin in recombinant human H-chain ferritin increases its water-solubility and stability. *Food Research International*, 62, 1147–1153. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.054>

Cocero, M. J., Martín, Á., Mattea, F., & Varona, S. (2009). Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 546–555. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.08.015>

De Marco, I., Rossmann, M., Prosapio, V., Reverchon, E., & Braeuer, A. (2015). Control of particle size, at micrometric and nanometric range, using supercritical antisolvent precipitation from solvent mixtures: Application to PVP. *Chemical Engineering Journal*, 273, 344–352. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.100>

de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292–302. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>

Delgado V. F., Paredes L., O. (2002). Natural colorants for Food and Narmaceutical uses. Ed. CRC Press. U.S.A. p. 240-243. (2002), 2002.

Desanti, O. I., & Cahyono, B. (2015). The Correlation between Knowledge and Attitude on Food Colorant Uses of PKK Mothers in Penggaron

Lor Village. *Procedia Food Science*, 3, 156–161.
<http://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.017>

Dotto, G. L., Pinto, L. A. A., Hachicha, M. A., & Knani, S. (2015). New physicochemical interpretations for the adsorption of food dyes on chitosan films using statistical physics treatment. *Food Chemistry*, 171, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.098>

Gajera, H. P., Bambharolia, R. P., Hirpara, D. G., Patel, S. V., & Golakiya, B. A. (2015). Molecular identification and characterization of novel *Hypocrea koningii* associated with azo dyes decolorization and biodegradation of textile dye effluents. *Process Safety and Environmental Protection*, 98, 406–416.
<http://doi.org/10.1016/j.psep.2015.10.005>

Gautam, R. K., Gautam, P. K., Banerjee, S., Rawat, V., Soni, S., Sharma, S. K., & Chattopadhyaya, M. C. (2015). Removal of tartrazine by activated carbon biosorbents of *Lantana camara*: Kinetics, equilibrium modeling and spectroscopic analysis. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 79–88.
<http://doi.org/10.1016/j.jece.2014.11.026>

González, J. A., Villanueva, M. E., Piehl, L. L., & Copello, G. J. (2015). Development of a chitin/graphene oxide hybrid composite for the removal of pollutant dyes: Adsorption and desorption study. *Chemical Engineering Journal*, 280, 41–48.
<http://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.112>

Haytowitz, D., & Bhagwat, S. (2010). USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. US Department of Agriculture, 10 – 48.
<http://doi.org/http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>

Jia, J., Wang, W., Gao, Y., & Zhao, Y. (2015). Ultrasonics Sonochemistry Controlled morphology and size of curcumin using ultrasound in supercritical CO₂ antisolvent, 27, 389–394.

Kakran, M., Sahoo, N. G., Tan, I.-L., & Li, L. (2012). Preparation of

nanoparticles of poorly water-soluble antioxidant curcumin by antisolvent precipitation methods. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(3), 757. <http://doi.org/10.1007/s11051-012-0757-0>

Kröber, H., & Teipel, U. (2005). Microencapsulation of particles using supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44(2), 215–219. <http://doi.org/10.1016/j.cep.2004.02.014>

Leshik, R. R.; Magnolia, D. E. (1981). Stabilized Curcumin Colorant United States, Patent No 4307-117. U.S.A (1981). (1981), (4307), 4307.

Li, M., Ngadi, M. O., & Ma, Y. (2014). Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. *Food Chemistry*, 165, 29–34. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.115>

Li, X. Q., Zhang, Q. H., Ma, K., Li, H. M., & Guo, Z. (2015). Identification and determination of 34 water-soluble synthetic dyes in foodstuff by high performance liquid chromatography-diode array detection-ion trap time-of-flight tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 182, 316–26. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.019>

Liu, F.-J., Liu, C.-T., Li, W., & Tang, A.-N. (2015). Dispersive solid-phase microextraction and capillary electrophoresis separation of food colorants in beverages using diamino moiety functionalized silica nanoparticles as both extractant and pseudostationary phase. *Talanta*, 132, 366–72. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.014>

Liu, W., Chen, X. D., Cheng, Z., & Selomulya, C. (2016). On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. *Journal of Food Engineering*, 169, 189–195. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.08.034>

López-Tobar, E., Blanch, G. P., Ruiz del Castillo, M. L., & Sanchez-Cortes, S. (2012). Encapsulation and isomerization of curcumin with cyclodextrins characterized by electronic and vibrational

spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 62, 292–298.
<http://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.06.008>

Lv, Li. (2013). Novel 4-Arm Poly(Ethylene Glycol)-Block-Poly(Anhydride-Esters) Amphiphilic Copolymer Micelles Loading Curcumin: Preparation, Characterization, and In vitro Evaluation. *Biomed Res Int*, 2013, 1-11. <http://doi.org/10.1155/2013/507103>

Matouq, M., Al-Anber, Z., Susumu, N., Tagawa, T., & Karapanagioti, H. (2014). The kinetic of dyes degradation resulted from food industry in wastewater using high frequency of ultrasound. *Separation and Purification Technology*, 135, 42–47.
<http://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.08.002>

Mohajeri, M., Sadeghizadeh, M., Naja, F., & Javan, M. (2015). Neuropharmacology Polymerized nano-curcumin attenuates neurological symptoms in EAE model of multiple sclerosis through down regulation of inflammatory and oxidative processes and enhancing neuroprotection and myelin repair, 99, 156–167.
<http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.013>

Mohan, P. R. K., Sreelakshmi, G., Muraleedharan, C. V., & Joseph, R. (2012). Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 62, 77–84.
<http://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.05.002>

Oancea, P., & Meltzer, V. (2013). Photo-Fenton process for the degradation of Tartrazine (E102) in aqueous medium. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 990–994.
<http://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.03.014>

Osorio-Tobón, J. F., Carvalho, P. I. N., Rostagno, M. A., Petenate, A. J., & Meireles, M. A. A. (2016). Precipitation of curcuminoids from an ethanolic turmeric extract using a supercritical antisolvent process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 108, 26–34.
<http://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.012>

- Patil, S., Choudhary, B., Rathore, A., Roy, K., & Mahadik, K. (2015). Enhanced oral bioavailability and anticancer activity of novel curcumin loaded mixed micelles in human lung cancer cells. *Phytomedicine*, 22(12), 1103–1111. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.08.006>
- Paulucci, V. P., Couto, R. O., Teixeira, C. C. C., & Freitas, L. A. P. (2013). Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(1), 94–100. <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000117>
- Safdar, M., Junejo, Y., & Balouch, A. (2015). Efficient degradation of organic dyes by heterogeneous cefdinir derived silver nanocatalyst. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 31, 216–222. <http://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.06.026>
- Schranz, J. L. & Palos, H. (1983). Water Soluble Curcumin complex. United States Patent No. 4368- 208. (1983), (4368), 4368.
- Sorouraddin, M.-H., Saadati, M., & Mirabi, F. (2015). Simultaneous determination of some common food dyes in commercial products by digital image analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 447–452. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.007>
- Sowasod, N., Nakagawa, K., Tanthapanichakoon, W., & Charinpanitkul, T. (2012). Development of encapsulation technique for curcumin loaded O/W emulsion using chitosan based cryotropic gelation. *Materials Science and Engineering: C*, 32(4), 790–798. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2012.01.027>
- Tan, J. B. L., Lim, Y. Y., & Lee, S. M. (2014). Rhoes spathacea (Swartz) Stearn leaves, a potential natural food colorant. *Journal of Functional Foods*, 7, 443–451. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.012>
- Tønnesen, H. H., Másson, M., & Loftsson, T. (2002). Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: Solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of*

Pharmaceutics, 244(1-2), 127–135. [http://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00323-X](http://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00323-X)

Tønnesen, H. H., Karlsen, J., & van Henegouwen, G. B. (1986). Studies on curcumin and curcuminoids VIII. Photochemical stability of curcumin. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 183(2), 116–122. <http://doi.org/10.1007/BF01041928>

Visentin, A., Rodríguez-Rojó, S., Navarrete, A., Maestri, D., & Cocero, M. J. (2012). Precipitation and encapsulation of rosemary antioxidants by supercritical antisolvent process. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 9–15. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.015>

Wada, M., Kido, H., Ohyama, K., Ichibangase, T., Kishikawa, N., Ohba, Y., Nakashima, K. (2007). Chemiluminescent screening of quenching effects of natural colorants against reactive oxygen species: Evaluation of grape seed, [i]Monascus[i], gardenia and red radish extracts as multi-functional food additives. *Food Chemistry*, 101(3), 980–986. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.050>

Wakte, P. S., Sachin, B. S., Patil, A. A., Mohato, D. M., Band, T. H., & Shinde, D. B. (2011). Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Separation and Purification Technology*, 79(1), 50–55. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.03.010>

Wikene, K. O., Bruzell, E., & Tønnesen, H. H. (2015). Characterization and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80, 26–32. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.013>

Yadav, D., & Kumar, N. (2014). Nanonization of curcumin by antisolvent precipitation: Process development, characterization, freeze drying and stability performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1-2), 564–577. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.070>

Zabihi, F., Xin, N., Li, S., Jia, J., Cheng, T., & Zhao, Y. (2014a). Polymeric

coating of fluidizing nano-curcumin via anti-solvent supercritical method for sustained release. *Journal of Supercritical Fluids*, 89, 99–105. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.02.021>

Zabihi, F., Xin, N., Li, S., Jia, J., Cheng, T., & Zhao, Y. (2014b). Polymeric coating of fluidizing nano-curcumin via anti-solvent supercritical method for sustained release. *Journal of Supercritical Fluids*, 89, 99–105. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.02.021>

Zhao, L., Zeng, B., & Zhao, F. (2014). Electrochimica Acta Electrochemical determination of tartrazine using a molecularly imprinted polymer – multiwalled carbon nanotubes - ionic liquid supported Pt nanoparticles composite film coated electrode. *Electrochimica Acta*, 146, 611–617. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.08.108>

Zhu, Y., Wu, Y., Zhou, C., Zhao, B., Yun, W., Huang, S., ... Chen, S. (2016). A screening method of oil-soluble synthetic dyes in chilli products based on multi-wavelength chromatographic fingerprints comparison. *Food Chemistry*, 192, 441–451. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.038>

CAPÍTULO 3. ESCALADO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE CURCUMINA POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS: CONSIDERACIONES ECONÓMICAS Y AMBIENTALES

3.1 Introducción

La extracción de compuestos bioactivos por fluidos supercrítico ha concentrado la atención de los investigadores durante los últimos años por presentar múltiples ventajas en comparación con las técnicas tradicionales. Esta tecnología se ha aplicado para la obtención de variadas materias primas que van desde la recuperación de principios activos de residuos agroindustriales, hasta sustancias contaminantes de los suelos y otros materiales (Alonso, Cantero, García, & Cocero, 2002; Mezzomo, Martínez, & Ferreira, 2009; Prado et al., 2012b; Taher et al., 2014).

A pesar que la actividad industrial genera gran cantidad de dióxido de carbono que es emitido a la atmósfera, contrariamente su uso en las extracciones supercríticas, puede ayudar significativamente a reducir aún más las emisiones de dióxido de carbono, dado que elimina la necesidad de transportar e incinerar desechos de disolventes orgánicos procedentes de la industria (Ramsey, Sun, Zhang, Zhang, & Gou, 2009), ofreciendo un potencial significativo para reemplazar la actual dependencia de una amplia gama de solventes orgánicos peligrosos (Chou & Yang, 2008) , relativamente costosos y perjudiciales para el ambiente que se utilizan a gran escala en el sector industrial (Ramsey, Sun, Zhang, Zhang, & Gou, 2009; Karlsson, Torstensson, & Taylor, 1997 ;Knez et al., 2014).

Las investigaciones sobre la extracción con dióxido supercrítico se han enfocado principalmente en aspectos como: los fundamentos y aplicaciones, que se centran en propiedades de transporte, equilibrio, modelado y simulación; el trabajo de laboratorio que se centra en la extracción y purificación; el análisis económico y las patentes (De Melo et al., 2014). La aplicación de ésta tecnología requiere que se cuente con la información necesaria para llevar los procesos de extracción a escala industrial a partir de los datos de laboratorio, en ese sentido, el escalado es una etapa muy importante de la investigación y permite predecir las condiciones y requerimientos para su implementación, estableciendo las pautas metodológicas.

En los últimos años se ha presentado un incremento en el escalado de los procesos de extracción por fluidos supercríticos. Los criterios más aplicados son los siguientes:

Relación solvente-alimento constante (S/F). Es uno de los criterios adoptado con éxito en estudios con diferentes materias. Este criterio fue utilizado por Paula y otros (Paula et al., 2016) para escalar desde condiciones de laboratorio hasta nivel piloto, dos procesos de extracción por fluidos supercríticos, uno para residuos de clavos de olor y otro para caña de azúcar, logrando una escala 15 veces mayor, con rendimientos y tiempos un poco superiores pero que indican una adecuada predicción de los resultados. De igual forma, Prado y otros (Prado et al., 2012), obtuvieron un escalado de la extracción de semillas de uva 17 veces mayor, desde escala laboratorio hasta nivel piloto. Los resultados indicaron que el criterio (S/F constante) tuvo éxito en la reproducción del comportamiento de la cinética a diferentes escalas y un rendimiento ligeramente mayor.

Relaciones basadas en la geometría del lecho. La geometría del lecho es considerado un importante factor en los procesos industriales de extracción. Ecuaciones empíricas que relacionan la altura y el diámetro del lecho son aplicadas en el escalado con buenos resultados. Carvalho y otros presentan en su trabajo sobre la extracción de romero por fluidos supercríticos (Carvalho, Moura, Rosa, & Meireles, 2005), una ecuación empírica que mantiene la relación entre altura y diámetro del lecho (H_B/d_B), lo que permite estimar los resultados del escalado. De igual forma para la extracción de romero, Zibetti y otros (Wüst Zibetti, Aydi, Arauco Livia, Bolzan, & Barth, 2013) obtienen la reproducibilidad de las curvas de extracción de manera satisfactoria.

Modelos matemáticos. La modelación matemática es una poderosa herramienta que permite describir fácilmente el comportamiento de un proceso y realizar su escalado (Lucas, Calvo, Palencia, & Cocero, 2004). Los perfiles de concentración del soluto, tanto en la fase sólida como en la líquida a través del lecho fijo, no son fáciles de obtener, durante el proceso de extracción por fluidos supercríticos. Un continuo muestreo bajo altas presiones es difícil, costoso, demorado y no siempre es posible. Sin embargo, estos perfiles de concentración se pueden predecir mediante el uso de modelos, una vez que sus parámetros han sido adecuadamente ajustados de los datos experimentales. De esta forma, un modelo permite predecir el comportamiento de la extracción antes de hacer el experimento, reduciendo el tiempo y focalizando los

experimentos con criterios definitivos (Lucas, Calvo, García-Serna, Palencia, & Cocero, 2007). Los modelos más comunes que se utilizan para describir los procesos de extracción por fluidos supercríticos se basan en los fenómenos de transferencia de masa (Lebedev, Katalevich, & Menshutina, 2015).

El objetivo de este capítulo es realizar el escalado a nivel piloto e industrial de un proceso de extracción por fluidos supercríticos para la extracción de colorantes a partir de cúrcuma, teniendo en cuenta criterios de factibilidad técnica, económica y ambiental.

Se seleccionó la extracción por fluidos supercríticos para realizar el desarrollo de un proceso limpio a escala industrial, dado a la amplia difusión de dicha tecnología en la industria y por la posibilidad de utilizar este principio, tanto en la extracción como en la estabilización de la molécula.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales y reactivos

La harina de *Cúrcuma Longa* fue suministrada por un cultivador y productor de esta materia prima en Uramita, Colombia. Todos los solventes y reactivos utilizados para las extracciones fueron grado reactivo adquiridos en Filtración y Análisis S.A.S Medellín, Colombia y para las pruebas cromatográficas se utilizaron solventes grado HPLC y estándares de curcumina, bisdesmetoxicurcumina y desmetoxicurcumina CromaDex adquiridos en Grupo Químico S.A.S Bogotá, Colombia. El dióxido de carbono del 99.5 % w/w fue suministrado por Cryogas S.A Medellín, Colombia.

3.2.2 Cuantificación de curcuminoides

La caracterización y cuantificación de los curcuminoides en las muestras de extracto y del producto de las extracciones se determinó por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC. basado en el método reportado por Li y otros (Li, Ngadi, & Ma, 2014). Estas pruebas se realizaron en un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific con

una columna de fase reversa C18 AcclaimTM 120 Thermo (250 mm x 4,6 mm, tamaño de poro de 5 μ ; Thermo). La fase móvil se programó isocrática con proporciones de A: B 50:50 con A: ácido acético 0.05% y B: acetonitrilo durante 10 min, con una velocidad de flujo de 20 mL/min. El sistema se dejó estabilizar durante 2 min entre inyecciones consecutivas. La temperatura de la columna fue mantenida a 25°C. La detección UV de las muestras fue realizada a una longitud de onda de 427nm y el volumen de inyección fue de 10 μ L. Las muestras fueron detectadas por UV a 427 nm. Para la curva se inyectaron estándares individuales y en mezcla de los curcuminoides.

3.2.3 Caracterización morfológica de harina de cúrcuma

Esta caracterización se realiza con la finalidad visualizar el efecto de la presión sobre las células de la harina, para ello se tomaron microscopías electrónicas de barrido a la harina antes y después de la extracción por fluidos supercrítico. Las micrografías fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-820, en el cual las partículas de las muestras fueron recubiertas de oro a temperatura ambiente en una atmósfera de Argón.

3.2.4 Determinación de la curva global de extracción

La curva de extracción global se determinó con base en los resultados obtenidos para la optimización del proceso de extracción de curcumina por fluidos supercríticos, que fueron presentados en el capítulo 1 y corresponden a las condiciones para el mayor rendimiento de extracción de curcumina (69,16 %): 90°C, 500 bar, flujo de 200 g CO₂/min, 100 g de harina de cúrcuma y una relación H_B/d_B de 2. La extracción se realizó en un equipo a escala de laboratorio Thar-P200 con una capacidad de extracción de 1L, el cual consta de un extractor y dos separadores con capacidad de 500 mL cada uno. Durante el proceso de extracción, se tomaron muestras de los separadores con intervalos de 15 minutos durante dos horas de proceso. Las muestras fueron analizadas por HPLC para la cuantificación de curcumina y posterior cálculo del rendimiento. Ésta curva fue utilizada como referencia para el escalado.

3.2.5 Extracción por fluidos supercríticos y condiciones para el escalado

La extracción piloto por fluidos supercríticos se realizó por lotes, en un equipo a escala semi-industrial (Guangzhouajeiya economic training CO Ltda.), que consta de dos extractores de 12 L de capacidad y dos separadores de 6 L cada uno.

Para el escalado del proceso piloto a partir del proceso de laboratorio se consideraron como criterios la relación solvente/alimento y la geometría del lecho. En ese sentido, se mantuvieron constantes la relación de flujo de dióxido de carbono a masa de harina de cúrcuma ($Q_{CO_2}/F = 60 \text{ h}^{-1}$) y la relación entre altura y diámetro del lecho ($H_b/d_b = 2$). En la Tabla 12 se presentan las condiciones experimentales para la extracción.

Tabla 12. Condiciones experimentales para el escalado-escala laboratorio a escala piloto

Condición	Escala laboratorio	Escala piloto
Temperatura de extracción (°C)	90	90
Presión extracción (MPa)	50	50
Flujo de CO ₂ (Kg/h)	12	108
Masa de materia prima (kg)	0,2	1,8
Diámetro del extractor (m)	0,0762	0,1320
Altura del lecho (m)	0,1524	0,2642
Densidad harina (kg/m ³)	499,8	499,8

La extracción se realizó en varias etapas, inicialmente el montaje, en el cual se cargó el equipo con 1,8 kg de harina de *Cúrcuma longa* y se llevó el sistema a condiciones de extracción, durante 60 minutos. Posteriormente y una vez que el equipo mantuvo estables su temperatura, presión y flujo de dióxido de carbono, se procedió con la etapa de extracción y separación, la cual se llevó a cabo a 50 MPa 90 °C y 108 kg/h de CO₂, durante 105 minutos. El extracto se recolectó a 60°C y 7,5 MPa. En la Figura 14 se presenta el diagrama de flujo del proceso a escala piloto de extracción de curcuminoides.

Teniendo en cuenta las necesidades del mercado de curcuminoides según la industria de colorantes en Medellín, se determinó realizar la extracción para un alimento de 15 kg de harina (en 105 minutos tiempo para la máxima extracción). El volumen requerido manteniendo la relación

El costo del equipo de extracción por fluidos supercríticos se estimó en función a la inflación, a la capacidad estimada, al costo conocido de otro equipo de capacidad conocida, comprado en otro momento y al índice de costo (CEPCI) de acuerdo a la metodología propuesta por Rocha y otros (Rocha Uribe J. A., Novelo Perez J.I, and Ruiz Machado,C, 2013) según la ecuación:

$$C_2 = C_1 \left(\frac{I_1}{I_2} \right) \left(\frac{V_2}{V_1} \right)^n \quad (3.2)$$

Dónde:

C_2 : costo (USD) del equipo que desee con capacidad V_2 (litros) en el tiempo actual

C_1 : costo (USD) de equipo de capacidad conocida V_1 (litros) al tiempo de referencia

I_2 : Índice de costo (CEPCI) en el momento actual

I_1 : Índice de Costo (CEPCI) del equipo de costo conocido en el año de su compra

n : exponente de costos (a menudo alrededor de 0,6)

En la Tabla 13 se presentan los datos para estimar el costo del equipo de extracción por fluidos supercríticos de acuerdo a la ecuación (3,2) y para el volumen escalado a nivel industrial de 30 L.

Tabla 13. Valores para estimación del costo del equipo de fluidos supercríticos

Parámetro	valor
C_1 (2009) (US)	271000*
I_1 (2008)	575,4
I_2 (2015)	576,1
V_1 (L)	12*
V_2 (L)	30
n	0,6909*

*Dato presentado por Rocha y otros (Rocha Uribe J. A., Novelo Perez J.I, and Ruiz Machado,C, 2013).

El valor estimado para el equipo es de US 510875, con el cual se calculará el valor asociado al costo FRI.

Con relación a los costos laborales-COL, se calcularon para dos turnos al día de 8 horas cada uno, considerando 2 operarios por turno con un valor de US 2/h pagada, laborando 5 días a la semana, por 50 semanas al año, en este sentido el número de horas laborales para la extracción es de 4000h/año.

Los costos por servicios públicos-CUT se calcularon teniendo en cuenta el costo del kWh para el sector industrial suministrado por Empresas Públicas de Medellín-EPM, con un valor de US\$ 0,163 /kWh. Adicionalmente, el consumo eléctrico se determinó considerando que el equipo en funcionamiento, a las condiciones de extracción, incluye el bombeo y cambios de fase del dióxido de carbono, circulación y calentamiento del agua de las chaquetas de calefacción y circulación de agua de enfriamiento, funcionamiento del chiller y torre de enfriamiento.

En la experimentación, tanto a escala de laboratorio como a escala piloto, se realizaron mediciones de los parámetros eléctricos de forma directa, que permitieron determinar el consumo eléctrico para los dos procesos. Estos valores son para la escala de laboratorio de 1,84 kWh y para la escala piloto de 16,95 kWh. Al realizar las relaciones de $\text{kWh}_{\text{piloto}}/\text{kWh}_{\text{lab.}}$, se obtiene un valor de 9,2, que es aproximadamente la relación de los flujos de dióxido de carbono entre las dos escalas ($Q_{\text{CO}_2 \text{ piloto}}/Q_{\text{CO}_2 \text{ lab.}} = 9$, (Tabla 12). Por lo tanto, para el cálculo del consumo eléctrico entre la escala piloto y la escala industrial, se asume la relación entre los flujos de dióxido de carbono de ambas escalas, con un valor de 8,33.

Los costos de materia prima-CRM, se calcularon teniendo en cuenta la harina por cada lote, el tiempo de extracción (1,75 h) y el número de horas laborales (4000 horas/año) con un valor de 34,28 Tm/año. El costo del dióxido de carbono de US 1,1/kg, el flujo de dióxido de carbono se calculó con base a la relación de escalado Q_{CO_2}/F ; (Tabla 12) y se asumieron unas pérdidas del 2% (Rosa & Meireles, 2005).

Entre los costos de materia prima también se consideró el costo del etanol como cosolvente con una relación del 10% de la harina de cúrcuma y un valor de US 5,5/kg.

Para los costos de tratamiento de los residuos-CWT se consideró que los residuos de harina pueden ser llevado a compostaje o utilizados en otros procesos de aprovechamiento, lo cual no genera costos. Adicionalmente, se determinó que el equipo debe ser lavado cuatro veces en el año, con una generación de 2 m³ de aguas residuales por cada lavado y un costo de tratamiento de US 21,2 /m³ por cada lavado, este costo es despreciables comparados con los demás (Rosa & Meireles, 2005).

3.2.7 Diagnóstico ambiental para proceso de extracción y lavado del equipo

Con la finalidad de realizar la identificación y análisis de los aspectos ambientales durante la extracción de curcumina por fluidos supercríticos, se realizó una delimitación de las etapas involucradas durante el proceso, para ello se aplicó una matriz de lista de chequeo descriptiva (V.Conesa Fdez-Vítor, 2013). En cada etapa se determinó consumo energético, consumo de agua, generación de residuos y emisiones de CO₂. Las etapas consideradas son descritas a continuación:

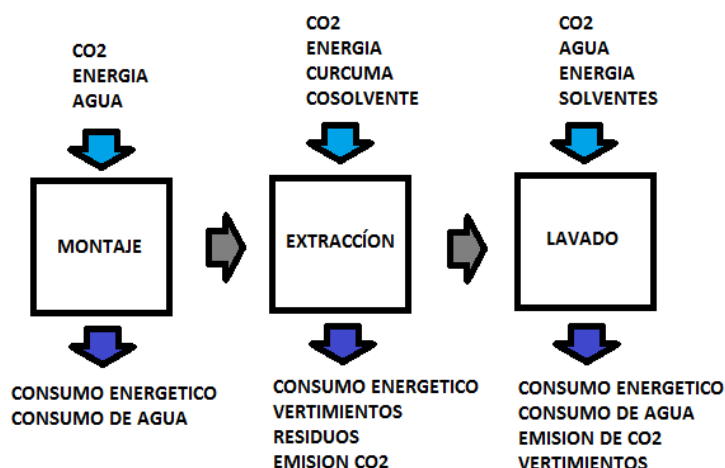
Montaje. En esta etapa se lleva el equipo de fluidos supercríticos a las condiciones de temperatura y presión de operación, esto se logra mediante el calentamiento de una mezcla saturada de CO₂ por compresión y bombeo, la temperatura es ajustada mediante el intercambiador de calor.

Extracción. El flujo de CO₂ entra en contacto con la matriz y arrastra la curcuminoides presentes en la harina de cúrcuma, ésta operación se lleva a cabo durante 105 min en el extractor a 50 MPa, 90 °C y un flujo de 108 kg/h de CO₂. Una vez terminado el proceso se retira el extracto que se encuentra a 60°C y 7,5 Mpa, para su análisis.

Lavado. Consta de cuatro fases en las cuales el equipo de fluidos supercrítico se opera a 23°C y 10 Mpa, en la primera fase se utilizan 24 L de etanol (95% v/v) y 12,8 kg de CO₂ durante 6 horas, la segunda fase 24 L de etanol (45% v/v) y 5 kg de CO₂ durante 6 horas, la tercera fase 24 L de etanol (24%v/v) y 13,6 kg de CO₂ durante 4 horas y en la cuarta fase 24 litros de agua y 13,79 kg CO₂ durante 4 horas.

En la Figura 15 se representan las etapas del proceso de extracción, para las cuales se indican las entradas y las salidas de masa y energía.

Figura 15. Flujograma de consumo y emisiones de masa y energía durante la extracción de curcumina por fluidos supercríticos.



En la Tabla 14, se reportan los valores de materias primas, insumos y energía asociados al proceso de extracción de curcumina y lavado del equipo.

Tabla 14. Insumos y energía asociados al proceso de extracción de curcumina y lavado del equipo a escala piloto.

Consumo	Cantidad Escala piloto
Agua montaje (m ³)	0,05
Agua lavado del equipo (L)	96
Emisiones de CO ₂ (Kg CO ₂ / 110 min extracción descarga el equipo)	17
Emisiones de CO ₂ en lavado equipo (Kg CO ₂ / 20 horas de lavado)	35
Residuos orgánicos (kg/110 min)	1,5
Energía en etapa de montaje (kW/h)	12,74
Energía en etapa de extracción (kW/2h)	33,91
Energía en etapa de lavado (kW/20h)	236
Etanol (L)	46

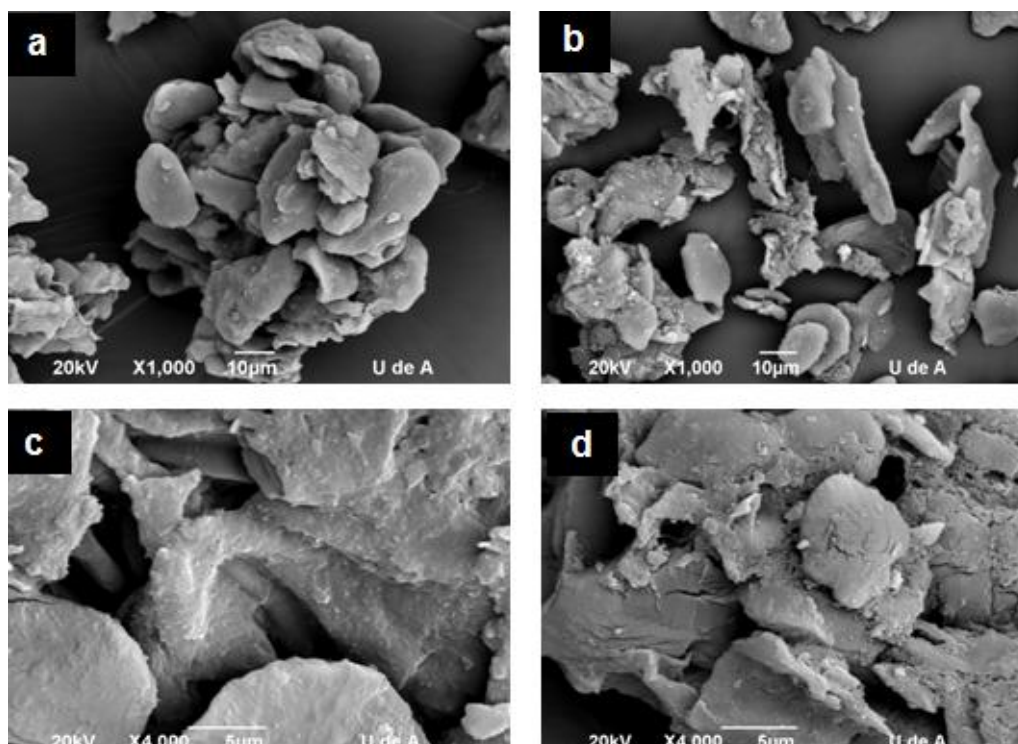
3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Caracterización morfológica de harina de cúrcuma

En la Figura 16 se presenta la microscopia electrónica de barrido realizada a la harina de cúrcuma antes y después de la extracción por fluidos supercríticos en el proceso piloto, de estas imágenes se puede observar a escala de 1000 y 4000; que las partículas de harina después de la extracción muestran fisuras que indican el fraccionamiento de las células que permiten la liberación del compuesto activo y facilitando el contacto con el solvente y la transferencia de masa, que da como resultado la extracción de los curcuminoides.

Figura 16. Micrografías SEM de la harina de cúrcuma

a). Antes de la extracción por fluidos supercríticos a escala de 1000 b). Después de la extracción por fluidos supercríticos a escala de 100 c). Antes de la extracción por fluidos supercríticos a escala de 4000 d). Después de la extracción por fluidos supercríticos a escala de 4000.



3.4 Escalado

El dimensionamiento a escala industrial, de acuerdo a los criterios establecidos para el escalado se presenta en la Tabla 15. El equipo constaría de dos extractores de 30 L cada uno, para operar por lotes, de tal forma que mientras se realiza la extracción en el primer extractor se estaría cargando el segundo.

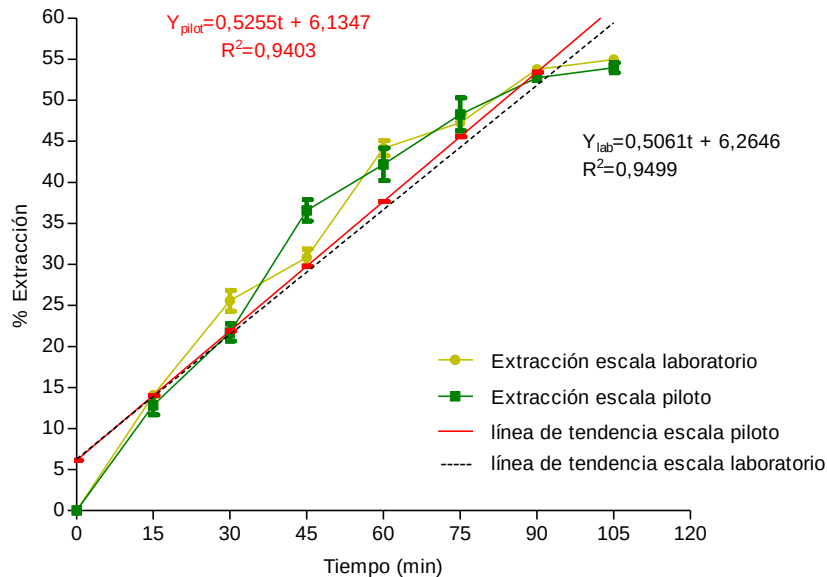
Tabla 15. Condiciones experimentales para el escalado - escala piloto a escala industrial

Condición	Escala piloto	Escala industrial
Temperatura de extracción (°C)	90	90
Presión extracción (MPa)	50	50
Flujo de CO ₂ (Kg/h)	108	900
Masa de materia prima (kg)	1,8	15
Diámetro del extractor (m)	0,1320	0,2673
Altura del lecho (m)	0,2642	0,5351
Densidad harina (kg/m ³)	499,8	499,8

En la Figura 17 se presentan las curvas globales de extracción obtenida para los curcuminoides a escala de laboratorio y a escala piloto. La curva para la extracción a escala de laboratorio presenta un largo periodo para el cual la tasa de extracción permanece constante, alrededor de 105 min, observándose a partir de este tiempo la tendencia de permanecer constante, lo que indica el agotamiento de la curcumina extraíble en el proceso a estas condiciones.

De estas curvas se observa que los porcentajes de extracción total de curcuminoides son prácticamente iguales; alrededor de 55% (este porcentaje es calculado con base a los curcuminoides totales presentes en la harina de cúrcuma, extraídos por soxhlet, como se explicó en el capítulo 1, ecuación (2)).

Figura 17. Curva global de extracción de curcuminoides a escala de laboratorio y a escala piloto



Dado al buen ajuste presentado entre las curvas globales de extracción a escala de laboratorio y a escala piloto de la Figura 15, se puede inferir que el criterio aplicado para el escalado, en el cual permanecieron constantes las relaciones de solvente a alimento (Q_{CO_2}/F) y la relación geométrica de altura del lecho a diámetro del extractor (H_B/d_B), es adecuado para la extracción de curcuminoides por fluidos supercríticos, permitiendo llegar a un escalado 60 veces mayor desde la escala de laboratorio hasta la escala piloto, con una predicción de la cinética a diferentes escalas bastante precisa.

Los criterios de escalado establecidos permitieron replicar las condiciones de transferencia de masa sin necesidad de recurrir a modelos matemáticos de fenómenos de transporte de masa y energía. Estos resultados son interesantes en cuanto que para este caso específico, el escalado fue un proceso simple.

Realizando una regresión lineal para cada una de las curvas de extracción presentadas en la Figura 17 (tanto para la extracción a escala de laboratorio como para la extracción piloto), se obtiene un ajuste cercano a 0.94 para ambas curvas, lo cual indica que la extracción se ajusta a una cinética de primer orden (Chang, 2008), que tiene la forma

$Y = kt + Y_0$; donde k es la constante cinética, t es el tiempo, Y es el porcentaje de extracción en un tiempo t y Y_0 es el porcentaje de extracción en el tiempo cero. En este caso se observa que el valor de k para ambas extracciones es muy similar. De estas ecuaciones y la información de la curva global de extracción, se pueden obtener los parámetros cinéticos (Prado et al., 2012). Teniendo en cuenta que en la extracción a escala de laboratorio, la masa de harina de cúrcuma alimentada fue 0.2 kg, el flujo de CO_2 de 3.33×10^{-3} kg/s y su contenido de curcuminoides totales es del 10.8% (teniendo como referencia los curcuminoides extraídos por soxhlet), los resultados de dichos parámetros cinéticos se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Parámetros cinéticos obtenidos para la extracción de curcuminoides por fluidos supercríticos

Parámetro	Resultados
T (min)	105
T_{CER} (min)	70
M_{CER} (kg/s)	$1,822 \times 10^{-6}$
Y_{CER} (kg extracto/kg CO_2)	$5,709 \times 10^{-4}$
R_{CER} (%)	45
R(%)	55,5

T_{CER} - tiempo para tasa constante de extracción; M_{CER} - tasa de transferencia de masa; Y_{CER} - relación másica de soluto en la fase supercrítica a la salida del lecho durante el período de tasa constante de extracción; R_{CER} - rendimiento de extracción de cúrcuma durante el tiempo para tasa constante de extracción.

El tiempo para la tasa constante de extracción de 70 min, indica el tiempo mínimo que debe durar un ciclo para que el proceso de extracción sea económicamente viable.

3.5 Estimación de costos

La estimación de costos se realizó para la extracción a escala industrial a condiciones de 90°C, 50 MPa, flujo de CO_2 de 900 kg/h y 15 kg de harina. Para determinar los costos de producción COM se utilizó la curva de

extracción extrapolando a la escala industrial, para un volumen de 30 L, manteniendo la relación Q_{CO_2}/F constante e igualmente la relación H_b/d_b . La Tabla 17 muestra los costos presentados en fracciones, COM-costo de producción, FRI- Inversión inicial, COL-Costos laborales, CUT- Costo de servicios públicos y CRM-Costo de materia prima, así como el costo de producción específica, en función del tiempo y de las fracciones de extracción (Paula et al., 2016).

Un análisis para los resultados consignados en la Tabla 17, indica que la fracción de inversión inicial, es constante en el tiempo, dado que se relaciona únicamente con la inversión inicial en equipos. Con relación a la mano de obra y los servicios públicos, estos dependen sólo de la capacidad de producción y del equipo, parámetros que se mantienen constantes durante la extracción, por lo tanto estas dos fracciones de costos también permanecen constantes durante el tiempo de extracción. Para la fracción de los costos materia prima, se puede observar que estos varían conforme a las fracciones de extracción durante el tiempo.

Una vez que el rendimiento de extracción aumenta con el tiempo, la misma cantidad de materia prima da lugar a rendimientos más altos de extracto, por lo tanto, se requiere menor cantidad de materia prima para recuperar una cantidad específica de producto (A.C. Aguiar, J.V. Visentainer, J. Martínez, 2012).

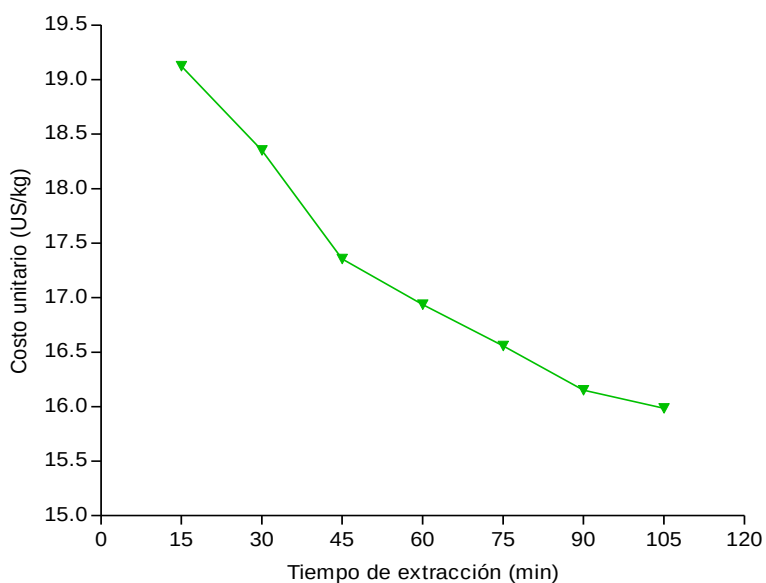
En la Figura 18 se muestra la gráfica que relaciona el costo unitario en función del tiempo de extracción; en esta curva, se observa que el costo unitario presenta una tendencia a estabilizarse para un valor cercano a US 16/ kg a un tiempo de 105 minutos, que se corresponde con el tiempo de extracción mínimo (T_{CER} presentado en la Tabla 16) e indica el tiempo mínimo que debe durar un ciclo, para que el proceso de extracción sea económicamente viable.

Tabla 17. Estimación de costos por fracciones, para la extracción por fluidos supercríticos a escala industrial a 50 MPa y 90°C

Tiempo (min)	FRI (US/año)	COL (US/año)	CUT (US/año)	CRM (US/año)	COM (US/año)	CU* (U\$/kg)
15	510875	16000	92055	266594	655706	19,125
30	510875	16000	92055	234878	629202	18,352
45	510875	16000	92055	193957	595007	17,355
60	510875	16000	92055	176826	580691	16,937
75	510875	16000	92055	161282	567702	16,558
90	510875	16000	92055	144562	553730	16,151
105	510875	16000	92055	137715	548008	15,984

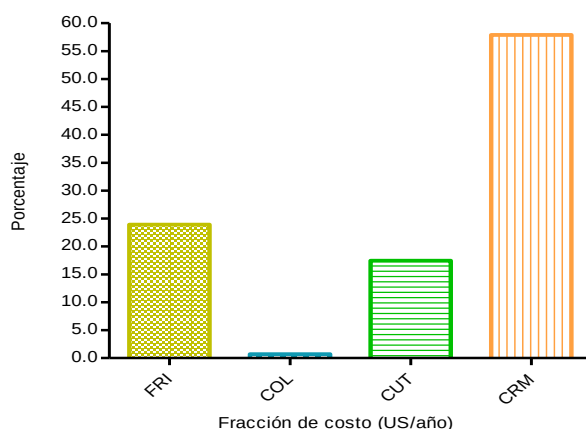
*CU- Costo unitario

Figura 18. Costo unitario para la extracción de curcuminoides por fluidos supercríticos a 5 MPa y 90°C



En la Figura 19 se presenta el porcentaje de cada fracción de costos en la participación de costo global. El costo con mayor participación es el asociado a la materia prima con 57,90%, seguido de la inversión en el equipo con un 23,93%, los costos de servicios públicos con un 17,44 % y el menor porcentaje lo tiene el costo laboral con un 0,67%.

Figura 19. Porcentajes por fracción con respecto al costo global.



Haciendo un estimado de los costos de producción y del precio de venta de los curcuminoides se tiene el siguiente análisis:

En el mercado la oleorresina del 10% de curcuminoides tiene un valor de US 45,5/(kg de oleorresina) (valor suministrado por la industria de los colorantes en Medellín) (US 454,5/kg de curcuminoides). Por otro lado, de los resultados de la estimación de costos de este trabajo, se requiere de 1.66 kg de harina de cúrcuma para obtener 0,1 kg de curcuminoides (el contenido de curcuminoides de la harina es de 10,8 % y de este se extrae 55,5%) y tiene un costo de US 16/kg. por lo tanto, el costo de producción es de US 272/kg. En conclusión el valor de producción es el 60% del valor de venta, estas cifras indican que es viable la extracción de curcuminoides por fluidos supercríticos.

3.6 Diagnóstico ambiental para proceso de extracción y lavado del equipo

Los resultados del diagnóstico ambiental son presentados en la matriz de lista de chequeo descriptiva en la Tabla 18.

Haciendo un análisis de la información presentada en esta Tabla se puede observar que los aspectos ambientales que presentan mayor afectación están relacionados con la operación de lavado del equipo en el proceso de extracción de curcumina. Como se evidencia, los aspectos ambientales más relevantes en el proceso de extracción son la emisión de

CO₂ y el consumo de energía, siendo el primero el más crítico dado a la afectación directa relacionada con el cambio climático, que como se sabe es de gran importancia, ya que estos gases propician el calentamiento global.

Tabla 18. Matriz de lista de chequeo descriptiva para el diagnóstico ambiental en el proceso de extracción de cúrcuma y lavado del equipo

Componente Ambiental	Actividad	Acción	Tipo de impacto	Indicador ambiental	Medición indicador
Agua Superficial	Lavado Equipo (SFE)	Vertido de agua residual (Derivados de cúrcuma +etanol)	Directo: Aumento de carga orgánica y aumento de demanda química de cuerpos de agua. Indirecto: Disminución del oxígeno disuelto en las aguas receptoras.	DQO (mg/l)	1.202.000
				Color (UC)	12.600
				pH	5,95
				Turbidez(NTU)	33,5
				Conductividad eléctrica(μs/cm)	45,6
				DBO5(mg/L)	961,600
				Dureza total (mg/L) CaCO ₃	10,5
	Montaje del equipo (SFE)	Consumo de agua	Directo: Agotamiento del recurso hídrico	L agua	50
Suelo	Desmonte del equipo (SFE)	Generación de residuos orgánicos	Directo: Acumulación desmedida de residuos Indirecto: Proliferación de insectos, roedores y microorganismos patógenos.	kg residuos	1,5
Aire	Descarga del equipo (SFE) después del proceso de extracción	Emisión de CO ₂	Directo: Aumento La temperatura media de la superficie terrestre debido al aporte que genera en el calentamiento global. Indirecto: Aumento y propagación de enfermedades respiratorias.	kg de CO ₂ / 100 minutos de extracción	17
	Lavado del equipo (SFE)			kg de CO ₂ / 20 horas de lavado	45,19
Energía	Montaje del equipo (SFE)	Consumo energético	Directo: Desequilibrio en aspectos del cambio climático Indirecto: Aumento del consumo de combustibles fósiles (petróleo, gas y carbón)	kW/ horas	16,96
	Proceso de extracción	Consumo energético			
	Lavado del equipo (SFE)	Consumo energético		kW/20 horas	236

Adicionalmente, el dióxido de carbono podría tener efectos adversos para la salud pública, por exposiciones ocupacionales a concentraciones bajas o moderadas, que pueden afectar el sistema nervioso y propiciar el desarrollo de otras enfermedades (Mohammadi, Golabadi, Labbafinejad, Pishgahhadian, & Attarchi, 2012). Dado a estos efectos adversos hacia el medio ambiente y la salud pública, el manejo del dióxido de carbono se ha convertido en una preocupación para la población, la industria y la comunidad científica.

Las acciones que permiten mitigar las emisiones de dióxido de carbono producidas en el proceso de extracción de curcumina por fluidos supercríticos se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19. Acciones de mitigación y control de las emisiones de dióxido de carbono en el proceso de extracción de curcumina por fluidos supercríticos

Componente ambiental	Aire
Objetivo	Mitigar la cantidad de CO ₂ Emitidos en el proceso de extracción y lavado de curcuminoides de la tecnología Fluidos Supercríticos.
Etapas del proyecto	Extracción y lavado.
Impactos identificados	Aumento La temperatura media de la superficie terrestre debido al aporte que genera en el calentamiento global y Aumento en la propagación de enfermedades respiratorias.
Causa del impacto	Liberación CO ₂ a la atmosfera.
Efecto ambiental	Contaminación atmosférica.
Tipo de medida	Medida de mitigación.
Acciones a desarrollar medida de manejo	Recirculación de CO₂: Se podría diseñar un equipo con una mayor capacidad de almacenamiento y recirculación de CO₂ en el proceso de extracción. Condiciones de Extracción: la tecnología se podría trabajar a condiciones de temperatura y de presión que permitan reducir la cantidad de flujo de CO₂ para el proceso de extracción requerido.

Esta tecnología presenta otras afectaciones a considerar, para las cuales se plantea acciones de control y manejo en el proceso de extracción de curcumina, las acciones de mejora se presentan a continuación en la Tabla 20.

Tabla 20. Acciones de mitigación y control de otras afectaciones al ambiente generadas por el proceso de extracción de curcumina por fluidos supercríticos

Componente ambiental	Agua
Objetivo	Mitigar la Cantidad de etanol vertido.
Etapas del proyecto	Lavado.
Impactos identificados	Aumento de carga orgánica y aumento de demanda química de cuerpos de agua lo cual genera disminución del oxígeno disuelto en las aguas receptoras.
Causa del impacto	Vertimiento de aguas con etanol y derivados cúrcuma.
Efecto ambiental	Contaminación de aguas superficiales.
Tipo de medida	Medida de mitigación.
Acciones a desarrollar medida de manejo	Condiciones de Lavado: el lavado se podría realizar con combinaciones de agua y etanol a menores relaciones másicas.
Componente ambiental	Suelo
Objetivo	Mitigar la cantidad de residuos generados.
Etapas del proyecto	Desmonte del equipo.
Impactos identificados	Acumulación desmedida de residuos y podría generar proliferación de insectos, roedores y microorganismos patógenos.
Causa del impacto	Acumulación y disposición residuos de cúrcuma.
Efecto ambiental	Contaminación de suelos superficiales.
Tipo de medida	Medida de mitigación.
Acciones a desarrollar medida de manejo	Manejo de residuos: El material vegetal extraído puede ser llevado a una segunda etapa de extracción. Disposición de residuos: Aprovechamiento para compostaje. Investigación: determinar o identificar otros componentes en la cúrcuma para generar otro tipo de productos o subproductos de interés comercial.
Componente ambiental	Energía
Objetivo	Mitigar la cantidad consumida de energía en el proceso de montaje, extracción y lavado de la tecnología Fluidos Supercríticos.
Etapas del proyecto	Montaje, extracción y lavado.
Impactos identificados	Desequilibrio en aspectos del cambio climático que a su vez pueden generar aumento en el consumo de combustibles fósiles (petróleo, gas y carbón).
Causa del impacto	Requerimientos de energía para el proceso de extracción.
Efecto ambiental	Agotamiento del recurso.
Tipo de medida	Medida de mitigación.
Acciones a desarrollar medida de manejo	Componentes eléctricos: Se podrían implementar accesorios de reducción energética en bombas, compresores a fin de mejorar la eficiencia eléctrica de estos equipos. Programación de mantenimientos y capacitaciones en uso adecuado del equipo de extracción.

3.7 Conclusiones

El criterio establecido para realizar el escalado del proceso de extracción de curcumina por fluidos supercrítico, permitió de forma simple obtener un escalado 60 veces mayor, desde la escala de laboratorio a escala piloto, con una predicción de la cinética con buena aproximación. Dicho criterio de escalado fue mantener constantes las relaciones de flujo de dióxido de carbono a harina de cúrcuma (Q_{CO_2}/F) y diámetro- altura del extractor (H_b/d_b). De igual forma, este criterio permitió determinar las condiciones geométricas, flujos y tiempos de extracción a escala industrial, estas condiciones son: volumen del extractor de 30 L, flujo de dióxido de carbono de 900 kg/h y un alimento de materia prima de 15 kg, para un ciclo de extracción de 105 min a 90°C y 50 kPa.

Como resultado de la estimación de costos, se encontró que el costo de extracción de curcuminoides por fluidos supercríticos es de US 16/kg el cual representa un 60% del valor de venta, con lo cual el proceso es viable.

El diagnóstico ambiental que se realizó para el proceso de extracción de curcumina, permitió identificar las principales afectaciones que genera la extracción sobre el ambiente y representa un aporte importante para la evaluación ambiental del proceso, en este sentido se evidenció que las acciones que mayor afectación tienen sobre el ambiente están relacionadas con el manejo del dióxido de carbono, el consumo energético y los vertimientos de las aguas residuales procedentes de la operación de lavado. Para controlar y mitigar estas afectaciones se propusieron diferentes acciones de buen manejo, que permiten hacer de la tecnología de extracción por fluidos supercríticos una tecnología más ecoeficiente.

3.8 Referencias

A.C. Aguiar, J.V. Visentainer, J. Martínez. (2012). Extraction from striped weakfish (*Cynoscion striatus*) wastes with pressurized CO₂: global yield, composition, kinetics and cost estimation. J. Supercrit. Fluids, 71, 1–10.

Alonso, E., Cantero, F. J., García, J., & Cocero, M. J. (2002). Scale-up for a process of supercritical extraction with adsorption of solute onto

active carbon. Application to soil remediation. *Journal of Supercritical Fluids*, 24(2), 123–135. [http://doi.org/10.1016/S0896-8446\(02\)00016-5](http://doi.org/10.1016/S0896-8446(02)00016-5)

Carvalho, R. N., Moura, L. S., Rosa, P. T. V, & Meireles, M. A. A. (2005). Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *Journal of Supercritical Fluids*, 35(3), 197–204. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.01.009>

Chang, R. (2008). *Fisicoquímica*. (M. Hill, Ed.) (3 edición). Mexico: McGraw HILL.

Chen, Z., Xia, Y., Liao, S., Huang, Y., Li, Y., He, Y., ... Li, B. (2014). Thermal degradation kinetics study of curcumin with nonlinear methods. *Food Chemistry*, 155, 81–86. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.034>

Chou, W.-L., & Yang, K.-C. (2008). Effect of various chelating agents on supercritical carbon dioxide extraction of indium(III) ions from acidic aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3), 498–505. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.052>

De Melo, M. M. R., Domingues, R. M. A., Sova, M., Lack, E., Seidlitz, H., Lang, F., ... Silva, C. M. (2014). Scale-up studies of the supercritical fluid extraction of triterpenic acids from *Eucalyptus globulus* bark. *Journal of Supercritical Fluids*, 95, 44–50. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.030>

Karlsson, Torstensson, & Taylor. (1997). The use of supercritical fluid extraction for sample preparation of pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15(5), 601–611. [http://doi.org/10.1016/S0731-7085\(96\)01879-1](http://doi.org/10.1016/S0731-7085(96)01879-1)

Knez, Marko, E., Leitgeb, M., Primožič, M., Knez Hrncar, M., & Škerget, M. (2014). Industrial applications of supercritical fluids: A review. *Energy*, 77, 235–243. <http://doi.org/10.1016/j.energy.2014.07.044>

- Lebedev, a. E., Katalevich, a. M., & Menshutina, N. V. (2015). Modeling and scale-up of supercritical fluid processes. Part I: Supercritical drying. *The Journal of Supercritical Fluids*, 106, 122–132. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.06.010>
- Li, M., Ngadi, M. O., & Ma, Y. (2014). Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.115>
- Lucas, S., Calvo, M. P., Garc??a-Serna, J., Palencia, C., & Cocero, M. J. (2007). Two-parameter model for mass transfer processes between solid matrixes and supercritical fluids: Analytical solution. *Journal of Supercritical Fluids*, 41(2), 257–266. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.10.007>
- Lucas, S., Calvo, M. P., Palencia, C., & Cocero, M. J. (2004). Mathematical model of supercritical CO₂ adsorption on activated carbon: Effect of operating conditions and adsorption scale-up. *Journal of Supercritical Fluids*, 32(1-3), 193–201. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.02.008>
- Mezzomo, N., Martínez, J., & Ferreira, S. R. S. (2009). Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. *Journal of Supercritical Fluids*, 51(1), 10–16. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.07.008>
- Mohammadi, S., Golabadi, M., Labbafinejad, Y., Pishgahhadian, F., & Attarchi, M. (2012). Effects of exposure to mixed organic solvents on blood pressure in non-smoking women working in a pharmaceutical company. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 63(2), 161–9. <http://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2186>
- Paula, J. T., Aguiar, A. C., Sousa, I. M. O., Magalhães, P. M., Foglio, M. A., & Cabral, F. A. (2016). Scale-up study of supercritical fluid extraction process for *Baccharis dracunculifolia*. *Journal of Supercritical Fluids*, 107, 219–225.

<http://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.013>

Prado, J. M., Dalmolin, I., Carareto, N. D. D., Basso, R. C., Meirelles, A. J. A., Oliveira, J. V., ... Meireles, M. A. A. (2012a). Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, 109(2), 249–257. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.007>

Prado, J. M., Dalmolin, I., Carareto, N. D. D., Basso, R. C., Meirelles, A. J. A., Oliveira, J. V., ... Meireles, M. A. A. (2012b). Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, 109(2), 249–257. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.007>

Ramsey, E., Sun, Q., Zhang, Z., Zhang, C., & Gou, W. (2009). Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. *Journal of Environmental Sciences*, 21(6), 720–726. [http://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62330-X](http://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62330-X)

Rocha Uribe j. A., Novelo Perez J.I., and R. M. C. (2013). COST ESTIMATION FOR CO₂ SUPERCRITICAL EXTRACTION SYSTEMS AND MANUFACTURING COST FOR HABANERO PEPPER (pp. 1–7). Cartagena: III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids.

Rosa, P. T. V., & Meireles, M. A. A. (2005). Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 235–240. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.064>

Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A. H., Haik, Y., Farid, M., & Tariq, S. (2014). Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up. *Journal of Supercritical Fluids*, 86, 57–66. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.020>

V.Conesa Fdez-Vítoria. (2013). Guía metodológica para la evaluación de impactos ambientales (4th ed.). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Wüst Zibetti, A., Aydi, A., Arauco Livia, M., Bolzan, A., & Barth, D. (2013). Solvent extraction and purification of rosmarinic acid from supercritical fluid extraction fractionation waste: Economic evaluation and scale-up. *Journal of Supercritical Fluids*, 83, 133–145. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.09.005>

CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales de este trabajo dan cuenta del desarrollo de un proceso de extracción limpia de colorantes a base de curcumina, para ello se evaluó la eficiencia de extracción de curcuminoides por el método soxlet y se comparó con la extracción por fluidos supercrítico y con la extracción asistida por microondas, encontrando que la extracción asistida por microondas es la tecnología con mayor rendimiento (70,86%) en comparación con la extracción por fluidos supercríticos (55,5%).

En la extracción asistida por microondas se utilizó como solvente una solución de tween 20, lo cual es una alternativa para la sustitución de solventes orgánicos tóxicos como la acetona, haciendo que esta tecnología sea más amigable con el ambiente.

Se determinó que la extracción por fluidos supercríticos está controlada por el flujo de dióxido de carbono, de forma tal que al aumentar la velocidad del solvente se mejora la transferencia de masa, mostrando un aumento del rendimiento de extracción con aumentos del mismo. Las variables presión y temperatura no causan efectos significativos en el proceso de extracción.

Una vez se han extraído los curcuminoides, se desarrolló la formulación de un colorante natural en la cual se mejoran la estabilidad y solubilidad en agua de la curcumina a través de la encapsulación, dicha encapsulación se logró haciendo uso de la tecnología de antisolvente supercrítico a 100 bares de presión, una temperatura de 40° C, un flujo de extracto de 1 mL/min y manteniendo un flujo de CO₂ de 2 kg/h, se utilizó como encapsulante una mezcla de Eudragit L®100 y Pluronic®127 y se incorporó tween 20 como surfactante, en una relación másica de extracto: Eudragit: Plurionic: tween de 1:1:0,2:0,1.

La mayor solubilidad del colorante se obtuvo a pH4, alcanzando un valor de 211 µg/mL de curcuminoides totales (con una concentración de 4,45 µg/mL de curcumina). Los resultados del estudio de estabilidad indicaron que la curcumina es más estable a pH 4 (3- 5% de degradación) que a pH 8 (7,5 a 11 de degradación). A pH 4, no se observó dependencia de la degradación con la temperatura, mientras que a pH 8 el colorante presenta una tendencia a aumentar su degradación con aumentos de temperatura. De los resultados del estudio de fotodegradación utilizando

luz y radiación UV se concluye que la radiación luminosa es un factor crítico para la estabilidad del colorante obtenido por SAS. La formulación del colorante mostró una capacidad antioxidante de 22348 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ y una eficiencia de encapsulación (% EE) de 16%.

De los resultados del análisis de color se concluye que una solución de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la formulación del colorante a base de curcuminoides equivale a una solución aproximadamente de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tartrazina.

Una vez obtenida la formulación de un colorante con características de estabilidad y solubilidad en agua, se escaló el proceso de extracción por fluidos supercríticos teniendo consideraciones económicas y ambientales. El criterio establecido para realizar el escalado del proceso de extracción de curcumina por fluidos supercrítico, permitió de forma simple obtener un escalado 60 veces mayor, desde la escala de laboratorio a escala piloto, con una predicción de la cinética con buena aproximación. Dicho criterio de escalado fue mantener constantes las relaciones de flujo de dióxido de carbono a harina de cúrcuma (Q_{CO_2}/F) y diámetro- altura del extractor (H_b/d_b). De igual forma, este criterio permitió determinar las condiciones geométricas, flujos y tiempos de extracción a escala industrial, estas condiciones son: volumen del extractor de 30 L, flujo de dióxido de carbono de 900 kg/h y un alimento de materia prima de 15 kg, para un ciclo de extracción de 105 min a 90°C y 50 kPa.

Como resultado de la estimación de costos, se encontró que el costo de extracción de curcuminoides por fluidos supercríticos es de US 16/kg el cual representa un 60% del valor de venta, con lo cual el proceso es viable.

El diagnóstico ambiental que se realizó para el proceso de extracción de curcumina, permitió identificar las principales afectaciones que genera la extracción sobre el ambiente y representa un aporte importante para la evaluación ambiental del proceso, en este sentido se evidenció que las acciones que mayor afectación tienen sobre el ambiente están relacionadas con el manejo del dióxido de carbono, el consumo energético y los vertimientos de las aguas residuales procedentes de la operación de lavado. Para controlar y mitigar estas afectaciones se propusieron diferentes acciones de buen manejo, que permiten hacer de la tecnología de extracción por fluidos supercríticos una tecnología más ecoeficiente.

RECOMENDACIONES

Se recomienda explorar la encapsulación de los curcuminoides por la tecnología de antisolvente supercrítico-SAS, utilizando otros materiales encapsulantes con aplicación en alimentos, que permitan mejorar las propiedades de estabilidad y solubilidad en agua de la curcumina encontradas en el presente trabajo. Adicionalmente, determinar las condiciones para obtener por esta tecnología nanopartículas, las cuales podrían igualmente presentar mayor estabilidad y solubilidad en agua.

Probar otras tecnologías de extracción de curcuminoides, a partir de la harina de *Cúrcuma longa*. Igualmente, probar el uso de solventes no tóxicos, que permitan sustituir los solventes orgánicos tradicionales, con miras a contar con alternativas de extracción inocuas para el medio ambiente.

Desarrollar un proyecto que permita obtener un modelo matemático del proceso de extracción de curcuminoides por fluidos supercríticos.