

Obtención de oleorresinas con capacidad antioxidante a partir de especias
deshidratadas mediante la tecnología de fluidos supercríticos

Trabajo para optar por el título de magister en Innovación Alimentaria y Nutrición

Jeanine Kathleen Peñaloza Figueroa

Asesor
Julián Alberto Londoño
PhD Ciencias químicas

Corporación Universitaria Lasallista
Facultad de Ingeniería
Ingeniería de Alimentos
Caldas-Antioquia
2017

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	24
Justificación.....	26
Objetivos.....	28
Marco teórico	29
Espicias.....	29
Oleorresinas de especias	33
Antioxidantes.....	36
Comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	38
Pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	43
Extracción por fluidos supercríticos	47
Metodología.....	53
Espicias empleadas para estudio.....	53
Caracterización de las especias deshidratadas de estudio.....	53

Pág.

Análisis de tamaño de partícula de especias deshidratadas.....	53
Análisis de estructura de especias de estudio mediante microscopía de barrido electrónico (SEM)	54
Análisis sensoriales de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) y pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	54
Extracción de oleorresinas del comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) y la pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) mediante fluidos supercríticos	55
Caracterización de capacidad antioxidante de las oleorresinas obtenidas.....	56
Medición de la capacidad antioxidante en términos de ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno).....	56
Medición de ABTS.....	57
Determinación del contenido de piperina por GC-MS	58
Identificación de cuminaldehído por GC-MS.....	58
Determinación del rendimiento de extracción.....	59

Pág.

Dosis de oleorresinas de comino y pimienta negra empleadas en dos condimentos cárnicos “preparado sabor hamburguesa de pollo” y “preparado sabor salchicha tipo bigger.....	59
Análisis de compactación textural de condimentos “preparado sabor hamburguesa de pollo” y “preparado sabor salchicha tipo bigger” con adición de oleorresinas de comino y pimienta negra comerciales y obtenidas por fluidos supercríticos.....	60
Seguimiento sensorial de condimentos “preparado sabor hamburguesa de pollo” y “preparado sabor salchicha tipo bigger” con adición de oleorresinas de comino y pimienta negra comerciales y obtenidas por fluidos supercríticos.....	63
Análisis de vida útil de las oleorresinas de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) y pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) obtenidas por fluidos supercríticos	63
Mediciones de color.....	63
Estudio de estabilidad oxidativa de oleorresinas de comino y pimienta negra obtenidas por fluidos supercríticos y oleorresinas comerciales empleadas en Tecnas S.A. por la técnica de Rancimat	64

Pág.

Análisis estadístico.....	65
Resultados y Discusión.....	66
Caracterización del comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) y pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) empleadas para el estudio	66
Caracterización de tamaño de partícula (DTP) del comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) y la pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	66
Identificación de morfología del comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) y la pimienta negra (<i>Piper nigrum</i>) mediante microscopía de barrido electrónico (SEM).....	68
Caracterización sensorial de especias comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) y pimienta (<i>Piper nigrum</i> L.).....	72
Extracción supercrítica de oleorresinas de especias deshidratadas.....	74
Optimización de variables de proceso para extracción de oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) por fluidos supercríticos.....	75

Pág.

Optimización de variables de proceso para extracción de oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) por fluidos supercríticos.....	82
Capacidad antioxidante de oleorresinas de comino y pimienta negra obtenidas por extracción supercrítica.....	90
Determinación de piperina en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	93
Determinación de cuminaldehído en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	95
Rendimiento de extracción de oleorresinas de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) y pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) obtenidas por FSC.....	97
Dosis de oleorresinas de comino y pimienta negra empleadas en dos condimentos cárnicos “preparado sabor hamburguesa de pollo” y “preparado sabor salchicha tipo bigger”.....	99
Desempeño de la oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) en un preparado sabor salchicha tipo bigger.....	100
Compactación textural de preparado sabor salchicha tipo bigger con adición de oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	103

Pág.

Desempeño de la oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) en el condimento preparado sabor hamburguesa de pollo.....	106
<i>Compactación textural del preparado sabor hamburguesa de pollo con adición de oleorresina de comino (Cuminum cyminum L.).....</i>	<i>109</i>
Vida útil de oleorresinas de comino y pimienta negra obtenidas por fluidos supercríticos.....	111
Estabilidad oxidativa de oleorresinas de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) y comino (<i>Piper nigrum</i> L.).....	114
Conclusiones	y
Recomendaciones.....	121
Referencias.....	124
Apéndices.....	130

Listas especiales

	Pág.
Tabla 1. Funciones primarias y secundarias de especias seleccionadas.....	30
Tabla 2. Composición nutricional del comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	41
Tabla 3. Composición nutricional de la pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	45
Tabla 4. Propiedades de algunos fluidos en estado supercrítico	51
Tabla 5. Índices de cohesión de material particulado.....	62
Tabla 6. Descriptores característicos de las especias comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) y pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	74
Tabla 7. Valores mínimos y máximos de los factores de proceso empleados para obtención de oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	76
Tabla 8. Valores de los factores experimentales que maximizaron la capacidad antioxidante en términos de ORAC y ABTS en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	77
Tabla 9. Valores de los factores experimentales que maximizaron el % de rendimiento y el contenido de cuminaldehído en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.)....	77

Pág.

Tabla 10. Ecuaciones de regresión para las variables respuesta involucradas en la obtención de oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	79
Tabla 11. Valores óptimos de los factores de proceso que maximizan las variables respuesta y la función de deseabilidad en oleorresina de comino.....	81
Tabla 12. Valores mínimos y máximos de los factores de proceso empleados para la obtención de oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	83
Tabla 13. Valores de los factores experimentales que maximizaron la capacidad antioxidante en términos de ORAC y ABTS en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	84
Tabla 14. Valores de los factores experimentales que maximizaron el % de rendimiento y el contenido de piperina en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	84
Tabla 15. Ecuaciones de regresión para las variables respuesta involucradas en la obtención de oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	86
Tabla 16. Valores óptimos de los factores de proceso que maximizan las variables respuesta y la función de deseabilidad en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	88

Pág.

Tabla 17. ORAC y contenido de fenoles de oleorresinas de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) y comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) comerciales y obtenidas por fluidos supercríticos	91
Tabla 18. Rendimientos de extracción de oleorresinas de comino (<i>Cuminun cyminum</i> L.) y pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) y mejores condiciones de trabajo.....	97
Tabla 19. Evaluación sensorial durante 180 días de formulaciones con oleorresinas de pimienta negra (comercial y obtenida por FSC).....	102
Tabla 20. Índices de cohesión obtenidos de formulaciones con oleorresinas de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) comercial y obtenida por FSC	104
Tabla 21. Evaluación sensorial durante 180 días de formulaciones con oleorresinas de comino (comercial y obtenido por FSC).....	108
Tabla 22. Índices de cohesión de formulaciones con oleorresinas de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) comercial y obtenida por FSC	108
Tabla 23. Vida útil estimada a 25°C en función de DEcmc para las oleorresinas comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) y pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) obtenidas por FSC	

comparadas con la vida útil de los patrones
comerciales.....113

Tabla 24. Tiempos de inducción de oleorresinas de comino y pimienta negra obtenidos
por fluidos supercríticos y comerciales.....115

Listas especiales

	Pág.
Figura 1. Estructura química del cuminaldehído.....	40
Figura 2. Estructura química de la piperina.....	44
Figura 3. Equipo de extracción de fluidos supercríticos	49
Figura 4. DTP del comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) en polvo molido fino.....	67
Figura 5. DTP del comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) en polvo molido grueso.....	67
Figura 6. DTP de la pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) en polvo.....	68
Figura 7. Microscopia de barrido electrónico (SEM) del comino molido fino.....	70
Figura 8. Microscopia de barrido electrónico (SEM) de la pimienta negra en polvo.....	71
Figura 9. Diagrama de radar para intensidad de sabor del comino molido fino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	72
Figura 10. Diagrama de radar para intensidad de sabor de pimienta negra en polvo (<i>Piper nigrum</i> L.).....	73
Figura 11. Superficie de respuesta de variables óptimas para obtención de oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	80
Figura 12. Superficie de respuesta de variables óptimas para obtención de oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	87

Pág.

Figura 13. Espectro de masas de la piperina.....	93
Figura 14. Cromatograma característico, mostrando el pico correspondiente a piperina obtenida por GC-MS.....	94
Figura 15. Pico característico del cuminaldehído encontrado en el espectro de masas.....	96
Figura 16. Espectro de masas del cuminaldehído.....	96
Figura 17. Comportamiento de cohesión de polvos característico para el preparado sabor salchicha con adición de oleorresina de pimienta negra obtenida por fluidos supercríticos almacenado a 45°C.....	105
Figura 18. Comportamiento de cohesión de polvos característico de preparado sabor hamburguesa de pollo con adición oleorresina de comino comercial almacenada a 45°C.....	110
Figura 19. Ajuste de los datos de DEcmc de la oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) a la distribución de Weibull.....	112
Figura 20. Ajuste de los datos de DEcmc de la oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) a la distribución de Weibull.....	112
Figura 21. Diagrama de deterioro de la oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) comercial medido por método rancimat a temperaturas de 90°C, 110°C y 120°C.....	117

Pág.

Figura 22. Diagrama de deterioro de la oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) obtenida por FSC mediante método rancimat a temperaturas de 90°C, 110°C y 120°C.....	117
Figura 23. Diagrama de deterioro de la oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) comercial medido por método rancimat a temperaturas de 90°C, 110°C y 120°C.....	118
Figura 24. Diagrama de deterioro de la oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) obtenida por FSC mediante método rancimat a temperaturas de 90°C, 110°C y 120°C.....	118

Lista de apéndices

	Pág.
Apéndice A. Diseño experimental de Box Benhken para obtención de oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	132
Apéndice B. Diseño experimental de Box Benhken para obtención de oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.).....	133
Apéndice C. Gráfico de contornos de la superficie estimada para ORAC en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	134
Apéndice D. Gráfico de contornos de la superficie estimada para ABTS en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	135
Apéndice E. Gráfico de contornos de la superficie estimada para % cuminaldehído en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	136
Apéndice F. Gráfico de contornos de la superficie estimada para % rendimiento en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	137
Apéndice G. Interacción de factores de proceso sobre la variable ORAC en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	138
Apéndice H. Interacción de factores de proceso sobre la variable ABTS en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.).....	139

Pág.

Apéndice I. Interacción de factores de proceso sobre la variable % rendimiento en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L).....	140
Apéndice J. Interacción de factores de proceso sobre la variable % cuminaldehído en oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L).....	141
Apéndice K. Gráfico de contornos de la superficie estimada para ORAC en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L).....	142
Apéndice L. Gráfico de contornos de la superficie estimada para ABTS en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L).....	143
Apéndice M. Gráfico de contornos de la superficie estimada para % piperina en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L).....	144
Apéndice N. Gráfico de contornos de la superficie estimada para % rendimiento en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L).....	145
Apéndice O. Interacción de factores de proceso sobre la variable ORAC en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L).....	146
Apéndice P. Interacción de factores de proceso sobre la variable ABTS en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L).....	147
Apéndice Q. Interacción de factores de proceso sobre la variable % rendimiento en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L).....	148

Pág.

Apéndice R. Interacción de factores de proceso sobre la variable % piperina en oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L).....	149
---	-----

Glosario

Especia: partes comestibles de las plantas que se añaden tradicionalmente a los productos alimenticios para proporcionar aromas naturales y propiedades aromáticas.

Oleorresina: extractos de especias de los que se ha evaporado el disolvente de extracción, dejando una mezcla del aceite volátil y el material resinoso de la especia.

ORAC (oxygen radical absorbance capacity): medición de la capacidad global que tienen todos los antioxidantes presentes en un alimento para neutralizar radicales peroxilo generados en un ensayo *in vitro* de actividad antioxidante.

ABTS: 2,2 azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico, es un compuesto químico utilizado para medir la capacidad antioxidante de alimentos y otros productos agrícolas. Además, un uso común es en el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) para detectar la unión de moléculas entre sí.

Polifenoles: compuestos bio-sintetizados por las plantas cuya principal característica estructural es la de poseer uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a uno o más anillos

bencénicos. Son primariamente conocidos por sus propiedades antioxidantes y otras actividades biológicas potencialmente beneficiosas para la salud.

Vida útil: periodo de tiempo estimado en el que un alimento mantiene sus características organolépticas desde la fecha de su producción hasta su caducidad

Compuestos aromáticos volátiles: componentes que proporcionan aroma y sabor a la mayoría de productos naturales. La mezcla de numerosos compuestos volátiles como esterres, aldehídos, cetonas, ácidos, furanos y terpenos define los atributos sensoriales de las especias y la aceptación del consumidor.

Resumen

El estudio se enfocó en la obtención de oleorresinas con capacidad antioxidante a partir de comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.) mediante la tecnología de fluidos supercríticos. Se ensayaron rangos de temperatura, presión y tiempo entre 40 a 70°C, 150 a 400 bares y 30 a 90 min para la oleorresina de comino y de 40°C a 70°C, 220 a 550 bares y 30 a 90 min para oleorresina de pimienta negra.

Se hallaron condiciones óptimas de extracción de 63°C, 346 bares y 53 min para oleorresina de comino y de 68°C, 328 bares y 90 min para oleorresina de pimienta negra.

Se identificaron y cuantificaron químicamente los componentes activos de las oleorresinas obtenidas a través de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), encontrándose valores máximos de 23,94% y 12,56% para cuminaldehído y piperina respectivamente. Comparadas con patrones comerciales, las oleorresinas obtenidas presentaron buenas similitudes sensoriales y mayor afinidad lipofílica. Por esta razón, fue necesario vehiculizar en solventes permitidos con el fin de conseguir una mayor compatibilidad química con los sistemas oleosos encontrados en las formulaciones de condimentos.

La capacidad antioxidante optimizada en términos de ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno) fue de 585164 μmol Trolox/100g para la oleorresina de pimienta y 886728 μmol Trolox/100g para la oleorresina de comino.

Se aplicaron dosis de 0,015g/kg de oleorresina de comino en preparado sabor hamburguesa de pollo y 0,0055g/kg de oleorresina de pimienta negra en preparado sabor salchicha tipo bigger, cantidades que se emplean actualmente en los condimentos mencionados pero con oleorresinas comerciales. Los resultados en términos de compactación y sabores residuales/extraños medidos en el tiempo mostraron que las dosis de reemplazo de 1 a 1 generaron buenos perfiles de sabor y buenas características de fluencia y calidad textural.

La vida útil de las oleorresinas en función del cambio de color DE_{cmc} analizadas mediante el análisis probabilístico de Weibull fue de 7,51 meses y 7,73 meses para pimienta negra y comino respectivamente. Esto reveló que el tiempo de anaquel de las oleorresinas obtenidas tomando variables colorimétricas fue comparable con los 7 meses reportados en la ficha técnica de las actualmente empleadas en la elaboración de condimentos.

Con los resultados obtenidos se podrán reemplazar las oleorresinas de comino y pimienta negra que se importan de Estados Unidos logrando con ello facilitar procedimientos logísticos, buenos perfiles sensoriales y menores tiempos de entrega a los clientes. En una próxima etapa del estudio donde se realice el escalamiento por baches y la aplicación en otras matrices que contengan estas materias primas se podrán definir dosis de reemplazo y mejoras operativas en procesos.

Palabras clave: Especia, oleorresina, fluidos supercríticos, capacidad antioxidante, pimienta negra, comino

Abstract

The study focused on the production of oleoresins with antioxidant capacity from cumin (*Cuminum cyminum* L.) and black pepper (*Piper nigrum* L.) using supercritical fluid technology. Temperature, pressure and time ranges were tested between 40 to 70°C, 150 to 400 bar and 30 to 90 min for cumin oleoresin and 40°C to 70°C, 220 to 550 bar and 30 to 90 min for oleoresin of black pepper.

Optimal extraction conditions were found at 63°C, 346 bar and 53 min for cumin oleoresin and 68°C, 328 bar and 90 min for black pepper oleoresin. The active components of the oleoresins obtained through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) were chemically identified and quantified, with maximum values of 23,94% and 12,56% for cuminaldehyde and piperine respectively. Compared with commercial standards, the oleoresins obtained showed good sensorial similarities and greater lipophilic affinity. For this reason, it was necessary to carry in allowed solvents in order to achieve greater chemical compatibility with the oily systems found in the condiment formulations.

The optimized antioxidant capacity in terms of ORAC (Absorption Capacity of Oxygen Radicals) was 585164 $\mu\text{mol Trolox} / 100\text{g}$ for pepper oleoresin and 886728 $\mu\text{mol Trolox} / 100\text{g}$ for cumin oleoresin.

Doses of 0,015g / kg of cumin oleoresin were poured into flavored chicken burger flavor and 0,0055g / kg of black pepper oleoresin in sausage seasoning ", amounts which are currently used in the seasonings mentioned but with commercial oleoresins.

Results in terms of compaction and strange/residual flavors that were measured over time showed that replacement doses of 1 to 1 generated good flavor profiles and good flow characteristics and textural quality.

The shelf life of the oleoresins according to the color change DEcmc analyzed by the probabilistic analysis of Weibull was of 7,51 months and 7,73 months for black pepper and cumin respectively. This revealed that the shelf life of the oleoresins obtained by taking colorimetric variables was comparable to the 7 months reported in the datasheet of those currently used in the elaboration of condiments.

The results obtained will be able to replace the cumin and black pepper oleoresins imported from the United States, thereby facilitating logistics procedures, good sensory profiles and shorter delivery times to customers. In a next stage of the study where the bump scale is carried out and the application in other food matrices containing these raw materials will be able to define replacement doses and operational improvements in processes.

Keywords: Spice, oleoresin, supercritical fluids, antioxidant capacity, pepper, cumin.

Introducción

Las oleorresinas son extractos semisólidos de plantas, de los que se ha evaporado el disolvente de extracción y abundan en compuestos más pesados y lipófilos. Tecnologías como la extracción con solventes han estado asociadas a la producción de estos componentes, pero se han presentado inconvenientes relacionados con la presencia de gran cantidad de compuestos que minimizan la pureza de la oleorresina y de trazas de solventes orgánicos que podrían afectar a largo plazo la salud de los consumidores y el no cumplimiento de los límites permitidos por las regulaciones de alimentos.

En vista del anterior panorama, se pretendió abordar la tecnología de fluidos supercríticos con el fin de mejorar la calidad de las oleorresinas en función de la eliminación de residuos de solventes y la obtención de los compuestos activos responsables de los conferir perfiles sensoriales característicos de cada especie.

Se ejecutó el estudio con comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.) debido a que son dos de las especias fundamentales más empleadas para impartir aroma y color en gran cantidad de preparaciones alimenticias y formulaciones de condimentos.

El objetivo del proyecto fue obtener oleorresinas de comino y pimienta negra como ingredientes propios que se puedan proveer en el territorio nacional colombiano, facilitando de este modo que las empresas minimicen tiempos de entrega, mantengan costos finales de producción, reduzcan y/o eliminen tiempos de nacionalización y se

garanticen las menores fluctuaciones posibles en la cantidad de componentes activos presentes en las oleorresinas.

El proyecto se planteó para que los resultados tuvieran aplicación industrial, buscando factibilidad tecnológica y económica al hacer comparaciones entre prototipos obtenidos a diferentes condiciones de laboratorio, al efectuar paralelos sensoriales de las oleorresinas obtenidas con referentes competitivos (productos posicionados en el mercado), al determinar la dosis de reemplazo de cada oleorresina que se podrá aplicar en formulaciones de condimentos y al mejorar las actividades productivas con la obtención de materias primas de fácil dispersión. Lo anterior, brindará una alternativa para el reemplazo de importaciones y para la creación de un portafolio de productos propios.

Justificación

Tecnas S.A. importa aproximadamente 12576 Kg de oleorresinas de cebolla, comino, pimienta negra, orégano, ají picante, jengibre, pimienta dulce, alcaravea, laurel, ajo, apio, páprika y nuez moscada al año. De esta cantidad, 4400 Kg corresponde a oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L.) y 1275 Kg a oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L.) con costos estimados para estos dos productos de alrededor de \$1.222.230.000 (COP). Las anteriores cifras mostraron un mercado potencial susceptible de ser explorado con el fin de buscar alternativas para la obtención de las oleorresinas que más se emplean para la elaboración de condimentos. Las tecnologías para fabricar este tipo de ingredientes oleosos fueron revisadas, encontrándose que hay varias técnicas ampliamente utilizadas, pero a las cuales las acompañan unas limitantes relacionadas con el tema regulatorio en la industria de alimentos, en particular el uso de solventes orgánicos.

En las revisiones bibliográficas realizadas, se encontraron reportes de estudios para la obtención de aceites esenciales y oleorresinas libres de residuales orgánicos utilizando la extracción por fluidos supercríticos (FSC). Por esta razón, se indagó alrededor de esta tecnología con el fin de buscar una alternativa para promover el uso de procesos amigables con el medio ambiente, productos libres de solventes y con características sensoriales agradables en término de olor y sabor. Por otro lado, en el sector empresarial, debido a la poca masificación de esta tecnología, se tiene un sesgo

con respecto los costos de esta técnica de extracción, siendo el momento oportuno para mostrar con productos de uso comercial, su factibilidad técnica y económica.

De acuerdo con lo anterior, Tecnas S.A. ha visto una oportunidad para extenderse en el territorio nacional a través de la producción, comercialización y distribución de materias primas que usualmente compra en el exterior. Además, en vista de que el precio de los productos importados depende de la fluctuación de las divisas, de los costos de transporte, fletes y nacionalización, es cada vez más complicado el proceso para consecución de estas oleorresinas. En este caso, Tecnas S.A. como empresa capaz de generar productos equivalentes a los posicionados en el mercado tiene proyectado para el corto plazo la creación de un portafolio de ingredientes propios que sean de alta calidad lote a lote, tengan características sensoriales adecuadas, que ayuden a promover la salud, que se puedan entregar a los clientes en menor tiempo y que permitan la resolución de problemas tecnológicos en términos de operatividad y seguridad en el trabajo (salud ocupacional).

Como aporte social, en esta investigación se empleó la pimienta negra sembrada en el Putumayo con el fin de apoyar al programa del Ministerio de Agricultura *“Pimienta para la paz”* como mecanismo de erradicación de cultivos ilícitos, buscando con ello que un mayor número de familias, campesinos y organizaciones indígenas tuvieran un empleo digno y una mejor calidad de vida.

Objetivos

Objetivo General

Obtener oleorresinas con capacidad antioxidante a partir de comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.) mediante la tecnología de fluidos supercríticos.

Objetivos Específicos

Determinar las condiciones de extracción de oleorresinas de comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.) con capacidad antioxidante por medio de la tecnología de fluidos supercríticos.

Determinar la capacidad antioxidante y el contenido de metabolitos secundarios de las oleorresinas de comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.) obtenidas a través de la tecnología de fluidos supercríticos.

Establecer las dosis óptimas de las oleorresinas con capacidad antioxidante obtenidas de comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.) destinadas para matrices alimenticias.

Marco teórico

Esencias

Las especias se definen como partes comestibles de las plantas que se añaden tradicionalmente a los productos alimenticios para proporcionar aromas naturales y propiedades aromáticas (European Spice Association, 2014). A través de la historia, han sido conocidas tanto sus bondades curativas como la mejora de las características sensoriales de los productos, siendo destacadas como “sazonadores naturales”.

Las principales funciones de las especias se encaminan a proporcionar sabor, aroma, color y textura. Proporcionan seis percepciones básicas del gusto: dulce, salado, picante, amargo, ácido y caliente. Sin embargo, se incluyen otros descriptores como pungente, umami, refrescante, floral, terroso, leñoso o verde.

Por otra parte, los componentes responsables de color pueden ser solubles en aceite o en agua. Algunos componentes típicos de color en las especias son crocetina en azafrán, carotenoides en pimentón, capsantina en pimiento chile, bixina en el achiote, o curcumina en la cúrcuma. La coloración general dada por una especia es a veces un efecto combinado de dos o más de sus componentes colorantes (Raghavan, 2007, 31).

Dentro de las funciones secundarias de las especias se encuentran: estimular el apetito, mejorar la digestión, aliviar el estrés, aumentar la energía, conservar los

alimentos procesados, ayudar a la nutrición cuando se utilizan en lugar de sal, grasa o azúcar para mejorar el sabor, entre otros (Raghavan, 2007, 39).

En la tabla 1 se muestran algunas de las funciones primarias y secundarias de algunas especias de amplio uso en la industria alimentaria.

Tabla 1.

Funciones primarias y secundarias de especias de amplio uso alimentario

Característica	Especia
Sabor	Albahaca, pimienta negra, cardamomo, jalapeño, anís, hierba de limón, alazán, chipotle, ají habanero
Aroma	Jengibre, clavo, hoja de kari, menta, nuez moscada, romero, cardamomo, estragón, canela, albahaca dulce
Textura/Consistencia	Semillas de mostaza, cebolla, sastrás, semillas de sésamo, chalote, grano de pimienta, semillas de amapola
Color	Achiote, pimentón, páprika, perejil, cúrcuma, azafrán, albahaca, cilantro, menta
Antimicrobiano	Canela, clavo, comino, orégano, romero, tomillo, jengibre, fenogreco, chile, salvia
Antioxidante	Cúrcuma, romero, salvia, clavo, orégano
Beneficio para la salud	Chile, canela, fenogreco, jengibre, ajo, cúrcuma, alcaravea, clavo, salvia

Fuente: Raghavan, S. (2007) Handbook of spices, seasonings, and flavorings.

Los componentes activos presentes en las especias y que resultan interesantes para estudio son: *los aceites esenciales* o fracción volátil a los cuáles se les atribuye la esencia y aromas de la especia, y *las oleorresinas* o fracción no volátil que imparten el sabor y sensaciones picantes de las mismas.

Los aceites esenciales desempeñan un papel importante en la producción de saborizantes, los cuales son empleados en la industria alimentaria para dar perfiles característicos y mejorar o aumentar el atractivo de los productos. Se clasifican por grupos funcionales desde alcoholes, aldehídos, aminas, ésteres, éteres, cetonas, terpenos hasta tioles y otros compuestos diversos. En las especias, los aceites esenciales contienen los anteriores grupos funcionales con el fin de proporcionar sabor a los productos que los contengan (Zachariah, 1995, 152; Menon, 2000, 185).

Las especias poseen además una gran cantidad de componentes bioactivos responsables de los atributos medicinales, en especial impidiendo la formación y propagación de los radicales libres, por lo que son conocidos como *antioxidantes* (Shahidi et al., 2009, 67). Debido a la presencia de estos componentes, tanto la preservación de alimentos como la potenciación de características destinadas para fines saludables y mejora de la estabilidad de matrices alimenticias ha sido posible.

Las propiedades antioxidantes de las especias son de particular interés por el impacto que tienen sobre la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad en el desarrollo de la arterosclerosis (Ray, Etherton, Teeter, Chen, Heuvel y West, 2011, 1452). Además, una amplia gama de compuestos bioactivos presentes han sido estudiados por sus propiedades anticancerígenas en animales.

El reto consiste en integrar este conocimiento para determinar si estos efectos pueden observarse en humanos. La investigación sobre las relaciones de actividad estructural en los componentes de las especias se ha convertido en un campo emocionante ya que, estos compuestos juegan un papel importante en el campo culinario, industrial y farmacológico (Parthasarathy et al., 2008, 9).

Se ha informado que muchos compuestos fenólicos presentes en las especias poseen una potente actividad antioxidante, actividades anticancerígenas/antimutagénicas, antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias (Veeriah et al., 2006; Baidez at al., 2007; Han et al., 2007). Los estudios epidemiológicos han asociado estos polifenoles con un riesgo reducido de enfermedades cardiovasculares, y esto es atribuible, al menos en parte, a su efecto directo sobre los vasos sanguíneos, y en particular sobre las células endoteliales. También se ha descubierto que activan las células endoteliales para aumentar la formación de potentes factores vasoprotectores, incluyendo el óxido nítrico (NO) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio.

En general, existe un creciente interés en los aspectos teóricos y prácticos de los mecanismos biosintéticos de los principios activos en las especias, así como en la relación entre la actividad biológica y la estructura química de estos metabolitos secundarios.

Oleorresinas de especias

Las especias imparten aroma, color y sabor a las preparaciones alimenticias y a veces enmascaran olores indeseables. Los aceites volátiles dan el aroma, y las oleorresinas imparten el sabor. Los compuestos aromáticos volátiles que imparten aroma desempeñan un papel importante en la producción de sabores, los cuales son usados en la industria alimentaria para dar sabor, mejorar y aumentar el atractivo de los productos (Charles, 2013, 203).

Las oleorresinas son formas concentradas de especias donde se alcanzan sabores y aromas más potentes. De acuerdo con la Comunidad Económica Europea (2006) las oleorresinas son “extractos de especias de los que se ha evaporado el disolvente de extracción, dejando una mezcla del aceite volátil y el material resinoso de la especia”.

Normalmente, se producen triturando las especias, extrayendo con un disolvente y después eliminando las trazas del mismo. Las oleorresinas tienen el sabor, aroma y pungencia completos de las especias frescas o secas porque contienen los componentes volátiles y los no volátiles de alto punto de ebullición, incluyendo resinas y gomas que son propias de las especias. Los componentes no volátiles causan por ejemplo el calor y la pungencia de la pimienta negra, la mostaza, el jengibre y el chile. Estos componentes pueden ser amidas de ácido, tales como capsaicina en pimiento rojo o piperina en pimienta negra, isotiocianatos en mostaza, carbonilos tales como gingerol en jengibre y tioéteres tales como sulfuros de dialilo en ajo o cebolla.

Las ventajas del empleo de las oleorresinas frente a las especias puras son las siguientes (Raghavan, 2006, 31):

Uniformidad del sabor. La calidad del sabor, fuerza y color de las especias y las hierbas tienden a variar año tras año. El uso de las oleorresinas minimiza tales variaciones.

Estabilidad. Las hierbas y las especias tienden a perder sus aceites volátiles a través de la polimerización, la oxidación y la evaporación. Con las oleorresinas el alto contenido de componentes no volátiles, incluyendo los antioxidantes, retardan la pérdida del aroma.

Almacenamiento. El valor de sabor equivalente de una oleorresina frente a una especia seca es baja. Así, una cantidad mucho más pequeña de oleorresina es necesaria para reemplazar una cantidad equivalente de la especia deshidratada: pequeñas cantidades disminuyen el espacio requerido para almacenamiento.

Aspectos microbiológicos. A través de técnicas de esterilización se pueden elaborar hierbas y especias libre de bacterias, pero no se pueden eliminar completamente otros microorganismos. Las oleorresinas debido a la naturaleza de su producción, son libres de hongos y levaduras, y además, no soportan crecimiento microbiano.

Economía. Las especias y las hierbas, no importa que tan finamente molidas se encuentren, siempre pierden algunos de los componentes de sabor que están atrapados dentro de las células. Por ende, tales sabores no están disponibles debido a esa pérdida. Las oleorresinas dan un gran valor de sabor por unidad de especia

comparadas con las especias deshidratadas, debido a que la concentración de los componentes volátiles responsables del sabor se hace de manera selectiva.

De acuerdo con lo anterior, las oleorresinas muestran mayor estabilidad en aquellas aplicaciones que requieren altas temperaturas, tiempos largos de almacenamiento, alto contenido de volátiles y características de sabor más potenciadas que permiten dosificar menores cantidades en comparación con las especias naturales.

Las principales oleorresinas comercializadas en el mundo son de pimienta negra, cardamomo, chile, pimienta, pimentón, jengibre, cúrcuma, pimienta blanca, cilantro, comino, apio, hinojo, alholva, semilla de mostaza, ajo, clavo, nuez moscada, canela, cassia, tamarindo, galanga, romero y oleorresinas de curry en polvo (Guenther, 1950, 396). Las oleorresinas se presentan comercialmente como aceites viscosos y pastas gruesas, más difíciles de manejar que los aceites esenciales. Usualmente, las oleorresinas se mezclan con un diluyente para una mejor manipulación o se les añade un emulsionante para que sea soluble en agua. Tienen un amplio rango de aplicaciones en la industria alimenticia (procesamiento de carnes, pescado, vegetales, sopas y aderezos, quesos y productos lácteos, horneados y bebidas), farmacéutica y productos no alimenticios (cosméticos, productos de higiene y perfumes).

Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos bioactivos que estabilizan los radicales libres inestables, los cuales provocan reacciones en cadena que pueden dañar las células,

causando envejecimiento celular y enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y neurovasculares, entre otras (Masisi, Beta y Moghadasian, 2016, 154). Desde el punto de vista nutricional, el consumo de alimentos ricos en antioxidantes se considera actualmente una de las formas más eficaces de reducir el riesgo de las enfermedades crónicas mencionadas.

Existen dos categorías principales categorías de antioxidantes según su mecanismo de acción: antioxidantes primarios y secundarios o antioxidantes preventivos. Los antioxidantes primarios interrumpen la reacción oxidativa en cadena de los radicales libres mediante la donación de electrones o átomos de hidrógeno desde grupos hidroxilo fenólico y, por lo tanto, estabilizan los radicales libres lipídicos. Como resultado, inhiben o retrasan la fase de iniciación e interrumpen o perturba la etapa de propagación de la autooxidación. Los antioxidantes secundarios desactivan el oxígeno singlete, iones metálicos quelados (como hierro y cobre), absorben la radiación ultravioleta, eliminan el oxígeno y ayudan a regenerar antioxidantes primarios. Para una mayor efectividad, antioxidantes primarios se utilizan a menudo en combinación con antioxidantes secundarios (Senanayaake, 2013, 1532).

La oxidación de lípidos y el desarrollo de la rancidez es un reto importante para los fabricantes de alimentos, debido a la reducción de la vida útil y la alteración de la calidad y el valor nutricional de sus productos. La autooxidación, es el proceso más común, que conduce al deterioro oxidativo de los alimentos grasos. Es una reacción en cadena de los radicales libres que procede a través de tres etapas distintas: iniciación, propagación y terminación. La generación de radicales libres primarios se ve facilitada

por la presencia de iniciadores de la oxidación, tales como: la luz, el calor, la radiación ionizante, metales de transición, metaloproteínas, oxidantes, diversas sustancias propensas a la homólisis y enzimas.

Los hidroperóxidos de lípidos han sido identificados como productos primarios de auto-oxidación. La descomposición de hidroperóxidos produce aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos y ácidos, que se conocen como productos de oxidación secundarios de los lípidos. En muchos casos, estos compuestos son responsables de malos sabores y olores desagradables en los alimentos.

Investigaciones recientes se han enfocado hacia la identificación de nuevos antioxidantes a partir de fuentes naturales. Debido a su alto contenido en compuestos fenólicos, las frutas, especias y otros materiales vegetales son una buena fuente de antioxidantes naturales y ofrecen una alternativa a la actualmente utilizada antioxidantes convencionales (Nuñez de Gonzalez et al., 2008, 997). Muchos antioxidantes naturales tales como el romero y los extractos de especias han demostrado ser más activos que los antioxidantes sintéticos y la aplicación en alimentos de estos compuestos deben ser explorados.

El uso de antioxidantes en productos alimenticios es controlado por las leyes reguladoras de cada país o por las normas internacionales. Aunque hay muchos compuestos que se han propuesto por poseer propiedades antioxidantes para inhibir el deterioro oxidativo, sólo unos pocos se pueden utilizar en productos alimenticios. En los Estados Unidos el uso de antioxidantes es objeto de regulación en la Ley Federal de

Alimentos, Medicamentos y Cosméticos y otras leyes estatales (Mikova, 2001, 268; Shahidi y Zhong, 2005, 492).

En la Unión Europea, la regulación de los antioxidantes se estipula por el Parlamento Europeo y la Directiva 95/2/CE del Consejo del 20 de febrero de 1995, relativa a aditivos alimentarios distintos de colorantes o edulcorantes. Otra organización que regula el uso de antioxidantes es el Codex Alimentarius, que es un conjunto de normas aceptadas internacionalmente. El Codex Alimentarius sólo permite el uso de los antioxidantes que han sido evaluados por el Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y éstas sólo pueden utilizarse en los alimentos normalizados por el Codex (Mikova, 2001, 270).

Comino (*Cuminum cyminum* L.)

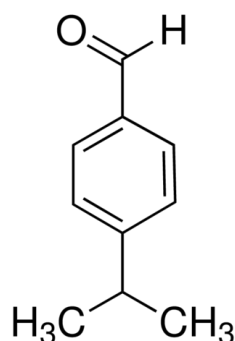
El comino es una especia de gran antigüedad que ha sido usado desde tiempos ancestrales. El término *Cuminum* que da origen al nombre de este género, es derivado del griego *Kuminum* y es probable que haya sido derivado de babilón *ka-mu-na*. Los valles del Tigris y el Eufrates usaron esta especia como saborizante y en el Egipto faraónico fue usado como una medicina (Weiss, 2000, 261). Se cultiva hoy en día alrededor del mundo, pero es nativo del norte de África y fue llevado a Asia central y occidental. La mayoría de los cultivos se encuentran en países como Marruecos, Turquía, Grecia, Egipto, Irán, la parte sur de la provincia de Mashad, Irán. Además, es

ampliamente cultivado en la India, el Himalaya, Punjab, Baluchistán y Cachemira. India exporta comino en semilla y en polvo a Bangladesh, Brasil, Japón, Malasia, Nepal, Singapur, Emiratos Árabes, el Reino Unido, Estados Unidos y muchos otros países (Peter, 2000, 83).

La semilla de comino tiene un sabor amargo distintivo y un aroma fuerte y cálido debido a su abundante contenido de aceite esencial. El olor se describe como penetrante, irritante, grasa, parecido al curry, pesado, picante, cálido y persistente, incluso después de secarse (Farrell, 1985, 100). El sabor característico es probablemente debido al dihidrocuminaldehído y los monoterpenos (Weiss, 2002, 265).

El comino tiene 2,5% a 4,5% de aceite esencial (dependiendo de la edad y las variaciones regionales), el color varía desde pálido a incoloro, contiene principalmente aldehídos monoterpénicos, aldehído cumínico (cuminaldehído) (33%), β -pineno (13%), terpineno (29,5%), *p*-cimeno (8,5%), *p*-menta-1,3-dien-7-al (5,6%), alcohol cumínico (2,8%) y β -farneseno (1,1%). Del aceite esencial, el 40-65% es cuminaldehído (4-isopropilbenzaldehído), constituyente principal y compuesto aromático importante, a quien se le atribuye el descriptor sensorial amargo reportado en comino (Hirasa y Takemasa, 1998, 70). En la figura 1 se presenta la estructura química del cuminaldehído, compuesto que en la oleoresina de comino es el que proporciona el perfil aromático característico.

Figura 1. Estructura química del cuminaldehído.



Fuente. Software ChemSketch Versión 2017

El cuminaldehído ($C_{10}H_{12}O$) tiene una masa molar de 148,21 g/mol, una densidad de $0,978 \text{ g/cm}^3$, un punto de ebullición de $235,5^\circ\text{C}$ y es insoluble en agua. La tecnología de fluidos supercríticos se ha utilizado para su extracción, ya que, el CO_2 al comportarse como un líquido facilita su disolución, a la vez que, su comportamiento como gas permite la fácil separación de la matriz que lo contiene. Por otros métodos extractivos es posible que se afecte su naturaleza y rendimiento.

Además, el comino contiene calcio, vitamina A, potasio, sodio, hierro, magnesio y fósforo. La composición nutricional del comino se puede apreciar en la tabla 2.

Tabla 2.

Composición nutricional del comino (Cuminum cyminum L.)

Composición	Cantidad
Agua (g)	0,16
Energía (kcal)	7,50
Proteína (g)	0,36
Grasa (g)	0,44
Carbohidratos (g)	0,88
Cenizas (g)	0,16
Calcio (mg)	18,62
Fósforo (mg)	9,98
Sodio (mg)	3,36
Potasio (mg)	35,76
Hierro (mg)	1,32
Tiamina (mg)	0,02
Vitamina E (UI)	0,04
Niacina (mg)	0,10
Vitamina A (RE)	2,54

Fuente: ESHA Research, Salem, Oregon.

La oleorresina de comino es de color pardusco a verde amarillento, tiende a oscurecer cuando se está envejeciendo y 100 g de comino contiene 60 mL de aceite volátil. Un kilogramo de la oleorresina es equivalente a 20 kg de comino recién molido en aroma y características de sabor (Farrell, 1985, 98).

Los componentes principales son: cuminaldehído, alcohol cumínico, P-Mentha-1,3-dien-7-al, siendo los niveles mínimos perceptibles de 0,2 ppm.

Los aceites del comino se utilizan en medicina como estimulante, antiespasmódico y carminativo. Se utiliza principalmente como un condimento en curry en polvo, sopas, guisos, embutidos, quesos, encurtidos, carnes y chutneys (Farrell,

1985, 99). El comino se usa principalmente donde se preparan comidas picantes, principalmente en la cocina india, oriental, del medio oriente, mexicana, portuguesa y española.

Sigh et al. (1998) investigaron el aceite esencial de comino almacenado a 70°C y encontraron que poseía excelentes efectos antioxidantes, mejores que los del antioxidante sintético, hidroxitolueno butilado (BHT). En un estudio de Chipault et al. (1952) para probar el efecto estabilizador de 36 especias diferentes en la manteca de cerdo por el método del oxígeno activo a 98,6°C, se encontró que el índice antioxidante del comino molido era 1,3 mientras que el de la fracción soluble en éter de petróleo era 1,1 y el de la fracción soluble en alcohol 1,2.

El estudio de la propiedad antioxidante de las especias en la emulsión de aceite en agua por Chipault et al. (1955) reveló que el comino podría aumentar la estabilidad media de estas emulsiones a 33,5 h, frente a 15,5 h para el control, siendo el índice antioxidante de 2,6 (relación de estabilidad media de la muestra a la estabilidad media del control).

En cuanto a la extracción, Naik et al. (1989) informaron que la extracción líquida de CO₂ fue más rápida que la destilación con vapor para la extracción cuantitativa de oleorresina de comino sin pérdida de componentes activos del sabor con condiciones de 58 bar y 20°C.

Pimienta negra (*Piper nigrum* L.)

La pimienta negra (*Piper nigrum* L.) pertenece a la familia *Piperaceae*. Su fruta se seca y se utiliza generalmente como especia y condimento. La misma fruta también se utiliza para producir pimienta blanca y pimienta verde. Es nativa del sur de la India, donde se cultiva extensamente, y también en algunas otras regiones tropicales. También es conocida como "oro negro" y el "rey de las especias", es la especia más importante y consumida del mundo. Comparada con muchas otras especias, la pimienta negra cuando es correctamente secada tiene un contenido aproximado de humedad de 8 a 10% que puede almacenarse en recipientes herméticos durante muchos años sin perder su sabor y aroma (Ravindran, 2000, 14).

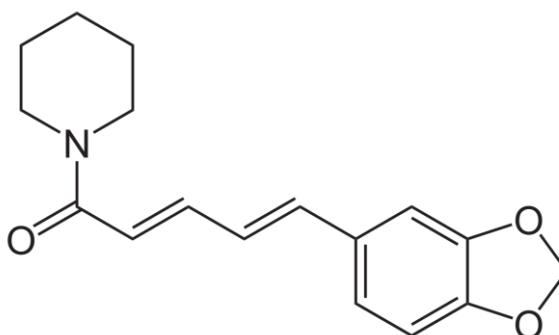
Hay dos componentes principales de la pimienta negra y blanca: el aceite volátil y los compuestos picantes. El nivel de aceite volátil en la pimienta negra es generalmente más alto que en la pimienta blanca. La cáscara de la pimienta contiene fibra y un poco de aceite esencial, además contiene aproximadamente 2,0-2,6% de aceite volátil y 6-13% de oleorresina. La pungencia de la pimienta negra se atribuye inicialmente a la presencia de solo piperina (Borges y Pino, 1993, 127). Sin embargo, a través de diversas investigaciones se llegó al descubrimiento que otros compuestos distintos de piperina como los aceites volátiles, la piperidina y la piperanina entre otros no identificados también contribuyen a su pungencia (Traxler, 1971, 1135). En la figura 2, se representa la estructura química de la piperina, compuesto que será referente en

la selección de la oleorresina que mayor contenido presente, como indicador de calidad sensorial debido a su grado de pungencia.

La piperina ($C_{17}H_{19}NO_3$) tiene una masa molar de 285,34 g/mol, una densidad de 1,193 g/cm³, un punto de fusión de 130°C y una solubilidad en agua de 40 mg/L.

En algunos estudios se ha observado una amplia variación en la composición química del aceite de pimienta; esto se puede atribuir a los efectos del cultivo, la variación agroclimática, la madurez de la materia prima, las diferencias en el método de obtención del aceite, la no resolución de los constituyentes en los primeros análisis cromatográficos utilizando columnas empaquetadas, entre otros (Jagella y Grosch, 1999).

Figura 2. Estructura química de la piperina



Fuente. Software ChemSketch Versión 2017

Chun et al. (2002) encontraron que el 88% del polisacárido de las bayas de pimienta negra era glucosa, seguido de galactosa, arabinosa, ácido galacturónico y ramnosa en proporciones más pequeñas. Además, el aroma de la pimienta negra se da

principalmente por el aceite volátil, que varía entre 2 y 5 % en las bayas (Mansurah et al., 2016, 281). La composición nutricional de la pimienta se puede apreciar en la tabla 3.

Tabla 3.

Composición nutricional de la Pimienta negra (Piper nigrum L.)

Composición	Requerimiento ASTA*
Agua (g)	8,0
Energía (kcal)	400
Proteína (g)	10,0
Grasa (g)	10,2
Carbohidratos (g)	66,5
Cenizas (g)	4,6
Calcio (g)	0,4
Fósforo (mg)	160
Sodio (mg)	10
Potasio (mg)	1200
Hierro (mg)	17
Tiamina	0,07
Riboflavina (mg)	0,210
Niacina (mg)	0,8
Vitamina A (RE)	19

Nota: *ASTA: American Spice Trade Association.

Fuente. Tainter y Grenis (1993).

Aparte de los principales atributos de calidad como la pungencia y el aroma, la apariencia con respecto al color (marrón / negro) es importante para el uso de la pimienta negra. Dado que se sabe que los fenoles contribuyen al dorado /

ennegrecimiento de los granos de pimienta terminados, la naturaleza y la distribución de los compuestos fenólicos son muy importantes.

Bandyopadhyay et al. (1990) indican que la conversión de pimienta verde en pimienta negra mediante el secado se encuentra acompañada por una disminución del 75% del contenido fenólico total y una pérdida completa de la fracción fenólica oxidable de la o-difenol oxidasa.

Dentro de los usos tradicionales se encuentran: ayudar en el alivio del dolor, el reumatismo, escalofríos, gripe, resfriados, cansancio y dolores musculares, frialdad física y emocional, fiebres, tónico nervioso y para aumentar la circulación sanguínea. Además, incrementa el flujo de la saliva, estimula el apetito, estimula el peristaltismo, tonifica los músculos del colon y es un tónico digestivo general (Pruthi, 1993, 91).

La oleorresina producida por la destilación del vapor de los granos de pimienta suele ser de un color oliva pálida, con un aroma caliente, picante, fresco. Tiene notas mezcladas entre rosa, romero, mejorana, incienso, oliva, sándalo y lavanda (Borges et al., 2003, 128).

En la extracción del aceite esencial y la oleorresina de pimienta negra con CO₂ supercrítico, se observa que la concentración de la fase fluida de los componentes solubles comienza a disminuir después de que se elimina una parte del soluto (disminución del período de la tasa de extracción). Este efecto puede explicarse por la combinación de una mayor resistencia a la transferencia de masa de fluido soluto y una disminución de la longitud "efectiva" del lecho fijo, debido al agotamiento del extracto en el sustrato sólido en la dirección del flujo.

Extracción por fluidos supercríticos

Las técnicas ecológicas de extracción y recuperación de compuestos bioactivos son muy atractivas en los últimos años. Entre estas tecnologías verdes, destaca la extracción asistida por ultrasonido, por líquido presurizado y extracción mediante fluidos supercríticos (Viganó, Zobot, y Martínez, 2017, 88; Oliveira, Angonese, Gomes, y Ferreira, 2016, 55).

La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) se basa en el uso de la energía de las ondas sonoras que provocan ciclos de expansión y compresión en un medio (vibración mecánica). Este fenómeno acelera la extracción de compuestos en tiempo reducido debido a la influencia sobre el transporte de masa, la relación solvente / muestra y la temperatura (Luque-García y Luque De Castro, 2003, 41). La extracción de líquido presurizado (PLE) consiste en el flujo continuo de disolvente a través de un lecho sólido fijo de partículas colocado dentro de la columna de extracción.

Las principales ventajas de PLE son mayores eficiencias de extracción que requieren menores cantidades de disolventes, menor tiempo de extracción y el uso de solventes clasificados como Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS) (Viganó, Brumer, Braga, Da Silva, Maróstica, Reyes y Martínez, 2016,382; Duba, Casazza, Mohamed, Perego, y Fiori, 2015, 29). La extracción de fluidos supercríticos (SFE) es un proceso verde que llama la atención sobre los métodos tradicionales porque protege el material vegetal contra la degradación térmica y la contaminación con disolventes en los extractos obtenidos (Brunner, 1994, 625).

La extracción por fluidos supercríticos (SFE) es un método de separación que está basado en el mismo principio básico que tienen los procesos de separación convencional de destilación y extracción en donde se explota el comportamiento de la fase de equilibrio entre diferentes estados de la materia a diferentes condiciones de operación.

La extracción supercrítica es esencialmente una extracción típica con solventes, con la diferencia básica de estar en el estado supercrítico (SC) bajo el cambio del estado anterior al proceso de extracción y cambios de estado luego de finalizado el proceso. Esta tecnología toma ventaja por la alta capacidad de disolución de los fluidos en estado supercrítico bajo condiciones específicas de temperatura y presión. El fluido supercrítico tiene las características tanto de un gas como de un líquido, siendo las ventajas de los solventes supercríticos las siguientes (Herrero, Mendiola, Cifuentes e Ibáñez, 2010, 2496):

El poder como solvente depende sólo de su densidad, la cual puede ajustarse fácilmente cambiando la presión o la temperatura,

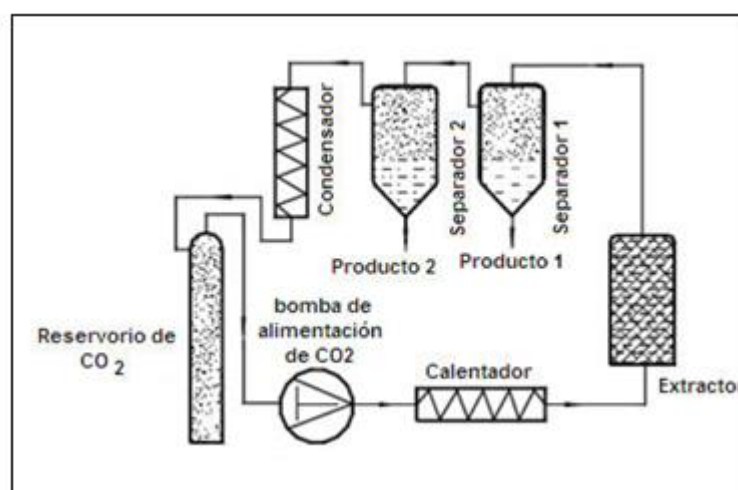
Tiene un coeficiente de difusión mayor, menor tensión superficial y viscosidad que un solvente líquido, lo cual favorece la transferencia de masa.

Un sistema de extracción supercrítica típico se muestra en la figura 3. La materia prima es ubicada en un contenedor equipado con válvulas de control de temperatura y presión para mantener las condiciones de extracción deseadas.

El contenedor es presurizado con el fluido (solvente de extracción) mediante el empleo de una bomba, luego el solvente y los materiales disueltos en él son

transportados a tanques separadores, en donde se baja la presión y/o se aumenta la temperatura para separar al solvente del extracto. El extracto es recuperado en el fondo de los tanques y mientras tanto el fluido es regenerado y reciclado.

Figura 3. Representación esquemática de un equipo de extracción de fluidos supercríticos.



Fuente. Pantoja et al. (2017)

El CO₂ se ha convertido en el solvente supercrítico por excelencia, debido a la reducción importante en sus precios y a las limitaciones que se tienen con otros solventes orgánicos. Además, el CO₂ no es inflamable, no es tóxico, no es costoso en comparación con otras tecnologías y representa una buena alternativa para extraer componentes específicos de tipo no polar y medianamente polar. Para extraer compuestos polares, algunos fluidos supercríticos como el freón-22, óxido de nitrógeno y el agua se han considerado (Hassina et al., 2016).

Al transcurrir de los años, la extracción por fluidos supercríticos ha sido posicionada como un método de separación convencional junto con la destilación y extracción líquida, como potencial en el procesamiento de componentes verdes (King y Bott, 1993,1).

En la tabla 4 se presentan algunas de las propiedades más comunes de los fluidos supercríticos, tales como temperatura y presión. El solvente más atractivo y comúnmente utilizado en equipos de laboratorio, piloto y escala industrial es el CO₂.

Tabla 4.

Propiedades de algunos fluidos en estado supercrítico

Fluido	Temperatura Crítica (T _c)(°C)	Presión crítica (P _c)(atm)
Dióxido de carbono	31,1	72,8
Etano	32,3	48,2
Etileno	9,3	49,7
Propano	96,7	41,9
Propileno	91,9	45,6
Ciclohexano	280,3	40,2
Óxido nitroso	36,4	71,5
Benceno	289	48,3
Tolueno	318,6	40,6
p-xileno	343,1	34,7
Clorotrifluorometano	28,9	38,7
Triclorofluorometano	198,3	43,5
Xenón	16,9	58
Amonio	132,5	111,3
Agua	374,2	217,6

Fuente. Adaptado de McHugh, M.A., Krukoni, V.J. 1986, Supercritical fluid extraction. Butterworths, USA.

El punto crítico del CO₂ sigue operaciones a temperaturas moderadas (típicamente 40-70°C) y presiones accesibles: la presión máxima de operación es usualmente 300 bares para la mayoría de las aplicaciones (McHugh y Krukoni, 1994, 19; Brunner, 1994, 19).

La aplicación del dióxido de carbono como fluido supercrítico (SC-CO₂) para la extracción y fraccionación de materiales lipofílicos ha sido revisado por Stahl et al. (1987).

“La tecnología de fluidos supercríticos es adecuada para remover oleorresinas presentes en el aceite esencial de romero a una presión de 300 bares y 35°C” (Tateo y Fellin, 1988, 125). Los residuos remanentes en las hojas después de la extracción es entonces reextraído con etilalcohol, filtrado, evaporado y secado para obtener el principio activo de tipo antioxidante.

La corporación Pfizer desde 1988 ha producido un producto comercial de romero desodorizado en el cual la fracción de oleorresina obtenida por fluidos supercríticos está sujeta a destilación molecular para mejorar el color y el aroma. El producto resultante contiene alrededor del 80% de triglicérido cáprico y caprílico (vehículo de la destilación) los cuáles tienen una solubilidad pobre y débil capacidad antioxidante.

Metodología

Especias empleadas para estudio

En este proyecto se trabajó con comino (*Cuminum cyminum* L) proveniente de la India y pimienta negra (*Piper nigrum* L) cultivada en el Putumayo. Las especificaciones del comino empleado fueron: color aparente amarillo verdoso, pérdidas por secado máximo del 14% y cenizas máximo del 12% mientras que las especificaciones para la pimienta negra fueron: color aparente verde claro, contenido de carbohidratos entre 60 a 67% y olor/sabor característicos a pimienta.

Caracterización de las especias deshidratadas de estudio

Esta se realizó en función de: distribución de tamaño de partícula (DTP), morfología mediante microscopía de barrido electrónico (SEM) y análisis sensoriales.

Análisis de tamaño de partícula de especias deshidratadas

Para su evaluación se empleó un analizador de tamaño de partícula mastersizer 2000 marca Malvern con intervalos de medida entre 0,2 micras a 2000 micras (*con*

sistema de detección de luz roja y azul, sistema de alineación óptica automático) cuyo principio de funcionamiento es el principio de dispersión de Mie. Para el análisis de las muestras (*evaluación en seco*), se seleccionó el valor óptimo de obscuración, de tal modo que, se garantizó la orientación óptima de los rayos difractores (*acordes a las características de concentración y tamaño de partícula de cada sistema*). Esta medida permitió identificar el tamaño de partícula adecuado que debía incorporarse en el equipo de fluidos supercríticos para obtener buenos rendimientos de extracción. Los resultados obtenidos dieron información sobre el porcentaje en volumen para cada tamaño de partícula expresados como $D_{[3, 2]}$ (momento de área superficial medio) y $D_{[4, 3]}$ (momento de volumen medio).

Análisis de estructura de especias de estudio mediante microscopía de barrido electrónico (SEM)

Se empleó un microscopio SEM marca JEOL 5910LV con magnificación de 300000X, resolución de 3 nm en alto vacío y energía dispersiva de rayos X (EDX) que detecta elementos con un peso atómico mayor al del berilio. Las muestras se depositaron en una cinta conductora de cobre dispuesta sobre un porta-muestras, luego se recubrió con oro en un evaporador al vacío Dentom Vacuum, 30 mA, 5 kV, 100 mTorr. Las micrografías fueron visualizadas a 15 kV por medio del software integrado al equipo. Las estructuras observadas posibilitaron establecer relaciones con la distribución de tamaño de partícula, de manera que se pudieran seleccionar las muestras de comino y pimienta negra para extracción por fluidos supercríticos.

Análisis sensoriales de comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.).

Se elaboraron diluciones al 1% de los últimos lotes de pimienta negra y comino con el fin de evaluar los atributos sensoriales. La identificación de los mismos se efectuó con 11 jueces entrenados que calificaron en una escala de 1 a 5 los sabores característicos más sobresalientes para cada especia. Para el comino fueron seleccionados los descriptores aromático, especiado, astringente, herbal, maderoso, amargo, verde y dulce, mientras que para la pimienta negra los atributos de mayor incidencia fueron dulce, picante, pungente, ardiente y especiado.

Cada juez sensorial evaluó dos muestras por lote para cada especia en momentos diferentes del día, con el fin de minimizar posibles errores debidos a factores externos.

Extracción de oleorresinas del comino (*Cuminum cyminum* L.) y la pimienta negra (*Piper nigrum* L.) mediante fluidos supercríticos

Los factores que influyeron en el proceso extractivo fueron: la presión, el tiempo y la temperatura. El flujo de CO₂ fue un factor experimental que se bloqueó para fines de este trabajo (variable constante), y como variables respuesta se tomaron: contenido de piperina (*para pimienta*), contenido de cuminaldehído (*para comino*), rendimiento de extracción (%), capacidad antioxidante en términos de ORAC y ABTS.

Se empleó un equipo marca Spe-ed SFE Basic Applied Separations para establecer condiciones adecuadas de extracción basadas en un diseño experimental de Box Benhken en tres bloques con 3 puntos centrales y un número de 30 corridas por especie, generando de este modo modelos de superficie de respuesta, determinación de los coeficientes de regresión y la significancia estadística. Cantidades de 30 g de comino y 50 g de pimienta fueron adicionados por separado al cilindro portamuestras en cada corrida experimental, diferencia debida a la densidad aparente de cada material. Luego se programaron en el equipo las condiciones de presión y temperatura establecidas en el diseño experimental. Ver apéndices A y B con la plantilla de los diseños experimentales generados para comino y pimienta negra en el software estadístico Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.03.

Las condiciones óptimas se seleccionaron en función del mayor contenido de piperina y cuminaldehído y del mayor porcentaje de rendimiento de extracción acorde a la ecuación 2, buscando oleorresinas con futuro comercial y similitud con las actualmente presentes en el mercado.

Caracterización de la capacidad antioxidante de las oleorresinas obtenidas.

Medición de la capacidad antioxidante en términos de ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)

El procedimiento experimental fue basado en reportes previos de Ou y colaboradores (Ou, Huang y Hamppsch, 2002, 2), en el cual se empleó Trolox® como

estándar a condiciones controladas de temperatura a 37°C y pH 7,4. Las lecturas se realizaron a una λ de excitación 493 nm y slit de excitación 10, λ de emisión 515 nm y slit de emisión 15, con atenuador del 1%. Para el desarrollo de la técnica se utilizaron soluciones de fluoresceína 1×10^{-2} M y AAPH 0,6 M en buffer fosfato (75 mM, pH 7,4). Una alícuota de 30 μ L de muestra se mezcló con 21 μ L de fluoresceína, 50 μ L de AAPH y 2,899 μ L de buffer fosfato. El efecto protector del antioxidante se calculó usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra, y se comparó con la curva patrón. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por litro de muestra (μ mol Trolox/ 100 g producto seco), de acuerdo a la ecuación 1.

$$ORAC = \frac{(AUC - AUC^0)}{(AUC_{Trolox} - AUC^0)} f[Trolox] \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra, AUC^0 área bajo la curva para el control, AUC_{Trolox} área bajo la curva para el Trolox, f es el factor de dilución del extracto (Prior, Wu, y Schaich, 2005, 4292). La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia LS55 Perkin Elmer®.

Medición de ABTS

Se disolvió ABTS en agua hasta una concentración de 7 mM. Se produjo el catión radical ABTS ($ABTS^{*+}$) haciendo reaccionar la solución madre ABTS con

persulfato de potasio 2,45 mM (concentración final). Se dejó reposar la mezcla en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 h antes de su uso.

La capacidad de las muestras de plasma para eliminar el radical ABTS se evaluó reduciendo la absorbancia después de 30 min a 732 nm en un espectrofotómetro de fluorescencia LS55 Perkin Elmer®. Los resultados se presentaron como valores de TEAC / L solución usando una curva estándar de Trolox (Van der Berg et al., 1999, 1245).

Determinación del contenido de piperina por GC-MS

La piperina se determinó por cromatografía de gases en un equipo Trace GC Ultra marca Thermo acoplado a detector de masas DFS High Resolution Magnetic Sector con velocidades de calentamiento de 20°C a 200°C en 30 s, rango de temperatura de 3 a 450°C, y resolución de la temperatura del set point de 0,1°C. El gas portador fue helio con un caudal de 1 ml/min, relación de separación de 1: 50, temperatura del inyector de 250°C, temperatura de la columna programada de 70 a 280°C y una velocidad de 3°C/min. Los componentes principales de las oleorresinas de pimienta negra se identificaron comparando los espectros de masas y el tiempo de retención con la librería NIST 11 Mass Spectral Library disponible en el equipo. Se analizaron por duplicado las 30 muestras establecidas en el diseño experimental de Box behnken.

Determinación de cuminaldehído por GC-MS

El cuminaldehído se identificó por cromatografía de gases en un equipo Trace GC Ultra marca Thermo acoplado a detector de masas DFS High Resolution Magnetic Sector con velocidades de calentamiento de 20°C a 200°C en 30 s, rango de temperatura de 3 a 450°C, y resolución de la temperatura del set point de 0,1°C. Las condiciones de operación usadas fueron: una columna de silica fundida tipo PTE- 5 de 30 m de longitud y diámetro interno de 0,25 mm. La temperatura del inyector fue de 250°C, la temperatura de la columna fue desde 70°C hasta 220°C a una velocidad de calentamiento de 2°C/min. El gas empleado fue helio con un flujo de 0,9 mL/min y el detector empleado fue de masas. Los componentes principales de las oleorresinas de comino se identificaron comparando los espectros de masas y el tiempo de retención con la librería NIST 11 Mass Spectral Library disponible en el equipo. Se analizaron por duplicado las 30 muestras establecidas en el diseño experimental de Box behnken.

Determinación del rendimiento de extracción

Para cada corrida experimental se pesó la materia prima inicial en polvo y la oleorresina obtenida. De acuerdo a las cantidades obtenidas se realizaron los cálculos basados en la ecuación 2.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso final Oleorresina}}{\text{Peso inicial materia prima}} * 100$$

Ecuación 2

Dosis de oleorresinas de comino y pimienta negra empleadas en dos condimentos cárnicos “preparado sabor hamburguesa de pollo” y “preparado sabor salchicha tipo bigger”

Se definieron dos condimentos de Tecnas S.A. para la aplicación de las oleorresinas obtenidas por fluidos supercríticos. El primero de ellos fue el preparado sabor hamburguesa de pollo donde se utilizó dentro de la formulación la oleorresina de comino y el segundo fue el preparado sabor salchicha tipo bigger donde se incorporó la oleorresina de pimienta. Simultáneamente, se prepararon las dos fórmulas con las oleorresinas comerciales normalmente utilizadas para tener un referente de comparación. La dosis de oleorresina de comino en el primer condimento fue de 0,015 g/kg y en el segundo condimento se aplicó una dosis de oleorresina de pimienta de 0,0055 g/kg. Las cantidades de oleorresinas se tomaron con el fin de evaluar relaciones de reemplazo de 1:1 (oleorresina comercial: oleorresina obtenida en esta investigación) con respecto a la formulación real de los productos. Para identificar si las dosis empleadas funcionaron adecuadamente se midieron durante 180 días: el comportamiento textural en función de la variable compactación y la aparición de sabores extraños/residuales. No se definió un diseño experimental para esta etapa; sin embargo, se dispusieron 10,5 kg de preparado sabor hamburguesa de pollo y 10,5 kg de preparado sabor salchicha empacados por 500 g a tres condiciones de temperatura (25°C, 35 °C y 45°C) en cámaras de aceleración para efectuar el seguimiento en el tiempo de los atributos de calidad anteriormente mencionados. El muestreo se llevó a cabo en los días 1, 30, 60, 90, 120, 150 y 180. Por cada día de medición se analizaron

4 paquetes correspondientes dos de ellos a las formulaciones con oleorresinas comerciales y los otros dos a las formulaciones con las oleorresinas procedentes de esta investigación. Los condimentos muestreados una vez analizados los atributos sensoriales y de textura fueron desechados.

Análisis de compactación textural de condimentos “preparado sabor hamburguesa de pollo” y “preparado sabor salchicha tipo bigger” con adición de oleorresinas de comino y pimienta negra comerciales y obtenidas por fluidos supercríticos

Se realizó el seguimiento de compactación textural de los condimentos durante los días 1, 30, 60, 90, 120, 150 y 180. Para cada medición no se realizaron repeticiones.

Para la medida de la compactación se empleó un texturómetro TA.XT Plus marca Stable microsystems con velocidad de 0,01 – 40 mm/s, 370 mm de apertura, 0,001 mm de distancia de resolución, celdas de carga de 5 kg, 10 kg y 30 kg, 650 mm de altura, 515 mm de largo y 280 mm de ancho.

Para la medición de compactación a través del método de compresión fue necesario utilizar el accesorio “analizador de flujo de polvos” con el fin de identificar la afectación de las matrices a las que se le adicionaron las oleorresinas por la humedad, el almacenamiento, el cizallamiento, distribución de tamaño de partícula y la interacción entre componentes de la formulación.

Para la evaluación, se tomaron entre 140 y 160 g de material particulado, se calibró la altura hasta una distancia de retorno de 30 mm, una velocidad a 10 mm/s y una fuerza de contacto de 5 g. El coeficiente de cohesión fue el área negativa bajo la curva y los índices de cohesión se obtuvieron del cociente entre el coeficiente de cohesión y el peso de la muestra. La interpretación de los resultados se dio con respecto a la tabla 5.

Tabla 5.

Índices de cohesión de material particulado

Índice de cohesión	Interpretación
>19	Fuerte/extremadamente cohesivo
19-16	Muy cohesivo
16-14	Cohesivo
14-11	Fácil flujo
<11	Libre flujo

Seguimiento sensorial de condimentos “preparado sabor hamburguesa de pollo” y “preparado sabor salchicha tipo bigger” con adición de oleorresinas de comino y pimienta negra comerciales y obtenidas por fluidos supercríticos

Se realizó el análisis sensorial de los condimentos para identificar presencia de sabores extraños/residuales, tomando muestras durante los días 1, 30, 60, 90, 120, 150 y 180. Para ello, 7 jueces sensoriales se encargaron de identificar sabores

extraños/residuales calificando la intensidad percibida en una escala de 1 a 7. Para poder estimar los perfiles extraños/residuales que cada juez determinó, se ajustó en el formato de evaluación un espacio para escribir los sabores encontrados. No se realizaron repeticiones de las muestras y no se siguió un diseño experimental.

Análisis de vida útil de las oleorresinas de comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.) obtenidas por fluidos supercríticos

Para esta fase del estudio no se estableció algún diseño experimental. Se realizó el estudio de vida útil de las oleorresinas obtenidas en esta investigación, tomando como referencia los patrones comerciales y como variable respuesta el "color". Las muestras de oleorresinas se mantuvieron en recipientes de vidrio ámbar a tres temperaturas (25°C, 35°C y 45°C) durante 95 días (*hasta presentarse el punto de falla*), y los días para tomar muestras fueron: 1, 8, 18, 25, 45, 58 y 95.

Para el almacenamiento a las diferentes temperaturas se emplearon dos cámaras climáticas marca BINDER KBF P720 con rango de humedad relativa entre 15 a 80% +/-5 y control de temperatura desde 10°C hasta 60°C +/-2°C (*humidificación por evaporación y deshumidificación por condensación, sensor de platino 100 bulbo seco*). Los valores de las mediciones para establecer la vida útil se examinaron por medio del análisis probabilístico de Weibull y se compararon con los datos de vida útil reportados en las fichas técnicas de las oleorresinas comerciales.

Mediciones de color

Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotocolorímetro de esfera integradora Datacolor 650, con un ángulo de medición de observador de 10° y un iluminante D65 adaptado al software de análisis de color Datacolor tools 2.0. Las lecturas realizadas arrojaron las coordenadas colorimétricas L (Luminosidad), a* (+/- rojo/verde), b* (+/- amarillo/azul), C* (Saturación), h° (tono) de la muestra. Sin embargo, el análisis final se hizo en función del parámetro de color DEcmc que fusiona todas las anteriores coordenadas colorimétricas.

Las mediciones colorimétricas de la oleoresina de comino se realizaron por transmitancia debido a su naturaleza translúcida; mientras que para la oleoresina de pimienta debido a su turbidez y presencia de sedimentos cristalinos se requirieron mediciones por reflectancia. Se prepararon diluciones desde 0,01% hasta 1% y la cantidad de muestra requerida para cada medición fue de 10 mL aproximadamente.

Obtenidas estas diluciones se llevaron al equipo y se analizaron bajo un iluminante D65 y un observador de 10° a través de un diafragma de 22 mm para la determinación del grado de transmisión. Las mediciones se realizaron por triplicado para dar confiabilidad a los resultados obtenidos.

Estudio de estabilidad oxidativa de oleorresinas de comino y pimienta negra obtenidas por fluidos supercríticos y oleorresinas comerciales empleadas en Tecnas S.A. por la técnica de Rancimat

Esta medición se realizó como valor agregado de la investigación con el fin de comparar el grado de degradación oxidativa que presentaron las oleorresinas obtenidas en esta investigación en comparación con las actualmente utilizadas en las formulaciones de Tecnas S.A. Esto proporcionó una herramienta importante en el momento de seleccionar materias primas susceptibles de ser reemplazadas. Para este fin, se empleó el equipo Rancimat 892 marca Metrohm con rango de temperatura de 50°C a 220°C, 8 portamuestras (2 bloques de 4), rango de flujo de gas de 1 a 25 L/h, medida de conductividad desde 0 a 400 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y dos bloques de calefacción calentados por separado. Una corriente de aire limpio y seco se burbujeó en las muestras de oleorresinas contenidas en tubos de reacción. Cada tubo se colocó en un canal del bloque de calentamiento eléctrico, que se fijó a temperaturas de 90°C, 110°C y 120°C. El aire efluente que contenía los ácidos orgánicos volátiles de la muestra de oleorresinas se recogió en un recipiente de medición (vaso de policarbonato) con 60 ml de agua desionizada. La conductividad del agua se registró continuamente y el índice de estabilidad oxidativa (OSI) se determinó automáticamente por el aparato. Ocho muestras de oleorresinas, cada una de 3 g se dispusieron simultáneamente en el equipo para el respectivo análisis. El total de muestras analizadas por oleorresina fue de: 12 para comino, 12 para pimienta negra y 24 para el patrón (oleorresinas

comerciales). El número de muestras fueron suficientes para poder abarcar las tres temperaturas de análisis.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de diseños experimentales fueron tratados mediante análisis de varianza (ANOVA) con el fin de identificar los efectos estimados, los coeficientes de regresión, las predicciones y las condiciones óptimas empleando el software estadístico Statgraphics centurión XVI versión 16.1.03.

Resultados y discusión

Caracterización del comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.) empleadas para el estudio.

Se evaluaron las características de tamaño de partícula (DTP), análisis de estructuras/morfologías y los aspectos sensoriales del comino y la pimienta negra destinados para extracción de oleorresinas por fluidos supercríticos.

Caracterización de tamaño de partícula (DTP) del comino (*Cuminum cyminum* L.) y la pimienta negra (*Piper nigrum* L.).

Se evaluaron las propiedades de las especias deshidratadas en estudio, con el fin de poder establecer los tamaños de partícula que posibilitaran los mayores rendimientos de extracción por la tecnología de fluidos supercríticos (FSC). Diferentes factores tales como el tamaño de partícula, la forma, el área superficial, la porosidad, la humedad, el nivel de solutos extraíbles y la naturaleza de la matriz afectan los resultados de la extracción (Camel, 1997 y McNally, 1996).

En este estudio, se evaluaron dos granulometrías de comino y una de pimienta negra con el fin de identificar cuáles muestras eran más homogéneas y presentaban mejor distribución de partículas dispuestas para procesos extractivos. Los resultados de DTP obtenidos para comino y pimienta se muestran en las figuras 4, 5 y 6.

En la figura 4 el valor del momento de área superficial medio $D_{[3,2]}$ fue de: $104,6 \mu\text{m}$ y del momento de volumen medio $D_{[4,3]}$ fue de: $189,5 \mu\text{m}$.

Figura 4. DTP del comino en polvo molido fino (*Cuminum cyminum* L.).

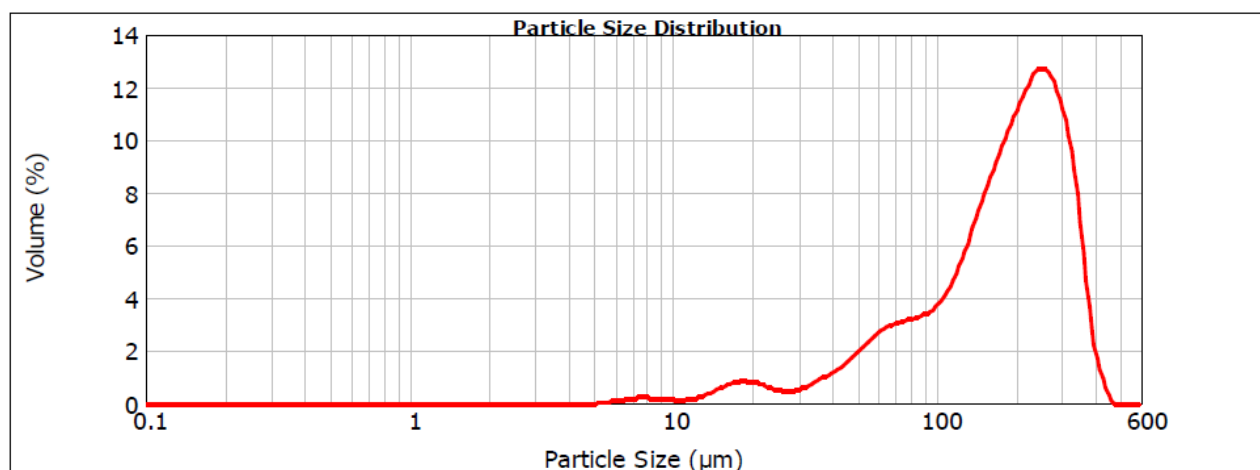
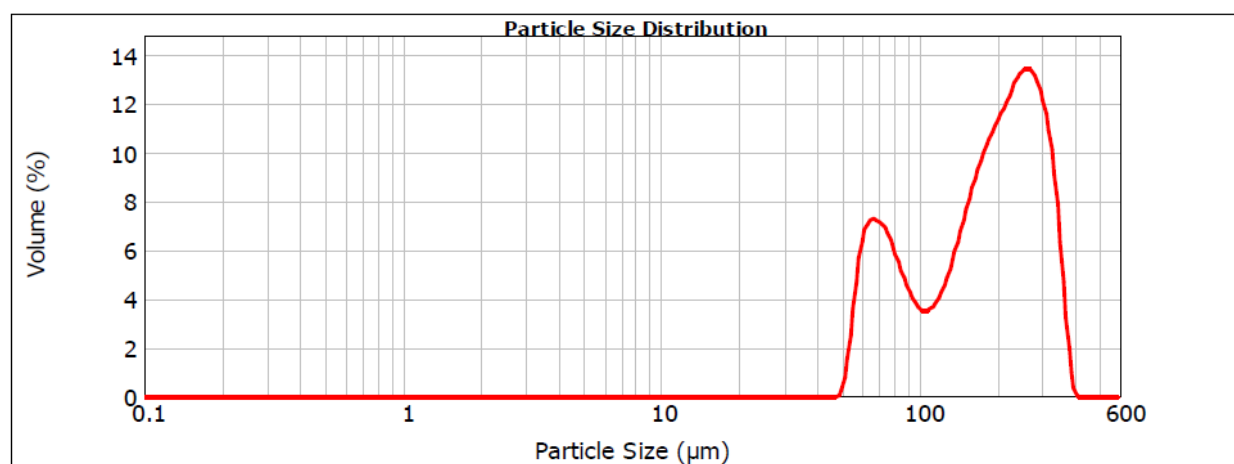


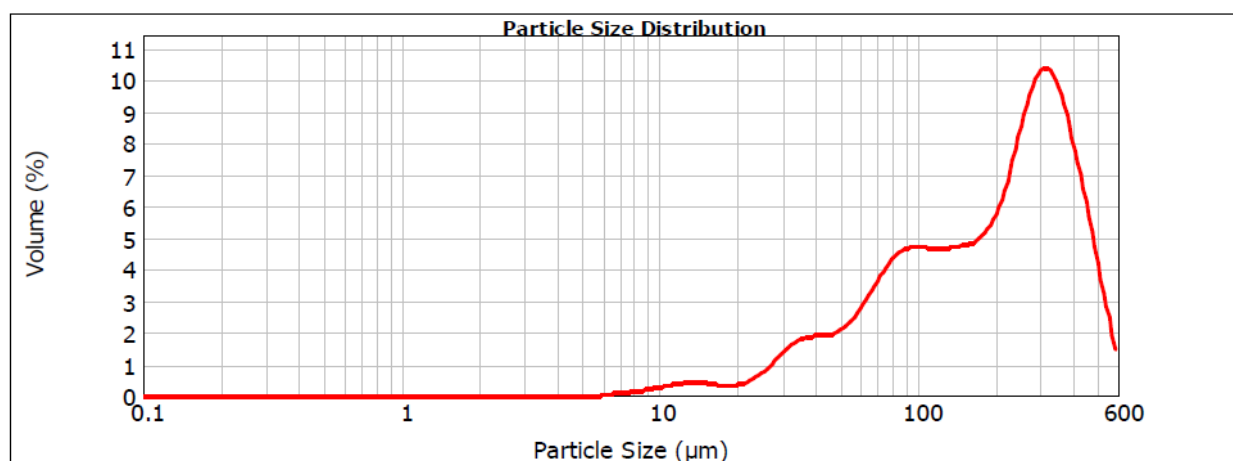
Figura 5. DTP del comino en polvo molido grueso (*Cuminum cyminum* L.).



En la figura 5 el valor del momento de área superficial medio D [3,2] fue de: 141,1 μm y del momento de volumen medio D [4,3] fue de: 188,9 μm

En la figura 6 el valor del momento de área superficial medio D [3,2] fue de: 105,8 μm y del momento de volumen medio D [4,3] fue de: 221,3 μm

Figura 6. DTP de la pimienta negra en polvo (*Piper nigrum* L.).



Los valores de los tamaños se dieron en función del volumen de distribución ponderado debido a que la contribución de cada partícula en la distribución se refirió al volumen de esa partícula. Esto resultó útil desde un punto de vista comercial porque la distribución representó la composición de la muestra en términos de su volumen/masa, y por lo tanto, su valor potencial.

Sowbhagya, Sathyendra y Krishnamurthy (2008) reportaron que el tamaño ideal del comino para poder obtener buenos rendimientos durante la extracción de aceites y oleorresinas debería ser de 500 μm . En este estudio, el hecho de emplear alguno de los dos cominos daría buenos resultados en cuanto a rendimientos de extracción. Sin embargo, se apreció que el comino molido fino tenía una distribución menos variable en cuanto a presencia de comportamientos bimodales, y por esta razón fue seleccionado.

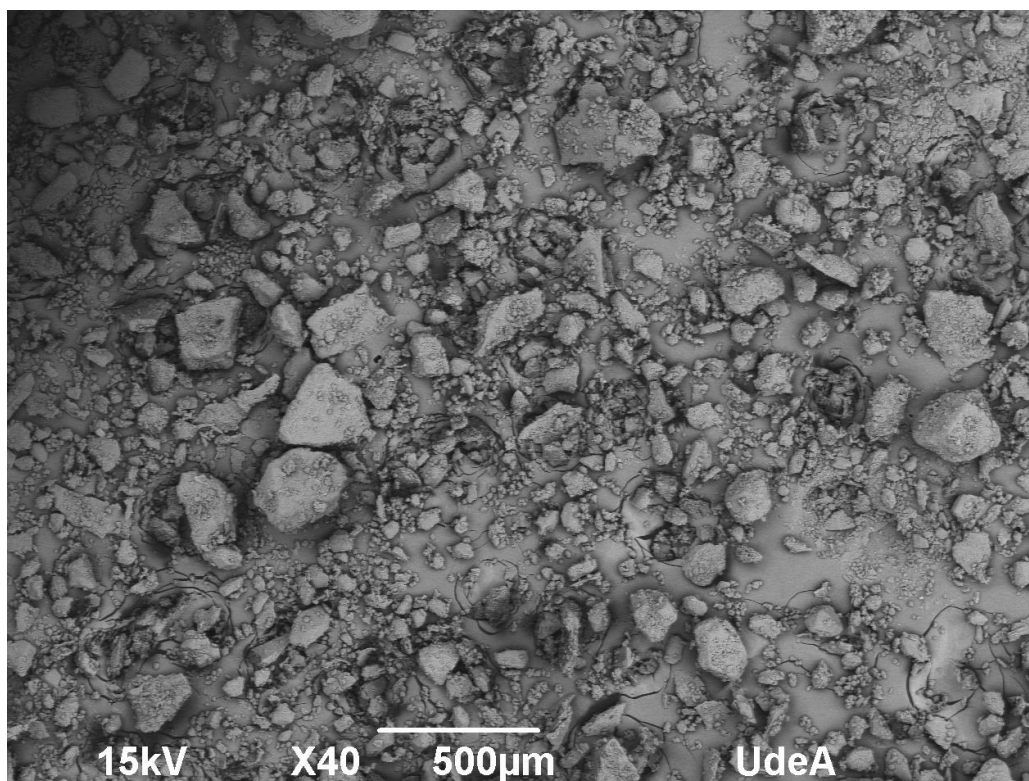
Kuhn, Lang, Bezold, Minceva y Briesen (2016) identificaron que el tamaño de partícula tiene un efecto significativo en la cinética de extracción. Los componentes se extraen más rápidamente de partículas pequeñas que de partículas grandes por presentarse mayor área superficial.

La pimienta presentó una distribución superficial similar al comino molido fino y la distribución gaussiana fue adecuada para poder predecir buenos comportamientos extractivos. No se buscó minimizar más la granulometría de la pimienta puesto que una reducción en el tamaño de partícula podría afectar la estructura de la fibra, la porosidad y el área superficial, dando lugar a cambios en las propiedades fisicoquímicas y funcionales (Wuttipalakorn et al., 2009).

Identificación de morfología del comino (*Cuminum cyminum* L.) y la pimienta negra (*Piper nigrum*) mediante microscopía de barrido electrónico (SEM).

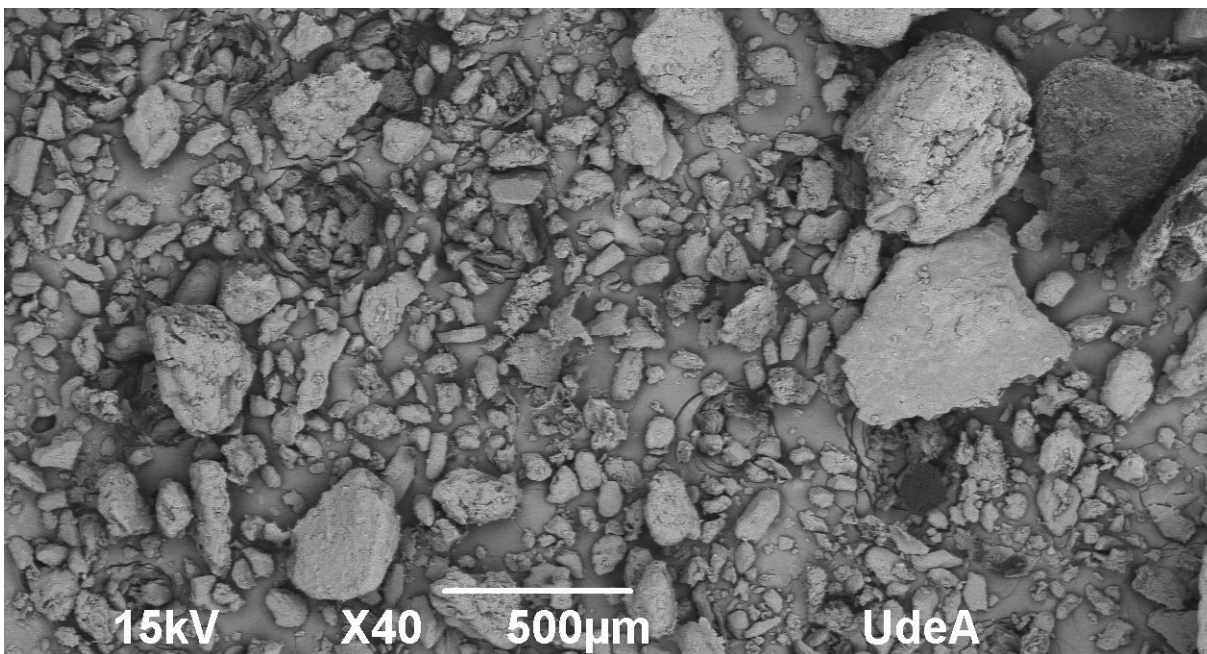
Mediante observaciones cualitativas se pudieron corroborar tamaños y estructuras del comino y la pimienta negra que por DTP ya se habían determinado. Ver figuras 7 y 8.

Figura 7. Microscopía de barrido electrónico (SEM) del comino molido fino (*Cuminum cyminum* L.).



Las morfologías y tamaños observados fueron adecuados para que la extracción por fluidos supercríticos pudiera ser eficiente.

Figura 8. Microscopía de barrido electrónico (SEM) de la pimienta negra en polvo (*Piper nigrum* L.).



En la figura 8 se apreciaron estructuras heterogéneas debidas al proceso de molienda del grano de pimienta. Sin embargo, fueron más predominantes los tamaños pequeños para el posterior proceso extractivo.

Caracterización sensorial de especias comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta (*Piper nigrum* L.).

Se identificaron los perfiles de sabor característicos de las especias de estudio.

La confiabilidad de los jueces sensoriales en la variable de intensidad de sabor estuvo entre 87,64% a 88,40%. En las figuras 9 y 10 se presentan diagramas de radar que plasman las percepciones de intensidad de sabor de los jueces sensoriales entrenados para comino y pimienta negra. De igual modo, en la tabla 6 se muestran los resultados de los jueces sensoriales.

Figura 9. Diagrama de radar para intensidad de sabor del comino molido fino (*Cuminum cyminum* L.).

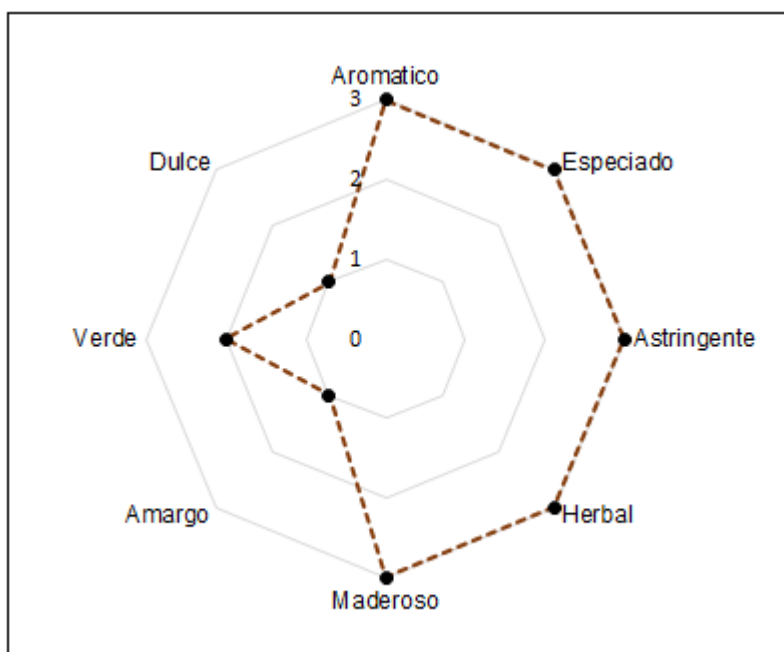
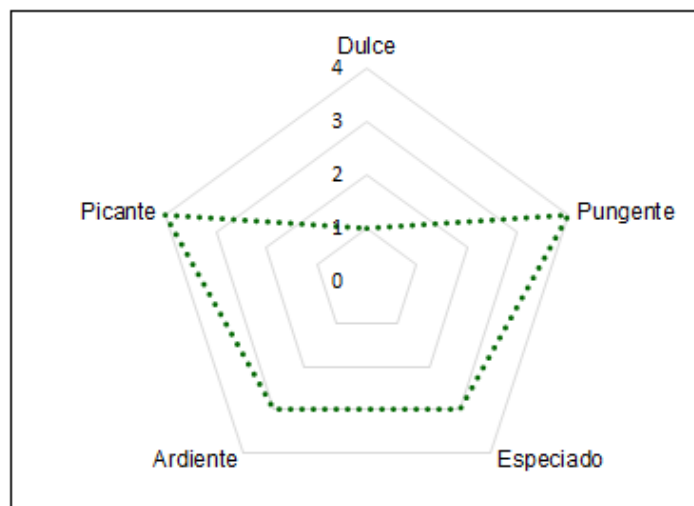


Figura 10. Diagrama de radar para intensidad de sabor de la pimienta negra en polvo (*Piper nigrum* L.).



Los descriptores de la tabla 6 fueron los seleccionados y los que se tuvieron en cuenta en el momento de evaluar las dos especias, además fueron los indicadores de la pureza o mezcla de las mismas con otras especias similares. Los que presentaron mayor calificación de intensidad fueron los más relevantes y por medio de los cuales se dieron los juicios de sabor.

Tabla 6.

Descriptorios característicos de las especias comino (Cuminum cyminum L.) y pimienta negra (Piper nigrum L.)

COMINO (<i>Cuminum cyminum</i> L.)			PIMIENTA NEGRA (<i>Piper nigrum</i> L.)		
Notas de sabor generales para comino	Descriptorios seleccionados	Intensidad percibida por los jueces *	Notas de sabor generales para pimienta negra	Descriptorios seleccionados	Intensidad percibida por los jueces *
Aromático					
Especiado					
Salado	Aromático	3			
Astringente			Picante		
Herbal	Especiado	3	Pungente	Dulce	1
Amargo			Especiado		
Maderoso	Astringente	3	Ardiente	Pungente	4
Verde			Salado		
Floral	Herbal	3	Maderoso	Especiado	3
Dulce			Herbal		
Pungente	Maderoso	3	Aromático	Ardiente	3
Refrescante			Dulce		
Balsámico	Amargo	1	Astringente	Picante	4
Refrescante			Terroso		
Floral	Verde	2	Adormecimiento		
Terroso					
Salado	Dulce	1			
Mentolado					

* Nota. La intensidad se mide en una escala de 1 a 5

Extracción supercrítica de oleorresinas de especias deshidratadas.

La extracción de aceites esenciales y oleorresinas utilizando la tecnología de fluidos supercríticos se empleó por el hecho de proporcionar productos de mayor calidad libres de solventes tóxicos (Rizvi et al., 1986; Schultz y Randall, 1970). El uso de la extracción por fluidos supercríticos tiene por lo menos tres ventajas: (1) las temperaturas bajas preservan la calidad del aceite/oleorresina de las especias, ya que

sus constituyentes son termolábiles; (2) el proceso es muy selectivo para el aceite/oleorresina de especias; y (3) la residualidad en el producto final es mínimo.

En este estudio, la variable que se tomó como constante dentro de la obtención de oleorresinas de comino y pimienta fue el flujo de CO₂. La temperatura, la presión y el tiempo se variaron de acuerdo a rangos de condiciones encontradas en la literatura, siguiendo un diseño experimental de superficie de respuestas de Box Benhken. Las variables respuesta seleccionadas para optimizar la extracción supercrítica fueron: ORAC, ABTS, rendimiento de extracción, piperina para la pimienta y cuminaldehído para el comino. El éxito de la extracción supercrítica no sólo dependió de la propia etapa de extracción (naturaleza del fluido supercrítico y la elección de los parámetros de extracción), sino también de las matrices consideradas y del sistema de captura de analitos.

Optimización de variables de proceso para extracción de oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L.) por fluidos supercríticos.

De acuerdo con algunos ensayos exploratorios ejecutados para oleorresina de comino en el equipo de fluidos supercríticos, se determinó que con las condiciones altas de temperatura y presión intermedia se presentaron buenos resultados de ORAC y buena eficiencia de extracción. Se emplearon temperaturas máximas de 70°C y se evitaron altas presiones (*superiores a 500 Bar*) debido a que proporcionaron pérdida de los volátiles y afectación de la capacidad antioxidante. Por esta razón, se trabajó con

presiones hasta 400 Bar y temperaturas hasta 70°C. Los rangos de las variables de proceso empleadas para la extracción de oleorresina de comino se aprecian en la tabla 7.

Tabla 7.

Valores mínimos y máximos de los factores de proceso empleados para la obtención de oleorresina de comino (Cuminum cyminum L.)

Factores	Valor mínimo	Valor máximo
Temperatura (°C)	40	70
Tiempo (min)	30	90
Presión (Bar)	150	400

Tras correr el diseño experimental de Box Behnken planteado con el fin de optimizar las condiciones de proceso que mejor contenido de cuminaldehído, capacidad antioxidante ORAC/ABTS y rendimiento generaron, se obtuvieron los siguientes resultados: a. Dependiendo de las variables respuesta incluidas en la investigación, se obtuvieron diferentes resultados de optimización para los factores de proceso. En la tabla 8 se encuentran los valores de la temperatura, presión y tiempo que maximizaron la capacidad antioxidante en términos de ORAC y ABTS, y en la tabla 9 se encuentran los valores que maximizaron el porcentaje de rendimiento y el contenido de cuminaldehído.

Tabla 8.

Valores de los factores experimentales que maximizaron la capacidad antioxidante en términos de ORAC y ABTS en oleorresina de comino (Cuminum cyminum L.)

Variable de capacidad antioxidante	Temperatura (°C)	Presión (Bar)	Tiempo (min)
ORAC óptimo*	70	400	30
ABTS óptimo**	57,4	150	90

Nota. *ORAC óptimo: 1214430 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$; **ABTS óptimo: 66670 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$.

Fuente. Datos obtenidos de software Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.03

Tabla 9.

Valores de los factores experimentales que maximizaron el % de rendimiento y el contenido de cuminaldehído en oleorresina de comino (Cuminum cyminum L.)

Variable respuesta	Temperatura (°C)	Presión (Bar)	Tiempo (min)
% Rendimiento*	69.3	150	90
% Cuminaldehído**	70	331,24	49,63

Nota. *Rendimiento óptimo: 6,05%; **Cuminaldehído óptimo: 27,67%.

Fuente. Datos obtenidos de software Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.03

Puesto que el ABTS, no es una variable tan relevante dentro del estudio por la baja sensibilidad y reproducibilidad del método y además, debido a que sus aproximaciones analíticas son muy distantes de la alta reactividad que típicamente caracteriza a las especies reactivas al oxígeno (ROS), se toma el ORAC como

indicador de capacidad antioxidante más asertivo. Además, el ORAC se ha definido como el método internacional para determinar la actividad antioxidante y así expresa los datos la FDA.

Las condiciones optimizadas en la tabla 8 dan indicio de los valores de proceso que deberían emplearse para poder obtener la mayor capacidad antioxidante.

Sin embargo, debe incluirse el rendimiento con el fin de poder hacer comercial la oleorresina y el contenido de cuminaldehído que es un parámetro reportado en la ficha técnica de los productos comerciales.

No sería adecuado optimizar solo las variables de proceso que mejor contenido de antioxidantes proporcionen sino aquellas que de igual manera permitan obtener buenos rendimientos de extracción y contenido de bioactivos de referencia.

Las ecuaciones de regresión que mejor ajustan a los datos de las variables involucradas en el estudio (ORAC, ABTS, % Rendimiento y % Cuminaldehído) para la obtención de la oleorresina de comino se muestran en la tabla 10.

Tabla 10.

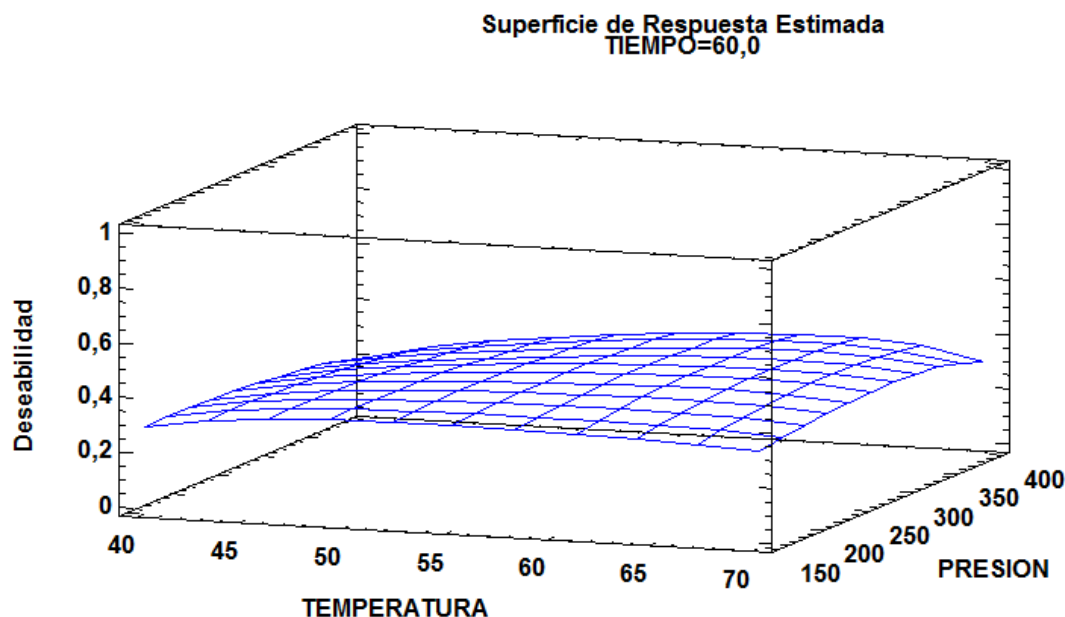
Ecuaciones de regresión para las variables respuesta involucradas en la obtención de oleorresina de comino (Cuminum cyminum L.)

Variable respuesta	Ecuación de regresión
ORAC (μmol Trolox/100 g)	ORAC = 2,29731E6 - 56358,4*Temperatura - 6682,75*Presión + 23110,6*Tiempo + 472,449*Temperatura ² + 98,8911*Temperatura*Presión - 289,485*Temperatura*Tiempo + 2,4464*Presion ² + 2,74371*Presión*Tiempo - 64,8831*Tiempo ²
ABTS (μmol Trolox/100 g)	ABTS = -476098, + 13779,3*Temperatura + 601,897*Presión + 2287,01*Tiempo - 124,465*Temperatura ² - 1,47191*Temperatura*Presión + 8,21782*Temperatura*Tiempo - 0,586059*Presion ² - 4,26338*Presión*Tiempo - 11,5119*Tiempo ²
Rendimiento (%)	RENDIMIENTO = -4,21241 + 0,367308*Temperatura - 0,0060807*Presión - 0,0560587*Tiempo - 0,00359238*Temperatura ² - 0,0000957906*Temperatura*Presión + 0,00161822*Temperatura*Tiempo + 0,0000313085*Presion ² - 0,00011586*Presión*Tiempo - 0,0000259385*Tiempo ²
Cuminaldehído (%)	CUMINALDEHIDO = -30,2203 - 1,50108*Temperatura + 0,228205*Presión + 2,04044*Tiempo + 0,016175*Temperatura ² + 0,000736667*Temperatura*Presión - 0,00763611*Temperatura*Tiempo - 0,00033204*Presion ² - 0,001205*Presión*Tiempo - 0,0111479*Tiempo ²

Fuente. Datos obtenidos de software Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.03

Del porcentaje de rendimiento obtenido y del tiempo de proceso dependerá el costo final del producto. Para ello se optimizó el diseño experimental, involucrando todas las variables ORAC, ABTS, % Rendimiento y % de Cuminaldehído y se presentó la superficie de respuesta en la figura 11, tomando en cuenta la función de deseabilidad como estrategia para la optimización simultánea.

Figura 11. Superficie de respuesta de variables óptimas para obtención de oleorresina de comino (*Cuminum cyminum L.*).



Para la superficie de respuesta estimada en la figura 11, se obtuvieron los valores óptimos de los factores de proceso y variables respuesta mostrados en la tabla 11. El valor óptimo de la deseabilidad fue de 0,3937, como ese valor fue menor de 1 quiere decir que la forma de la función se incrementó rápidamente al principio y luego se niveló más lento. Si la deseabilidad hubiese sido igual a 1 indicaría que el comportamiento fue lineal.

Ver en apéndices C, D, E y F los gráficos de contornos en donde se aprecian las superficies de respuesta estimadas para cada una de las variables respuesta: ORAC, ABTS, % Cuminaldehído y % Rendimiento.

Tabla 11.

Valores óptimos de los factores de proceso que maximizan las variables respuesta y la función de deseabilidad en oleoresina de comino (Cuminum cyminum L.)

Factores de proceso y variables de proceso	Valor óptimo
Temperatura (°C)	63,09
Presión (Bar)	346,1
Tiempo (min)	52,94
ORAC (μmol Trolox/100g)	886728
ABTS (μmol Trolox/100g)	41938,7
Rendimiento (%)	4,45
Cuminaldehído (%)	23,94

*Notas. *p<0.05 para n=30

Fuente. Datos obtenidos de software Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.03

Chen et al. (2014) reportaron las siguientes condiciones de extracción por fluidos supercríticos para oleoresina de comino: presión de extracción de 35 MPa, temperatura de 40°C, tamaño de partícula de 0,38 mm, un flujo de 25 kg/h, presión de separación de 6 MPa, temperatura de separación de 50°C y tiempo total de extracción de 2 h. Bajo esas condiciones se obtuvo un rendimiento de 13,56%, sin embargo, se desconoce el porcentaje de cuminaldehído obtenido.

La temperatura optimizada en esta investigación fue superior a la encontrada en la literatura y el rendimiento fue más bajo, esto pudo deberse a que dentro del estudio el flujo se dejó como variable fija. Posiblemente, si el flujo hubiera estado dentro de los factores de proceso, los resultados podrían ser similares a los reportados. Además, el rendimiento de la oleorresina podría mejorarse aumentando el tiempo de extracción sin que supere las 2 horas, ya que, haría improductivo el proceso, y se vería reflejado en el incremento del costo del producto. La condición de presión obtenida fue similar a la de la literatura.

Los valores del factor de la inflación de la varianza (V.I.F) para estos datos se comportó perfectamente ortogonal, esto indicó que se minimizó la confusión entre los efectos. Los efectos encontrados para la obtención de la oleorresina de comino no fueron estadísticamente significativos en un nivel de significancia del 5% para el ABTS y el porcentaje de cuminaldehído pero si lo fueron la temperatura sobre el rendimiento y la interacción tiempo-presión sobre el ORAC. Quizá, un aumento en el rendimiento con disminuciones en la extracción de cuminaldehído podría no ser deseable; debido al bajo peso molecular del cuminaldehído y su baja polaridad, es de esperarse que su extracción no se aumente con el tiempo. Ver apéndices G, H, I, y J, para evidenciar las interacciones de los factores de proceso sobre las variables respuesta de las oleorresinas comino.

Optimización de variables de proceso para extracción de oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L.) por fluidos supercríticos

De igual manera que con la oleorresina de comino, en la obtención de oleorresina de pimienta se variaron la presión, la temperatura y el tiempo como se presentan en la tabla 12. Se han reportado varios estudios sobre la extracción supercrítica para obtener aceite de pimienta negra (Ferreira, Nikolov, Doraiswamy, Meireles, y Petenate, 1999; Sankar, 1989; Sovová, Jež, Bártlová y St'astova, 1995; Tipsrisukond, Fernando, & Clarke, 1998, Vidal y Richard, 1987).

Tabla 12.

Valores mínimos y máximos de los factores de proceso empleados para la obtención de oleorresina de pimienta negra (Piper nigrum L.)

Factores	Valor mínimo	Valor máximo
Temperatura (°C)	40	70
Tiempo (min)	30	90
Presión (Bar)	200	550

Se corrió el diseño experimental de Box Behnken buscando optimizar las variables contenido de piperina, ORAC, ABTS y % de rendimiento. Para cada una de las variables respuesta incluidas en la investigación, se obtuvieron diferentes resultados de optimización para los factores de proceso: temperatura, presión y tiempo.

En la tabla 13 se encuentran los valores de la temperatura, presión y tiempo que maximizaron la capacidad antioxidante en términos de ORAC y ABTS, y en la tabla 14 se encuentran los valores que maximizaron el % de rendimiento y el contenido de piperina.

Tabla 13.

Valores de los factores experimentales que maximizaron la capacidad antioxidante en términos de ORAC y ABTS en oleorresina de pimienta negra (Piper nigrum L.)

Variable de capacidad antioxidante	Temperatura (°C)	Presión (Bar)	Tiempo (min)
ORAC óptimo*	40	359	90
ABTS óptimo**	70	332	90

Nota. *ORAC óptimo: 2437680 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$; **ABTS óptimo: 6413 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$.

Fuente. Datos obtenidos de software Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.03

Tabla 14.

Valores de los factores experimentales que maximizaron el % de rendimiento y el contenido de piperina en oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L.)

Variable respuesta	Temperatura (°C)	Presión (Bar)	Tiempo (min)
% Rendimiento*	70	200	30
% Piperina**	70	200	81

Nota. *Rendimiento óptimo: 10,6 %; **Piperina óptimo: 17,51 %.

Fuente. Datos obtenidos de software Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.03

Se incluyeron el porcentaje de rendimiento y el contenido de piperina como aspectos importantes para poder buscar la producción industrial de la oleorresina y como parámetros reportados en la ficha técnica de los productos comerciales.

No sería adecuado optimizar solo las variables de proceso que mejor contenido de antioxidantes proporcionen sino aquellas que de igual manera permitan obtener buenos rendimientos de extracción y contenido de componentes activos de referencia. Las ecuaciones de regresión que se ajustaron a los datos de cada una de las variables respuesta involucradas en la investigación se muestran en la tabla 15.

Tabla 15.

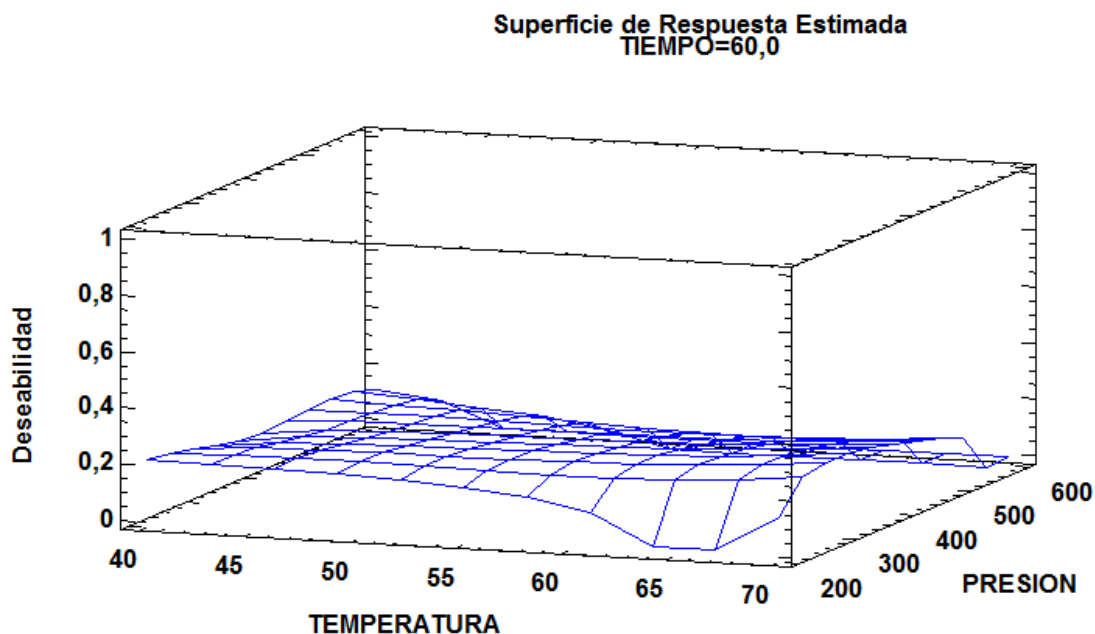
Ecuaciones de regresión para las variables respuesta involucradas en la obtención de oleorresina de pimienta negra (Piper nigrum L.).

Variable respuesta	Ecuación de regresión
ORAC (μmol Trolox/100 g)	ORAC = $1,05741\text{E}6 - 71589,1 * \text{Temperatura} + 6147,32 * \text{Presión} + 25864,0 * \text{Tiempo} + 1151,07 * \text{Temperatura}^2 + 25,255 * \text{Temperatura} * \text{Presión} - 1406,72 * \text{Temperatura} * \text{Tiempo} - 11,461 * \text{Presión}^2 + 12,0651 * \text{Presión} * \text{Tiempo} + 451,395 * \text{Tiempo}^2$
ABTS (μmol Trolox/100 g)	ABTS = $8724,97 - 346,051 * \text{Temperatura} + 24,7243 * \text{Presión} - 26,3767 * \text{Tiempo} + 3,39133 * \text{Temperatura}^2 - 0,0531824 * \text{Temperatura} * \text{Presión} + 0,521886 * \text{Temperatura} * \text{Tiempo} - 0,027323 * \text{Presión}^2 - 0,031479 * \text{Presión} * \text{Tiempo} + 0,167967 * \text{Tiempo}^2$
Rendimiento (%)	RENDIMIENTO = $13,0996 + 0,391952 * \text{Temperatura} - 0,0499761 * \text{Presión} - 0,389197 * \text{Tiempo} - 0,00228891 * \text{Temperatura}^2 - 0,000377548 * \text{Temperatura} * \text{Presión} + 0,00123362 * \text{Temperatura} * \text{Tiempo} + 0,0000505299 * \text{Presión}^2 + 0,00044116 * \text{Presión} * \text{Tiempo} + 0,00125651 * \text{Tiempo}^2$
Piperina (%)	PIPERINA = $11,061 - 0,332655 * \text{Temperatura} + 0,00656786 * \text{Presión} + 0,187253 * \text{Tiempo} + 0,00290833 * \text{Temperatura}^2 - 0,000417143 * \text{Temperatura} * \text{Presión} + 0,00468333 * \text{Temperatura} * \text{Tiempo} + 0,00000671429 * \text{Presión}^2 - 0,000139286 * \text{Presión} * \text{Tiempo} - 0,00300486 * \text{Tiempo}^2$

Fuente. Datos obtenidos de software Statgraphics centurion XVI, Versión 16.1.03

Del porcentaje de rendimiento obtenido y del tiempo de proceso dependerá el costo final del producto. Una vez analizada cada variable, se optimizó el diseño experimental, involucrando ORAC, ABTS, % Rendimiento y % de piperina y se presentó la superficie de respuesta de la figura 12.

Figura 12. Superficie de respuesta de variables óptimas para obtención de oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L.).



Para la superficie de respuesta estimada en la figura 12, se obtuvieron los valores óptimos de los factores de proceso y variables respuesta mostrados en la tabla 16. El valor óptimo de la deseabilidad fue de 0,2766 y como éste fue menor de 1 indicó que la forma de la función se incrementó rápidamente al principio, luego se niveló más lentamente. El comportamiento característico fue de tipo cuadrático.

Ver en apéndices K, L, M, y N los gráficos de contornos en donde se aprecian las superficies de respuesta estimadas para cada una de las variables respuesta: ORAC, ABTS, % Piperina y % Rendimiento.

Tabla 16.

Valores óptimos de los factores de proceso que maximizan las variables respuesta y la función de deseabilidad en oleorresina de pimienta negra (Piper nigrum L.)

Factores de proceso y variables de proceso	Valor óptimo*
Temperatura (°C)	68,15
Presión (bar)	328,5
Tiempo (min)	90
ORAC (μmol Trolox/100g)	585164
ABTS (μmol Trolox/100g)	6133,26
Rendimiento (%)	5,52
Piperina (%)	12,56

*Notas. *p<0.05 para n=30

Fuente. Datos obtenidos de software Statgraphics centurion XVI, Versión 16.1.03

Los valores del factor de la inflación de la varianza (V.I.F) para estos datos se comportó perfectamente ortogonal, esto indicó que se minimizó la confusión entre los efectos. Los efectos encontrados para la obtención de la oleorresina de pimienta negra no fueron estadísticamente significativos en un nivel de significancia del 5% para las variables de capacidad antioxidante, pero si lo fueron el tiempo y la presión sobre porcentaje de rendimiento y el porcentaje de piperina.

Ver apéndices O, P, Q y R para evidenciar las interacciones de los factores de proceso sobre las variables respuesta de la oleorresina de pimienta.

Se observó que la velocidad de extracción de la oleorresina de pimienta incrementó en la medida en que la presión lo hizo, este fenómeno ocurrió debido a que se incrementó la densidad del CO₂, siendo compatible con la densidad de la piperina (1,193 g/cm³). De esta manera, la extracción se facilitó. Si se trabajara con presiones inferiores, posiblemente el rendimiento disminuiría por el hecho de que algunos componentes que son solubles a presiones superiores no lo serían a menores valores. En este caso, sería necesario emplear cosolventes para favorecer la solubilidad de sustancias polares en el fluido supercrítico. Con lo anterior, haría falta evaluar si la selectividad de la extracción se ve afectada. Sin embargo, no se considera adecuada porque al final deberán removerse las trazas presentes.

De acuerdo con las observaciones efectuadas en el proceso experimental, sería aconsejable trabajar con presiones altas y temperaturas bajas o viceversa para obtener rendimientos altos de extracción.

El tiempo de extracción obtenido en la investigación fue similar al encontrado por Duarte et al., (2004) para la extracción de oleorresina de pimiento rojo.

Capacidad antioxidante de oleorresinas de comino y pimienta negra obtenidas por extracción supercrítica.

Las hierbas y las especias son materiales ricos en fitoquímicos antioxidantes (Carlsen et al., 2010, 3). De las hierbas, el tomillo, la salvia, el romero y la mejorana contienen los más grandes valores de capacidad antioxidante como ORAC, mientras que el comino, la pimienta y el jengibre tienen los mayores valores en las especias (Ninfali et al., 2005).

En la tabla 17 se encuentra la comparación de la capacidad antioxidante de las oleorresinas patrón que actualmente se emplean en la empresa Tecnas S.A. y las obtenidas por fluidos supercríticos. De esta manera, es importante corroborar que a pesar de que son productos diferentes por el hecho de emplear tecnologías diferentes de obtención, tienen buen contenido de metabolitos antioxidantes.

Se partió de comino molido con un ORAC de 26955 $\mu\text{mol Trolox equivalente}/100\text{ g}$ y de 20720 $\mu\text{mol Trolox equivalente}/100\text{ g}$ para la pimienta negra molida. El departamento de agricultura de los Estados Unidos reportó que la semilla de comino tiene 50372 $\mu\text{mol Trolox equivalente}/100\text{ g}$ y la semilla de pimienta 34053 $\mu\text{mol Trolox equivalente}/100\text{ g}$ (USDA, 2011). Estos valores son diferentes a los encontrados puesto que el contenido de metabolitos antioxidantes son dependientes de la variedad, la altitud, la disponibilidad de agua y las condiciones de los cultivos.

Por ejemplo, el estrés hídrico produce cambios en la producción de metabolitos secundarios en plantas, especialmente en medicinales y aromáticas (Petropoulos et al., 2008).

Tabla 17.

ORAC y contenido de fenoles de oleorresinas de pimienta negra (*Piper nigrum* L.) y comino (*Cuminum cyminum* L.) comerciales y obtenidas por fluidos supercríticos

Variable de capacidad antioxidante	Unidades	Oleorresina de Pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) comercial	Oleorresina de Comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) comercial	Oleorresina de Pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) por FSC	Oleorresina de Comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) por FSC
ORAC hidro	μmol Trolox equivalente/100 g	86230	9402	573510	146726
ORAC lipo	μmol Trolox equivalente/100 g	125885	83891	714612	534966
ORAC total	μmol Trolox equivalente/100 g	212115	93293	1288122	681093
Fenoles totales	mg ácido gálico/100 g	2837,4	1172,7	7349,6	4104,45

Se obtuvo mayor capacidad antioxidante en las oleorresinas de comino y pimienta negra obtenidas por fluidos supercríticos en comparación con las oleorresinas comerciales que actualmente se compran en Estados Unidos. De igual manera, la diferencia en el contenido de fenoles totales entre oleorresinas fue de 61% para la pimienta y de 71% para el comino. Lo anterior pudo deberse al tipo de tecnología empleada para su obtención o por la concentración final con la que se venden estos productos luego de ser vehiculizados en sistemas oleosos compatibles químicamente. Los fenoles podrían ser utilizados como aditivos alimentarios debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Ortega Ramirez et al., 2014). Esta fuerte actividad

antioxidante de los compuestos fenólicos podría explotarse para crear una defensa contra las especies reactivas al oxígeno (ROS) (Sreenivasulu et al., 2000).

Shan et al. (2005) identificaron que el comino contenía ácido cafeico, kaemferol, otros flavonoides, volátiles, aceites esenciales y cumarinas como componentes representativos de los fenoles totales. En esta investigación no se identificaron los fenoles específicos, solo se hizo la determinación del contenido total.

Wu et al. (2004) midieron la capacidad antioxidante de las fracciones hidrofílicas y lipofílicas de 16 especias secas y encontraron que los valores de ORAC lipofílico para 5 de ellas: clavo, comino, jengibre, pimienta negra y cúrcuma fueron más altos que la fracción de ORAC hidrofílico, lo cual indicó que los aceites esenciales presentes en esas especias contenían una cantidad sustancial de antioxidantes. En los valores reportados en la tabla 17 fue observado que el ORAC lipofílico fue mayor que el hidrofílico y esto se explica por la afinidad del CO₂ por los componentes oleosos, en este caso los aceites y las oleorresinas. Además, la piperina y el cuminaldehído se encontraron en esta fracción.

Determinación de piperina en oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L.).

Se realizó el montaje del método de piperina a través de cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS) con estandarización externa. Se identificó un tiempo de retención (RT) de 15,77 min con un pico característico encontrado en el espectro de

masas, y se construyó la curva de calibración. El método implementado pasó los requisitos de la prueba de idoneidad del sistema en los parámetros simetría (S), resolución (R), ancho del pico (W), sobrecarga (S), línea base (B), ruido (N), cóncavo (C), saturación (D), los cuales indicaron que el sistema funciona correcta y adecuadamente para examinar el analito.

En las figuras 13 y 14 se muestran el espectro de masas de la piperina y el pico característico en un corrido cromatográfico.

Figura 13. Espectro de masas de la piperina

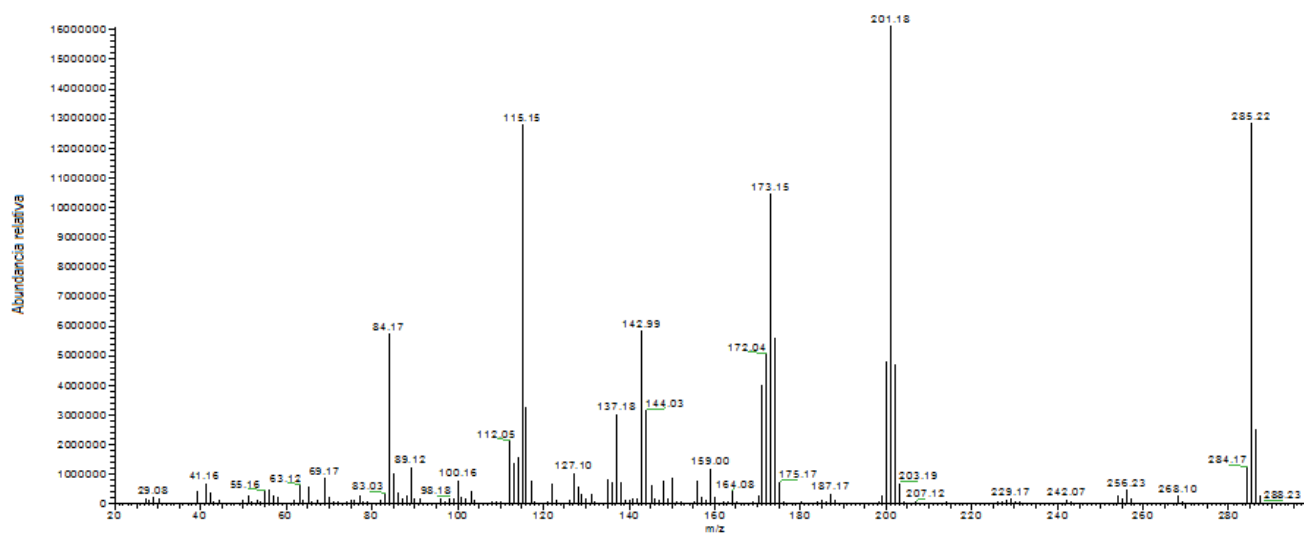
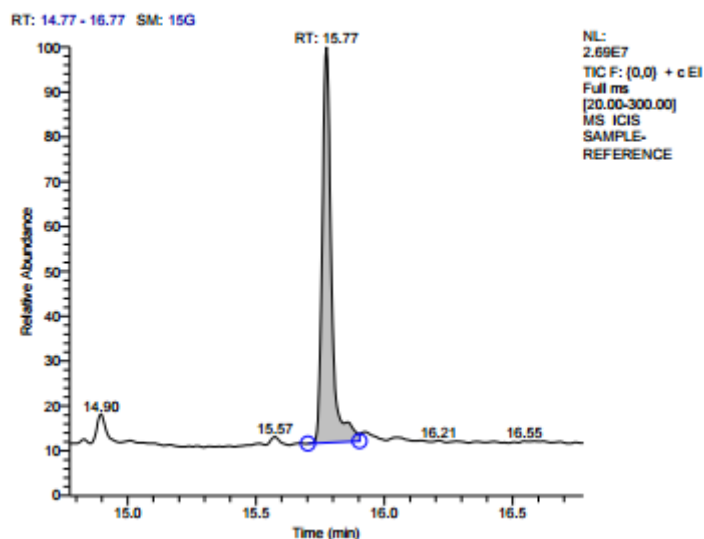


Figura 14. Cromatograma característico, mostrando el pico correspondiente a piperina obtenida por GC-MS



El mayor contenido de piperina encontrado tras las corridas experimentales fue de 20,86%. Este valor fue cercano al reportado por las muestras patrón de oleorresina comercial correspondientes a 25%.

El contenido de piperina es el que define la pungencia de la pimienta y dependiendo de este se define la cantidad que deba incluirse en una formulación. La extracción por fluidos supercríticos fue una técnica eficaz para la recuperación de oleorresinas y extractos ricos en piperina, proporcionando un extracto de alto valor agregado y exento de solventes orgánicos.

Según la escala de precisión de Horwitz, la muestra se encontró con un porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) conforme, es decir, máximo de 8% para concentraciones entre 100 y 500 mg/L.

Determinación de cuminaldehído en oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L.)

Se realizó el montaje del método de cuminaldehído a través de cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS), con estandarización externa y previa caracterización del estándar. Se identificó un tiempo de retención (RT) de 7,24 min, la curva de calibración y el pico característico.

El método implementado pasó los requisitos de la prueba de idoneidad del sistema en los parámetros simetría (S), Resolución (R), Ancho del pico (W), sobrecarga (S), línea base (B), ruido (N), cóncavo (C), saturación (D) los cuales indicaron que el sistema funciona correcta y adecuadamente para examinar el analito.

En las figuras 15 y 16 se muestran el pico característico y el espectro de masas del cuminaldehído.

Figura 15. Pico característico del cuminaldehído encontrado en el espectro de masas

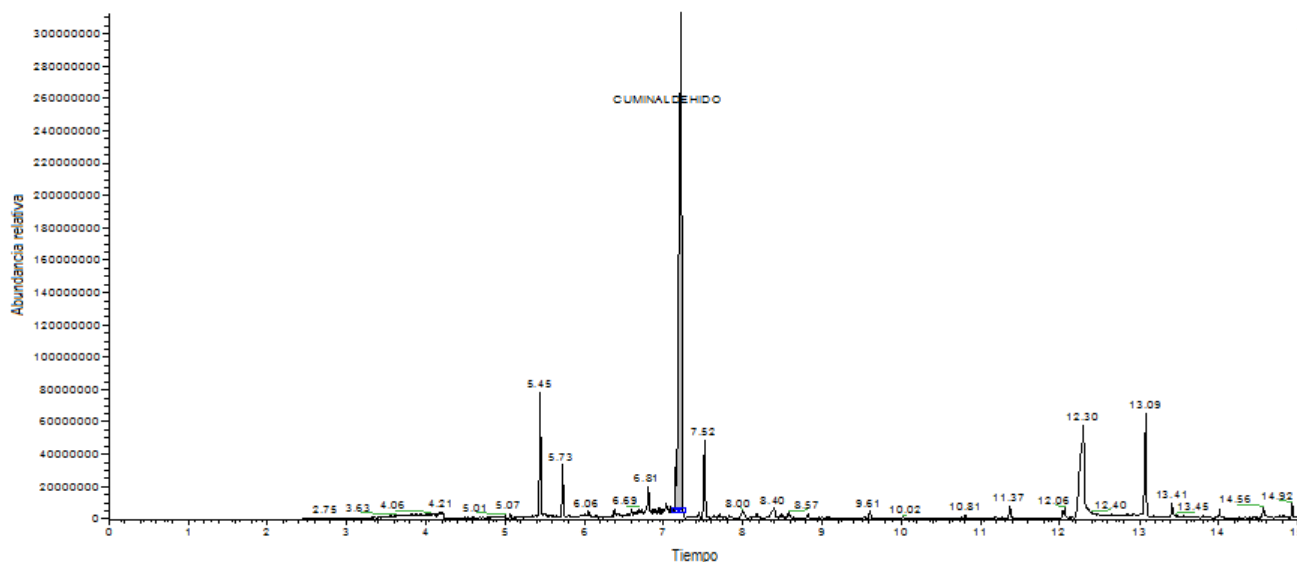
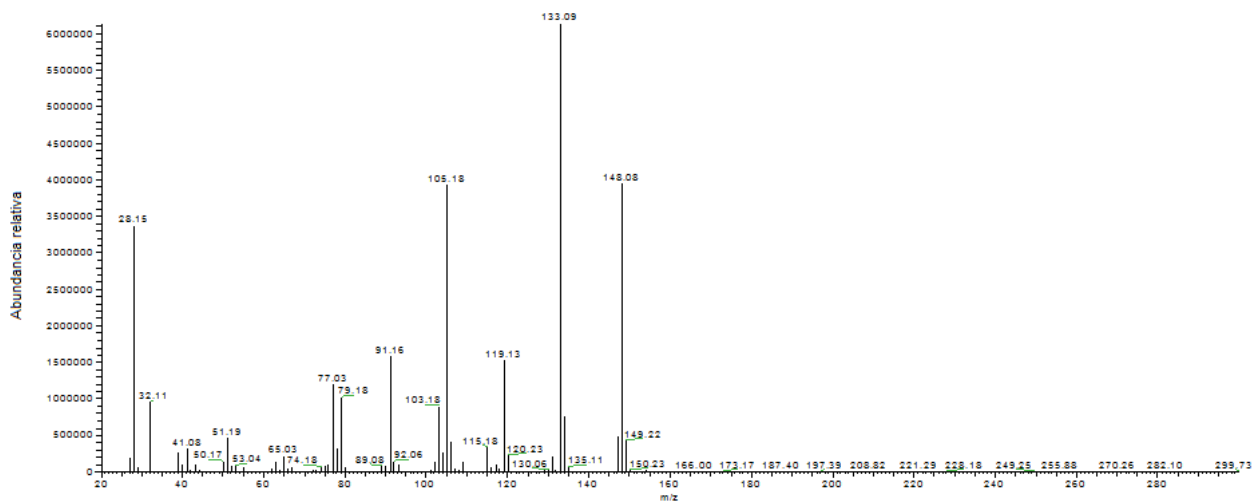


Figura 16. Espectro de masas del cuminaldehído.



El contenido de cuminaldehído encontrado en las oleorresinas del trabajo fue de 48,14%, valor superior al reportado por Pourmortazavi, Ghadiri y Hajimirsadeghi (2005) quienes obtuvieron un 11,48% tras haber evaluado la extracción por fluidos

supercríticos. Además, fue mayor que el reportado en ficha técnica por los patrones comerciales. El cuminaldehído es el componente que define las notas mentolado-maderoso del comino, y los perfiles encontrados fueron característicos de la especia.

La extracción por fluidos supercríticos fue una técnica eficaz para la recuperación de oleorresinas ricas en cuminaldehído siendo adecuada para proteger los componentes volátiles termolábiles.

Rendimiento de extracción de oleorresinas de comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.) obtenidas por FSC

A través de la variación de los factores de proceso se logró identificar el mayor rendimiento de extracción de las oleorresinas de comino y pimienta negra y las condiciones que hicieron posible esto. Ver tabla 18.

Tabla 18.

*Rendimientos de extracción de oleorresinas de comino (*Cuminum cyminum* L.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.) y mejores condiciones de trabajo*

Factores de proceso/resultado	Oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L)	Oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L)
Temperatura (°C)	70	70
Presión (Bar)	150	200
Rendimiento (%)	6,05	10,6
Tiempo (min)	90	81

Ferreira, Meireles y Cabral (1992), reportaron un rendimiento máximo luego de 1 hora de extracción para la pimienta negra de 2,88% a 6,35 MPa, 20°C y un flujo de 10,35 mgCO₂/s, mientras que el rendimiento obtenido en este estudio fue superior. El comportamiento del bajo rendimiento de la literatura se pudo presentar porque emplearon tamaños de partícula tan pequeños para el proceso extractivo, que no permitieron el paso del solvente por los intersticios de la matriz. De esta manera, se presentó dificultad de difusión del disolvente en las partículas. Vidal y Richard (1987) determinaron que el rendimiento de extracción depende del tamaño del sólido.

Además, el exceso de molienda pudo obstaculizar la extracción debido a la readsorción de los analitos en las superficies de la matriz, ocasionando una variación en la tasa de flujo, una interferencia en la transferencia de masa (aceite/oleorresina que cubre la superficie de la partícula sólida y el disolvente) y la caída de presión en el interior de la cámara de extracción. El tamaño de partícula de la pimienta empleada en este estudio fue adecuado para poder obtener buen comportamiento de transferencia de masa al llevarse a cabo la interacción con el disolvente.

Por otra parte, Benrejda, Dridi y Nabiev (2012) reportaron un rendimiento de 2,25% de aceite de comino luego de una larga extracción de 240 min. Si se analizara este tiempo en términos de productividad, no sería económicamente ventajoso por los costos que esto implicaría.

En este estudio se evidenció que las condiciones obtenidas para la oleorresina de comino hicieron posible que se aumentara el rendimiento 4,44 veces más.

Dosis de oleorresinas de comino y pimienta negra empleadas en dos condimentos cárnicos “preparado sabor hamburguesa de pollo” y “preparado sabor salchicha tipo bigger”

Las aplicaciones fueron establecidas de acuerdo a la selección de productos de consumo masivo y los cuáles experimentarían mayores cambios, resultado de la incorporación en la formulación de las oleorresinas evaluadas en el estudio. Las dosis de reemplazo determinadas por la concentración fueron de 1:1 frente a las oleorresinas actuales utilizadas y si se tuviera que reemplazar la especia en polvo dentro de otra formulación, la dosis adecuada sería de 1:25. En este caso, para cumplir con el reemplazo de 1:1 se adicionaron 0,015 g/kg de oleorresina de comino en el preparado sabor hamburguesa de pollo y 0,0055 g/kg de oleorresina de pimienta negra al preparado sabor salchicha. Para identificar si las dosis empleadas funcionaron adecuadamente se midieron durante 180 días: el comportamiento textural en función de la variable compactación y la aparición de sabores extraños/residuales.

Para cada aplicación se hizo comparación con la oleorresina actualmente empleada en las formulaciones, buscando identificar diferencias sensoriales y de comportamiento en aspectos texturales, específicamente “compactación”.

Desempeño de la oleoresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L.) en un preparado sabor salchicha tipo bigger

El preparado sabor salchicha tipo bigger fue elaborado con los siguientes ingredientes: especias (páprika, ajo), oleoresinas de especias (pimienta negra), proteína vegetal hidrolizada, sabor artificial (carne), acentuador de sabor, extracto de levadura, anticompactante, humo natural, y acidulante. La única diferencia de la formulación fue el reemplazo de la oleoresina comercial por la obtenida en este trabajo, y las comparaciones se hicieron con la oleoresina actualmente empleada. El anticompactante y las especias presentes en el condimento no se eliminaron puesto que el producto es una fórmula base y se debió elaborar conforme se fabrica actualmente. Desde el punto de vista sensorial no se presentaron problemas con la presencia de páprika y ajo debido a que los jueces sensoriales tenían la capacidad de identificar los perfiles de cada especia y se registraron los descriptores característicos para identificar diferencias y/o presencia de sabores extraños. El seguimiento se hizo durante 6 meses a 25°C, 35°C y 45°C debido a que a estas condiciones se aceleraron los procesos de deterioro, permitiendo con ello estimar el posible cambio sensorial en el tiempo. Se obtuvieron datos importantes que se validarán luego para establecer la vida útil sensorial establecida por punto de falla y modelamiento cinético. Los resultados se muestran en la tabla 19.

El preparado sabor salchicha patrón analizado en el tiempo presentó mayor percepción de sabores extraños, sobre todo cuando se almacenaron a temperaturas de 35°C y 45°C. Los residuales encontrados fueron: metálico, rancio, solvente, grasoso,

alcohólico, jabón. Esto pudo haberse presentado por la tecnología de extracción empleada y por la vehiculización de la oleorresina en sistemas oleosos específicos.

De igual modo, se analizó la misma formulación de condimento con la oleorresina de pimienta negra obtenida en este estudio y se notó que fueron menos los descriptores negativos percibidos por los jueces sensoriales. Entre los sabores extraños percibidos en los tiempos cercanos a los 6 meses de análisis a las temperaturas más extremas fueron: aceitoso.

No fueron distinguidos perfiles de solvente o alcohol puesto que con la tecnología de fluidos supercríticos se obtuvieron productos libres de solventes orgánicos y otras trazas de componentes específicos.

Tabla 19.

Evaluación sensorial durante 180 días de formulaciones con oleorresinas de pimienta negra (comercial y obtenida por FSC)

Preparado sabor salchicha tipo bigger con oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) actual				Preparado sabor salchicha tipo bigger oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) obtenida por FSC			
Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Sabores extraños y/o residuales	Intensidad*	Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Sabores extraños y/o residuales	Intensidad*
1			0	1			0
15			0	15			0
30			0	30			0
60	25	No se detectaron sabores extraños y/o residuales	0	60	25	No se detectaron sabores extraños y/o residuales	0
90			0	90			0
120			0	120			0
150			0	150			0
180			0	180			0
15			0	15			0
30			0	30			0
60	35	Metálico	0	60	35	Aceitoso	0
90			0	90			0
120			1	120			0
150			1	150			0
180			3	180			1
15			0	15			0
30		Solvente	0	30			0
60	1		60	0			
90	3		90	0			
120	3		120	1			
150	4		150	2			
180	4	180	2				

*Nota: Intensidad de 0 a 5, siendo 0 la no detección de sabores extraños y/o residuales y 5 la presencia de sabores extraños específicos

Compactación textural de preparado sabor salchicha tipo bigger con adición de oleorresina de pimienta negra (Piper nigrum L.):

Los paquetes de condimento en presentaciones de 500 g expuestos a las diferentes temperaturas, fueron extraídos al azar de las cámaras de aceleración para cada tiempo de muestreo (días 1, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180). Cada muestra se empleó para las mediciones de compactación y demás variables del seguimiento. Los resultados se muestran en la tabla 20.

El preparado sabor de salchicha que tenía dentro de formulación la oleorresina de pimienta comercial, experimentó mayores tendencias a compactarse en el tiempo, sobre todo a temperaturas extremas de almacenamiento. Mientras que, la oleorresina obtenida por FSC permitió que la matriz no presentara cohesividad. Este resultado es importante puesto que indica que el producto formulado con la oleorresina de pimienta obtenida en esta investigación, mantendrá las características de polvo durante su vida útil.

Tabla 20.

Índices de cohesión obtenidos de formulaciones con oleorresinas de pimienta negra (*Piper nigrum* L) comercial y obtenida por FSC

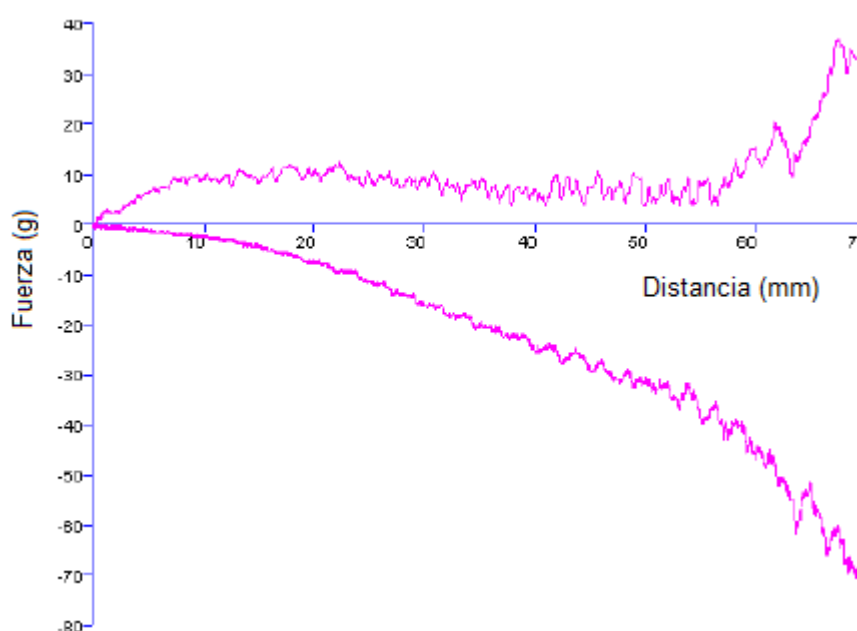
Preparado sabor salchicha tipo bigger con oleorresina de pimienta negra actual			Preparado sabor salchicha tipo bigger oleorresina de pimienta negra obtenida por FSC		
Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Índice de cohesión*	Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Índice de cohesión*
1		1	1		1
30		1	30		1
60		2	60		1
90	25	3	90	25	1
120		5	120		2
150		5	150		2
180		5	180		4
1		1	1		1
30		1	30		1
60		3	60		1
90	35	4	90	35	3
120		13	120		4
150		15	150		7
180		15	180		8
1		5	1		1
30		5	30		3
60		13	60		3
90	45	13	90	45	10
120		16	120		12
150		16	150		13
180		20	180		13

*Nota: Se calificó como: <11 libre flujo, 14-11 fácil flujo, 16-14 cohesivo, 19-16 muy cohesivo y >19 fuertemente cohesivo

El comportamiento característico encontrado para el análisis de cohesión de una de las muestras evaluadas para el preparado sabor salchicha tipo bigger con

oleorresina de pimienta negra por el método de cohesión de polvos se muestra en la figura 17.

Figura 17. Comportamiento de cohesión de polvos característico para el preparado sabor salchicha con adición de oleorresina de pimienta negra obtenida por fluidos supercríticos almacenado a 45°C



El coeficiente de cohesión fue el área negativa bajo la curva y los índices de cohesión mostrados en la tabla 20 se obtuvieron del cociente entre el coeficiente de cohesión y el peso de la muestra. Esta gráfica indica la tendencia que tiene este producto a compactarse tras el almacenamiento a una temperatura alta (en este caso 45°C). Sin embargo la medición en el equipo se hizo a 26°C.

El índice de cohesión fue muy útil, y se adaptará como medida de control calidad, ya que permite determinar cambios en especificaciones de muestras de polvo

(formulación, distribución de tamaño de partícula, forma de la partícula, entre otros). Se apreció que las condiciones de almacenamiento ambientales de evaluación influyen en la tendencia de las muestras a agregarse.

Desempeño de la oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L.) en el condimento preparado sabor hamburguesa de pollo.

El preparado sabor hamburguesa de pollo fue elaborado con los siguientes ingredientes: especias (cebolla y cúrcuma), oleorresinas de especias (comino), proteína vegetal hidrolizada, sabor artificial (pollo), extracto de levadura, anticompactante y acentuador de sabor. La única diferencia de la formulación fue el reemplazo de la oleorresina comercial por la obtenida en este trabajo, y las comparaciones se hicieron con la oleorresina actualmente empleada.

El anticompactante y las especias presentes en el condimento no se eliminaron puesto que el producto es una fórmula base y se debió elaborar conforme se fabrica actualmente.

El seguimiento se hizo durante 6 meses a tres condiciones de temperatura y los resultados se muestran en la tabla 21.

El condimento sabor hamburguesa de pollo con adición de oleorresina comercial en el tiempo presentó mayor percepción de sabores extraños, especialmente cuando se almacenó a las temperaturas de aceleración (35°C y 45°C). Los sabores residuales encontrados fueron: solvente, jabón y rancio. Esto pudo haberse presentado por la tecnología de extracción utilizada (*posiblemente con solventes*), por las materias

primas empleadas para la vehiculización de la oleorresina y por los posibles emulsificantes adicionados para mantener el sistema estable.

De igual modo, se analizó la misma formulación con la oleorresina de comino obtenida en este estudio y se notó que fueron menos los descriptores negativos percibidos por los jueces sensoriales. El único sabor extraño percibido a las temperaturas extremas y en el tiempo cercano a los 6 meses de análisis fue: aceitoso.

No fueron percibidos perfiles de solvente y rancio por el hecho de que la tecnología de fluidos supercríticos hace posible la obtención de productos libres de solventes orgánicos y otras trazas de componentes extraños específicos.

Tabla 21.

Evaluación sensorial durante 180 días de formulaciones con oleorresinas de comino (comercial y obtenido por FSC)

Preparado sabor hamburguesa de pollo con oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) actual				Preparado sabor hamburguesa de pollo con oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) obtenida por FSC			
Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Sabores extraños y/o residuales	Intensidad*	Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Sabores extraños y/o residuales	Intensidad*
1			0	1			0
15			0	15			0
30			0	30		No se detectaron	0
60			0	60		sabores	0
90	25	Solvente	0	90	25	extraños y/o	0
120			0	120		residuales	0
150			0	150			0
180			1	180			0
15			0	15			0
30			0	30		No se detectaron	0
60			0	60		sabores	0
90	35	Solvente	0	90	35	extraños y/o	0
120		Jabón	1	120		residuales	0
150			1	150			0
180			4	180			0
15			0	15			0
30			0	30			0
60			2	60			0
90	45	Solvente	2	90	45	Aceitoso	0
120		Rancio	2	120			1
150			4	150			1
180			4	180			2

*Nota: Intensidad de 0 a 5, siendo 0 la no detección de sabores extraños y/o residuales y 5 la presencia de sabores extraños específicos

Compactación textural del preparado sabor hamburguesa de pollo con adición de oleoresina de comino (*Cuminum cyminum* L.):

Las mismas muestras dispuestas para análisis sensorial se midieron en la variable de compactación textural. Los resultados se muestran en la tabla 22.

Tabla 22.

*Índices de cohesión de formulaciones con oleoresinas de comino (*Cuminum cyminum* L.) comercial y obtenida por FSC*

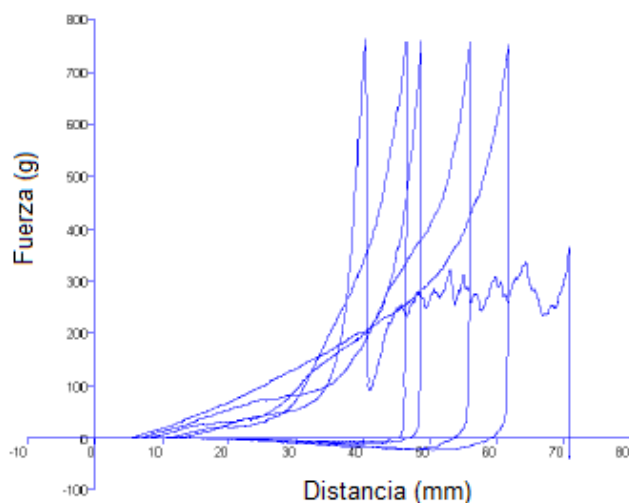
Preparado sabor hamburguesa de pollo con oleoresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) actual			Preparado sabor hamburguesa de pollo con oleoresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) obtenida por FSC		
Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Índice de cohesión*	Tiempo (días)	Temperatura (°C)	Índice de cohesión*
1		1	1		1
30		1	30		1
60		1	60		1
90	25	2	90	25	1
120		6	120		1
150		7	150		4
180		10	180		4
1		1	1		1
30		1	30		1
60		2	60		1
90	35	3	90	35	2
120		12	120		5
150		16	150		5
180		16	180		7
1		2	1		1
30		2	30		1
60		2	60		4
90	45	4	90	45	9
120		12	120		10
150		13	150		11
180		21	180		11

*Nota: Se calificó: <11 libre flujo, 14-11 fácil flujo, 16-14 cohesivo, 19-16 muy cohesivo y >19 fuertemente cohesivo

Los índices de cohesión mostrados en la tabla 22 se obtuvieron del cociente entre el coeficiente de cohesión y el peso de la muestra. La figura 18 indica la tendencia que tiene este producto a compactarse tras el almacenamiento a una temperatura alta (en este caso 45°C).

El preparado sabor hamburguesa de pollo que tenía dentro de formulación la oleorresina de comino comercial, experimentó mayores tendencias a compactarse en el tiempo, mientras que la oleorresina obtenida por FSC permitió que la matriz mantenga sus características de polvo hasta el fin de su vida útil. El comportamiento característico encontrado para el análisis de cohesión de una de las muestras evaluadas para el preparado sabor hamburguesa de pollo con oleorresina de comino comercial por el método de cohesión de polvos se muestra en la figura 18.

Figura 18. Comportamiento de cohesión de polvos característico de preparado sabor hamburguesa de pollo con adición oleorresina de comino comercial almacenada a 45°C



De las dos oleorresinas obtenidas por FSC, la de comino es quien mejor se desempeña, pues, no genera tendencia a la compactación en el tiempo a pesar de ser sometida a temperaturas extremas por tiempos largos. Para otro estudio posterior, se podría pensar en involucrar otras variables y hacer su respectiva correlación.

Vida útil de oleorresinas de comino y pimienta negra obtenidas por fluidos supercríticos

La variable de color tomada como base del estudio de vida útil fue el parámetro colorimétrico DEcmc debido a que con éste se involucraron las demás coordenadas colorimétricas: tono, croma y L^* , a^* , b^* . Además, este parámetro mostró el momento en que se presentaron diferencias de color, siendo una buena alternativa para el establecimiento de especificaciones y tiempos de almacenamiento en anaquel. Se utilizó el análisis de Weibull con el fin de identificar los tiempos de falla del color de las oleorresinas. En las figuras 19 y 20 se muestran los ajustes de DEcmc a la distribución de Weibull mediante el establecimiento de un modelo y estimación de los parámetros por el método de estimación de máxima verosimilitud. Con este, se pudieron obtener estimadores consistentes, asintóticamente eficientes e insesgados y para construir los intervalos de confianza a partir de los parámetros obtenidos.

Figura 19. Ajuste de los datos de DEcmc de la oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L.) a la distribución de Weibull

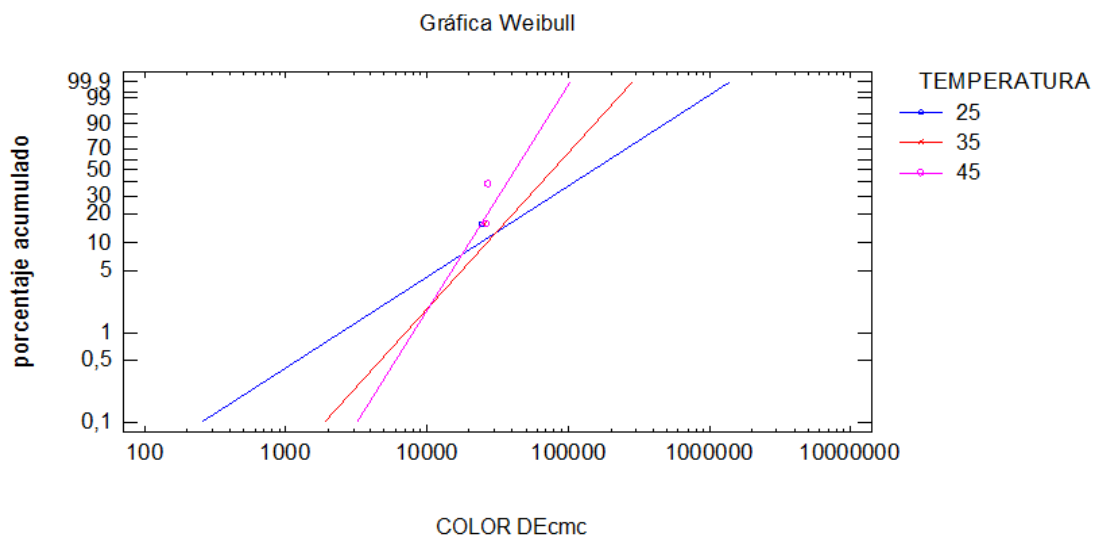
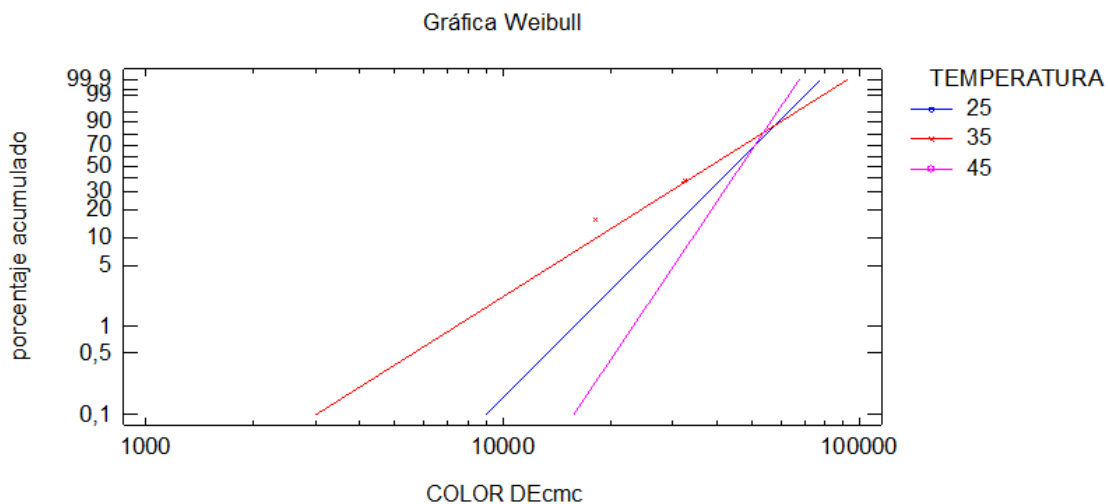


Figura 20. Ajuste de los datos de DEcmc de la oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L.) a la distribución de Weibull



Los comportamientos encontrados por Weibull establecen que la oleorresina de pimienta en función del color es más sensible que la oleorresina de comino y al estimar

el parámetro de forma de las distribuciones para ambas oleorresinas, la variación aumenta en orden desde 25 a 45°C, es decir, primero se deterioraron las muestras almacenadas a 45°C, seguido de las de 35°C y finalmente, las de 25°C.

Se obtuvieron los tiempos de vida útil que se muestran en la tabla 23 comparadas con los reportados en ficha técnica para los patrones comerciales.

Tabla 23.

Vida útil estimada a 25°C en función de DEcmc para las oleorresinas comino (Cuminum cyminum L.) y pimienta negra (Piper nigrum L.) obtenidas por FSC comparadas con la vida útil de los patrones comerciales.

Muestras	Tiempo de vida útil estimado (semanas)	Tiempo de vida útil estimado (meses)
Oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.) obtenida por FSC	30,14	7,51
Oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.) obtenida por FSC	30,92	7,73
Patrón comercial de oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.)	32	7
Patrón comercial de oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.)	32	7

Estos valores de vida útil son adecuados considerando que la variable color es sensible a cualquier variación de luz y temperatura. Además, el tiempo de duración fue mayor que el reportado en la ficha técnica de los patrones comerciales, indicando que la calidad obtenida por FSC es buena. Las oleorresinas deberán almacenarse en

empaques oscuros para evitar que los rayos ultravioleta afecten su calidad sensorial y en este caso el color. Las empresas como Kalsec, Naturex, Félix Reverté, Aseal, Natura extracta entre otras, mantienen sus productos en empaques oscuros de tal manera que no solo protegen el producto de la luz sino del deterioro oxidativo. En estudios posteriores, cuando se pueda obtener mayor cantidad de oleorresinas en procesos de escalado, se realizarán correlaciones entre las mediciones instrumentales y los juicios sensoriales, de manera que, se pueda establecer un factor que indique cuando las percepciones de diferencia del color de los jueces entrenados son comparables con las obtenidas en equipos especializados.

Estabilidad oxidativa de oleorresinas de pimienta negra (*Piper nigrum* L.) y comino (*Piper nigrum* L.)

Mediante el método rancimat se realizó el seguimiento de las oleorresinas a tres temperaturas: 90°C, 110°C y 120°C. Se determinó el tiempo de inducción, momento en el cual, empezaron a generarse peróxidos e hidroperóxidos a través de una serie de reacciones paralelas, produciendo compuestos secundarios como aldehídos, cetonas y ácidos que dan notas características a rancio, en otras palabras “rancidez oxidativa”.

Se calculó el Q_{10} como indicador de degradación de las oleorresinas, en la medida en que a estas se les incrementó la temperatura en 10°C. En la tabla 24 se muestran los tiempos de inducción, los coeficientes de regresión y el Q_{10} de las oleorresinas comerciales y las obtenidas por fluidos supercríticos. En las figuras 21, 22, 23 y 24 se aprecia el comportamiento de las mismas a las tres temperaturas de estudio.

Tabla 24.

Tiempos de inducción de oleorresinas de comino y pimienta negra obtenidos por fluidos supercríticos y comerciales

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo de inducción (h)	Coeficientes de regresión			Q10
			A	B	R ²	
Oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L) comercial	90	148,3				
	110	1,88	2,40E+07	-0,157	0,951	4,81
	120	0,08				
Oleorresina de comino (<i>Cuminum cyminum</i> L) obtenida por FSC	90	157,8				
	110	1,9	1,46E+07	-0,151	0,9697	4,5
	120	0,12				
Oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L) comercial	90	109,89				
	110	1,7	193266	-0,097	0,929	2,65
	120	0,5				
Oleorresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L) obtenida por FSC	90	149,1				
	110	2,32	106720	-0,093	0,935	2,55
	120	1,9				

En la tabla 24, los tiempos de inducción o índice de estabilidad hacen relación a las horas que se tardó cada una de las oleorresinas en iniciar su proceso de degradación oxidativa. A las temperaturas más bajas se encontraron tiempos largos de deterioro, y en la medida en que el sistema fue sometido a altas temperaturas, el tiempo se minimizó. Lo anterior, da pie para estimar que en ese momento se empezaron a generar peróxidos, hidroperóxidos, compuestos polares totales y otros componentes provenientes de la oxidación lipídica (Farhoost, 2007). Las oleorresinas obtenidas por fluidos supercríticos tardaron más tiempo en degradarse a las tres temperaturas evaluadas en comparación con las oleorresinas comerciales que actualmente se tienen como patrón de referencia. Lo anterior indica que si un producto

que se somete a tratamientos térmicos contiene oleorresinas comerciales como ingredientes de la formulación, podría experimentar mayores cambios sensoriales y químicos por la descomposición temprana de los ácidos grasos. El método rancimat se ha usado ampliamente en la industria de aceites y otros sistemas oleosos, pero ha sido poco empleado en el estudio de estabilidad de oleorresinas. Sin embargo, para efectos de este estudio fue interesante poder comparar el grado de deterioro que las oleorresinas podrían experimentar cuando se sometieran a tratamientos térmicos y/o se incluyeran dentro de la formulación de una matriz alimenticia. Estas podrían degradarse en el tiempo, ser iniciadoras de reacciones en cadena que afecten la calidad, siendo evidentes los cambios en la reducción de la vida útil y en algunos aspectos sensoriales como sabor y color.

Figura 21. Diagrama de deterioro de la oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L.) comercial medido por método rancimat a temperaturas de 90°C, 110°C y 120°C

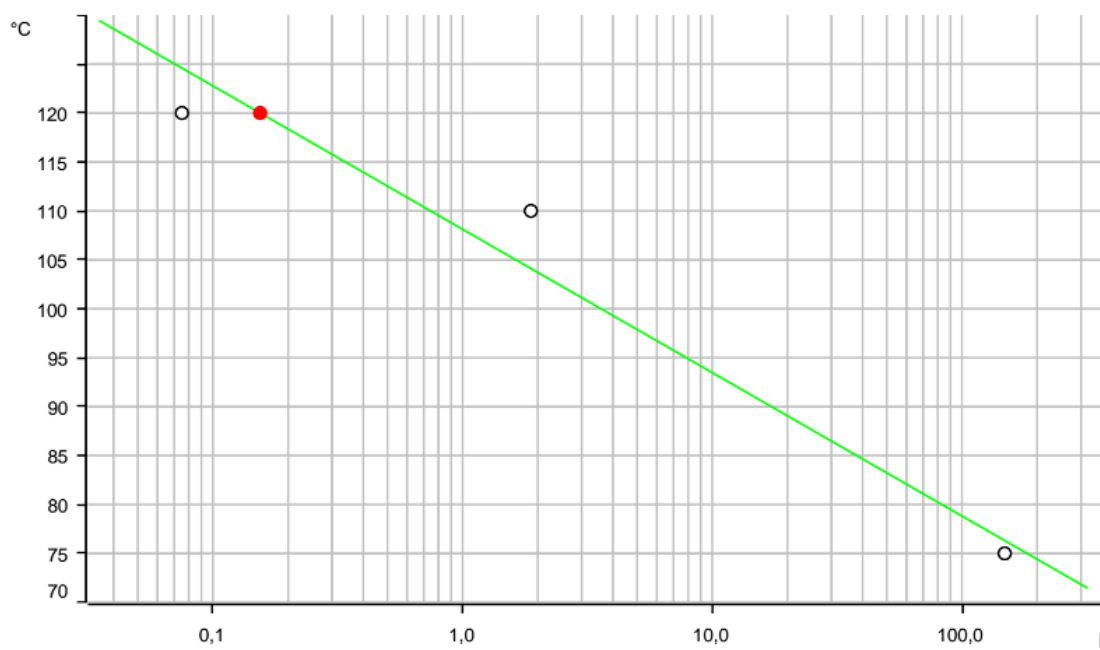


Figura 22. Diagrama de deterioro de la oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L.) obtenida por FSC mediante método rancimat a temperaturas de 90°C, 110°C y 120°C

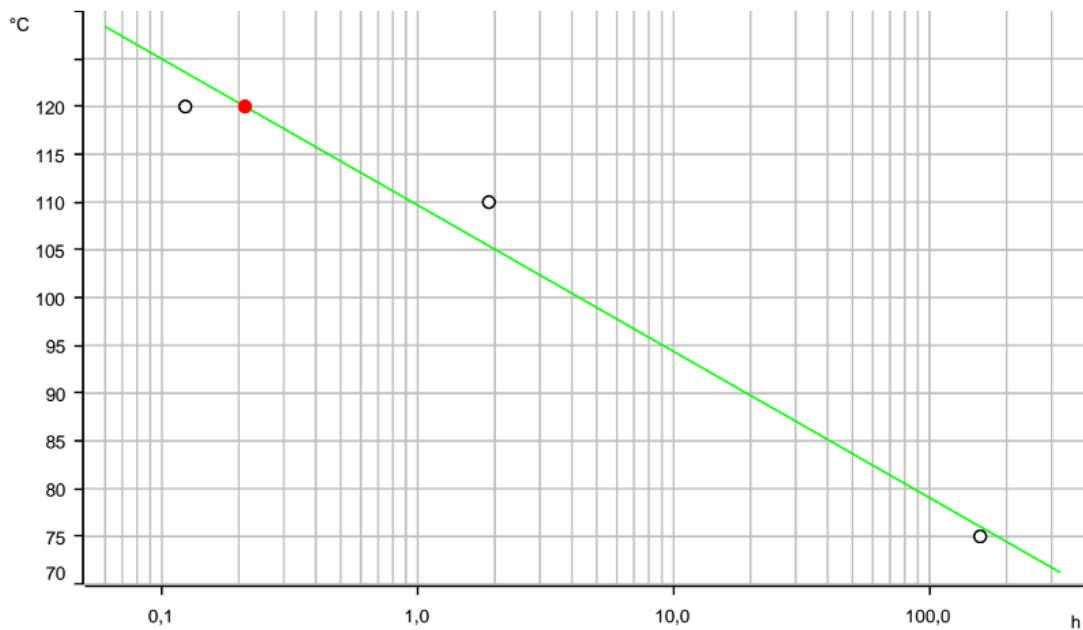


Figura 23. Diagrama de deterioro de la oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L.) comercial medido por método rancimat a temperaturas de 90°C, 110°C y 120°C

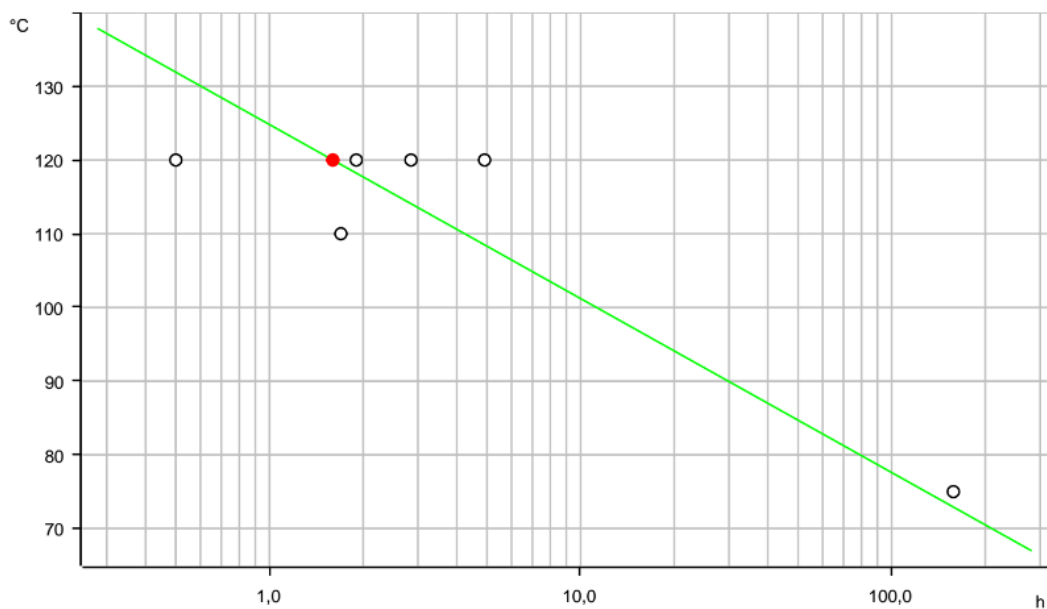
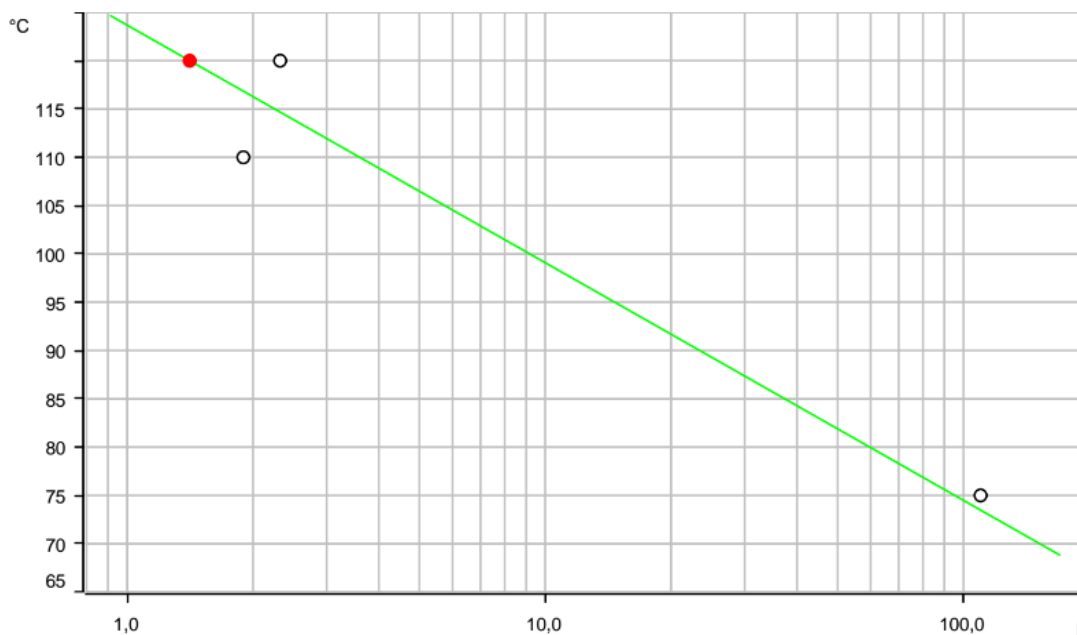


Figura 24. Diagrama de deterioro de la oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L) obtenida por FSC mediante método rancimat a temperaturas de 90°C, 110°C y 120°C



Labuza (1985) y Neter (1983), indicaron que la cantidad mínima de temperaturas para conducir un estudio de estabilidad y vida útil deberían ser tres. A partir de allí se establecieron los coeficientes de regresión útiles para el cálculo del Q_{10} (razón de las constantes de velocidad de reacción). Las oleorresinas comerciales tuvieron 2 veces mayor tasa de deterioro en comparación con las oleorresinas obtenidas por supercríticos, esto indica que tendrán menor vida útil. Comercialmente, los resultados de esta investigación son de gran valor puesto que se están generando materias primas estables en el tiempo, manteniendo sus características sensoriales casi intactas.

Basados en lo anterior, no solo las oleorresinas serían efectivas en la reducción de la oxidación lipídica sino que también podrían ser sustancias poderosas para minimizar la formación de aminas heterocíclicas en el caso de emplearse en la

elaboración de derivados cárnicos. Varios autores (Gibis, 2007; Rounds, Havens, Feinstein, Friedman, & Ravishankar, 2012; Smith, Ameri, & Gargil, 2008; Viegas, Amaro, Ferreira, & Pinho, 2012; Zeng et al., 2014), reportaron que las oleorresinas, los aceites esenciales y otros extractos de especias tienen un uso beneficioso en la inhibición de la rancidez oxidativa de los productos donde se aplique, especialmente en aquellos que tengan alto contenido de ácidos grasos. Tales beneficios podrían ser de utilidad en el momento de ofrecer productos a los consumidores, puesto que se generarían etiquetas limpias y productos más naturales.

Conclusiones y recomendaciones

De los factores experimentales tomados, la relación de la presión y la temperatura tuvieron incidencia significativa sobre el rendimiento de extracción y el contenido de piperina y cuminaldehído. Para oleorresina de comino las condiciones de operación optimizadas fueron 63°C, 346 bar y 53 min y para la oleorresina de pimienta negra los mejores resultados fueron 68°C, 328 bar y 90 min.

La alta capacidad antioxidante encontrada en las oleorresinas obtenidas por fluidos supercríticos, brindó la posibilidad de reducir la generación de productos provenientes de la oxidación lipídica al ser incluidas en formulaciones de condimentos destinados para la industria cárnica. En estudios posteriores, se identificará el efecto antioxidante y conservante de la adición de estos condimentos en productos procesados y madurados.

La tecnología de fluidos supercríticos permitió que se obtuvieran valores de 23,94% de cuminaldehído y 12,56% de piperina, además de brindar protección de su naturaleza sensorial. Esto fue importante para que los sabores y perfiles característicos de las especias pimienta negra y comino se mantuvieran durante su vida útil, tanto en presentación de oleorresina o como ingredientes de formulación de diferentes matrices alimenticias.

Los análisis sensoriales mostraron la diferencia entre las oleorresinas obtenidas por fluidos supercríticos y las obtenidas bajo otras tecnologías. En el tiempo, se identificaron sabores residuales en las oleorresinas comerciales atribuibles a los solventes de dilución donde se vehiculizan los productos para la venta, los ingredientes

que ayudan a mantener estable el sistema final de la oleorresina, la tecnología que involucra solventes orgánicos para la extracción de los componentes esperados y la falta de purificación requerida para minimizar trazas de residuales.

La vida útil estimada en función del cambio de color DE_{cmc} para las oleorresinas de pimienta negra y comino obtenidas por FSC fue de 7,51 meses y 7,73 meses respectivamente. En comparación con la vida útil de las oleorresinas comerciales cuyo valor es de 7 meses (según ficha técnica), se establece que los productos obtenidos en esta investigación son altamente competitivos y podrían ser una buena opción de reemplazo en formulaciones de condimentos.

Las características competitivas de las oleorresinas de pimienta negra y comino obtenidas en esta investigación al ser comparadas con patrones comerciales posicionados en el mercado, aportan para que Tecnas S.A. cree un portafolio de ingredientes propios que minimicen y/o reemplacen importaciones.

Para próximas investigaciones, podrían abordarse dos temas interesantes: **1.** identificar los componentes que cada presión de trabajo permite extraer y establecer parámetros de selectividad de sustancias específicas y **2.** Determinar el efecto de la adición de oleorresinas en procesados cárnicos como alternativa para reducir ingredientes que serán restringidos en la industria de alimentos tales como nitritos, fosfatos, eritorbato de sodio y antioxidantes como el BHT.

La adecuada estabilidad oxidativa que mostraron las oleorresinas obtenidas en esta investigación, comparadas con los patrones comerciales, indica que pueden ser aplicadas en matrices alimenticias no solo con la función de proporcionar sabor y

perfiles aromáticos especiados, sino que brindarán protección a la degradación de las grasas y proteínas.

Referencias

- Baidez, A., Gomez, J., & Ortuno, A. (2007). Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3373–3377
- Borges, P., & Pino, J. (1993). Preparation of black pepper oleoresin by alcohol extraction. *Nahrung*, 37 (2), 127–130.
- Brunner, M., Katona, R., Stefánka, Z., & Prohaska, T. (2010). Determination of the geographical origin of processed spice using multielement and isotopic pattern on the example of Szegedi paprika. *European Food and Research Technology*, 231, 623–634.
- Camel, V. The determination of pesticide residues and metabolites using supercritical fluid extraction. (1997). *Trends in Analytical Chemistry*, 16 (6), 351-369.
- Carlsen, M., Halvorsen, B., Holte, K., Bohn, S., Dragland, S., Sampson, L., et al. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, (9), 3. Recuperado de <http://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2891-9-3>.
- Charles, D. (2013). *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. New York: Springer.
- Chen, Q., Gan, Z., Zhao, J., Wang, Y., Zhang, S., Li, J., & Ni, Y. (2014). In vitro comparison of antioxidant capacity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) oils and their main components. *LWT Food Science and Technology*, 55, 632-637
- Chung, J.G., Garrett, L.R., Byers, P.E. & Cuchens, M.A. (1989). A survey of the amount of pristane in common fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2 (1), 22–27.

- Duarte, C., Moldão, M., Gouveia, A., Beirão, S., Leitão, A., & Bernardo, M. (2004). Supercritical fluid extractio of red pepper (*Capsicum frutescens* L.). *Journal of Supercritical Fluids*, 30, 155-161
- Duba, K., Casazza, A., Ben Mohamed, H., Perego, P., & Fiori, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 29–38.
- Farrell, K.T. (1985). En: *Spices, Condiments and Seasonings*. Westport, Connecticut: The AVI Publishing Co.
- Farhoost, R. (2007). El efecto de los parámetros operacionales del método rancimat en la determinación de las medidas de estabilidad oxidative y predicción de vida útil del aceite de soja. *Revista de la American Oils Chemists Society*, 84, 205-209.
- Ferreira, S., Meireles, M., & Cabral, F. (1993). Extraction of essential oil of black pepper with liquid carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 20, 121-133.
- Gibis, M. (2007). Effect of oil marinades with garlic, onion, and lemon juice on the formation of heterocycle aromatic amines in fried beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10240–10247.
- Guenther, E. (1950). *The Essential Oils*. New York: Van Nostrand Publishing Co.
- Han, X., Shen, T., & Lou H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8, 950–988.
- Herrero, M., Mendiola, J., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2495-2511
- Hirasa, K., & Takemasa, M. (1998). Cooking with spices. En: *Spice Science and Technology*. New York: Marcel Dekker.

- Jagella, T., & Grosch, W. (1999). Flavour and off flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.): Evaluation of potent odorants of black pepper by dilution and concentration techniques. *European Food Research and Technology*, 209 (1), 16–21.
- McNally, M. (1996). Method development in supercritical fluid extraction. *Journal of AOAC International*, 79 (2), 380-387.
- Mansurah, A., Ibrahim, S., Bolanle, D., & Abdulmalik, S. (2016). Black pepper (*Piper nigrum* L) oils. En: Victor Preedy (ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 277-284). Londres: Academic Press.
- Masisi, K., Beta, T., & Moghadasian, M. H. (2016). Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chemistry*, 196, 90-97.
- Menon, A.N. (2000). The aromatic compounds of pepper. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 22 (2/3), 185–190.
- Naik, S., Lentz, H., & Maheshwari, R. (1989). Extraction of perfumes and flavors from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor-equilibrium conditions. *Fluid Phase Equilibria*, 49, 115–126.
- Neter, J. (1983). *Applied linear regression models*. Illinois: Richard D. Irwin, Inc.
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., & Bacchiocca, M. (2005). Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *British Journal of Nutrition*, 93 (2), 257–266.
- Labuza, T., & Schmidt, M. (1985). Accelerated shelf life dating of foods. *Food Technology*, 39, 57-64.
- Luque-García, J., & Luque De Castro, M. (2003). Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 41–47.

- Oliveira, D., Angonese, M., Gomes, & Ferreira, C. (2016). Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. *Journal of Supercritical Fluids*, 111, 55–62.
- Peter, K. (2000). Diversification vital. En: Ram, N (ed.). *The Survey of Indian Agriculture* (pp. 83 – 84). India: Kasturi and Sons Ltd.
- Pruthi, J.S. (1976). *Spices and Condiments*. India: National Book Trust.
- Petropoulos, S., Daferera, D., Polissiou, M., & Passam, H. (2008). The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Scientia Horticulturae*, 115, 393–397.
- Pourmortazavi, S., Ghadiri, M., & Hajimirsadeghi, S. (2005). Supercritical fluid extraction of volatile components from *Bunium persicum* Boiss. (black cumin) and *Mespilus germanica* L. (medlar) seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 439-446
- Raghavan, S. (2007). *Handbook of spices, seasonings, and flavorings*. USA: CRC Press
- Ravindran, P. (2000). Introduction on black pepper. En: Ravindran, P.N. (ed.), *Black Pepper (Piper nigrum L.)* (pp. 1 - 22). Amsterdam: Harwood Academic.
- Ray, S., Etherton, K., Teeter, D., Chen, C., Heuvel, V., & West, S. (2011). A high antioxidant spice blend attenuates postprandial insulin and triglyceride responses and increases some plasma measures of antioxidant activity in healthy, overweight men. *Journal of Nutrition*, 141 (8), 1451-1457.
- Rounds, L., Havens, C., Feinstein, Y., Friedman, M., & Ravishankar, S. (2012). Plant extracts, spices, and essential oils inactivate *Escherichia coli* O157:H7 and reduce formation of potentially carcinogenic heterocyclic amines in cooked beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3792–3799.
- Shahidi, F., Janitha P., & Wanasundara, P. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 (1), 67-103.

- Shan, B., Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749–7759.
- Singh, G., Kapoor, I., Pandey, S., & Singh, G. (1998). Studies on essential oils – XIII: natural antioxidant for sunflower oil. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 57(3), 139–142.
- Singh, G., Marimuthu, P., Lampasona, M., & De Catalan, C. (2006). *Cuminum cyminum* L. Chemical constituents, antioxidant and antifungal studies on its volatile oil and acetone extract. *Indian Perfumer*, 50 (3), 31–39.
- Smith, J. S., Ameri, F., & Gargil, P. (2008). Effect of marinades on the formation of heterocyclic amines in grilled beef steaks. *Journal of Food Science*, 73, 100–105.
- Sowbhagya, H., Sathyendra, B., & Krishnamurthy, N. (2008). Evaluation of size reduction and expansion on yield and quality of cumin (*Cuminum cyminum*) seed oil. *Journal of Food Engineering*, 84, 595-600.
- Sreenivasulu, N., Grimm, B., Wobus, U., & Weschke, W. (2000). Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiologia Plantarum*, 109,435–442.
- Tainter, R., & Grenis, T.A. (1993). *Spices and Seasonings*. Food Science and Technology. New York: VCH Publishers.
- Traxler, J.T. (1971). Piperanine, a pungent component of black pepper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19 (6), 1135-1138.
- USDA. (2010). USDA database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods. *Release 2*, pp. 1–4

- Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., & Dietrich, H. (2006). Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Molecular Carcinogenesis*, 45, 164–174.
- Vidal, J., & Richard, H. (1987). Production of black pepper oleoresin by dense carbon dioxide or carbon dioxide-ethanol extraction. *Sciences des Aliments*, 7, 481-488.
- Viganó, J., Zobot, G., & Martínez, J. (2016). Supercritical fluid and pressurized liquid extractions of phytonutrients from passion fruit by-products: Economic evaluation of sequential multi-stage and single-stage processes. *Journal of Supercritical Fluids*, 122, 88–98.
- Viganó, J., Brumer, P.A., Braga, C., Da Silva, J.K., Maróstica, M., Reyes, F.G., & Martínez, J. (2016). Pressurized liquids extraction as an alternative process to readily obtain bioactive compounds from passion fruit rinds. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 382–390.
- Weiss, E.A. (2002). Umbelliferae. En Weiss, E. (ed.), *Spice Crops* (pp. 261–268). United Kingdom: CAB International.
- Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., & Prior, R. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026–4037.
- Zachariah, T.J. (1995). Essential oil and its major constituents in selected black pepper accessions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 22 (2), 151–153.
- Zheng, W., & Wang, S. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165–5170.
- Zeng, M., He, Z., Zheng, Z., Qin, F., Tao, G., Zhang, S., Gao, Y., & Chen, J. (2014). Effect of six Chinese spices on heterocyclic amine profiles in roast beef patties by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and principal component analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9908–9915.

Apéndices

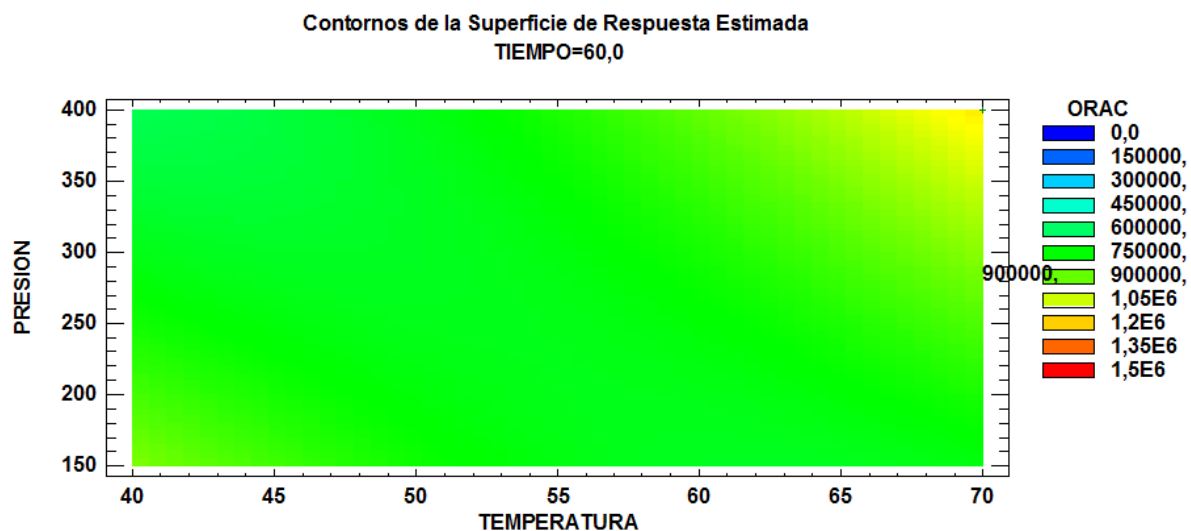
Apéndice A. Diseño experimental de Box Benhken para obtención de oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L.)

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	PRESIÓN (bar)	ORAC	CUMINALDEHIDO	RENDIMIENTO	ABTS
70	60	400				
55	60	275				
40	90	275				
55	60	275				
55	90	400				
70	60	150				
70	90	275				
55	30	150				
70	30	275				
40	60	400				
40	60	150				
40	30	275				
55	30	400				
55	60	275				
55	90	150				
70	60	400				
55	60	275				
40	90	275				
55	60	275				
55	90	400				
70	60	150				
70	90	275				
55	30	150				
70	30	275				
40	60	400				
40	60	150				
40	30	275				
55	30	400				
55	60	275				
55	90	150				

Apéndice B. Diseño experimental de Box Benhken para obtención de oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L.

TEMPERATURA (°C)	PRESIÓN (bar)	TIEMPO (min)	ORAC	RENDIMIENTO	PIPERINA	ABTS
55	385	60				
55	220	90				
55	550	90				
55	385	60				
70	550	60				
40	220	60				
55	550	30				
70	385	30				
55	220	30				
40	550	60				
55	385	60				
40	385	30				
70	220	60				
70	385	90				
40	385	90				
55	385	60				
55	220	90				
55	550	90				
55	385	60				
70	550	60				
40	220	60				
55	550	30				
70	385	30				
55	220	30				
40	550	60				
55	385	60				
40	385	30				
70	220	60				
70	385	90				
40	385	90				

Apéndice C. Gráfico de contornos de la superficie estimada para ORAC en oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L)



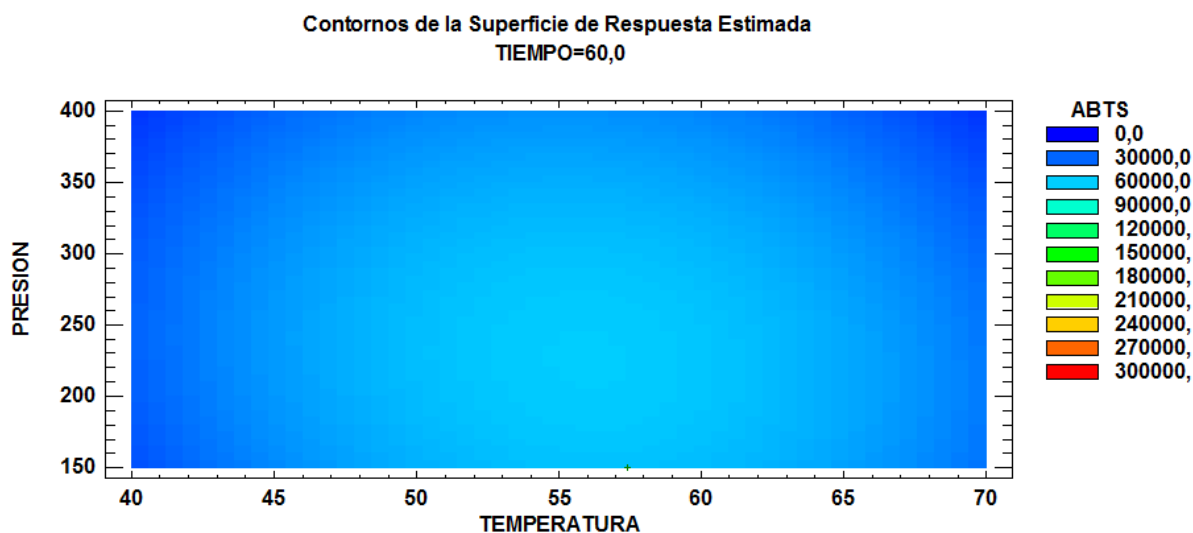
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar ORAC

Valor óptimo = 1,21443E6

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	40	70	70
Presión	150	400	400
Tiempo	30	90	30,4015

Apéndice D. Gráfico de contornos de la superficie estimada para ABTS en oleoresina de comino (*Cuminum cyminum* L)



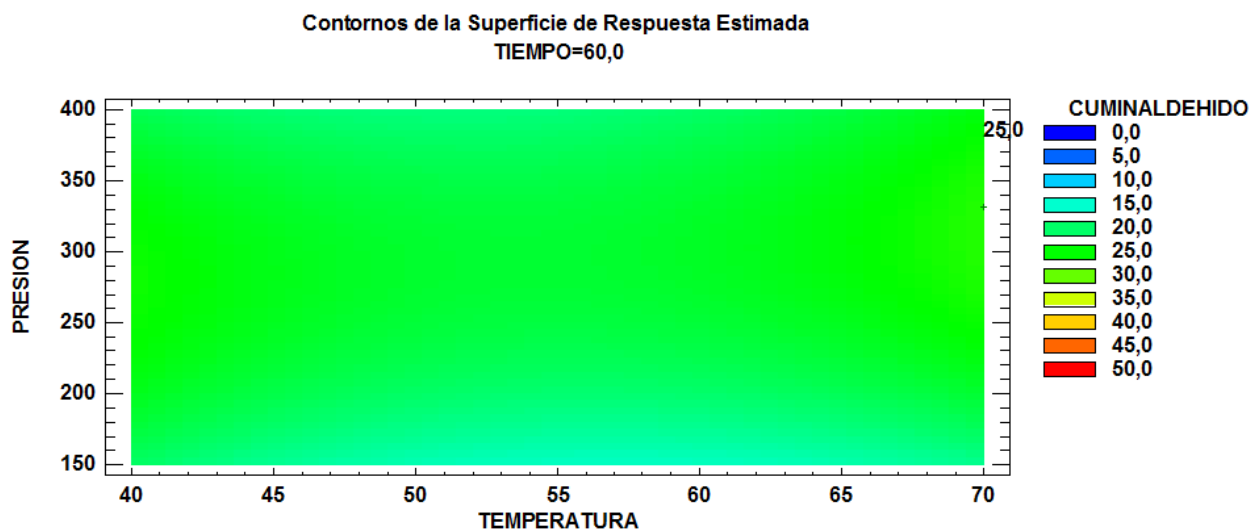
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar ABTS

Valor óptimo = 66660,9

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	40	70	57,4318
Presión	150	400	150,001
Tiempo	30	90	90

Apéndice E. Gráfico de contornos de la superficie estimada para % cuminaldehído en oleoresina de comino (*Cuminum cyminum* L)



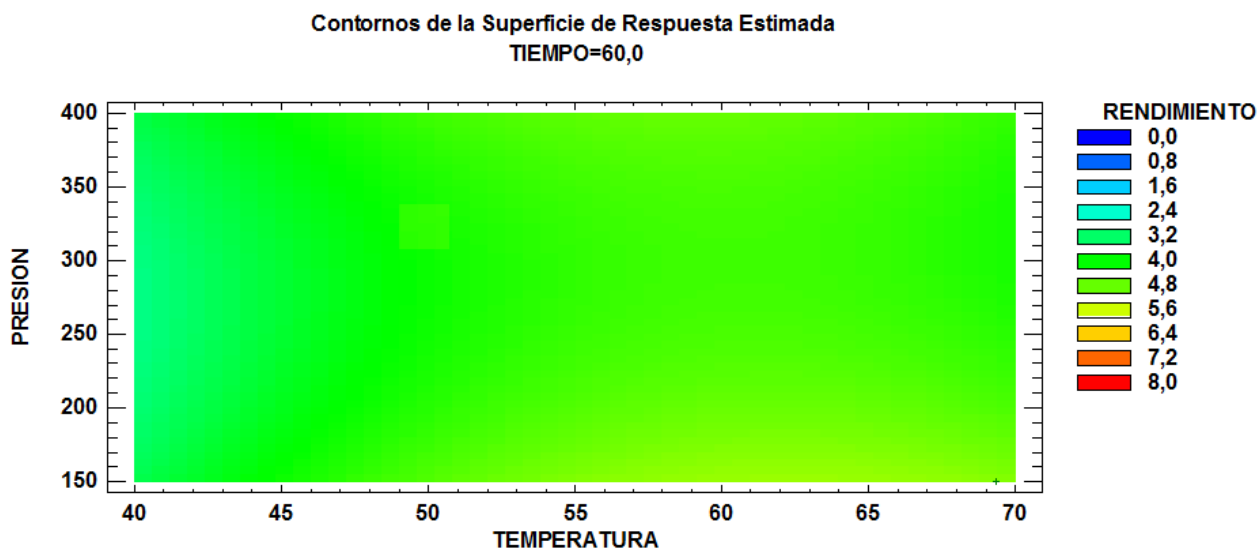
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar CUMINALDEHIDO

Valor óptimo = 27,6719

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	40	70	70
Presión	150	400	331,241
Tiempo	30	90	49,636

Apéndice F. Gráfico de contornos de la superficie estimada para % rendimiento en oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L)



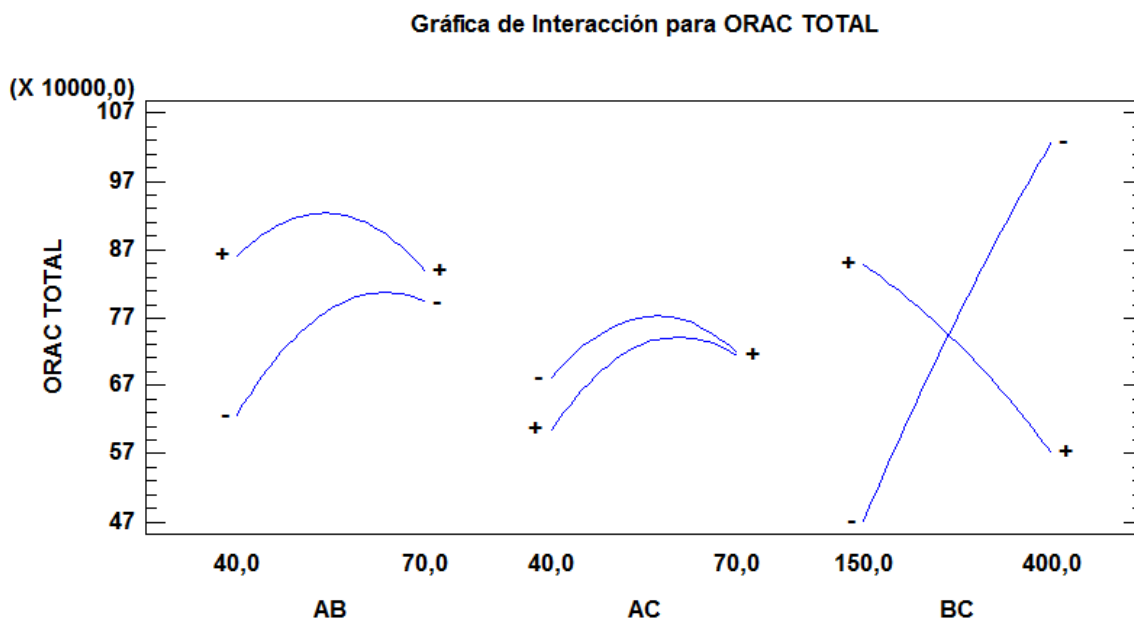
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar RENDIMIENTO

Valor óptimo = 6,05882

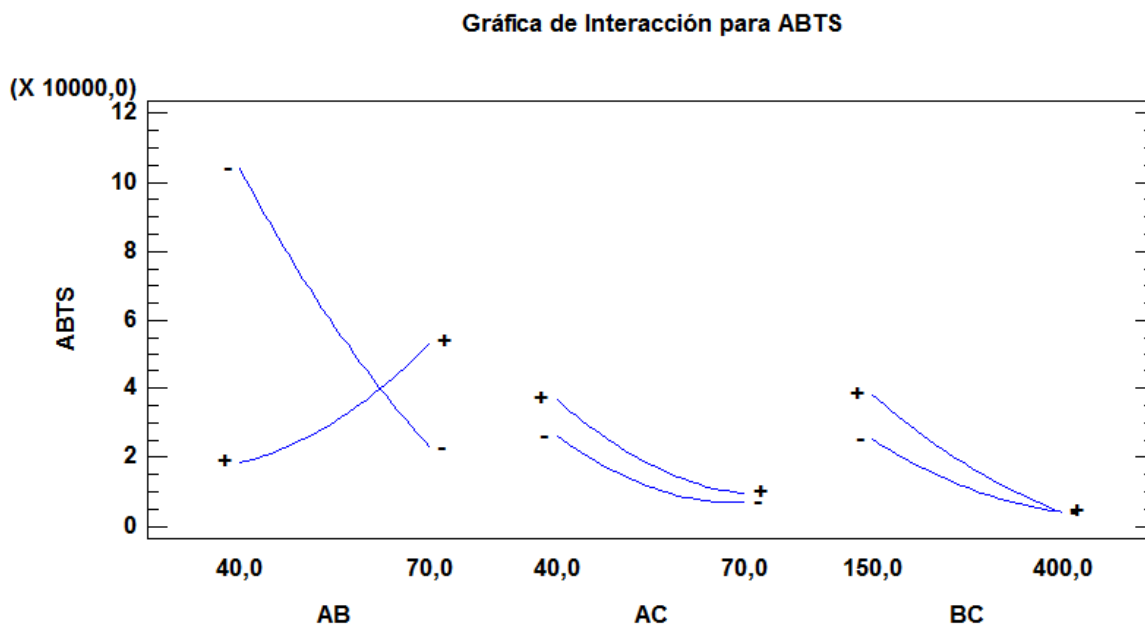
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	40	70	69,3287
Presión	150	400	150
Tiempo	30	90	89,9772

Apéndice G. Interacción de factores de proceso sobre la variable ORAC en oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L)



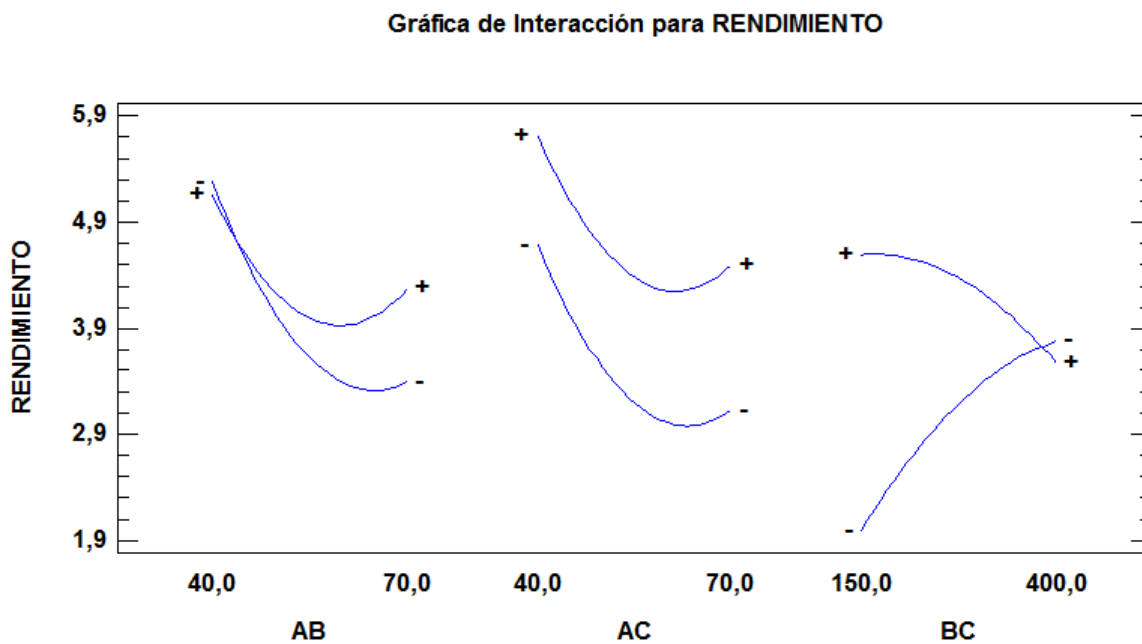
Donde A= Temperatura, B= Presión, C= Tiempo

Apéndice H. Interacción de factores de proceso sobre la variable ABTS en oleoresina de comino (*Cuminum cyminum* L)



Donde A= Temperatura, B= Presión, C= Tiempo

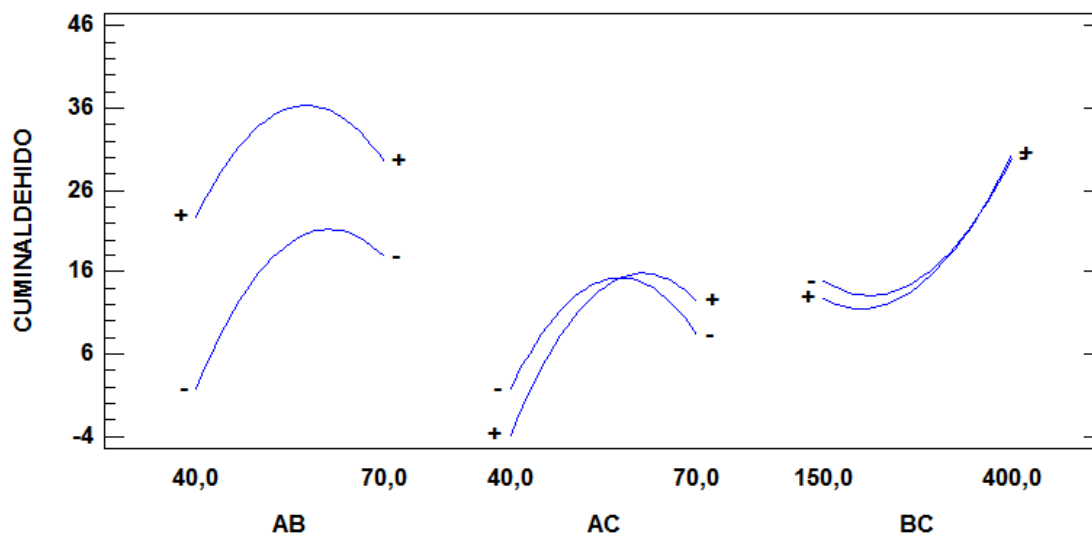
Apéndice I. Interacción de factores de proceso sobre la variable % rendimiento en oleorresina de comino (*Cuminum cyminum* L)



Donde A= Temperatura, B= Presión, C= Tiempo

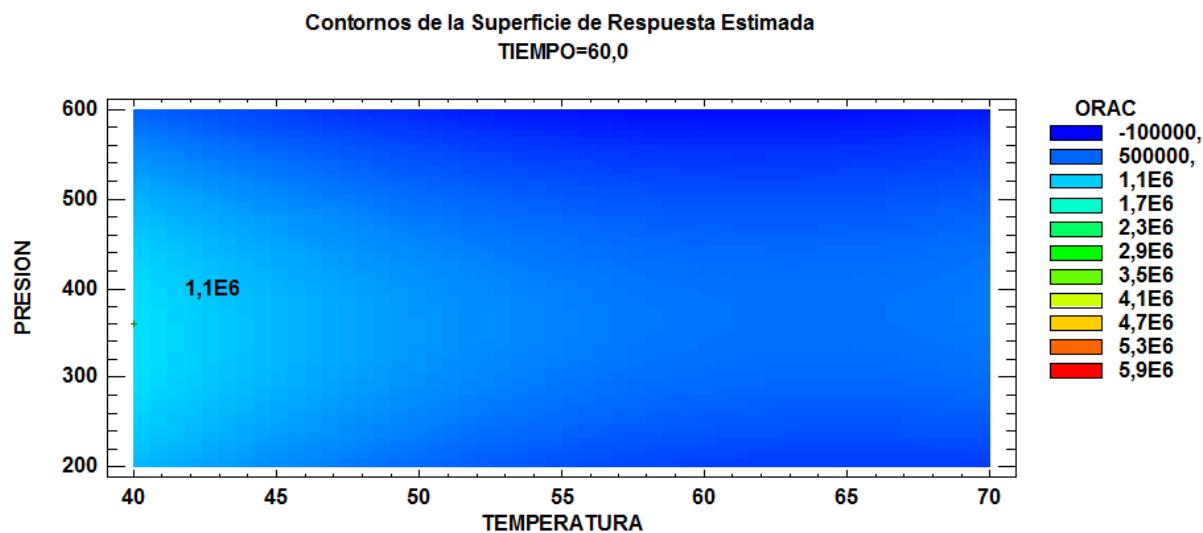
Apéndice J. Interacción de factores de proceso sobre la variable % cuminaldehído en oleoresina de comino (*Cuminum cyminum* L)

Gráfica de Interacción para CUMINALDEHIDO



Donde A= Temperatura, B= Presión, C= Tiempo

Apéndice K. Gráfico de contornos de la superficie estimada para ORAC en oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L)



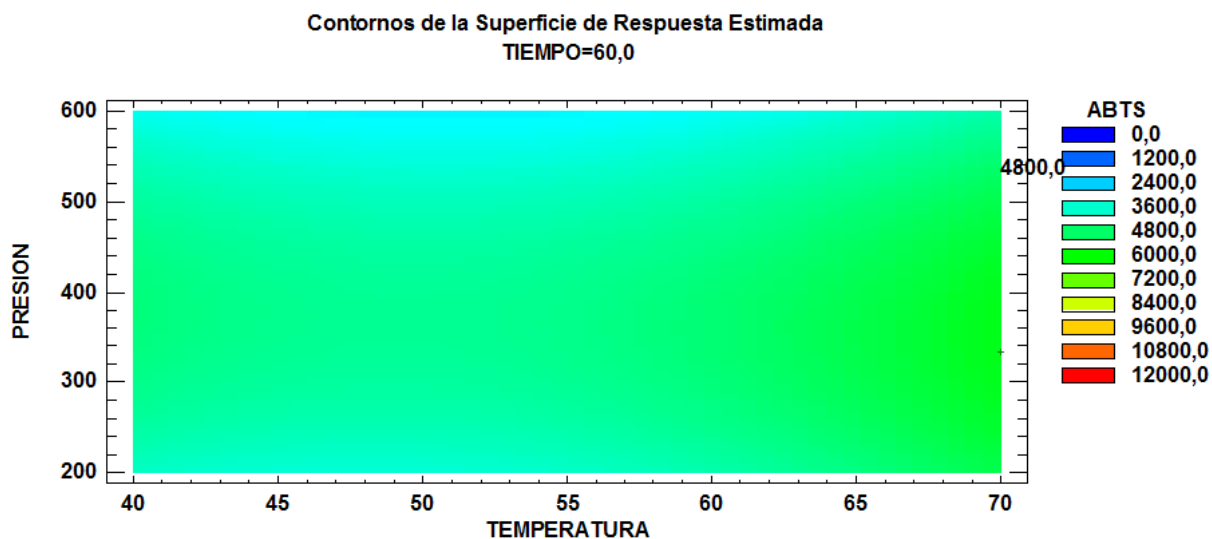
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar ORAC

Valor óptimo = 2,43768E6

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	40	70	40
Presión	200	550	359,645
Tiempo	30	90	90

Apéndice L. Gráfico de contornos de la superficie estimada para ABTS en oleoresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L)



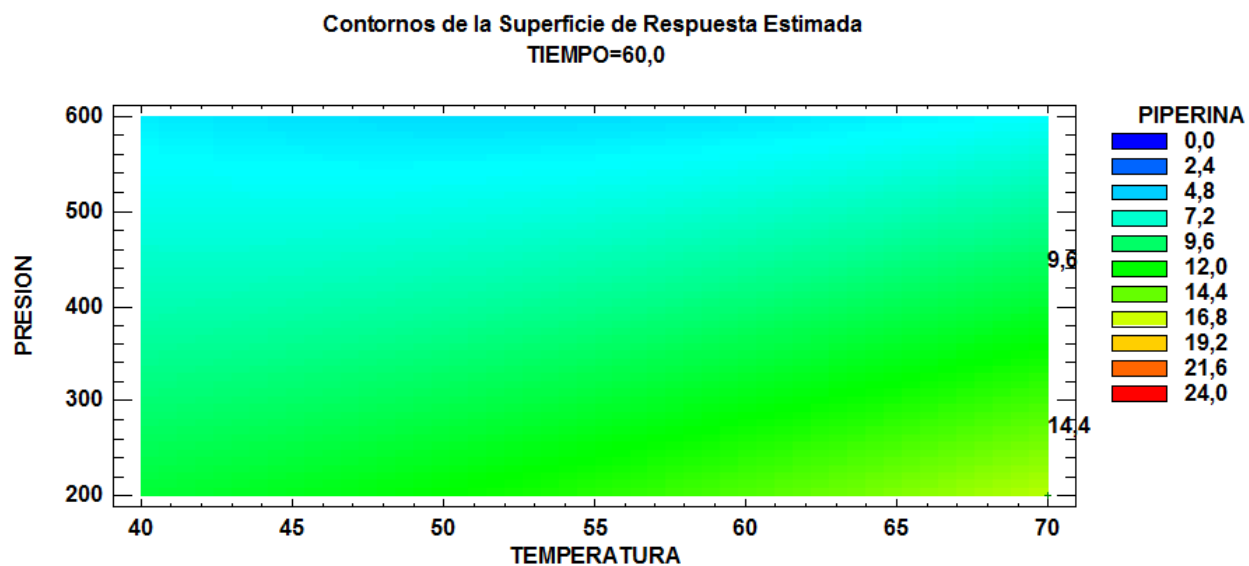
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar ABTS

Valor óptimo = 6413,67

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	40	70	70
Presión	200	550	332,468
Tiempo	30	90	89,9999

Apéndice M. Gráfico de contornos de la superficie estimada para % piperina en oleoresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L)



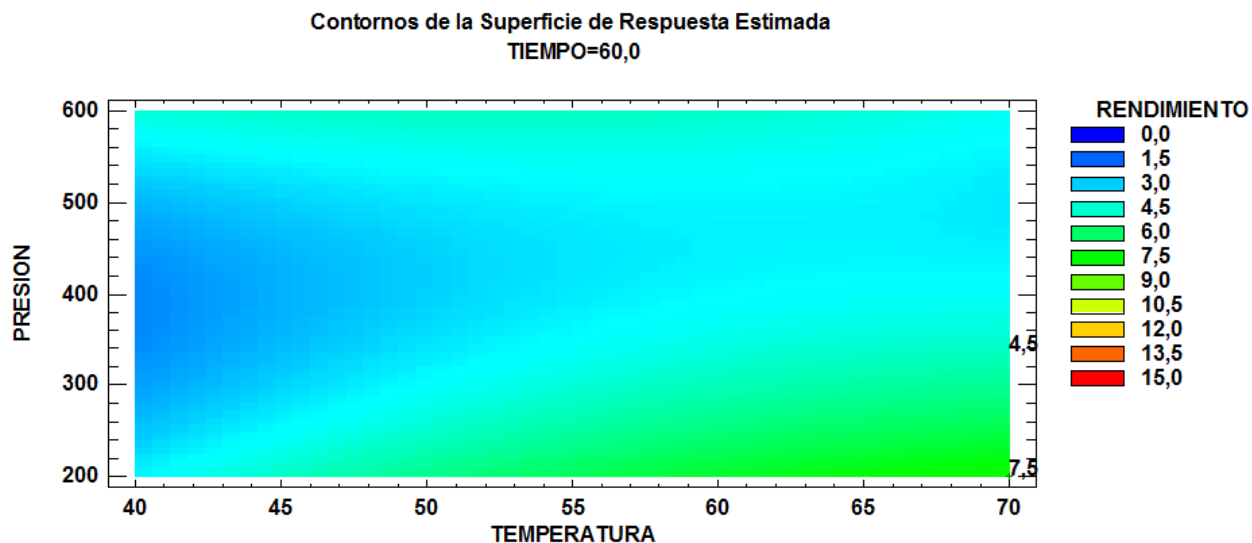
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar PIPERINA

Valor óptimo = 17,5184

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	40	70	69,9989
Presión	200	550	200
Tiempo	30	90	81,0513

Apéndice N. Gráfico de contornos de la superficie estimada para % rendimiento en oleoresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L)



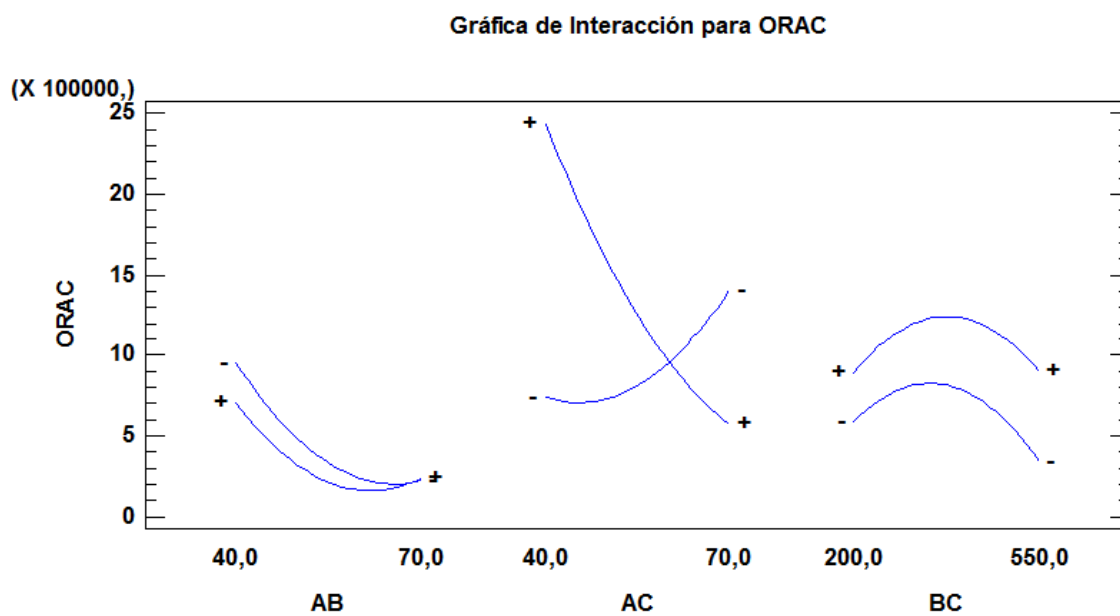
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar RENDIMIENTO

Valor óptimo = 10,6612

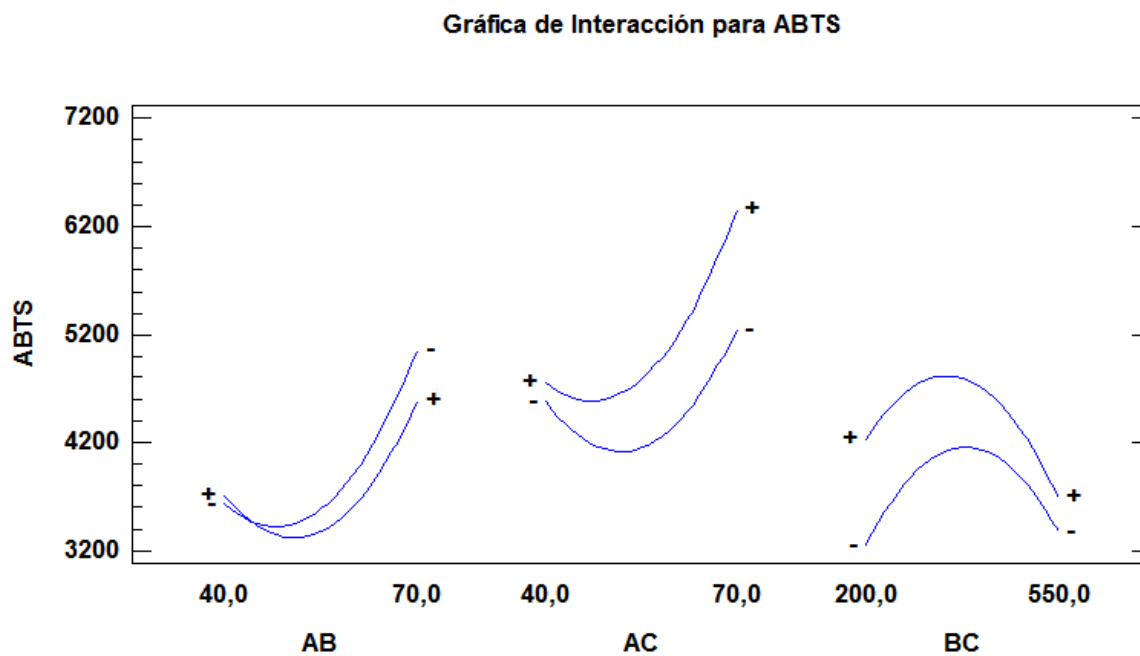
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	40	70	69,9949
Presión	200	550	200
Tiempo	30	90	30,6651

Apéndice O. Interacción de factores de proceso sobre la variable ORAC en oleorresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L)



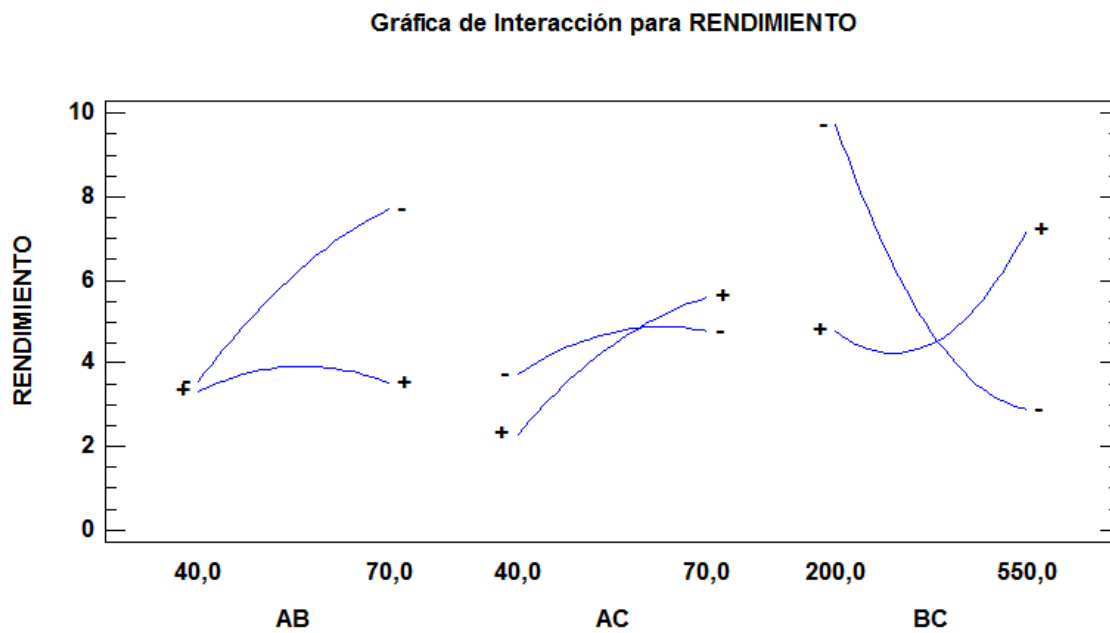
Donde A= Temperatura, B= Presión, C= Tiempo

Apéndice P. Interacción de factores de proceso sobre la variable ABTS en oleoresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L)



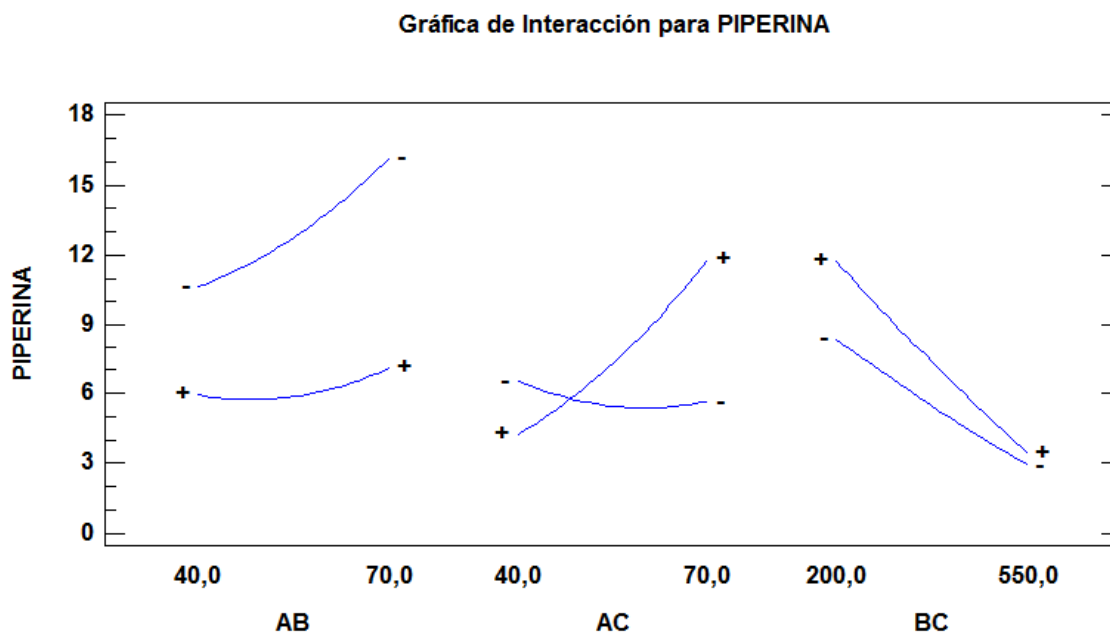
Donde A= Temperatura, B= Presión, C= Tiempo

Apéndice Q. Interacción de factores de proceso sobre la variable % rendimiento en oleoresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L)



Donde A= Temperatura, B= Presión, C= Tiempo

Apéndice R. Interacción de factores de proceso sobre la variable % piperina en oleoresina de pimienta negra (*Piper nigrum* L)



Donde A= Temperatura, B= Presión, C= Tiempo