



# Producción limpia de conservantes orgánicos para la industria de alimentos obtenidos a partir de la extracción de componentes bio-activos de la semilla del algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linneaus), utilizando las tecnologías de fluidos supercríticos y Soxhlet

Luz María Alzate Tamayo<sup>1</sup>, Catalina Vélez Argumedo<sup>2</sup>, Yamilé Jaramillo Garcés<sup>2</sup>,  
Maritza Andrea Gil Garzón<sup>3</sup>, Diana María Arteaga González<sup>4</sup>,  
Leonidas De Jesus Millan Cardona<sup>5</sup>

Línea de investigación Productos Naturales. Grupo de investigación GRIAL.  
Corporación Universitaria Lasallista

*Cleaner production of organic preservatives for food industries obtained by extracting bio-active components from the carob seed (*Hymenaea courbaril* Linneaus), by the use of supercritical fluids and Soxhlet techniques*

*Produção limpa de conservantes orgânicos para indústria de alimentos obtidos a partir da extração de componentes bio- ativos da semente do algarobeira (*Hymenaea courbaril* Linneaus), utilizando as tecnologias de fluidos Supercríticos e Soxhlet.*

---

<sup>1</sup>Ingeniera de Alimentos, Especialista en aseguramiento de la calidad microbiológica. Docente del Programa de Ingeniería de Alimentos, Corporación Universitaria Lasallista. <sup>2</sup>Estudiantes del programa de Ingeniería de Alimentos. Corporación Universitaria Lasallista. <sup>3</sup>Ingeniera de Alimentos. Magíster en Ciencia-Química. Docente Coordinadora del Programa de Ingeniería de Alimentos, Corporación Universitaria Lasallista. <sup>4</sup>Ingeniera de Alimentos. Docente del Programa de Ingeniería de Alimentos, Corporación Universitaria Lasallista. <sup>5</sup>Ingeniero Industrial, Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Docente del Programa de Ingeniería de Alimentos, Corporación Universitaria Lasallista.

## RESUMEN

**Introducción.** El algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) es una planta conocida por sus diferentes propiedades antimicóticas, moluscicidas, nutricionales y protectoras, que pueden ser aplicadas en la industria de los alimentos.

**Objetivo.** Este trabajo consiste en la extracción de los compuestos bioactivos de la semilla del árbol de algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*), por medio de Soxhlet con solventes polares y no polares, y a través de fluidos supercríticos con dióxido de carbono (FSC-CO<sub>2</sub>) para evaluar sus propiedades antimicrobianas sobre la *Escherichia coli* ATCC 25922 y determinar los rendimientos de cada extracción.

**Materiales y Métodos.** Las semillas de algarrobo fueron molidas, tamizadas y caracterizadas antes de realizarse los ensayos respectivos. Posteriormente se compararon los rendimientos del componente inhibitorio extraído por dos técnicas: Soxhlet y Fluidos Supercríticos, para determinar su espectro de acción antimicrobiano a diferentes concentraciones (%v/v) (100%, 50%, 10%). Para el estudio de los datos obtenidos se empleó el método de análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la variable respuesta rendimiento (%) y de dos vías para la variable respuesta análisis microbiológico.

**Resultados.** El análisis de rendimiento (%) presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre cada extracto obtenido. Para el análisis microbiológico (longitud de halo de inhibición en cm) presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los extractos y para las concentraciones evaluadas.

**Conclusión.** Los compuestos bioactivos de la semilla del algarrobo presentan actividad antimicrobiana sobre la *E. Coli*. Estos compuestos son solubles en etanol y su rendimiento es optimizado mediante una extracción previa a través de una tecnología de producción más limpia como FSC-CO<sub>2</sub>.

**Palabras clave:** Algarrobo, *Hymenaea courbaril Linneaus*, soxhlet, fluidos supercríticos, conservante, aditivo, *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

**Introduction.** Carob (*Hymenaea courbaril Linneaus*) is a plant known because of its several antifungal, molluscicide, nutritional and protective properties, all of which can be applied in food industries.

**Objective.** This research work is made extracting the bioactive components of carob seeds, by the use of Soxhlet with polar and non- polar solvents and supercritical fluids with carbon dioxide (FSC-CO<sub>2</sub>) to evaluate its antimicrobial properties on *Escherichia coli* ATCC 25922 and determine the performance of every extraction.

**Materials and methods.** The carob seeds were smashed and characterized before the respective tests. Then, the performances of the inhibitory component extracted were compared. The extraction was made by the use of two methods: Soxhlet and Supercritical Fluids, to determine the antimicrobial action spectrum at different concentrations (%v/v) (100%, 50%, 10%). To study the data obtained, the one way variance analysis method (ANOVA) was used for the performance response variable (%) and the two ways method for the microbiological analysis variable.

**Results.** The performance analysis (%) had significant differences ( $p < 0.05$ ) between each extract obtained for the microbiological analysis (length of inhibition halo in cm). The same happened ( $p < 0.05$ ) between extracts and for the concentrations evaluated.

**Conclusion.** The bioactive compounds of the carob seed have an antimicrobial activity on *E. Coli*. These compounds are soluble in ethanol and their performance is optimized by a previous extraction by the use of a cleaner production technology, like FSC-CO<sub>2</sub>.

**Key words:** Carob, *Hymenaea courbaril Linneaus*, Soxhlet, supercritical fluids, preservative, additive, *Escherichia coli*.

## RESUMO

**Introdução.** O algarobeira (*Hymenaea courbaril Linneaus*) é uma planta conhecida por suas diferentes propriedades anti-micóticas, moluscicidas, nutricionais e protetoras que podem ser aplicadas na indústria dos alimentos.

**Objetivo.** Este trabalho consiste na extração dos compostos bio- ativos da semente da árvore de algarobeira (*Hymenaea courbaril Linneaus*), por meio de Soxhlet com solventes polares e não polares, e através de fluidos supercríticos com dióxido de carbono (FSC-CO<sub>2</sub>), para avaliar suas propriedades antimicrobianas sobre a *Escherichia coli*. ATCC 25922 e determinar os rendimentos de cada extração.

**Materiais e Métodos.** As sementes de algarobeira foram trituradas e caracterizadas antes de realizarem-se os ensaios respectivos. Posteriormente, compararam-se os rendimentos do componente inibitório extraído por duas técnicas: Soxhlet e Fluidos Super Críticos, para determinar seu espectro de ação antimicrobiano a diferentes concentrações (%v/v) (100%, 50%, 10%). Para o estudo dos dados obtidos se emprego o método de análise de variância (ANOVA) de uma via para a variável resposta rendimento (%) e de duas vias para a variável resposta Análise Microbiológico.

**Resultados.** A análise de rendimento (%) apresentou diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre cada extrato obtido, para a análise microbiológica (longitude de halo de inibição em cm) apresentou diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os extratos e para as concentrações avaliadas.

**Conclusão.** Os compostos bio- ativos da semente do algarobeira apresentam atividade antimicrobiana sobre a *E. Coli*. Estes compostos são solúveis em etanol e seu rendimento é otimizado mediante uma extração prévia através de uma tecnologia de produção mais limpa como FSC-CO<sub>2</sub>.

**Palavras importantes:** Algarobeira, *Hymenaea courbaril Linneaus*, soxhlet, fluidos supercríticos, conservante, aditivo, *Escherichia coli*.

## INTRODUCCIÓN

Los aditivos son sustancias añadidas intencionalmente a los alimentos para mejorar su estabilidad, propiedades organolépticas o nutritivas. Entre los aditivos más importantes se encuentran los edulcorantes, los acidulantes, los

antioxidantes, los emulgentes, los colorantes, los nutrientes, los aromas y sabores y los antimicrobianos también llamados “conservantes” o “preservativos”<sup>1</sup>. El uso de éstos últimos está restringido y sólo los de un grupo de origen químico (anhídrido sulfuroso y bisulfitos, ácido benzoico, ácido acético, ácido propiónico, ácido sórbico, ésteres del ácido *p*-hidroxi-benzoico, nitritos y nitratos) y biológico (nisina, natamicina, tetraciclinas, piramicina), pueden ser utilizados en casos determinados según las reglamentaciones específicas y, en ningún caso, pueden utilizarse para enmascarar malas técnicas sanitarias<sup>1</sup>.

Los compuestos naturales con propiedades antimicrobianas son utilizados como alternativa para prolongar la estabilidad de algunos alimentos frente a la invasión de microorganismos. Algunos aceites esenciales obtenidos de productos naturales poseen compuestos activos responsables de la actividad antimicrobiana, como el eugenol, que se encuentra en el clavo, la alisina en el ajo, el aldehído cinámico y eugenol en la canela, el isotiocianato de alilo en la mostaza, el eugenol y el timol en la salvia, el carvacrol (isotimol) y el timol en el orégano<sup>2</sup>, los derivados del ácido hidroxicinámico (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico y ácido clorógeno) que se encuentran en las frutas, las hortalizas, el té, la melaza y en otras fuentes vegetales, los cuales se caracterizan por presentar actividad antibacteriana y, algunos, actividad antifúngica<sup>3</sup>.

El algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) es una planta de interés por sus diferentes propiedades protectoras, que pueden ser aplicadas en la industria de los alimentos. La actividad antimicótica sobre un amplio rango de levaduras incluyendo *Candida* es una de las propiedades más representativas<sup>4, 5</sup>. Otros estudios clínicos que han sido desarrollados desde los 70's han mostrado que tiene propiedades antimicrobianas, molusquicidas (destruye y controla caracoles y babosas). El algarrobo es conocido a nivel popular por el efecto repelente sobre insectos comedores de hojas<sup>6</sup>, por su actividad hipoglicémica produciendo una reducción significativa de los niveles de azúcar en la sangre a partir del extracto de las hojas<sup>7</sup> y, además, por la acción antidiarreica encontrada en la corteza del algarrobo<sup>8, 9</sup>. A nivel industrial, las semillas y el fruto son empleados como laxantes en preparaciones farmacéuticas<sup>10, 11</sup>.

Al observar el impacto de los compuestos bioquímicos de la *Hymenaea courbaril Linneaus* y la necesidad de la industria de alimentos por desarrollar compuestos naturales que sirvan como conservantes o preservativos de los productos alimenticios, se desea desarrollar un antimicrobiano a partir de la semilla del algarrobo.

El objetivo de este trabajo consiste en la extracción de los compuestos bioactivos de la semilla del árbol del algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) por medio de Soxhlet, con solventes polares y no polares, y a través de fluidos supercríticos con CO<sub>2</sub>, para evaluar sus propiedades antimicrobianas sobre la *Escherichia coli*. ATCC 25922 y determinar los rendimientos de cada extracción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Caracterización de la materia prima

Las semillas de algarrobo fueron trituradas en molinos CS-BELL.CO y tamizadas (malla No. 40) antes de ser sometidas al análisis experimental. La semilla molida fue caracterizada por medio de pruebas fisicoquímicas (acidez, pH, °Brix, actividad acuosa (Aw), densidad), y pruebas bromatológicas (humedad, fibra, grasa, carbohidratos (CHO), cenizas, proteína cruda)<sup>12</sup>.

### Extracción del componente inhibitorio

En esta etapa se extraen, con los diferentes solventes grado analíticos (MERCK), los componentes con capacidad antimicrobiana del fruto del algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*), comparando los resultados de los procesos de extracción mediante fluidos supercríticos y Soxhlet<sup>13</sup>.

En primera instancia se realizan extracciones por medio de Soxhlet a una temperatura de 175°C durante 150 min. utilizando como solventes etanol y hexano para evaluar su rendimiento y capacidad inhibitoria. Posteriormente se realiza una extracción por fluidos supercríticos, en un equipo (THAR) con un cilindro extractor de 1 L y dos cilindros receptores, las condiciones de extracción fueron 300 bar y 70°C, empleando como solvente el monóxido de carbono CO<sub>2</sub>, con una pureza de 99.9% (AGAFANO). El residuo obtenido de la semilla es sometido a una extracción por Soxhlet nuevamente con etanol<sup>12</sup>.

### Medición de la capacidad antimicrobiana

Se evalúa la capacidad antimicrobiana inhibitoria sobre *Escherichia coli* ATCC 25922. La técnica empleada fue difusión en pozos<sup>14</sup> con algunas modificaciones. Un horno MEMMERT fue empleado para la incubación a 37 °C.

La eficacia de los extractos fue evaluada analizando su capacidad antimicrobiana a diferentes concentraciones (10, 50, 100 %v/v), mediante la técnica mencionada<sup>14</sup>, para determinar cuál de estos presentaba una mayor capacidad.

### Diseño experimental

La semilla es dividida en 3 lotes. De cada uno de estos lotes se realiza una extracción, de la siguiente manera:

- Extracción por Soxhlet (solvente hexano): Lote 1, lote 2, lote 3.
- Extracción por Soxhlet (solvente etanol): Lote 1, lote 2, lote 3.
- Extracción por fluidos supercríticos (solvente CO<sub>2</sub>): Lote 1, lote 2, lote 3.
- Extracción por Soxhlet de la semilla residual de fluidos supercríticos (solvente etanol): Lote 1, lote 2, lote 3.

Para el estudio de los datos se empleó el programa Statgraphics Centurion versión 15 y el método utilizado fue análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la variable respuesta rendimiento (%) y análisis de varianza de dos vías para la variable respuesta análisis microbiológico (Longitud de halo de inhibición en cm). Los modelos anteriores se trabajaron con un nivel de confianza del 95% y un

nivel de potencia para detectar diferencias significativas del 90%. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de la materia prima

En las tablas 1 y 2 se muestra el análisis fisicoquímico y bromatológico realizado a la materia prima molida y homogenizada antes de ser sometida a cada una de las extracciones, con el fin de reproducir las condiciones de ensayo y facilitar el desarrollo de futuras investigaciones.

**Tabla 1. Análisis bromatológico de la materia prima antes de ser sometido a extracciones**

Análisis bromatológico	
% Grasas	4,006
%Proteína	6,779
%Fibra	9,687
%Cenizas	7,619
%Humedad	25,048
%CHO	46,862

**Tabla 2. Análisis fisicoquímico de la materia prima antes de ser sometido a extracciones**

Análisis fisicoquímico		
Acidez	14,537	±0,038
pH	5,463	±0,038
°Brix	6,400	±3,279
Aw	0,543	±0,005
Densidad	0,505	±0,037

### Extracción y determinación del componente inhibitorio y diseño experimental

El análisis de varianza para las variables respuesta rendimiento (%) y el análisis microbiológico (longitud de halo de inhibición en cm) presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para los extractos obtenidos por los dos métodos evaluados. Los extractos analizados a diferentes concentraciones también presentaron diferencias significativas.

En la gráfica a de la figura 1 se observa cómo el rendimiento obtenido por medio de la extracción con FSC-CO<sub>2</sub> presentó el valor más bajo en comparación con las extracciones realizadas por Soxhlet. Este mismo comportamiento también es observado con la extracción de algunas oleorresinas con propiedades funcionales obtenidas por los mismos métodos<sup>15</sup>, pero al realizar la extracción etanólica a las semillas residuales resultantes de la extracción por fluidos supercríticos se nota un aumento en el rendimiento final de los compuestos bioactivos. Este resultado tiene como fundamento químico que al retirar los compuestos no polares por medio del CO<sub>2</sub> supercrítico a las condiciones de presión y temperatura analizadas, las semillas concentran el contenido de compuestos polares. De allí que la respuesta

presente menores diferencias significativas al comparar los resultados obtenidos con un solvente más polar, como el etanol.

El efecto inhibitorio de las semillas del árbol del algarrobo se observa en el gráfico b de la figura 1, donde los compuestos extraídos con etanol a partir de las semillas secas y molidas y de las semillas residuales resultantes de la extracción por FSC, presentaron la mayor longitud de halo de inhibición. Los valores máximos obtenidos a una concentración de 100% ( $1.8 \pm 0.1$  cm) se encuentran cercanos a la longitud del halo de inhibición de la ampicilina (3.0 cm) y por encima de ensayos realizados con aceites extraídos de productos cítricos (0.5 cm)<sup>16</sup>.

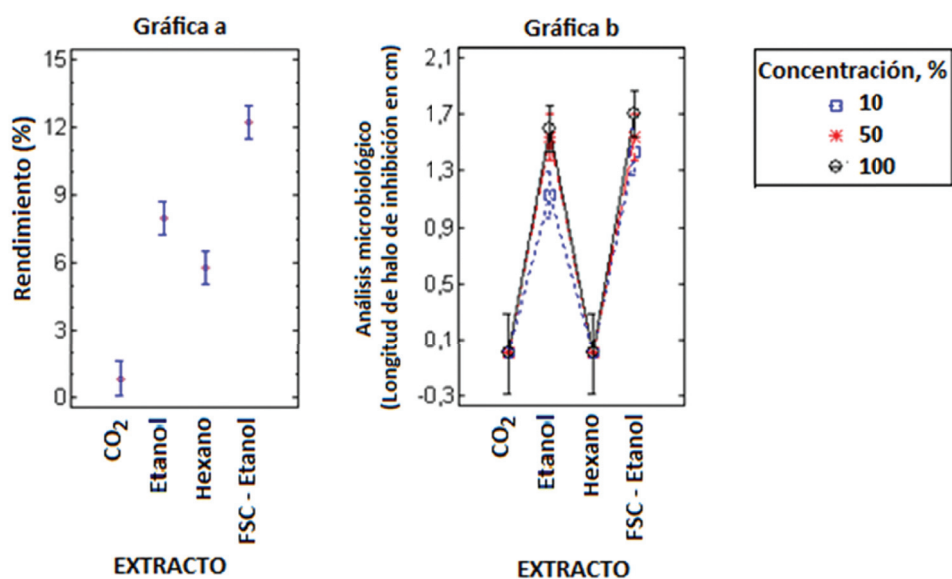


Figura 1. a. Rendimiento vs extracto. b. Microbiología vs extracto y concentración, intervalos LSD

Dada la polaridad del etanol se evidencia la afinidad de los compuestos bioactivos en solventes polares. Caso contrario ocurre con el hexano y el CO<sub>2</sub> supercrítico, los cuales no presentaron ninguna actividad inhibitoria.

## CONCLUSIÓN

Los componentes bioactivos presentes en la semilla de algarrobo poseen capacidad antimicrobiana sobre la enterobacteria *E.Coli* ATCC 25922. Estos resultados son una nueva alternativa natural para el reemplazo de los compuestos químicos empleados en la industria de alimentos como agentes antimicrobianos.

El etanol es el mejor solvente para la extracción, por su polaridad, y el rendimiento puede ser mejorado sometiendo las semillas a una extracción previa mediante FSC-CO<sub>2</sub>.

Para futuras investigaciones se recomienda utilizar la técnica de extracción por FSC utilizando como solvente una mezcla de etanol y CO<sub>2</sub>, para garantizar 100% de pureza en el extracto final.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto **Determinación de las propiedades conservantes de la Pulpa de Algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) para la industria de alimentos** (Código 22109), de la Corporación Universitaria Lasallista; al Laboratorio de Química y Biología de la Corporación Universitaria Lasallista y al Laboratorio de Materiales de la Universidad Pontificia Bolivariana.

## BIBLIOGRAFÍA

1. PRIMO YÚFERA, Eduardo. Química de los alimentos. Madrid: Síntesis S.A, 1997, p. 450.
2. GUPTA, Neal S., et al. Molecular preservation of plant and insect cuticles from the Oligocene Enspel Formation, Germany: Evidence against derivation of aliphatic polymer from sediment. En: Organic Geochemistry. 2007, vol 38, no. 1, p 404-418.
3. JAY, James M. Microbiología moderna de los alimentos. 3ª ed. España: Acribia, 1994. p. 804.
4. CRUZ, M.C.S, et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. En: Journal of Ethnopharmacology. May, 2007, vol. 111, no 2, p. 409-412.
5. DUQUE, James A. *Hymenaea courbaril*. [en línea] Indiana: Universidad de Purdue, 1983. [citado 13 junio 2008]. Disponible en: [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Hymenaea\\_courbaril.html#Uses](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hymenaea_courbaril.html#Uses)
6. PERU. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA. Azúcar Huayo. [en línea] Perú: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, s.f. [citado 13 junio 2008]. Disponible en: <http://www.unapikitos.edu.pe/.../docentes/archivos/ZUCAR%20HUAYO.doc?PHPPHPSES=002265285e96190d918f597b9d47009>.
7. RAIN TREE NUTRITION. Jatobá. [en línea] Carson city: Raintree Nutrition Inc, 1996. [Actualizada 18 enero 2007]. [citado 24 junio 2008]. Disponible en: <http://www.rain-tree.com/jatoba.htm>



8. HEALTHNOTES Algarrobo (Carob). [en línea] Sine loco: HEALTHNOTES, 2004. [citado 3 julio 2008]. Disponible en: [http://www.puritan.com/vf/healthnotes/HN\\_Live/Spanish/Es-Herb/Carob.htm](http://www.puritan.com/vf/healthnotes/HN_Live/Spanish/Es-Herb/Carob.htm)
9. PERES, V. and NAGEM, T. J. Trioxygenated naturally occurring xanthenes. En: *Phytochemistry*. January, 1997, vol. 44, no. 2, p. 191-214
10. FONT QUER, Pío. *Plantas medicinales: dioscórides renovado*. 4ªed. Barcelona: Península, 2002. p. 1184.
11. QUIRCE, Santiago, *et al.* Occupational asthma caused by tali and jatoba wood dusts. En: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. February, 2004, vol. 113, no. 2, p. 361- 363
12. HORWITZ, William. *Official methods of analysis of AOAC Interational*. Gaithersburg: AOAC, 2007.
13. ESQUIVEL F, Angélica y VARGAS, Pedro. Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales.: En: *Tecnología en Marcha*[En Linea]Vol.20 N°4, Octubre/Diciembre 2007. p 41-50 [itcr.ac.cr/publicaciones/tecnología\\_marcha/pdf/tecnología\\_marcha\\_24-4/20-4%2041-50.pdf](http://itcr.ac.cr/publicaciones/tecnología_marcha/pdf/tecnología_marcha_24-4/20-4%2041-50.pdf)[citado en Noviembre de 2008]
14. MONTVILLE, T. J. and CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. November, 1998, vol. 50, no. 5, p.511-519.
15. DURÁN, Melvin; GONZALEZ, Paula y CARDONA, Leonardo. Obtención y caracterización de la oleoresina del ajo (*allium sativum*). En: *Scientia et Technica*. Diciembre, 2007, vol. 13, no. 37, p.551–555.
16. RAMÍREZ A., Luz S. y DIAZ B., Hilda E. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones de ruibarbo (*rumex conglomeratus*). En: *Scientia et Technica*. 2007, vol. 13, no. 33, p.397–400.