



UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“Efecto de pre-tratamientos en hojas de *Leptocarpha rivularis* (palo negro) como
acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”**

NATALI SOLEDAD SEPÚLVEDA GÓMEZ

2014



UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

“Efecto de pre-tratamientos en hojas de *Leptocarpha rivularis* (palo negro) como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN
ALIMENTOS

Profesor Guía: Dr. Edgar Luciano Uquiche Carrasco

NATALI SOLEDAD SEPÚLVEDA GÓMEZ

2014

“Efecto de pre-tratamientos de hojas de *Leptocarpha rivularis* (palo negro) como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

NATALI SOLEDAD SEPÚLVEDA GÓMEZ

2014

DR. EDGAR LUCIANO UQUICHE CARRASCO

Profesor guía

DRA. MARIELA BUSTAMANTE
Profesor examinador

MG. LEONARDO PINO AROSTEGUY
Profesor examinador

Nota trabajo escrito :

Nota examen :

Nota final :

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto de distintos tipos de pre-tratamientos de un sustrato vegetal sobre el rendimiento de extracción de aceites esenciales y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos, usando dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) a dos presiones 108 y 192 bar y temperatura 52 °C. Como sustrato vegetal se utilizó hojas de *Leptocarpha rivularis* conocidas como “palo negro”. Se aplicaron tres distintos pre-tratamientos los cuales fueron: molienda convencional, molienda a baja temperatura y descompresión rápida con CO₂ supercrítico. Como método de comparación se realizó la hidrodestilación con hojas enteras de *L. rivularis*. El sustrato utilizado para la descompresión rápida con CO₂ supercrítico tuvo un tamaño promedio de partícula mayor ya que se hicieron pasar por un tamiz de abertura 2,36 mm. Este mayor tamaño de partícula, resultó en un valor bajo de densidad verdadera y valores bajos de porosidad de lecho empacado. La descompresión rápida con CO₂ supercrítico fue el pre-tratamiento que entregó mayor rendimiento de extracción de aceites esenciales a 108 bar (41,48 g aceite/kg sustrato) y a 192 bar (51,09 g aceite/kg sustrato). Esto podría explicarse por la selectiva ruptura de los tricomas que son las glándulas que almacenan los aceites esenciales y se encuentran en hojas de la familia *Asteraceae* y *Lamiaceae*. Le siguió en rendimiento de extracción la molienda a baja temperatura con valores de 31,85 g aceite/kg sustrato (108 bar) y 43,00 g aceite/kg sustrato (192 bar). La molienda convencional obtuvo valores de 14,19 g aceite/kg sustrato (108 bar) y 21,79 g aceite/kg sustrato (192 bar). Este valor es muy bajo comparado con los otros pre-tratamientos. Del mismo modo se encontró que la mayor actividad antioxidante se obtuvo en el pre-tratamiento por molienda a baja temperatura a 192 bar siguiéndole la descompresión rápida. Al comparar la extracción supercrítica con la hidrodestilación, se observó que en esta última se obtuvo una mayor cantidad de fenoles comparado con la extracción supercrítica, debido a que los fenoles son más solubles en agua. Esto evidenció una buena actividad antioxidante del extracto obtenido por hidrodestilación, medida por la reducción de hierro III (FRAP), con un valor de 2,03 µmol trolox/mg aceite. Sin embargo el extracto obtenido por hidrodestilación, presentó bajos valores de rendimiento y baja actividad antioxidante medida por el método DPPH y β-caroteno. El análisis de varianza entregó resultados que indican que las variables pre-tratamientos y presión afectaron significativamente ($\alpha=0,05$) sobre las respuestas rendimiento de extracción y actividad antioxidante (DPPH y β-caroteno). No ocurriendo lo mismo con la respuesta actividad antioxidante medida por el método de reducción del hierro III (FRAP) y contenidos de fenoles totales (método Folin).

Índice de contenido

Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
Capítulo 2. Antecedentes Generales	5
2.1. Materia prima	5
2.2. Aceites esenciales (AE)	5
2.3. Capacidad antioxidante	7
2.4. Fluido supercrítico	9
2.5. Extracción de aceites esenciales	11
2.5.1 Extracción supercrítica con CO ₂	11
2.5.2 Métodos convencionales de extracción de aceites.....	13
2.5.2.1 Extracción con disolventes	13
2.5.2.2 Extracción por arrastre con vapor	14
2.5.2.3 Hidrodestilación.....	15
2.6. Pre-tratamiento para la materia prima	15
2.6.1 Molienda convencional	15
2.6.2 Molienda a baja temperatura	16
2.6.3 Descompresión rápida con CO ₂	17
Capítulo 3. Materiales y métodos	19
3.1. Materiales	19
3.1.1 Materia Prima	19
3.1.2 Equipos e instrumentos.....	19
3.1.3 Reactivos	20
3.1.4 Materiales de vidrio y otros.....	20
3.2. Metodología	21
3.2.1 Distribución del tamaño de partícula.....	21
3.2.2 Determinación de humedad.....	21
3.2.3 Densidad aparente y densidad verdadera.....	22
3.2.4 Porosidad del lecho empacado.	23
3.2.5 Pre-tratamientos y caracterización física de substratos	24
3.2.6 Extracción supercrítica	25

3.2.7	Extracción por hidrodestilación.....	25
3.2.8	Análisis de extractos.....	26
3.2.8.1	Actividad antioxidante: método del radical DPPH.....	26
3.2.8.2	Actividad antioxidante: método del blanqueamiento del β -caroteno.....	27
3.2.8.3	Actividad antioxidante: método de reducción del Hierro III (FRAP)	28
3.2.8.4	Contenido de fenoles totales	29
3.2.9	Microscopia óptica	31
3.2.10	Análisis estadístico.....	31
Capítulo 4. Resultados y discusiones		34
4.1. Caracterización del sustrato		34
4.2. Efecto del pre-tratamiento y presión de extracción sobre el rendimiento de extracción		36
4.3. Efecto del pre-tratamiento sobre la actividad antioxidante de los extractos.....		39
4.3.1	Métodos basados en transferencia electrónica única.....	39
4.3.1.1	Actividad antioxidante: Método DPPH.....	39
4.3.1.2	Actividad antioxidante: método de reducción del Hierro III (FRAP)	41
4.3.2	Método basado en transferencia de átomos de hidrógeno.....	43
4.3.2.1	Actividad antioxidante, método blanqueamiento del β -caroteno	43
4.4. Efecto del pre-tratamiento y presión de extracción sobre el contenido de fenoles totales		45
4.5. Comparación de resultados entre hidrodestilación (HD) y extracción supercrítica.....		47
Capítulo 5. Conclusiones		52
BIBLIOGRAFÍA.....		54
Anexos.....		66
ANEXO A. Caracterización de sustrato (hojas de <i>L. rivularis</i>).....		66
ANEXO B. Análisis estadístico para la respuesta rendimiento de extracción.		69
ANEXO C. Análisis estadístico para la respuesta actividad antioxidante, método DPPH.		70
ANEXO D. Análisis estadístico para la respuesta actividad antioxidante, método FRAP.		71
ANEXO E. Curvas para obtención del porcentaje de inhibición IC₅₀		72
ANEXO F. Análisis estadístico para la respuesta actividad antioxidante, método blanqueamiento del β-caroteno.		73
ANEXO G. Análisis estadístico para la respuesta contenido de fenoles totales.		75
ANEXO H. Rendimiento de extracción obtenido en Hidrodestilación.		75
ANEXO I. Curvas de calibración.		76

Índice de Tablas

Tabla 2.1 Parametros criticos de diferentes sustancias potencialmente utiles como fluidos supercríticos.....	11
Tabla 2.2 Evidencia de extracción de aceites esenciales utilizando CO ₂ supercrítico.....	13
Tabla 3.1 Resultados obtenidos para cada respuesta.....	32
Tabla 4.1 Resumen de valores de tamaño de partícula promedio (d_p), densidad aparente (ρ_{ap}), densidad verdadera (ρ_v) y porosidad (ϵ) para un lecho empacado en función del tipo de pre-tratamiento.....	35
Tabla 4.2 Rendimiento de extracción de aceites esenciales (g aceite/kg sustrato) obtenido con CO ₂ supercrítico a 52 °C.....	37
Tabla 4.3 Actividad antioxidante medida por el método DPPH (mmol trolox eq/g aceite) en extractos obtenidos con CO ₂ supercrítico a 52 °C.....	40
Tabla 4.4 Actividad antioxidante medido por el método FRAP (μ mol trolox eq/mg aceite) en extractos obtenidos con CO ₂ supercrítico a 52 °C.....	42
Tabla 4.5 Actividad antioxidante medida por el método β -caroteno (IC ₅₀ en mg/mL) en extractos obtenidos con CO ₂ supercrítico a 52 °C.....	44
Tabla 4.6 medida del contenido de fenoles totales (mg GAE/g aceite) en extractos obtenidos con CO ₂ supercrítico a 52 °C.....	46
Tabla 4.7 Resultados de las distintas metodologías aplicadas en este estudio al extracto de <i>L. rivularis</i> obtenidos por hidrodestilación.....	47

Índice de Figuras

Figura 2.1 Hojas de palo negro (<i>Leptocarpha rivularis</i>).....	5
Figura 2.2 Isopreno (estructura química C ₅ H ₈) principales compuestos de aceites esenciales.....	6
Figura 2.3 Diagrama de fases para una sustancia pura.....	9
Figura 4.1 (A) imagen tomada por microscopio óptico de una hoja de <i>L. rivularis</i> antes de ser sometida a descompresión rápida con CO ₂ supercrítico. (B) imagen tomada por microscopio óptico de una hoja de <i>L. rivularis</i> después de ser sometida a descompresión rápida con CO ₂ supercrítico (glándulas tricomas indicadas por flechas).....	38

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La *Leptocarpha rivularis* conocida también como “palo negro”, es una planta endémica, que crece entre el Maule y Valdivia, en lugares húmedos y expuestos al sol, como cursos de agua y en la orilla de los bosques (Hoffmann, 2005). Los extractos de *L. rivularis* son usados como tratamiento para diferentes enfermedades y se basa en la medicina ancestral mapuche. Estos extractos corresponden principalmente a aceites esenciales. Los aceites esenciales tienen usos terapéuticos en la medicina humana debido a sus propiedades anticancerígenas, anticonceptivas, antiflogísticas, antivirales, antibacterianas y antioxidantes (Teixeira *et al.*, 2013). Los principales compuestos de aceites esenciales de plantas son terpenos, monoterpenos (C₁₀), que pueden constituir más del 80% del aceite esencial, y sesquiterpenos (Fornari *et al.*, 2012).

Efectivas **tecnologías** para extraer y aislar aceites esenciales a partir de materias primas están adquiriendo mucha atención en la investigación y el desarrollo. Los enfoques tradicionales para recuperar el aceite esencial de la matriz de la planta incluyen métodos de extracción por arrastre con vapor, hidrodestilación y extracción con solventes. Una de las desventajas **del arrastre con vapor** y los métodos de hidrodestilación está relacionada con la termolabilidad de los componentes de aceite esencial, que se someten a la alteración química debido al efecto de las altas temperaturas aplicadas (cercana a la temperatura de ebullición del agua) (Fornari *et al.*, 2012). Además, del bajo rendimiento por pérdidas de compuestos volátiles y tiempos de extracción prolongados. Uno de los principales problemas de la extracción por arrastre con vapor es la degradación de compuestos insaturados por acción del calor, mientras que para la extracción con solvente el principal problema es la incorporación al producto de residuos tóxicos provenientes del solvente (Pérez, 2005).

Por esta razón es de interés el investigar nuevas tecnologías que permitan mejorar la calidad de los extractos, como la extracción con fluido supercrítico utilizando dióxido de carbono (CO₂) como solvente, esta metodología ha sido ampliamente estudiada para la separación de aceites esenciales desde extractos herbáceos.

Para la extracción de aceites esenciales, es importante aplicar pre-tratamientos al sustrato vegetal a fin de lograr la destrucción de barreras microestructurales del tejido vegetal y mejorar la velocidad de extracción (Fornari *et al.*, 2012). Por esta razón, es posible pensar en minimizar

las pérdidas en la extracción de aceites esenciales aplicando diferentes tipos de pre-tratamientos ya que las pérdidas pueden variar según la técnica de extracción.

La molienda convencional corresponde a la reducción de tamaño de las partículas del sustrato vegetal en un molino. Una desventaja de la molienda convencional es el incremento de la temperatura por fricción ya que afecta la estabilidad y pérdida de los componentes volátiles del aceite esencial (Mella, 2002). Como alternativa está la molienda a baja temperatura. Esta técnica consiste en el pre-enfriamiento de la materia prima o el mantenimiento de baja temperatura dentro del molino de tal manera de reducir las pérdidas de aceites volátiles y posteriormente someterlo a molienda.

Sandoval (2008), ha estudiado el tratamiento de hojas de boldo y orégano por rápida descompresión con CO₂ para la ruptura de tricomas, que son órganos que producen y contienen los aceites esenciales. En este pre-tratamiento, el sustrato se expone al CO₂ comprimido a una determinada presión estática, y el gas penetra y se disuelve en el aceite intracelular hasta que se alcanza el límite de solubilidad. Durante la descompresión rápida, el gas disuelto se desorbe de la fase de aceite y se descarga rápidamente. La incapacidad de los tricomas para descargar el gas, a una velocidad establecida por la pérdida de solubilidad en el aceite con la descompresión, genera un gradiente de presión a través de la pared celular que pueden conducir a su ruptura (Gaspar *et al.*, 2003). Existe interés en buscar pre-tratamientos de sustratos vegetales que reduzcan las pérdidas de componentes volátiles, mejoren el rendimiento y la composición de los aceites esenciales.

En este contexto, se propone estudiar la extracción de aceite esencial de hojas de *L. rivularis* usando pre-tratamientos de molienda convencional, molienda a baja temperatura y descompresión rápida con CO₂, para luego extraer a dos presiones distintas con el propósito de aumentar el rendimiento de extracción de aceite esencial y la calidad del extracto.

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo general

El objetivo general es estudiar la aplicación de distintos pre-tratamientos sobre hojas de *L. rivularis* y su efecto sobre el rendimiento de extracción de aceite esencial usando dióxido de carbono (CO₂) supercrítico.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los distintos pre-tratamientos sobre el rendimiento de extracción
- Evaluar el efecto de los distintos pre-tratamientos y presión sobre la actividad antioxidantes de aceites esenciales obtenidos con CO₂ supercrítico.
- Establecer si existen diferencias en el rendimiento y la actividad antioxidante, entre los extractos obtenidos con CO₂ supercrítico y los obtenidos por hidrodestilación.

CAPÍTULO 2
ANTECEDENTES GENERALES

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. Materia prima

La *Leptocarpha rivularis* conocida también como “palo negro”, es una planta endémica, que crece entre el Maule y Valdivia, en lugares húmedos y expuestos al sol, como cursos de agua y en la orilla de los bosques (Hoffmann, 2005). Es un arbusto siempreverde que puede alcanzar hasta 2 m de altura. Hojas de hasta 10 cm, y flores de 2 cm de diámetro, amarillas. Florece entre primavera y verano, mientras que fructifica en otoño (Riedemann y Aldunate, 2003). Los extractos de *L. rivularis* perteneciente a la familia *Asteraceae* han sido usados en la medicina nativa de Chile como agente estimulante, carminativo y para el tratamiento de desórdenes gástricos.



Figura 2.1 Hojas de palo negro (*Leptocarpha rivularis*)

2.2. Aceites esenciales (AE)

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles que se encuentran en muchas especies vegetales y son responsables de su olor característico. Los terpenos son el componente fundamental de los aceites esenciales. Con el nombre de terpenos se conoce a un grupo importante de componentes vegetales que tienen un origen biosintético común. Todos, aunque con estructuras químicas muy distintas, proceden de la condensación, en número variable, de unidades isoprenicas (Figura 2.1) (Yoshikawa *et al.*, 1996). Entre sus distintas formas se encuentran hidrocarburos monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), monoterpenos oxigenados (MT),

Efecto de pre-tratamientos en hojas de Leptocarpha rivularis (palo negro) como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales

sesquiterpenos (ST), sesquiterpenos oxigenados ($C_{15}H_{28}$) que presentan la característica de ser muy volátiles, y compuestos de alto peso molecular (di-y triterpenos, ceras, pigmentos, etc.) (Gañán y Brignole, 2013). Estas sustancias también han demostrado poseer múltiples propiedades funcionales como capacidad antioxidante (Milan *et al.*, 2008) y capacidad antimicrobiana (Tatsadjieu *et al.*, 2010).

En términos generales los aceites esenciales están compuestos por más de setenta diferentes componentes (Russo *et al.*, 1998). Los componentes mayoritarios, entre ellos monoterpenos, pueden constituir por encima del 85% de la composición del AE mientras que otros componentes se encuentran en forma de trazas (Bauer *et al.*, 2001). Es muy importante el papel que juegan estos compuestos minoritarios ya que existen evidencias de que estos componentes contribuyen de manera significativa a las propiedades funcionales que el aceite esencial pueda presentar debido al posible sinergismo entre distintos componentes (Burt, 2004).

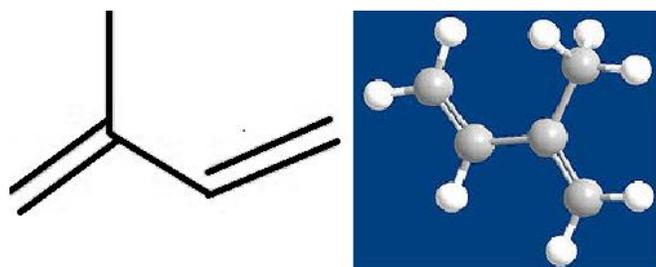


Figura 2.2 Isopreno (estructura química C_5H_8) principales compuestos de aceites esenciales

Los aceites esenciales en las plantas pueden encontrarse en diferentes células, en canales secretorios, glándulas o en los tricomas (Stashenko, 2009) y el tipo de estructura secretora es específico de la familia de plantas o especies (Zizovic *et al.*, 2007). Este tipo de conducto secretor son alargadas cavidades que a menudo se ramifican para crear una red que se extiende desde las raíces a través del vástago de las hojas, flores y frutas y se pueden encontrar en todas las especies de las familias de *Asteráceas*, *Lamiaceae* (Stashenko, 2009) y en las familia de *Apiaceae* (*Umbelliferae*) (Zizovic *et al.*, 2007). Estos conductos secretores se encuentran en la parte mesófila de la hoja en el tallo y corteza. Los tricomas glandulares se forman generalmente de un pedúnculo biseriado con una cabeza de una a muchas células. En el tipo más común, el pedúnculo está formado por cinco pares de células. La secreción de los conductos se compone de

aceites esenciales, lípidos, resinas, lactonas de sesquiterpeno, alcaloides, sustancias similares a la pectina, taninos y flavonoides (Bartoli *et al.*, 2011).

2.3. Capacidad antioxidante

Hoy en día, el interés en antioxidantes naturales ha aumentado considerablemente para uso en alimentos, productos cosméticos y farmacéuticos, principalmente para reemplazar a los antioxidantes sintéticos que están siendo restringidos debido a sus efectos tóxicos. Plantas aromáticas y medicinales son la fuente de antioxidantes naturales gracias a sus principales metabolitos secundarios como los polifenoles y aceites esenciales, en este sentido la actividad antioxidante de las plantas esta principalmente representada por los compuestos activos del aceite esencial presente en ellos. La cantidad de tales compuestos depositados en cada parte de la planta es normalmente diferente (Wannes *et al.*, 2010).

Un radical libre es una especie química definida, una molécula o fragmento de molécula, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable y fugaz con gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena (Halliwell, 1996). Los compuestos fenólicos pueden actuar eliminando los radicales libres o previniendo su formación, estos tienen la potencial capacidad de pérdida de un átomo de hidrógeno y/o un único electrón (debido a la estabilidad de la resultante de los radicales libres) exhiben considerables actividades antioxidantes, además de poseer propiedades como quelante de metales (debido a la presencia de grupos funcionales hidroxilo y carbonilo en sus estructuras) (Ebrahimabadi *et al.*, 2010).

Por otro lado, la actividad antioxidante de los aceites esenciales puede atribuirse a la presencia de hidrocarburos antioxidantes como monoterpenos y/o sesquiterpenos, que también pueden actuar como antioxidantes. Éste es el motivo por el cual se considera que los aceites esenciales que no contienen fenoles presentan actividad antioxidante (Taufert, 2005). El mecanismo de la acción antioxidante de los aceites esenciales no se conoce con certeza, sin embargo se ha mostrado que algunos aceites esenciales y sus fito constituyentes poseen la capacidad de atrapamiento de radicales libres igual o superior a la de antioxidantes sintéticos como la vitamina E, el trolox y el ácido ascórbico (Veillet *et al.*, 2010). Aunque el mecanismo de la acción antioxidante de los aceites esenciales no se conoce con toda certeza, en un estudio realizado por Foti y Ingold, (2003) se muestra que el γ -terpineno (hidrocarburo monoterpénico) presente en varios aceites esenciales,

actúa como antioxidante al retardar la peroxidación del ácido linoleico, porque los radicales peroxilo formados a partir de éste (HOO*) reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo del ácido linoleico (LOO*). De tal forma que se disminuye la concentración de los radicales peroxilo del ácido linoleico (LOO*). Es decir la presencia de hidrocarburos antioxidantes monoterpenos y/o sesquiterpenos, también pueden actuar como antioxidantes a través de mecanismos similares a los propuestos por Foti y Ingold, (2003). En este mismo sentido Sonsuzer *et al.* (2004) investigó que en plantas de la familia de las *Lamiaceae* a presión de 200 bar se extraen compuestos activos como sesquiterpenos, por lo que la habilidad de donar átomos de hidrogeno o electrones al electrón impar del DPPH de los aceites esenciales podría estar asociado principalmente a los compuestos activos pesados como hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados que son co-extraídos a alta presión (Sonsuzer *et al.*, 2004), provocando una disminución de la absorbancia proporcional a la concentración y actividad de dicho antioxidante en las mediciones (Brand-William *et al.*, 1995). Estos compuestos (hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados) son también los principales constituyentes en aceites esenciales de hojas de plantas pertenecientes a la familia *Asteraceae* además de presentar también los mismos conductos secretores.

Es sabido por tanto que los aceites esenciales están formados en su mayoría por monoterpenos (C₁₀), constituyendo hasta un 90% de los aceites esenciales siendo frecuentes en familias de angiospermas como *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myristaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae* y *Rubiaceae* (Guenther, 1972). Hasta ahora, el proceso de extracción de estos compuestos es un paso previo necesario para estudio de la capacidad antioxidante, la que posteriormente puede ser estudiada en diferentes modelos (Yahya *et al.*, 2005).

Los antioxidantes pueden desactivar radicales por dos mecanismos principalmente: transferencia de átomos de hidrógeno y transferencia única de electrones. La transferencia de átomos de hidrogeno mide la habilidad clásica de un antioxidante (AH) de extinguir radicales libres por donación de hidrógenos (Prior *et al.*, 2005). Así mismo el método de transferencia única de electrones detecta la habilidad de un potencial antioxidante (AH) de transferir un electrón, reduciendo cualquier compuesto incluyendo metales, carbonilos y radicales (Prior *et al.*, 2005). Los resultados finales son los mismos independientemente del mecanismo, pero la cinética y potencial de las reacciones difieren (Prior *et al.*, 2005; Antolovich *et al.*, 2002; Moon y Shibamoto, 2009).

Finalmente pero no menos importante es importante mencionar que muchas veces la comparación entre resultados de actividad antioxidante, aun correspondiendo al mismo método de medida, se deben efectuar con precaución; ya que pueden existir cambios en la temperatura del ensayo, sus condiciones de realización, en el modo de combinar las muestras con los reactivos (tiempo de exposición de los compuestos activos a los reactivos) y en la metodología empleada en la extracción (tamaño de partícula, ciclos de extracción, modo de agitación de la muestra, relación muestra: solvente, etc.) (Bompadre *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2000).

2.4. Fluido supercrítico

Los fluidos supercríticos son producidos por el calentamiento de un gas por encima de su temperatura crítica o la compresión de un líquido por encima de su presión crítica, tal como se observa en la Figura 2.3 (Esquivel y Vargas, 2007). En estas condiciones, el volumen molar es el mismo, con independencia de si la forma original es un líquido o un gas, el fluido supercrítico puede ser utilizado para extraer ingredientes activos o analitos de diversas plantas.

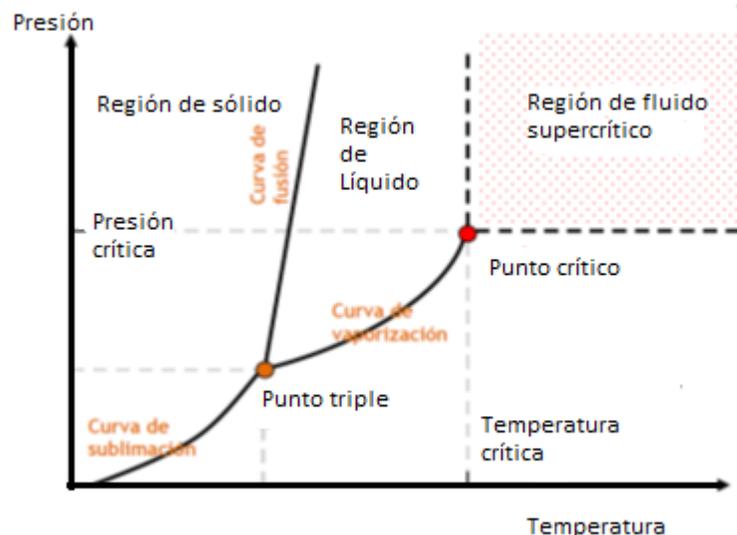


Figura 2.3 Diagrama de fases para una sustancia pura

En este sentido los fluidos supercríticos han recibido mayor atención en varios procesos químicos debido a sus propiedades únicas intermedias entre las de los gases y los líquidos. Por ejemplo, la viscosidad de un fluido supercrítico es, generalmente, comparable a la de un gas, pero dos

órdenes de magnitud menor que la de un líquido, mientras que su difusividad está entre la de un gas y un líquido. Los fluidos supercríticos poseen propiedades de gas como propiedades de transporte y las densidades como de líquido y, por lo tanto, se han utilizado ampliamente para aplicaciones de extracción (Huang *et al.*, 2005). Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción (Velasco *et al.*, 2007).

Otras de las ventajas de utilizar fluidos supercríticos son: a) Poseen alto coeficiente de difusión y viscosidad más baja que los líquidos; b) Ausencia de tensión superficial, la cual aumenta la operación de extracción dada la rápida penetración de estos al interior de los poros de la matriz heterogénea; c) La selectividad durante la extracción puede ser manipulada dada la variación de las diferentes condiciones de temperatura y presión afectando la solubilidad de varios componentes en el fluido supercrítico; d) La extracción con fluidos supercríticos no deja residuos químicos; e) La extracción con CO₂ supercrítico permite su fácil recuperación por procesos de reciclaje (Velasco *et al.*, 2007).

Entre las tecnologías innovadoras del proceso, la extracción con fluidos supercríticos (EFS) es la aplicación más estudiada. En general la EFS se realiza generalmente utilizando CO₂ supercrítico por varias razones prácticas: el CO₂ tiene presión crítica moderadamente baja (74 bar) y temperatura baja (32 °C) señalado en la Tabla 2.1, no es tóxico, no es inflamable, disponible en alta pureza a un costo relativamente bajo, y se elimina fácilmente del extracto. El CO₂ supercrítico tiene una polaridad similar al pentano líquido y de este modo es adecuado para la extracción de compuestos lipófilos. Por lo tanto, teniendo en cuenta la característica lipofílica de aceites esenciales de plantas, es obvio que la EFS utilizando CO₂ surge como una alternativa adecuada ambientalmente amigable para la extracción de aceites esenciales (Fornari *et al.*, 2012).

Tabla 2.1 Parametros criticos de diferentes sustancias potencialmente utiles como fluidos supercríticos.

Sustancia	Tc (°C)	Pc (KPa)	ρ (kg/m ³)
Agua	374,2	21480	320
Amoniaco	132,5	10990	230
butano	152,0	7060	230
Dioxio de carbono	31,1	7200	470
Etanol	243,3	7200	280
Etileno	11,0	4760	200
Metano	0,8	4600	170
metanol	239,0	7890	270
Pentano	196,0	3290	230
Propano	96,7	4240	220

Adaptado por Reglero *et al.* (2005)

2.5. Extracción de aceites esenciales

2.5.1 Extracción supercrítica con CO₂

Desde un tiempo se han desarrollado varias técnicas nuevas para la extracción de solutos de matrices sólidas, entre ellas se tiene la extracción con fluidos supercríticos con el objeto de acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de solvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad del extracto (Velasco *et al.*, 2007).

Es una técnica sencilla, donde el material vegetal se empaca en una cámara de acero inoxidable a través de la cual se hace circular un fluido en estado supercrítico (CO₂), que actúa como solvente y permite separar los componentes volátiles del material vegetal. El fluido, luego, se elimina por descompresión hasta alcanzar la presión y la temperatura ambiente. Finalmente, se obtiene un extracto cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Las ventajas de esta técnica son que se evita la degradación térmica de los componentes, hay mayor rendimiento en la extracción, y, presumiblemente, no hay cambios químicos de los componentes (Dean, 1998). Otras de las grandes ventajas de la extracción utilizando CO₂ supercrítico es la ausencia de residuos y la fácil recuperación del disolvente, así como los menores peligros y riesgos y, en ciertos casos ahorros de energía sustanciales respecto a extracción o destilación convencionales (del Valle y Aguilera, 1999).

El CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado debido a que sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar y se consigue con diferentes grados de pureza, se puede trabajar a baja temperatura y, por tanto, se pueden separar compuestos termolábiles ayudando a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos del alimento cuando son extraídos (Velasco *et al.*, 2007). De hecho, las presiones moderadas (90-120 bar) y temperaturas (35-50 °C) son suficientes para solubilizar los compuestos de aceites esenciales. Sin embargo, en algunos casos, las presiones más altas se aplican para contribuir a la ruptura de las células vegetales y la liberación de otras sustancias tales como ceras cuticulares que son co-extraídos además de otras sustancias co-extraídos de mayor peso molecular (Fornari *et al.*, 2012), esto guarda relación con que a temperatura constante, y aumentando la presión se aumenta también la densidad del CO₂ supercrítico, aumentando el poder disolvente. Como la densidad aumenta, la distancia entre las moléculas disminuye; por lo tanto, la interacción entre los analitos y CO₂ aumenta, lo que lleva a una mayor solubilidad de estos analitos en el CO₂ (Bimakr *et al.*, 2010).

En este sentido el parámetro más relevante en el proceso de extracción de la matriz de la planta es la presión de extracción, que puede ser utilizado para sintonizar la selectividad del disolvente supercrítico. Con respecto a la temperatura de extracción, en el caso de compuestos termolábiles tales como los que comprenden los aceites esenciales, los valores se deben establecer en el intervalo de 35-50 °C, por ejemplo, en las proximidades del punto crítico y tan bajo como sea posible para evitar la degradación (Fornari *et al.*, 2012). En Tabla 2.2 se muestra evidencia de extracción de aceites esenciales utilizando CO₂ supercrítico a diferente presión y temperatura.

La EFS de un soluto a partir de una materia prima sólida en general puede implicar tres etapas diferentes: transferencia de masa interna, de equilibrio de fase y de transferencia de masa externa. Por lo tanto, el rendimiento de extracción de aceite puede ser altamente afectada por parámetros operacionales tales como: pre-tratamiento, presión de extracción y temperatura (Rebolleda *et al.*, 2012).

Por otra parte, la extracción de aceites esenciales con fluidos supercríticos, se puede realizar a temperaturas de alrededor de 50 °C, preservando así la composición de aceite y sus propiedades originales (Zizovic *et al.*, 2007). Además, que muestra una evidente diferencia en calidad del aceite obtenido por este medio en comparación con los aceites extraídos con métodos tradicionales (Velasco *et al.*, 2007).

Tabla 2.2 Evidencia de extracción de aceites esenciales utilizando CO₂ supercrítico.

Materia prima	Condiciones de extracción		Referencia
	Temperatura (°C)	Presión (bar)	
Anís (<i>Pimpinella anisum</i> L.)	30	80-180	Rodrigues <i>et al.</i> (2003)
Pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.)	30-50	150-300	Ferreira <i>et al.</i> (1999)
<i>Acmella oleracea</i> (hojas)	50	250	Dias <i>et al.</i> (2012)
Hojas Eucaliptus (<i>Eucalyptus tereticornis</i>)	10-25	66,7-78,5	Rodrigues <i>et al.</i> (2002)
Hojas de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	38, 48	100, 160	Coelho <i>et al.</i> (1997)
Hojas de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	40	200	Viera de Melo <i>et al.</i> (2000)
Hojas de yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	40, 70	100-400	Saldaña <i>et al.</i> (2002)
Hojas de romero (<i>Rosmarinus Officinalis</i>)	100	350	Celiktas <i>et al.</i> (2007)
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	40	115	Babovic <i>et al.</i> (2010)
Hisopo (<i>Hyssopus officinalis</i>)	40	115	Babovic <i>et al.</i> (2010)
Flores de manzanilla (<i>Chamomilla recutita</i> L.)	30, 40	100-200	Povh <i>et al.</i> (2001)

2.5.2 Métodos convencionales de extracción de aceites

2.5.2.1 Extracción con disolventes

Las tecnologías tradicionales para la producción de extracto de plantas incluye la extracción soxhlet, utilizando diferentes tipos de disolventes: variando el disolvente de la extracción de acuerdo a los compuestos que se quiera obtener. Debe seleccionarse un solvente conveniente de

tal forma que ofrezca el mejor balance de varias características deseables: alto límite de saturación y selectividad respecto al soluto por extraer, capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente, estabilidad química en las condiciones del proceso, baja viscosidad, baja presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad, baja densidad, baja tensión superficial, facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto y bajo costo (Dahlstrom *et al.*, 1999). Cada solvente diferente produce extractos y composiciones específicos (Zarnowski y Suzuki, 2004). Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido; es una técnica utilizada tradicionalmente para la extracción de determinados compuestos en matrices vegetales. Esta técnica tradicional de extracción tiene ciertos problemas como son lentitud, laboriosidad, empleo de grandes cantidades de disolventes tóxicos, poca selectividad, entre otras. La principal desventaja de este método es que los extractos obtenidos mediante disolventes contienen residuos que contaminan los alimentos y aromas cuando se añaden (Wenqiang *et al.*, 2007).

2.5.2.2 Extracción por arrastre con vapor

Los aceites esenciales son predominantemente obtenidos por destilación con vapor, usando vapor directo o indirecto. El vapor se genera en una caldera individual y se inyecta en la parte inferior del recipiente con el material vegetal (Clarke, 2008). La extracción del aceite esencial se ve facilitada por la destilación de dos líquidos inmiscibles, es decir, agua y aceite esencial. Luego el vapor de agua y vapores de aceites esenciales se condensan y se separan; el aceite generalmente es más ligero que el agua, flota en la parte superior y el agua va al fondo. Algunos aceites muy volátiles pueden perderse en el proceso de destilación, además, se pueden inducir cambios químicos, tales como la oxidación o la hidrólisis. Por lo tanto, los aceites esenciales recuperados por destilación por arrastre con vapor son a menudo diferentes de los presentes en la fuente original (Lee *et al.*, 2009; Sánchez, 2006). En general las desventajas de estas técnicas son el bajo rendimiento por pérdidas de compuestos volátiles, tiempos de extracción prolongados, extractos con residuos de solventes tóxicos y degradación de compuestos insaturados por acción del calor, lo cual genera la aparición de compuestos indeseables del sabor y aroma (Ebrahimzadeh *et al.*, 2003).

2.5.2.3 Hidrodestilación

Este método consiste en llevar a estado de ebullición el agua, que penetra los tejidos de la planta y disuelve una parte del aceite esencial presente en las estructuras contenedoras; esta solución acuosa se difunde a través de las membranas de las células y el aceite se vaporiza inmediatamente desde la superficie. Este proceso continúa hasta que se remueve todo el aceite contenido en las glándulas de la planta. Los constituyentes oxigenados del aceite son más solubles en el agua hirviendo (unas 100 veces más) que los hidrocarburos análogos. Por esta razón, en las etapas iniciales, los componentes se liberan de acuerdo con su grado de solubilidad, antes que por sus puntos de ebullición. Luego, a medida que avanza la destilación, los compuestos se liberan en función de su temperatura de ebullición, siendo la última fracción muy rica en sesquiterpenos y sus análogos oxigenados (Clarke, 2008). Otro factor que juega un papel importante durante la extracción mediante esta técnica, es el contenido de compuestos grasos (lípidos) en la planta, ya que son poco volátiles y en cierto modo, retienen la fracción de hidrocarburos volátiles, los cuales muestran más afinidad por los compuestos grasos que por los compuestos oxigenados (Sánchez, 2006; Sarker *et al.*, 2006).

Dentro de las desventajas que posee este método es que se requiere tiempos largos de calentamiento y la utilización de grandes cantidades de agua, lo cual incrementa el coste y el tiempo de la destilación (Hernández, 2011) además que se basan en la selección del solvente asociado con el uso de calor y/o agitación (Velasco *et al.*, 2007).

Otras de las desventajas de los métodos de hidrodestilación es que los aceites esenciales se someten a alteración química y los compuestos sensibles al calor pueden ser destruidos fácilmente (Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007). Este proceso no es caro, pero puede inducir la degradación térmica, hidrólisis y solubilización en agua de algunos componentes de fragancia.

2.6. Pre-tratamiento para la materia prima

Existe un gran interés de buscar pre-tratamientos que minimicen las pérdidas de componentes volátiles ya que sin estos, se afectaría el rendimiento y la composición de los aceites esenciales además que éstos juntos con los métodos de extracción pueden afectar (parcial o totalmente) la calidad del extracto (Yahya *et al.*, 2010).

2.6.1 Molienda convencional

La trituración se refiere generalmente a la molienda de muestras sólidas compuestas de partículas de gran tamaño en una que consiste en partículas pequeñas. Si es apropiado, mejora la micro

homogeneidad del analito y evita la segregación del material como resultado de la amplia distribución del tamaño de partícula dentro de la muestra (da Silva *et al.*, 2011). En el caso de la materia prima previamente dividida, las membranas se encuentran parcialmente destruidas, lo que facilita la disolución de los constituyentes celulares.

La molienda convencional corresponde a la reducción de tamaño de las partículas del sustrato vegetal en un molino. Una desventaja de la molienda convencional es el incremento de la temperatura por fricción ya que afecta la estabilidad y pérdida de los componentes volátiles del aceite esencial, razón por la cual es recomendable mantener la temperatura lo más baja posible (Mella, 2002). En los procesos normales de molienda, se genera calor cuando se usa la energía para fracturar una partícula en un tamaño más pequeño. Este calor generado es generalmente perjudicial para materiales sensibles al calor tales como especias y resulta en alguna pérdida en la calidad del material y aceites esenciales (Goswami y Singh, 2003).

2.6.2 Molienda a baja temperatura

La pérdida de volátiles puede reducirse significativamente por la técnica de trituración criogénica o pre-enfriado de la muestra, utilizando nitrógeno líquido que proporciona la refrigeración (mediante la absorción de la generación de calor durante el rectificado) necesaria para pre-enfriar las especias y mantener la temperatura baja (Fornari *et al.*, 2012). Es por esto que Gaspar *et al.* (2003) propuso molienda criogénica para reducir la degradación térmica y la evaporación de los aceites esenciales durante el pre-tratamiento de la muestra.

La molienda de especias en la presencia de un fluido criogénico se conoce como crio molienda o molienda criogénica de especias. Además de los beneficios de la retención de la calidad de especias, el uso de la técnica a baja temperatura también ayuda en el proceso de reducción de tamaño por el efecto de la baja temperatura de fragilización. La temperatura extremadamente baja hace que los aceites se solidifiquen de manera que las especias se vuelven frágiles, se desmenuzan fácilmente permitiendo molienda a un tamaño más fino y más consistente. Así un tamaño más pequeño se puede obtener en condiciones criogénicas o de baja temperatura (Gouveia *et al.*, 2002).

Uno de los métodos de molienda es el pre-enfriado de la especia prima y el mantenimiento de baja temperatura dentro del molino de tal manera de reducir las pérdidas de aceites volátiles para retener la mayor parte del sabor del aceite (Murthy y Bhattacharya, 2008). Del mismo modo,

diferentes especies pueden ser molidas en un molino adicionando hielo seco para evitar perdidas de componentes volátiles como aceites esenciales (Charrapin, 2000).

En general, las muestras trituradas con el molino de cuchillas presentan la más amplia gama de tamaños de partículas, siendo el proceso de trituración menos eficiente, y así, el molino de bolas presenta un buen rendimiento para todos los tipos de muestras y es una alternativa interesante para el molino a bajas temperaturas, una vez que los costes de mantenimiento son mucho más bajos (Santos *et al.*, 2008).

2.6.3 Descompresión rápida con CO₂

En este pre-tratamiento, el substrato vegetal se expone al CO₂ comprimido, y el gas penetra y se disuelve en el aceite intracelular hasta que se alcanza el límite de solubilidad. Durante la descompresión rápida, el gas disuelto se desorbe de la fase de aceite y se descarga rápidamente. La incapacidad de los tricomas para descargar el gas, a una velocidad establecida por la pérdida de solubilidad en el aceite con la descompresión, genera un gradiente de presión a través de la pared celular que pueden conducir a su ruptura (Gaspar *et al.*, 2003).

Estudios sugieren una extracción inicial más rápida de los aceites esenciales sometidos a descompresión rápida, que la de una muestra molida a baja temperatura, ésto debido a la destrucción selectiva de las barreras de transferencia de masa (tricomas glandulares que contengan aceites esenciales en plantas seleccionadas) en la extracción de aceite esencial durante la descompresión rápida con CO₂ supercrítico de las muestras impregnadas, lo cual facilita considerablemente el proceso de extracción (Gaspar *et al.*, 2000, Gaspar *et al.*, 2001).

CAPÍTULO 3
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1 Materia Prima

La materia prima a ocupar corresponde a hojas de *L. rivularis*, conocidas como “palo negro”, recolectadas en la zona de Valdivia, XIV Región de Los Ríos. Se obtuvieron hojas libres de tallos y ramas. Las hojas se almacenaron en bolsas, bajo oscuridad y bajo refrigeración, para así evitar la oxidación de los aceites esenciales de las muestras tanto por efecto de la luz como la temperatura.

3.1.2 Equipos e instrumentos

- Agitador de tubos Vortex (VELP científica, Europea)
- **Balanza analítica**, sensibilidad $\pm 0,0001\text{g}$, (precisa gravimetrics AG XB-220, Estados Unidos)
- Balanza granataria, sensibilidad $\pm 0,1\text{g}$ (Shimadzu, modelo ELB600S, Japón)
- **Bomba de vacío** (Jubalo model F-200, labortechnik GMBH, Alemania)
- **Cámara fotográfica** Axiocam ERc5c, Zeiss (Alemania)
- Cronómetro (Stopwatch CP-2186, Classroom ProductsTM, China)
- **Espectrofotómetro** (Genesys 10s UV-vis termo scientific, Estados Unidos)
- **Estufa**, Model DGH electrotermstatic, Sudelab S.A.
- Extractor de aceite esencial por arrastre con vapor (Equipo Clavenger)
- Extractor supercrítico (Applied Separation Spe-ed 2, INC Allentown, Estados Unidos)
- **Microscopio óptico** Carls Zeiss GMBH (Alemania)
- Micrótopo manual (Jung, Heidelberg, Alemania)
- Picadora Moulinex La Moulinette, capacidad 330 g
- Placa calefactora (Thermolyne, Cimarec, Estados Unidos)
- Refrigerador (Frigidaire FRD22, China)
- Tamices de la serie Tyler
- Tamiz vibratorio Ro-Tap, (GilsonCompany, INC, Estados Unidos)
- Termómetro digital

3.1.3 Reactivos

- Ácido acético
- Ácido Gálico
- Xilol
- Ácido linoleico
- Agua desionizada
- Agua destilada
- Alcohol
- Butil-hidroxi-tolueno (BHT)
- Carbonato de sodio 7,5% p/v
- Cloroformo p.a A.C.S., Laboratorio Cicarelli, San Lorenzo, Argentina
- CO₂ 99% de pureza
- DPPH (*1,1-difenil-2-picrilhidracil*)
- Etanol p.a
- Folin-Ciocalteau
- Ter-butanol puro
- Metanol p.a
- n-Hexano p.a
- Reactivo FRAP
- Solución de β -caroteno
- Parafina líquida pura p. a.
- Surfactante Tween 40
- Tolueno p.a
- Trolox
- β -caroteno tipo I, aprox 98%
- Nitrógeno

3.1.4 Materiales de vidrio y otros

- Balón de 1000 mL
- Cubetas de vidrio
- Matraz aforado 5, 10, y 100 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Micropipetas de 10, 100 μ L
- Picnómetro de 25 mL
- Probeta de 100 y 500 mL
- Vasos de precipitado
- Viales de 60 mL
- Material de vidrio de uso habitual
- Desecador con silica gel

3.2. Metodología

3.2.1 Distribución del tamaño de partícula

Para el análisis del tamizado las hojas secas de *L. rivularis* fueron sometidas a distintos tipos de pre-tratamientos y luego se determinó la distribución del tamaño de partícula en el cual se necesitaron tamices de distintas aberturas y un agitador de tamices Ro-Tap. Los tamices utilizados fueron: N° 6 (abertura malla: 2,36 mm), N° 18 (abertura malla: 1,00 mm), N° 20 (abertura malla: 0,85 mm), N° 25 (abertura malla: 0,71 mm), N° 30 (abertura malla: 0,60 mm), N° 50 (abertura malla: 0,30 mm) y N° 80 (abertura malla: 0,18 mm). Luego se sometieron a vibración por 15 min en un agitador de tamices Ro-Tap.

Para los ensayos con descompresión rápida con CO₂, las hojas de *L. rivularis* no se molieron y fueron reducidas de tamaño en forma manual, hasta que éstas pasaron por una abertura de malla de la serie Tyler de 2,360 (mm). Las muestras tamizadas se envolvieron en bolsas de papel y polietileno para ser almacenadas en un refrigerador (5° C) hasta su posterior uso. Así mismo las muestras tamizadas para molienda convencional y a baja temperatura se recolectaron en bolsas de papel y bolsa de polietileno para luego ser almacenadas bajo refrigeración hasta su utilización. El promedio del tamaño de partículas se determinó por la ecuación de Sautier (Povh *et al.*, 2001), ecuación 3.1.

$$\overline{dp} = \frac{1}{\sum_{i=1}^k \frac{\Delta x_i}{dp_i}} \quad (3.1)$$

Donde:

\overline{dp} : Diámetro de partícula (mm).

\overline{dp}_i : Diámetro de la malla i (mm).

Δx_i : Fracción masa retenida por la malla i.

i: 1,2,3,...k.

3.2.2 Determinación de humedad

Se determinó la humedad de las hojas de *L. rivularis* por el método AOAC (1990) y antes de medir, éstas se depositaron en un desecador durante 5 días, luego la humedad de las hojas se

determinó pesando 1 g de muestra en placas previamente taradas y se llevaron a una estufa a 100 °C, manteniéndose esta temperatura por 3 horas, posteriormente las muestras fueron puestas en un desecador con silicagel para enfriarse a temperatura ambiente. Cada una de las pesadas se realizó en la balanza analítica hasta que alcanzara un peso constante (AOAC, 1990). Esta determinación se realizó en duplicado y fue aplicado al sustrato, previo y posterior a la extracción (sustrato inicial y sustrato agotado, respectivamente). Para la determinación de humedad se utilizó la ecuación 3.2, que se muestra a continuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \left[\frac{(m_i - m_f)}{m_i} \right] \times 100 \quad (3.2)$$

Donde:

m_i : Peso de la muestra inicial, húmeda (g).

m_f : Peso de la muestra final, seca (g).

3.2.3 Densidad aparente y densidad verdadera

Se determinó la densidad aparente (ρ_{ap}) y la densidad verdadera (ρ_v) de las muestras molidas y tamizadas. La densidad aparente se obtuvo dividiendo la masa (kg) del sustrato depositado en una probeta de volumen predeterminado (m^3). Este procedimiento se efectuó dejando caer el material en una probeta de 50 mL sin aplicar presión mecánica. Estas mediciones se realizaron en triplicado. Por otro lado, para la determinación de la densidad verdadera se utilizó un picnómetro de 25 mL (botella de Gay-Lussac). El procedimiento consistió en tomar la muestra e introducirla en el interior del picnómetro hasta llenarlo y luego se pesó en una balanza analítica, posteriormente se adicionó tolueno hasta el nivel máximo del picnómetro que contenía la muestra a medir y finalmente se pesó nuevamente (Roca *et al.*, 2006). Inmediatamente el volumen fue calculado mediante la ecuación 3.3.

$$V = V_p - \left(\frac{W_{Total} - W_p - W}{\rho_{Tolueno}} \right) \quad (3.3)$$

Donde:

V: Volumen de la muestra (m³).

V_P: Volumen de picnómetro (m³).

W_{Total}: Masa del picnómetro más la muestra y el tolueno (kg).

W_P: Masa del picnómetro (kg).

W: Masa de la muestra (kg).

$\rho_{tolueno}$: Densidad del tolueno (kg/m³).

Al tener el volumen calculado se podrá determinar la densidad verdadera de las muestras de *L. rivularis* usando la ecuación 3.4.

$$\rho_v = \frac{W}{V} \quad (3.4)$$

Donde:

ρ_v : Densidad verdadera (kg/m³)

W: Masa de la muestra (kg)

V: Volumen de la muestra (m³)

3.2.4 Porosidad del lecho empacado.

Para determinar la porosidad del lecho empacado de partículas (ϵ) se necesitarán los valores de la densidad aparente y densidad verdadera. Estos valores se reemplazarán en la ecuación 3.5.

$$\epsilon = \left(1 - \frac{\rho_{aparente}}{\rho_{verdadera}}\right) \times 100 \quad (3.5)$$

Donde:

ϵ : Porosidad (-)

$\rho_{aparente}$: Densidad aparente (kg/m³)

$\rho_{verdadera}$: Densidad verdadera (kg/m³)

3.2.5 Pre-tratamientos y caracterización física de sustratos

Para evaluar la extracción de solutos desde sustratos vegetales usados en este estudio las hojas de *L. rivularis* fueron sometidas a distintos tratamientos para destruir barreras y mejorar la extracción supercrítica de aceites esenciales. Se realizaron tres pre-tratamientos; la primera por el método convencional, utilizando una picadora Moulinex, la segunda pre enfriando el sustrato seguido de molienda en una picadora tipo Moulinex, y el tercer método por descompresión rápida utilizando CO₂.

- **Molienda convencional.**

Aproximadamente 130 g de hojas de *L. rivularis* se sometieron a molienda utilizando una moladora de cuchillos tipo Moulinex en lotes de 10 g durante 2 s y a una temperatura de aproximadamente 28 °C. Se alcanzó esta temperatura debido a que la muestra previamente se introdujo en estufa a temperatura de 30 °C por 45 min, esto para que la muestra elevara su temperatura simulando el calor generado durante una molienda convencional ya que en la picadora no se alcanza a provocar el aumento de temperatura deseado. El molido se recolectó en bolsas de papel y bolsas de plástico para luego ser selladas y almacenadas bajo refrigeración hasta su utilización.

- **Molienda a baja temperatura.**

Para este pre-tratamiento se procedió a la optimización de molienda en frío para superar la generación de calor durante el proceso, por lo que fue necesario congelar la muestra a una temperatura de -60 °C durante 4 días en un congelador ubicado en la Universidad de La Frontera. La molienda se realizó de forma igual a la molienda convencional, aproximadamente 140 g de hojas se sometieron a molienda en un molino de cuchillos tipo moulinex en lotes de 10 g durante 2 s, tiempo durante el cual no se elevó la temperatura considerablemente. La molienda se realizó lo más rápido posible para evitar el incremento de la temperatura y así la pérdida de volátiles. Inmediatamente después la muestra molida se recolectó y se envasó en bolsas de papel y plástico bajo refrigeración hasta su utilización.

- **Descompresión rápida con CO₂**

Para el pre-tratamiento de descompresión rápida con CO₂, las hojas de *L. rivularis* se fracturaron manualmente y se pasaron a través de un tamiz de abertura de 2,36 mm. Este procedimiento se realizó como señala Huerta (2005), se cargó la muestra dentro de un extractor de 50 mL del equipo de extracción supercrítica, el sistema se presurizó a la condición de 21 °C y 130 bar

(Martínez, 2013), siendo ésta la mejor condición para ruptura de tricomas. Se mantuvieron estas condiciones por 1 h. Luego se abrió la válvula manualmente para provocar la descompresión rápida. Después de esta etapa, el sistema se presurizó para iniciar la etapa de extracción.

3.2.6 Extracción supercrítica

La extracción supercrítica se llevó a cabo a 52 °C y a dos presiones de 108 bar y 192 bar. El tiempo de extracción y flujo de CO₂ para la condición de 108 bar fue de 103 minutos y 2,8 L/min de CO₂. Así también el tiempo de extracción y flujo de CO₂ para la condición de 192 bar fue de 60 minutos y 4,7 L/min de CO₂. Los experimentos se llevaron a cabo en una unidad supercrítica Applied Separation Spe-ed 2 para cada sustrato proveniente de los distintos tratamientos: molienda convencional, molienda a baja temperatura y descompresión rápida con CO₂. 17 gramos del sustrato herbáceo fueron cargados en el extractor de 50 mL de capacidad y antes de extraer se mantuvieron las condiciones de extracción durante 30 min. La extracción fue realizada usando un grado de alimentación de CO₂ de un 99,8% de pureza y con una velocidad superficial de 1 mm/segundo. La recuperación del extracto se realizó utilizando viales de 60 mL, previamente pesados. Las muestras se mantuvieron en un desecador con sílicagel para enfriarlos y eliminar la humedad, previo al pesado. La cuantificación del extracto recuperado se obtuvo por diferencia de peso con recipientes de vidrios limpios y secos. El cambio de peso registrado en los recipientes, permitió determinar la masa de extracto recuperado.

El rendimiento de extracción de aceites esenciales se calculó al dividir la suma de peso de los aceites por el peso de la muestra cargada en base seca (ecuaciones de balance de masa). Los aceites esenciales correspondientes al ensayo de extracción para cada pre-tratamiento y presión se recolectaron en un vial, y éste se utilizó para los análisis de actividad antioxidante. Los experimentos de extracción se realizaron en triplicado.

3.2.7 Extracción por hidrodestilación

Además de la extracción supercrítica se realizó la extracción por hidrodestilación como método de comparación. La extracción de aceites esenciales se llevó a cabo por la metodología de hidrodestilación. Se cargaron 40 g de muestra de hojas enteras de *L rivularis* junto con 500 mL de agua como lo señala Khajeh *et al.* (2004) en un destilador tipo Clavenger por aproximadamente 4 h. Se dejó decantar, para separar fases por diferencia de densidades entre el aceite y el agua. El aceite fue recolectado en un matraz de vidrio de 5 mL y mantenido bajo refrigeración. Posteriormente se determinó el rendimiento.

3.2.8 Análisis de extractos

3.2.8.1 Actividad antioxidante: método del radical DPPH

Este método consiste en la neutralización de radicales libres de DPPH de los extractos antioxidantes (García *et al.*, 2011). Generalmente, el método consiste en la mezcla de alícuotas del aceite esencial con el radical DPPH con posterior registro de la variación de absorbancia en el tiempo (Pastene, 2009). La decoloración corresponde a la actividad captadora de radicales del antioxidante (Kulisic, 2004).

Para este método se prepararon reactivos según Hatano *et al.* (1998):

- **Solución de DPPH.** Se disolvieron 0,0039 g de DPPH en 25 mL de etanol p.a. en un vaso precipitado cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz. Luego se dejó en agitación durante 30 min.
- **Solución de Trolox.** Se disolvieron 0,0025 g de Trolox en 5 mL de etanol p.a. y 5 mL de agua desionizada.

Primero se preparó una curva de calibración (Anexo I, Figura I-1), adicionando a un tubo de 0 a 0,1 mL de trolox, completando con etanol hasta obtener 3,2 mL de volumen total, donde el blanco corresponde al valor 0. Luego a cada tubo se agregó 0,8 mL de reactivo DPPH.

Se debió preparar diluciones para cada muestra donde se adicionó a cada tubo de ensayo: 2,2 mL de etanol, 1 mL de muestra (concentración: 10 mg/mL) y 0,8 mL de DPPH. Para el blanco se adicionó 3,2 mL de etanol con 0,8 mL de DPPH. La mezcla se agitó y se dejó reposar por 15 min en la oscuridad. Se trabajó en triplicado y se midió la absorbancia a 520 nm en cubeta de vidrio. Finalmente a partir de la curva patrón Trolox se calculó la actividad antioxidante de las muestras expresadas en mg de Trolox equivalentes por 100 gramo de muestra seca utilizando la ecuación 3.6.

$$C = \frac{(m \times A) \times V \times FD}{g} \quad (3.6)$$

Donde:

C: Concentración de trolox equivalente (mmol trolox/ g de aceite).

m: Pendiente de la curva patrón de trolox.

A: Absorbancia analizada en longitud 520 nm.

FD: Factor de dilución.

V: Volumen del solvente utilizado en la preparación del extracto (mL).

g: Gramos de extracto utilizado.

3.2.8.2 Actividad antioxidante: método del blanqueamiento del β -caroteno

El procedimiento para determinar la actividad antioxidante utilizando el método del blanqueamiento del β -caroteno, se basa en el método señalado por Mandiola *et al.* (2007). El método de blanqueamiento del β -caroteno se basa en la pérdida del color amarillo de β -caroteno debido a su reacción con los radicales que se forman por oxidación de los ácidos linoleico en una emulsión (Kulisic *et al.*, 2004).

Primeramente se prepara la solución β -caroteno (1 mg/mL en cloroformo), luego se elaboraron dos emulsiones consistentes en:

- A. 0,4 ml de β -caroteno, 0,088 mL de ácido linoleico y 0,4 mL de Tween 40. Se evaporó el cloroformo bajo una corriente de nitrógeno seco. La muestra seca se disolvió en 200 mL de agua destilada y se emulsificó en un sonificador durante 1 min.
- B. De igual forma se elaboró esta emulsión, pero sin el β -caroteno

Las muestras de aceite esencial fueron diluidas en metanol y se elaboraron distintas concentraciones (0,2, 0,5, 1,0 y 2,5 mg/mL). Posteriormente se agregó 0,2 mL de muestra diluida a cada tubo de ensayo junto con 5 mL de la solución A, se realizó un control sin antioxidante donde se agregó 0,2 mL de metanol y 5 mL de la solución A. La emulsión B se utilizó como blanco (se agregó a un tubo de ensayo 0,2 mL de metanol junto con 5 mL de solución B). Las muestras fueron agitadas y medidas inmediatamente ($t=0$) en un espectrofotómetro a 470 nm en cubetas de vidrio. Una vez leídas las muestras fueron sometidas a una auto-oxidación térmica a 50 °C por dos horas, se registró la absorbancia cada 15 min. Todas las muestras se realizaron en triplicado. La actividad antioxidante fue calculada en términos de porcentaje de inhibición relativa al control (ecuación 3.7).

$$IC = \left(\frac{A_{a(120)} - A_{c(120)}}{A_{c(0)} - A_{c(120)}} \right) \quad (3.7)$$

Donde:

$A_{a(120)}$: Absorbancia del antioxidante a $t= 120$ min.

$A_{c(120)}$: Absorbancia del control a $t= 120$ min.

$A_{c(0)}$: Absorbancia del control a $t= 0$ min.

3.2.8.3 Actividad antioxidante: método de reducción del Hierro III (FRAP)

El método FRAP, consiste en la reducción de un compuesto o mezcla de compuestos sobre el Fe^{+3} presente en el complejo orgánico Tripyridyltriazine (TPTZ) cuya intensidad de color es proporcional a la capacidad reductora de los compuestos ensayados. La capacidad de los aceites esenciales para reducir el hierro (III) a hierro (II) se determinó según el método de Benzie y Strain (1996). Para este método se prepara el reactivo FRAP (10 partes de tampón de acetato de sodio 300 nM a pH 3,6, 1 parte de solución TPTZ 10 nM (tripirydyltriazina) y 1 parte de 20 nM solución de $FeCl_3$). La preparación de cada una de estas partes se presenta a continuación:

- A. Para preparar tampón de acetato de sodio 300 nM a pH 3,6, se disolvieron 3,1 g de acetato sódico en 16 mL de ácido acético glacial, y posteriormente se aforó hasta 500 mL con agua destilada.
- B. Para preparar la solución de TPTZ (10 nM), primero se mezcló 0,166 mL de HCl con agua destilada aforando hasta 50 mL. Luego se pesó 0,1561 g de TPTZ y se aforó hasta los 50 mL con la primera solución preparada correspondiente a la de HCl.
- C. Finalmente para preparar la solución de $FeCl_3$ (20 nM) se pesó 0,1622 g de $FeCl_3$ y se aforó hasta 50 mL con agua destilada.

Para preparar el reactivo FRAP se mezcló 50 mL de la solución A más 5 mL de solución B y 5 mL de solución C. Así mismo para la curva de calibración (Anexo I, Figura I-2) se prepararon soluciones trolox a diferentes concentraciones, las cuales corresponden a 0, 100, 200, 350, 450 y 500 μmol de trolox/L (Gounder y Lingamallu, 2012).

Para la determinación de la actividad antioxidante se añadieron 50 μL de solución extracto en metanol (concentración 10 mg por mL de metanol) a 1500 μL del reactivo de FRAP más 150 μL de agua destilada y más 50 μL de las diferentes concentraciones de trolox, y se incubó en un baño de agua a 37 °C por 30 min. Luego de transcurrido el tiempo el aumento de la absorbancia a 593 nm se midió en cubetas de vidrio. La capacidad antioxidante basado en la capacidad de reducir los iones férricos del extracto fue expresada en μmol equivalentes de Trolox por mg de extracto a partir de la ecuación 3.8.

$$C = \frac{(m \times A) \times V \times FD}{mg} \quad (3.8)$$

Donde:

C: Concentración expresado en trolox equivalente (μmol trolox/mg de aceite).

m: Pendiente de la curva patrón de trolox.

A: Absorbancia analizada en longitud 593 nm.

FD: Factor de dilución.

V: Volumen del solvente utilizado en la preparación del extracto (mL).

mg: miligramos de extracto utilizado.

3.2.8.4 Contenido de fenoles totales

El contenido total de fenoles fue determinado de acuerdo con el procedimiento descrito previamente por Singleton y Rossi (1965), correspondiente al método Folin-Ciocalteu. Previamente la extracción de polifenoles extraídos serán medidas por el método informado por Koski *et al.* (2002) con algunas modificaciones.

Preparación de la muestra:

10 mg de aceite se disolvieron en hexano (2 mL) en un tubo de ensayo y se sometieron por 3 minutos a agitación en un agitador de tubos Vortex. El hexano fue extraído de la muestra por evaporación con nitrógeno y el procedimiento de extracción de polifenoles se repitió 3 veces, el residuo fue disuelto en etanol (2 mL) antes de someter a la prueba de Folin-Ciocalteu.

Para preparar los reactivos se utilizó reactivo Folin-Ciocalteu diluido, Na₂CO₃ 7,5% p/v y como patrón ácido gálico con una concentración de 0,5 mg/mL, posteriormente se prepararon los siguientes reactivos:

- Reactivo Folin Ciocalteu fue diluido en una relación 1:10 v/v (R. Folin/agua destilada). Se diluyeron 10 mL del reactivo en 100 mL de agua desionizada.
- Carbonato sódico (Na₂CO₃) 7,5% p/v.
- El patrón utilizado fue ácido gálico con una concentración de 0,5 mg/mL. Se disolvieron 0,01 g de ácido gálico con agua desionizada en un matraz de aforo de 20 mL.

Para la curva de calibración (Anexo I, Figura I-3), se adicionó a 5 matraces de aforo de 10 mL la solución patrón (0,0, 0,05, 0,1, 0,2, y 0,3 mL) a cada matraz (el primero se considera como blanco). A continuación, 0,5 mL del reactivo Folin-ciocalteu fueron añadidos a cada matraz más 1 mL de la solución de Na₂CO₃ y se aforó con agua desionizada a un volumen final de 10 mL. Se estableció el cero de la absorbancia del blanco a 765 nm y se procedió a medir la absorbancia de las demás soluciones, obteniéndose de esta forma el gráfico de la curva patrón. Los resultados de los análisis fueron expresados en mg de ácido gálico por 100 g de extracto. A partir de la ecuación de la curva obtenida con el patrón de ácido gálico se calculó la concentración de polifenoles totales del aceite expresado en mg de ácido gálico equivalente por g de aceite (mg GAE/g aceite) a partir de la ecuación 3.9

$$C = \frac{(m \times A) \times V \times FD}{g} \quad (3.9)$$

Donde:

C: Concentración de ácido gálico equivalente (mg GAE/g aceite).

m: Pendiente de la curva patrón de ácido gálico.

A: Absorbancia analizada en longitud 593 nm.

FD: Factor de dilución.

V: Volumen del solvente utilizado en la preparación del extracto (mL).

g: Gramos de extracto utilizado.

3.2.9 Microscopia óptica

Las muestras frescas se sometieron a fijación por 48 h con una solución compuesta por una mezcla de formalina, ácido acético, etanol y agua (1:1:13:5). Luego las muestras fueron deshidratadas mediante sucesivas inmersiones, de 30 min cada una, en soluciones acuosas con concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 95 y 100 %), seguido por una inmersión final de 15 min en ter-butanol puro. Luego siguieron etapas de corte y tinción, realizadas de desgarros o rupturas en la etapa de corte, las muestras deshidratadas fueron infiltradas con parafina (como material de soporte) mediante sucesivas inmersiones en una mezcla líquida de parafina y ter-butanol, que contenía volúmenes crecientes de parafina hasta lograr la inmersión en parafina líquida pura. Para el corte se utilizó un micrótopo manual (Jung, Heidelberg, Alemania), obteniendo laminas delgadas de 30 μm de grosor, las que fueron colocadas sobre un portaobjetos. La parafina fue removida de los cortes mediante lavado con xilol, seguido por sucesivos lavados con soluciones acuosas de etanol con concentraciones decrecientes, y finalmente se lavó con agua destilada.

Las imágenes de las muestras se obtuvieron mediante un microscopio óptico **Carl Zeiss GMBH** (Alemania) equipado con una cámara fotográfica **Axiocam ERc5c** (Alemania) (Sandoval, 2008).

3.2.10 Análisis estadístico

Los pre-tratamientos a estudiar correspondieron a molienda convencional (CO), molienda a baja temperatura (BT) y descompresión rápida con CO_2 (DR). Para cada sustrato obtenido del correspondiente pre-tratamiento, se realizó la extracción con CO_2 a dos condiciones: 52 °C y 108 bar; y 52 °C y 192 bar. Como respuestas se midió el rendimiento de extracción, la actividad antioxidante (tres métodos), y el contenido de fenoles totales. Posterior a esto, las respuestas fueron sometidas a un análisis de varianza de dos factores, esto es, que permite estudiar

simultáneamente los efectos de dos fuentes de variación, para poder entonces determinar su grado de significancia sobre el análisis de datos.

Los resultados fueron informados como lo muestra la Tabla 3.1 con el promedio \pm D.E considerando las tres replicas. La significancia de la diferencia promedios entre los tratamientos y entre las presiones de 108 y 192 bar fue determinado mediante la prueba de Duncan con $\alpha=0,05$.

Tabla 3.1. Resultados obtenidos para cada respuesta

Pre-tratamiento	52 °C	
	108 bar	192 bar
Molienda convencional		
Molienda a baja temperatura		
Descompresión rápida		

CAPÍTULO 4
RESULTADOS Y
DISCUSIONES

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Caracterización del sustrato

Numerosas variables tienen un efecto singular en la extracción supercrítica de aceites esenciales como son las condiciones de extracción (presión y temperatura), humedad y el pre-tratamiento aplicado al sustrato, estos afectan en gran medida no sólo el rendimiento sino también la composición del material extraído.

Para evaluar la extracción de aceites esenciales se aplicaron distintos pre-tratamientos al sustrato con el fin de destruir selectivamente las barreras celulares que contengan los aceites esenciales en la hierba. Luego de aplicar estos pre-tratamientos; molienda convencional, molienda a baja temperatura y descompresión rápida, las hojas de *L. rivularis* obtenidas fueron sometidas a tamizado para así determinar la distribución del tamaño de partícula (\overline{dp} , mm), densidad aparente (ρ_{ap} , kg/m³), densidad verdadera (ρ_v , kg/m³), y porosidad (ϵ), quedando así con determinadas características físicas señaladas en la Tabla 4.1. En primera instancia se midió la humedad de las muestras pre-tratadas de *L. rivularis*, resultando una humedad de 4,76 % (Anexo A, Tabla A-1). A pesar del carácter lipófilo de compuestos de aceites esenciales, el agua presente en la matriz vegetal puede interferir en la interacción soluto-CO₂ (en particular en el caso de los terpenoides que son más polares que los terpenos) y producir una disminución del rendimiento de la extracción. Por esta razón, se recomienda el secado de la materia prima (Fornari *et al.*, 2012) por ejemplo cuando la humedad se encuentra entre 7 y 18% se tiene poco efecto sobre la extractabilidad de aceite. Cuando el contenido de humedad aumenta, se evidencia una disminución en la eficiencia de extracción. En el caso de alto contenido de humedad (~ 85%) la extracción es casi inhibida (Nagy y Simándi, 2008). El tamaño promedio de partícula se determinó a partir de los datos de distribución de tamaño de partículas (Anexo A, Tabla A-2 y A-3).

Tabla 4.1 Resumen de valores de tamaño de partícula promedio (d_p), densidad aparente (ρ_{ap}), densidad verdadera (ρ_v) y porosidad (ε) para un lecho empacado en función del tipo de pre-tratamiento.

Tipo de pre-tratamiento	$\overline{d_p}$ (mm)	ρ_{ap} (kg/m ³)	ρ_v (kg/m ³)	ε (-)
Molienda convencional	0,78	340,7	1403,7	75,72
Molienda a baja temperatura	0,81	340,9	1363,0	74,98
Descompresión rápida	2,36	340,8	1044,0	67,34

La densidad aparente del sustrato entrega información sobre la capacidad de carga en el extractor. Para todos los pre-tratamientos; molienda convencional, molienda a baja temperatura y descompresión rápida las densidades fueron bastantes similares con valores de 340,7, 340,9 y 340,8 kg/m³ respectivamente.

La porosidad del lecho es el espacio vacío presente en la masa de hojas dentro del extractor, expresado en relación al porcentaje del volumen total de la muestra. La resistencia al flujo del CO₂ depende entre otros factores de la porosidad del lecho y del tamaño de la muestra. La molienda convencional y molienda a baja temperatura mostraron valores similares de porosidad con valores de 75,7 y 74,9 respectivamente, mientras que la descompresión rápida presentó menor porosidad de lecho con un valor de 67,34%.

El tamaño de las partículas juega un papel importante en los procesos de EFS; si las resistencias internas de transferencia de masa pueden ser reducidas, la extracción estará controlada por las condiciones de equilibrio y por lo tanto, se requieren cortos tiempos de extracción (Fornari *et al.*, 2012). Bocevska y Sovová (2004) estudiaron la EFS de aceite esencial de *Milenrama* (*Asteraceae*) e informaron que el tratamiento previo de las plantas de milenrama (molido fino o cortado con tijeras) no afecta la tasa de extracción. Estos resultados pueden explicarse por los fenómenos que tienen lugar a escala de estructura secretora en la planta, los tricomas glandulares son conductos secretores rígidos que no se ven afectados al momento en que las hojas son reducidas de tamaño. El tamaño promedio de partículas ($\overline{d_p}$, mm) de sustrato sometido a cada pre-tratamiento, se encontró en un rango parecido para molienda convencional y molienda a baja temperatura, esto debido a que se usó el mismo proceso de molienda. Sin embargo los valores informados para el sustrato tratado con descompresión rápida con CO₂ supercrítico, es diferente

Efecto de pre-tratamientos en hojas de Leptocarpha rivularis (palo negro) como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales

debido al mayor tamaño de partícula utilizado en este estudio ($d_p < 2,360 \text{ mm}$) lo cual a su vez afecta la porosidad (ϵ).

La distribución y el tamaño de partículas obtenidas de las hojas de *L. rivularis* pueden afectar la homogeneidad y reproducibilidad de sub-muestras utilizadas en cada carga dentro del extractor, por lo tanto, obtener homogeneidad de la muestra es esencial para obtener sub-muestras representativas (Santos *et al.*, 2008). Es por esto que la muestra cargada en el extractor se obtuvo sacando una parte de cada masa retenida en los tamices de tal manera de obtener una muestra homogénea del lote inicial en cada carga (Anexo A, Tabla A-4 y A-5).

4.2. Efecto del pre-tratamiento y presión de extracción sobre el rendimiento de extracción

En la Tabla 4.2 se presenta el rendimiento de extracción de aceite esenciales extraídos de *L. rivularis* (g aceite/kg sustrato) para cada combinación de presión y pre-tratamiento aplicado al sustrato. Este rendimiento resultó del promedio de 3 réplicas \pm desviación estándar de las extracciones de aceites esenciales obtenidas a 52 °C y a presiones de 108 y 192 bar para cada uno de los diferentes sustratos provenientes de los distintos pre-tratamientos. Los resultados del análisis estadístico determinaron que el tipo de pre-tratamiento y la presión de extracción afectaron significativamente ($\alpha=0,05$) el rendimiento de extracción. Así mismo se identificó la variable que posee mayor influencia sobre el rendimiento de extracción el cual fue la variable pre-tratamiento (Anexo B, Tabla B-1). Mediante el análisis Duncan con $\alpha=0,05$ se pudo identificar los pares de promedio que presentan diferencia significativa para la variable presión (Anexo B, Tabla B-2) y pre-tratamiento (Anexo B, Tabla B-3 y B-4).

Se puede observar de la Tabla 4.2 que el rendimiento de extracción de aceites esenciales fueron más altos para sustratos pre-tratados por descompresión rápida con CO₂ supercrítico (41,48 g aceite/kg sustrato) y por molienda a baja temperatura (31,85 g aceite/kg sustrato) extraídos a 108 bar en comparación con los rendimientos obtenidos por el método convencional (14,19 g aceite/kg sustrato). Para la extracción 192 bar el rendimiento de extracción aumentó a valores de 27,79, 43,00 y 51,09 g aceite/kg sustrato para molienda convencional, molienda a baja temperatura y descompresión rápida, respectivamente.

Tabla 4.2 Rendimiento de extracción de aceites esenciales (g aceite/kg sustrato) obtenido con CO₂ supercrítico a 52 °C.

Pre-tratamientos	108 bar	192 bar
Molienda convencional	14,19 ± 2,45a	27,79 ± 2,39a
Molienda a baja temperatura	31,85 ± 3,23b	43,00 ± 2,20b
Descompresión rápida	41,48 ± 2,20c	51,09 ± 2,59c

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0,05$)

Los bajos rendimientos de extracción obtenidos por el método convencional pueden ser explicado porque el calor generado durante la molienda, provocó pérdidas considerables de compuestos volátiles en el sustrato, los cuales pueden ser minimizados mediante la reducción de la temperatura inicial del material antes de la molienda, como se hace en las operaciones de molienda a baja temperatura (Uquiche *et al.*, 2012). En efecto, los tratamientos eficaces antes de la extracción de aceite esencial deben ser dirigidos a una destrucción selectiva de las barreras celulares que tenga el aceite esencial en la hierba, pero no a expensas de provocar pérdidas de compuestos volátiles. Es evidente que el contenido de aceite esencial depende del pre-tratamiento de la muestra, por lo que en la molienda a baja temperatura y por descompresión rápida se produjo una liberación más pronunciada de los aceites esenciales durante la extracción supercrítica. Así mismo los altos rendimientos de extracción obtenidos por el método de descompresión rápida pueden ser explicados por la ruptura eficiente de las paredes glandulares llamadas tricomas lograda por esta operación como lo muestra la Figura 4.1, los tratamiento de descompresión rápida muestran evidencia de ruptura desde dentro del interior de las glándulas haciéndolo más efectivo (Gaspar *et al.*, 2003). En la Figura 4.1 (A) tomada del microscopio, la flecha indica un tricoma glandular intacto en la superficie de la hoja de *L. rivularis* antes de someterlo a descompresión rápida, se observa pocos tricomas debido a que en este tipo de familia (*Asteraceae*) presentan más ductos oleoríferos que tricomas glandulares (Sharma y Bhat, 2009). En la Figura 4.1 (B) se muestra una hoja de *L. rivularis* luego del pre-tratamiento de descompresión rápida con CO₂, en esta imagen se indica los tricomas glandulares con su punta destruida y separadas de la hoja.

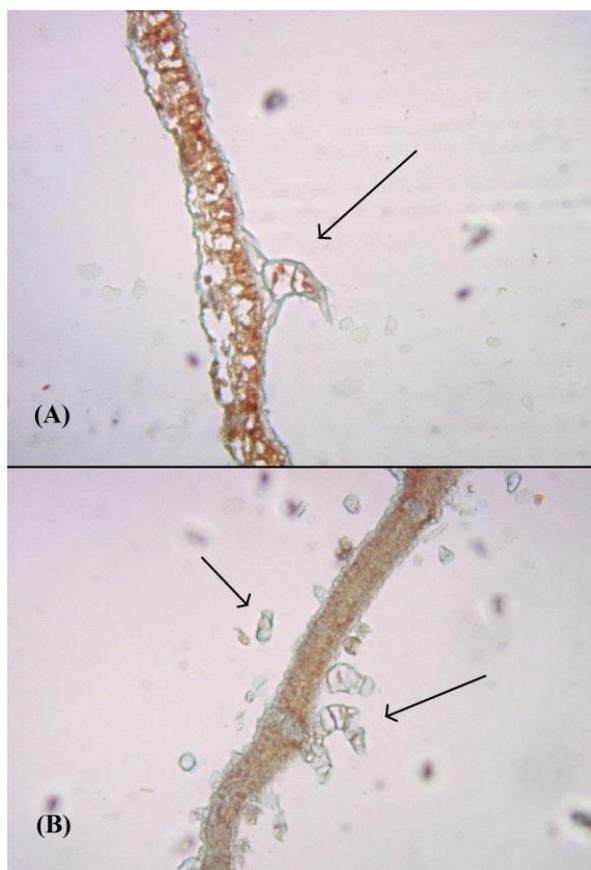


Figura 4.1 (A) imagen tomada por microscopio óptico de una hoja de *L. rivularis* antes de ser sometida a descompresión rápida con CO₂ supercrítico. (B) imagen tomada por microscopio óptico de una hoja de *L. rivularis* después de ser sometida a descompresión rápida con CO₂ supercrítico (glándulas tricomas indicadas por flechas)

Por otro lado la Tabla 4.2 muestra que para una temperatura constante, el rendimiento de extracción aumentó para cada pre-tratamiento conforme se aumenta la presión de extracción, esto se explica por el hecho que cuanto mayor es la presión, mayor es el poder disolvente del CO₂ y más pequeña es la selectividad de la extracción (Fornari *et al.*, 2012). Es por esto que a mayor presión se extraen mayores compuestos de diferente peso molecular.

Comparando el rendimiento de extracción de aceite esencial obtenido de *L. rivularis* con otros aceites esenciales obtenidos en plantas de la misma especie *Asteraceae*, el obtenido en este estudio muestra un valor de 27,79 g aceite/kg sustrato (molidos convencionalmente) lo que resulta bueno, ya que es mayor que el de especies de la familia *Asteraceae* como *Acmella oleracea* (hojas) extraídos a 50 °C y 250 bar con un rendimiento de 1,59 g aceite/kg sustrato (Dias *et al.*, 2012). Para baja presión (150 bar) y 40 °C se ha reportado un rendimiento de

extracción para especies como el Tomillo (*Lamiaceae*) de 0,754 g aceite/kg de sustrato (Babovic *et al.*, 2010). Lo que resulta bajo comparado con el rendimiento de extracción obtenido en este estudio a presión de 108 bar por molienda convencional el cual es 21 veces más alto presentando un valor de 14,19 g aceite/kg sustrato.

4.3. Efecto del pre-tratamiento sobre la actividad antioxidante de los extractos

4.3.1 Métodos basados en transferencia electrónica única

4.3.1.1 Actividad antioxidante: Método DPPH

Las actividades antioxidantes del extracto de *L. rivularis* se analizaron por el método de DPPH y los resultados se muestran en la Tabla 4.3 expresados en mmol trolox eq/g aceite. Este método consiste en determinar la capacidad de captura del radical libre DPPH por parte de los compuestos antioxidantes presente en el extracto obtenido con los distintos pre-tratamientos, extraídos a presiones de 108 y 192 bar y a temperatura constante (52 °C). Los resultados del análisis estadístico determinaron que el tipo de pre-tratamiento y la presión de extracción afectaron significativamente ($\alpha=0,05$) sobre la actividad antioxidante. Del análisis también se logró identificar la variable que posee mayor influencia sobre la respuesta actividad antioxidante, siendo el factor presión (Anexo C, Tabla C-1). Mediante el análisis Duncan con $\alpha=0,05$ se pudo identificar los pares de promedio que presentan diferencia significativa para la variable presión (Anexo C, Tabla C-2) y pre-tratamiento (Anexo C, Tabla C-3 y C-4).

Se puede observar de la Tabla 4.3 que el extracto obtenido a presión 108 bar y molienda convencional presentó la más baja actividad antioxidante con un valor de 0,50 mmol trolox eq/g aceite. El extracto que resultó con mayor capacidad antioxidante fue los de descompresión rápida con 0,74 mmol trolox eq/g aceite. Para el pre-tratamiento de molienda a baja temperatura se encontró un valor intermedio de 0,64 mmol trolox eq/g aceite. Se observa de la Tabla 4.3 también que al aumentar la presión de extracción para cada pre-tratamiento la actividad antioxidante aumentó con valores de 1,86, 2,53 y 1,79 mmol trolox eq/g aceite para molienda convencional, molienda a baja temperatura y descompresión rápida respectivamente.

Tabla 4.3 Actividad antioxidante medida por el método DPPH (mmol trolox eq/g aceite) en extractos obtenidos con CO₂ supercrítico a 52 °C.

Pre-tratamientos	108 bar	192 bar
Molienda convencional	0,50 ± 0,03a	1,86 ± 0,09a
Molienda a baja temperatura	0,64 ± 0,05b	2,53 ± 0,08b
Descompresión rápida	0,74 ± 0,03b	1,79 ± 0,01a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0,05$)

La extracción posterior al pre-tratamiento por descompresión rápida presentó la más alta actividad antioxidante para los aceites extraídos a 108 bar, demostrado en la baja absorbancia registrada. Esto sugiere que se extrajeron una cantidad relativa de compuestos activos que pueden neutralizan y evitar la propagación en cadena de los radicales libres (Thaipong *et al.*, 2006). Con el pre-tratamiento de molienda convencional se obtuvo la menor actividad antioxidante expresado mmol trolox eq/g aceite, esto explicado por el hecho que la muestra fue sometida a una mayor temperatura degradando parte de los aceites esenciales responsables de esta actividad. Para el pre-tratamiento de molienda a baja temperatura se obtuvo un valor intermedio, gracias a que se retuvieron gran parte de los aceites esenciales responsables de la actividad antioxidante mediante el pre-tratamiento de baja temperatura.

Para este ensayo sólo el extracto obtenido a alta presión consiguió disminuir más rápidamente la absorbancia y, en consecuencia, disminuyó el radical libre estable DPPH a difenilpicrilhidrazina de color amarillo, esto provocado por la absorción de hidrógeno del antioxidante, por lo que a esta presión de extracción es más potente la actividad antioxidante del extracto. De mayor a menor proporción se encontró: molienda a baja temperatura, molienda convencional y descompresión rápida con 2,53, 1,86 y 1,79 mmol trolox eq/g aceite respectivamente. Esto se explica porque los monoterpenos y sesquiterpenos son los constituyentes principales en el aceite esencial, los cuales presentan actividad antioxidante, y estos aumentan a medida que aumenta la presión de extracción, explicado en un estudio realizado en plantas de la familia *Lamiaceae*, en la cual demuestran que los compuestos monoterpenos aumentan en el extracto de un 40,30 hasta 48,39% a presiones de extracción de 120 y 180 bar, respectivamente. Así mismo a presiones de 120 y 180 bar, se extraen sesquiterpenos que contienen oxígeno y que aumentan de 9,12 hasta un

10,81% respectivamente (Costa *et al.*, 2012). Por lo que a mayor presión de extracción, aumenta el porcentaje de extracción de estos componentes y mayor es la capacidad antioxidante registrada. Es importante destacar que aunque los polifenoles presentan principios activos como antioxidantes (Li *et al.*, 2009) se ha encontrado que no existe ninguna relación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad de neutralizar el radical DPPH (Hinneburg, 2006).

Los resultados obtenidos con las actividades antioxidantes en este estudio presentaron valores bajos a los comparados con otros aceites esenciales de la familia de *Lamiaceae* a baja presión, las cuales poseen los mismos conductos secretores además de los mismos compuestos activos que contienen la familia de las *Asteraceae* (monoterpenos y sesquiterpenos) (Niemeyer, 2009), por ejemplo en la especie *Lippia origanoides* se presenta una actividad antioxidante de 0,8 mmol trolox eq/mg sustrato extraídos a 60 °C y a 110 bar. Para otro estudio realizado en plantas de la familia *Asteraceae Lavanda* se indica que al aumentar la presión de 100 a 180 bar (50 °C) aumenta la actividad antioxidante DPPH expresada en porcentaje de inhibición, desde 21.9% a 73.5% respectivamente (Danh *et al.*, 2012).

4.3.1.2 Actividad antioxidante: método de reducción del Hierro III (FRAP)

Las actividad antioxidante (método FRAP) obtenidas en este estudio provienen de las extracciones de aceites esenciales obtenidas a temperatura constante (52 °C) y a dos presiones de extracción, 108 y 192 bar para cada uno de los diferentes sustratos provenientes de los distintos pre-tratamientos.

Mediante el análisis estadístico, se obtuvo que ambas variables de control, pre-tratamiento y presión de extracción, no provocaron un cambio significativo ($\alpha=0,05$) en la actividad antioxidante (Anexo D, Tabla D-1).

Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol trolox eq/mg aceite}$, y se muestran en la Tabla 4.4, encontrándose que ha 108 bar, la mayor actividad antioxidante se obtuvo en muestras pre-tratadas por descompresión rápida con un valor de 2,44 $\mu\text{mol trolox eq/mg aceite}$. Y la menor actividad se obtuvo para muestras pre-tratadas por molienda convencional con 1,96 $\mu\text{mol trolox eq/mg aceite}$. Al aumentar la presión de extracción (192 bar) se puede observar que aumenta la actividad antioxidante aunque no considerablemente para el pre-tratamiento de molienda convencional y molienda a baja temperatura con valores de 2,48 y 3,02 $\mu\text{mol trolox eq/mg aceite}$

respectivamente. Para el extracto pre-tratado por descompresión rápida, su actividad antioxidante bajó en comparación con los otros pre-tratamientos a un valor de 2,17 $\mu\text{mol trolox eq/mg}$ aceite.

Tabla 4.4 Actividad antioxidante medido por el método FRAP ($\mu\text{mol trolox eq/mg}$ aceite) en extractos obtenidos con CO_2 supercrítico a 52 °C.

Pre-tratamientos	108 bar	192 bar
Molienda convencional	1,96 \pm 0,19	2,48 \pm 0,09
Molienda a baja temperatura	2,01 \pm 0,08	3,02 \pm 0,29
Descompresión rápida	2,44 \pm 0,08	2,17 \pm 0,03

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0,05$)

Según los resultados se observa que el extracto obtenido a 108 bar con pre-tratamiento de descompresión rápida presentó la mayor capacidad antioxidante con 2,44 $\mu\text{mol trolox eq/mg}$ sustrato, mientras que el extracto obtenido por molienda convencional presentó solo 1,96 $\mu\text{mol trolox eq/mg}$ aceite. A 192 bar se evidencia que aumentó la actividad antioxidante, a excepción del extracto obtenido por el pre-tratamiento de descompresión rápida. La mayor capacidad antioxidante se encontró para la muestra pre-tratada a baja temperatura. Esto es explicado debido a que el extracto obtenido por extracción supercrítica en este estudio puede estar conformado principalmente por tres grupos de compuestos, fenoles, hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpénicos oxigenados que podrían ser las sustancias que potencialmente reducirían el complejo ferricianuro a la forma ferrosa (Vasquez, 2012). Diferentes estudios han indicado que la capacidad de donación de electrones, lo que refleja el poder reductor de los compuestos bioactivos, se asocia con actividad antioxidante (Siddhuraju *et al.*, 2002; Arabshahi y Urooj, 2007). Esto queda evidenciado en los resultados ya que el poder antioxidante aumenta conforme se aumenta la presión de extracción, traducido en una mayor co-extracción de compuestos bioactivos responsables de esta actividad (Costa *et al.*, 2012), tal como son los polifenoles, ya que el método FRAP actúa sobre los polifenoles capaces de donar electrones reduciendo intermediarios oxidados (Vásquez, 2012). Ha mayor actividad antioxidante de extracto obtenido a 192 bar y pre-tratamiento de molienda a baja temperatura, indica que a estas condiciones se

extrajo mayor cantidad de compuestos fenoles, debido probablemente al pre-enfriado de la muestra que evitó la degradación de estos compuestos.

La disminución de la actividad antioxidante del extracto obtenido a 192 bar por el pre-tratamiento de descompresión rápida se puede deber a que la alta densidad del CO₂ a alta presión, resulta en la co-extracción de compuestos no activos, que no favorecen la actividad antioxidante de los extractos, ya que estos pueden interferir negativamente en la medición (Ilemonisa *et al.*, 2013).

Al comparar los datos con literatura se observa que los datos obtenidos en este estudio son mayores a los obtenidos por otras especies de la familia de *Lamiaceae* como es el caso de *L. origanoides* presentando un valor 0,69 mmol trolox eq/mg sustrato a presión de 110 bar y 50 ° C (Vásquez, 2012), comparado con los 1,96 μmol trolox eq/mg sustrato obtenidos a 108 bar y molienda convencional. No existen referencias de esta actividad a presiones cercanas a los 200 bar y 52 °C pero se presume que debe aumentar debido a la acción de los compuestos sesquiterpénicos mayormente co-extraídos a altas presiones.

4.3.2 Método basado en transferencia de átomos de hidrógeno

4.3.2.1 Actividad antioxidante, método blanqueamiento del β-caroteno

El método de blanqueo de β-caroteno se indujo por la presencia del radical peróxido formado a partir de la degradación oxidativa de ácido linoleico, reduciendo la cantidad de β-caroteno en la solución y por lo tanto la absorbancia. Esto se expresó en porcentaje de inhibición IC₅₀ (mg/mL) mostrado en la Tabla 4.5, para cada uno de los diferentes sustratos provenientes de los distintos pre-tratamientos a 108 y 192 bar (50 °C) (Anexo E, Figura E-1, E-2, E-3). Los resultados del análisis estadístico para los datos de actividad antioxidante se muestran en el Anexo F, Tabla F-1. **Según este análisis se establece que los factores de control presentaron un efecto significativo ($\alpha=0,05$) sobre la respuesta de actividad antioxidante (método blanqueamiento del β-caroteno), siendo la variable presión la que contribuyó más significativamente ($\alpha=0,05$).**

Los resultados obtenidos del análisis de varianza permitieron aplicar el análisis Duncan, para el factor presión los resultados se muestran en Anexo F, Tabla F-2 y para el factor pre-tratamiento Anexo F, Tabla F-3, F-4.

La Tabla 4.5 muestra que para el **extracto obtenido del sustrato tratado** por descompresión rápida (108 bar) se necesitó una cantidad de 1,80 mg/mL para inhibir al 50% la actividad antioxidante,

mientas que para la molienda convencional se necesitó 3,00 mg/mL. Para el extracto obtenido con pre-tratamiento con baja temperatura se obtuvo un valor intermedio de 2,50 mg/mL. Para el extracto obtenido a mayor presión (192 bar) la actividad antioxidante mejoró, demostrado en que se necesitan cantidades menores a 1 mg/mL para inhibir el 50% la actividad antioxidante quedando en evidencia la mayor capacidad antioxidante del extracto obtenido a esta presión.

Tabla 4.5 Actividad antioxidante medida por el método β -caroteno (IC_{50} en mg/mL) en extractos obtenidos con CO_2 supercrítico a 52 °C.

Pre-tratamientos	108 bar	192 bar
Molienda convencional	3,00a	0,69a
Molienda baja temperatura	2,50b	0,59b
Descompresión rápida	1,80c	0,70a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($\alpha=0,05$)

Según la Tabla 4.5, la EFS a alta presión es más eficiente en la obtención de antioxidantes capaces de inhibir la degradación del β -caroteno, lo cual hace que esta presión sea adecuada para la obtención de fracciones bioactivas con capacidad antioxidante. Los resultados sugieren que el extracto obtenido por EFS a 192 bar y pre-tratamiento de molienda a baja temperatura contiene la mayor concentración de compuestos con actividad antioxidante capaces de inhibir el 50% del β -caroteno con un valor de 0,59 mg/mL y que el extracto obtenido con pre-tratamiento de molienda convencional a 108 bar contenía poca actividad antioxidante o se encuentra en poca concentración expresada en 2,95 mg/mL. Los buenos valores obtenidos en este estudio podrían sugerir que la actividad antioxidante del extracto obtenido de *L. rivularis* son principalmente de carácter lipofílico ya que este método emplea un emulsificador lipídico (Kulisic *et al.*, 2004). Además en los pre-tratamientos de molienda a baja temperatura y descompresión rápida se obtienen mayor cantidad de extracto recuperado comparado con el extracto obtenido por molienda convencional (Uquiche *et al.*, 2012). La Tabla 4.5 muestra además que la extracción de aceites esenciales a 192 bar no varió mucho entre los diferentes pre-tratamiento aplicados, mostrando que no existe diferencia entre el pre-tratamiento de molienda convencional y descompresión rápida, esto se pudo deber a que el extracto obtenido a 192 bar y pre-tratados por

descompresión rápida extrajo compuestos que interfirieron negativamente en la medición de la actividad antioxidante (Ilemonisa *et al.*, 2013). Un aumento de presión durante la extracción puede conducir a la mayor solubilidad de estos compuestos.

Los resultados en la actividad inhibidora de la peroxidación de lípidos de los aceites por la prueba de blanqueamiento de β -caroteno, indican por tanto que a mayor presión de extracción mayor es la cantidad de compuestos bioactivos con actividad antioxidante que se extraen, y por consiguiente éstos poseen una mayor capacidad de evitar la oxidación del β -caroteno. Esto se puede explicar por el mismo motivo señalado anteriormente, a mayor presión se extrae un mayor porcentaje de compuestos bioactivos con actividad antioxidante principalmente sesquiterpenos y monoterpenos (Costa *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos pueden ser comparados a los extractos obtenidos por planta de la misma familia (*Asteraceae*) como *Acmella oleracea* (hojas) presentando un porcentaje de inhibición de 0,9 (mg/mL) extraídos a 250 bar y 50°C (Dias *et al.*, 2012), los cuales presentan actividad menor respecto a los obtenidos en este estudio con 0,70 mg/mL (descompresión rápida).

4.4. Efecto del pre-tratamiento y presión de extracción sobre el contenido de fenoles totales

Los compuestos fenólicos mostrados en la Tabla 4.6 de los diferentes extractos fueron determinados por ensayo colorimétrico y expresadas como equivalentes de ácido gálico/g aceite (mg GAE/g aceite). En este estudio se comparó el contenido polifenólico provenientes de los aceites esenciales obtenidas a temperatura constante (52 °C) y a dos presiones de extracción, 108 y 192 bar para cada uno de los diferentes sustratos obtenidos de los distintos pre-tratamientos. Los resultados del análisis estadístico para el método fenoles totales se muestran en el Anexo G, Tabla G-2. Mediante este análisis de varianza realizado para la cantidad de fenoles se demostró que ni la presión ni el pre-tratamiento afectaron significativamente ($\alpha=0,05$) en la cantidad de fenoles totales.

Se observa que las concentraciones de fenoles es mayor en la molienda convencional a 108 bar con 10,97 mg GAE/g aceite y menor en la molienda a baja temperatura a 108 bar con 6,98 mg GAE/g aceite, para el pre-tratamiento de descompresión rápida se obtuvo un valor intermedio cercano al de molienda convencional con un valor de 9,25 mg GAE/g aceite. A una presión de extracción de 192 bar los resultados decayeron a excepción de la molienda a baja temperatura la cual aumentó a un 9,05 mg GAE/g aceite.

Tabla 4.6 medida del contenido de fenoles totales (mg GAE/g aceite) en extractos obtenidos con CO₂ supercrítico a 52 °C.

Pre-tratamientos	108 bar	192 bar
Molienda convencional	10,97 ± 0,12	7,14 ± 0,24
Molienda a baja temperatura	6,98 ± 0,07	9,05 ± 0,14
Descompresión rápida	9,25 ± 0,05	5,83 ± 2,91

La concentración de compuestos fenólicos en los extractos, expresado como equivalente de ácido gálico (GAE) mostrado en la Tabla 4.6 demostraron que la diversidad y complejidad de los diferentes extractos obtenidos de las hojas de *L. rivularis* hacen que sea difícil para caracterizar los compuestos y determinar su actividad antioxidante por el método de contenido de fenoles. Estos resultados pueden explicarse debido a que los fenoles son los compuestos que se encuentran en menor cantidad en los sustratos de hojas de *L. rivularis* (Niemeyer, 2009). Además de que el CO₂ supercrítico es un buen disolvente para los compuestos lipofílicos (no polar), mientras que tiene una baja afinidad con compuestos polares (Fornari *et al.*, 2012). La alta presión de extracción es probable que favorezca la extracción de compuestos polares pesados como fenoles, lípidos o ceras. Sin embargo, el aumento de la presión, obviamente, se traduce en una disminución de la selectividad de la extracción (Herzia *et al.*, 2013), y se extraen compuestos no fenólicos o no activos que pueden interferir en las mediciones.

Otro aspecto importante que podría explicar los resultados obtenidos es que por la naturaleza general de la química de Folin-Ciocalteu (FC), este método mide fenoles totales y otros sustratos de oxidación. Los otros sustratos de oxidación presentes en los extractos pueden afectar las mediciones de fenoles totales de una manera inhibitoria o aditiva. Los efectos inhibidores se deben a los oxidantes que compiten con el reactivo de FC y/o a la oxidación con aire después que la muestra ha sido tratada con el reactivo alcalino. Los efectos aditivos se producen a partir de aminas aromáticas, altos niveles de azúcar o ácido ascórbico en las muestras. Sin embargo, a pesar de estas desventajas, el ensayo de FC es simple y reproducible y ha sido ampliamente utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de diversas plantas (Dai y Mumper, 2010).

Todos los valores obtenidos en este estudio son mayores comparados con la actividad reportada en hojas de planta de la familias *Asteraceae* como *Acmella oleracea* (hojas) con un valor de 0,60 mg ácido gálico/g sustrato extraídos a 50 °C y 250 bar (Dias *et al.*, 2012).

4.5. Comparación de resultados entre hidrodestilación (HD) y extracción supercrítica

La extracción supercrítica usando dióxido de carbono supercrítico (CO₂) se compara favorablemente con los procesos convencionales tales como la hidrodestilación, ya que permite altos rendimientos de extracción, al mismo tiempo que acorta el tiempo de proceso y evita la degradación térmica e hidrolítica de los compuestos lábiles. El tema de la mejora de la calidad de extracción supercrítica con CO₂ en comparación con los aceites esenciales extraídos convencionalmente ha sido revisado a fondo (Araus *et al.*, 2009). La Tabla 4.7 muestra los resultados de las distintas metodologías aplicadas en este estudio al extracto de hojas enteras de *L. rivularis* obtenido por hidrodestilación.

Tabla 4.7 Resultados de las distintas metodologías aplicadas en este estudio al extracto de *L. rivularis* obtenidos por hidrodestilación.

Metodología	Hidrodestilación
Rendimiento de extracción (g aceite/kg sustrato)	2,01 ± 0,12
DPPH (mmol trolox eq/g aceite)	0,44 ± 0,03
FRAP (µmol trolox eq/mg aceite)	2,03 ± 0,01
β-caroteno (mg/mL)	10
Fenoles (mg GAE /g aceite)	13,18

Respecto del rendimiento de extracción obtenido (Anexo H, Tabla H-1) en la Tabla 4.7 los valores obtenidos por el método de hidrodestilación fueron mucho menores que los obtenidos por extracción supercrítica, con un valor de 2,01 g aceite/kg sustrato comparado con un rendimiento mínimo alcanzado por el pre-tratamiento de molienda convencional y 108 bar (14,19 g aceite/kg sustrato), esto es explicado por el hecho que el método de hidrodestilación se relaciona con la

termolabilidad de los componentes principales del aceite esencial, y los compuestos sensibles al calor pueden ser destruidos fácilmente, y existe una eventual pérdida de las moléculas más volátiles (Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007). Además como en la hidrodestilación la transferencia de calor solo puede ocurrir por conducción y convección, se hace menos efectiva comparada con otros métodos, ya que no se produce calor con mayor rapidez dentro y fuera de las glándulas contenedoras del aceite esencial.

Este rendimiento de extracción obtenido fue mayor comparado con los reportados en literatura para plantas de la familia *Asteraceae* como *H. italicum* el cual presento un valor de 0,23 g aceite /kg sustrato (Ivanovic *et al.*, 2011).

Es importante señalar que la composición del aceite esencial cambia al presentarse reacciones químicas durante el procesamiento general de la planta en la hidrodestilación. El calor, el agua y el oxígeno influyen sobre las esencias en los aceites y cambian su estructura. Algunas de las partículas más volátiles desaparecen y a veces surgen nuevos compuestos (Grace, 2001), algunos componentes como los ésteres, pueden experimentar la hidrólisis, y algunos hidrocarburos monoterpénicos son susceptibles a la polimerización (Bandoni, 2000). Esto podría explicar los bajos valores de actividad antioxidante reportados en este estudio comparado con el método de extracción supercrítica.

De acuerdo con la actividad antioxidante medida por el método DPPH, la hidrodestilación presentó valores bajos comparado con la de extracción supercrítica con un valor de 0,44 mmol trolox eq/g aceite, una baja actividad en el proceso de HD podría ser debido a una degradación térmica, una hidrólisis y solubilidad en agua de algunos compuestos que alteran no solo el perfil de sabor y la fragancia de muchos aceites esenciales extraídos por esta técnica, sino que hace que su actividad disminuya (Reverchon y De Marco, 2006). Debido a que esta actividad está asociada a los compuestos pertenecientes a grupos hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados principalmente en la habilidad de donar átomos de hidrogeno o electrones al electrón impar del DPPH (Vázquez, 2012) se presenta una baja cantidad debido a que en la hidrodestilación se extrae poco de estos compuestos debido a que se extraen conforme a su temperatura de ebullición siendo la última fracción de sesquiterpenos y sus análogos oxigenados los que son extraídos (del Valle, 2012). El valor obtenido de actividad antioxidante en hidrodestilación es bajo comparado con los reportados en literatura como por ejemplo *Artemisa herba halba* (*Asteraceae*) que presento una actividad antioxidante de 11,60 mmol trolox eq/g aceite, y *Juniperus oxycedrus* con 10,70 mmol trolox eq/g aceite (Djeridane *et al.*, 2006).

Para el método de actividad antioxidante medido por el método de reducción del hierro III (FRAP), el cual mide la reducción del ión férrico (Fe^{+3}) a ferroso (Fe^{+2}) en presencia del antioxidante (Rojo *et al.*, 2009) ocurrió que los resultados del extracto obtenido por hidrodestilación se asemejó al obtenido a presión de 108 bar mediante el pre-tratamiento de molienda a baja temperatura, el cual presentó un valor de 2,01 μmol trolox eq/mg aceite y mientras que el extracto obtenido por hidrodestilación presentó un valor de 2,03 μmol trolox eq/mg aceite. Este buen resultado se puede explicar debido que el extracto obtenido por hidrodestilación está conformado por grupos de compuestos de los cuales principalmente se encuentran los fenoles que podrían ser las sustancias reductoras que reducirían el complejo ferricianuro a la forma ferrosa (Vázquez, 2012). Los resultados obtenidos en este estudio son mayores a los obtenidos en extractos como *Lippia origanoides* (*Lamiaceae*) presentados con un valor de 1,05 mmoles trolox eq/mg extracto (Vázquez, 2012).

Respecto del método del blanqueamiento del β -caroteno el extracto obtenido por hidrodestilación presentó una mayor concentración de inhibición IC_{50} comparado con el de extracción supercrítica presentando un valor de 10 mg/mL, esto quiere decir que se necesitan más mg de aceite para inhibir en 50% la degradación del β -caroteno y evitar la oxidación, comparado con los resultados del extracto obtenido por extracción supercrítica a 108 bar y molienda convencional (3,00 mg/mL). Esto se puede explicar por el hecho que debido a que algunos compuestos antioxidantes del proceso de extracción se pudieron haber quedado en la fase acuosa de la emulsión siendo más diluidos en la fase lipídica y por tanto son menos eficientes en la protección del ácido linoleico (Koleva *et al.*, 2002), además se ha reportado que los compuestos sesquiterpenicos (principales en la actividad antioxidante) se extraen en cantidad mayor por extracción supercrítica que por hidrodestilación (Perakis *et al.*, 2010). Los valores obtenidos son mejores a los obtenidos en extractos como *Acmella oleracea* (*Asteraceae*) con un valor de 20 en porcentaje de inhibición (IC_{50}) (Dias *et al.*, 2012).

Respecto de los valores obtenidos de fenoles totales, estos presentan mayor cantidad en el aceite extraído por hidrodestilación con un valor de 13,18 mg GAE/g aceite comparado con los obtenidos en mayor cantidad por extracción supercrítica (10,97 mg GAE/g aceite), esto se debe a que los compuestos fenoles, tienden a ser más solubles en agua (Bandoni, 2000), por lo que se extrajo una mayor concentración, esto es debido también a que el CO_2 supercrítico es un buen disolvente para los compuestos lipofílicos (no polar), mientras que tiene una baja afinidad con

compuestos polares (Fornari *et al.*, 2012) motivo por el cual se reportó solo un valor de 10,97 mg GAE/g aceite para la extracción supercrítica a 108 bar y molienda convencional. Los valores obtenidos de fenoles totales son mayores comparados con los encontrados en literatura, por ejemplo en el extracto de hojas de la familia *Apiaceae* como es *Canescens psammogeton* presentando una cantidad de 34,20 mg GAE/g aceite (Gholivanda *et al.*, 2010) es decir una mayor cantidad de fenoles, indica una mayor eficiencia en la extracción de compuestos fenólicos en los extractos de agua (Wong, 2006).--

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

- De los pre-tratamientos estudiados, la descompresión rápida fue el pretratamiento con mayor rendimiento de extracción. La molienda convencional fue aquel con menor rendimiento de extracción, que se puede relacionar con la mayor pérdida de compuestos volátiles por el aumento de la temperatura durante la molienda.
- Extracciones realizadas a 192 bar resultan en mayor rendimiento de extracción y mejor actividad antioxidante, comparados con las extracciones a 108 bar.
- El mayor rendimiento de extracción en sustratos pre-tratados por descompresión rápida, no solo depende de la menor pérdida de compuestos volátiles, sino también de su habilidad por liberar y desplazar los aceites esenciales intraglandulares al someterlos a dos presiones distintas (108 y 192 bar), ya que a la presión de extracción 192 bar se extraen mayor cantidad de aceites debido a la mayor solubilidad del CO₂.
- Los extractos obtenidos con CO₂ a 52 °C y 192 bar de sustrato pre-tratado por molienda a baja temperatura, resultaron con la mayor actividad antioxidante, medido por los métodos DPPH, β-caroteno y FRAP.
- En sustratos pre-tratados por molienda convencional y molienda a baja temperatura, el aumento de la presión de extracción de 108 a 192 bar, tuvo un efecto positivo sobre la capacidad antioxidante, medida por lo métodos DPPH, β-caroteno y FRAP.
- La extracción con CO₂ supercrítico resultó con mayor rendimiento de extracción y actividad antioxidante, en comparación al método de hidrodestilación.
- Extractos obtenidos por hidrodestilación tuvieron mayor concentración de compuestos fenólicos en comparación con la extracción supercrítica, debido a su menor solubilidad en el CO₂.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Antolovich, M. Prenzler, P.D. Patsalides. E. McDonald, S. Robards, K. (2000). “Methods for Testing Antioxidant Activity”. *Analyst*, **127**: 183-198.
- AOAC (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th edition, Washington DC, USA.
- Arabshahi, S., Urooj, A. (2007). “Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves”. *Food Chemistry*, **102**: 1233-1240.
- Araus, K., Uquiche, E., del Valle, J. (2009). “Matrix effects in supercritical CO₂ extraction of essential oils from plant material”. *Journal of Food Engineering*, **92**: 438–447.
- Babovic, N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S., Zizovic, I. (2010). “Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected *Lamiaceae* herbs and their antioxidant capacity”. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**: 98–107.
- Bandoni, A. (2000). “Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores”. 1^a edición, editorial Universidad nacional de la plata. La plata, p.p 13-42.
- Bartoli, A., Galati, B., Tortosa, R. (2011). “Anatomical studies of the secretory structures: Glandular trichomes and ducts, in *Grindelia pulchella* Dunal (*Astereae*, *Asteraceae*)”. *Flora*, **206**: 1063– 1068.
- Bauer, K., Garbe, D., and Surburg, H. (2001). “Common fragrance and flavour materials: Preparation, properties and uses”. *Wiley-VCH, Weinheim*. 293.
- Benzie, I., Strain, J. (1996). “The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay”. *Analytical Biochemistry*, **239**: 70–76.
- Bimakr, M. Rahman, R., Ganjloo, A., Saleena, F., Salleh, L., Sarker, M. (2010). “Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Bioactive Flavonoid Compounds from Spearmint (*Mentha spicata* L.) Leaves by Using Response Surface Methodology”. *Food Bioprocess Technology* DOI 10.1007/s11947-010-0504-4.

- Bocevska, M., Sovová, H. (2004). “Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow, in: 16th International Congress of Chemical and Process Engineering”. CHISA, Praha, Czech Republic, Summaries 2, P3.93, 712.
- Bompadre, S. Leone, L. Politi, A. Battino, M. (2004). “Improved FIA-ABTS method for antioxidant capacity determination in different biological samples”. *Free Radical Research*, **38**: 831-838.
- Brand-williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **28**: 25-30.
- Burt, S. (2004). “Essentials oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review” *International Journal of Food Microbiology*, **94**: 223-253.
- Celiktas Y., Bedir, E., Vardar, F. (2007). “In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus ocinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide”. *Food Chemistry*, **101**: 1457–1464.
- Charrapin, N. (2000). “Fundamentos de tecnologia de productos fitoterapeuticos”. Editorial CYTED. 1^{ra} edición. Convenio Andres Bello. Colombia.
- Clarke, S. (2008). “Essential chemistry for aromatherapy”. Second edition. Churchill livingstone. Elsevier. 320 p.
- Coelho, L. A. F., Oliveira, J. V., Avila, S. G., Vilegas, J. H., Lancas, F. M. (1997). “SFE of rosemary oil: assessment of the influence of process variables and extract characterization”. *Journal of High Resolution Chromatography*, **20**: 431–436.
- Costa, P., Gonc, S., Grosso, C., Andrade, P., Valentão, P., Bernardo-Gilc, M., Romano, A. (2012). “Chemical profiling and biological screening of *Thymus lotocephalus* extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation”. *Industrial Crops and Products*, **36**: 246–256.
- da Silva, M., Santos, D., Nunes, L., Arantes de Carvalho, G., de Oliveira, F., Krug, F. (2011). “Evaluation of grinding methods for pellets preparation aiming at the analysis of plant materials by laser induced breakdown spectrometry”. *Talanta*, **85**: 1744–1750.
- Dahlstrom, D. A., Bennett, R., Emmett, R., Harriott, P., Laros, T., Leung, W., McCleary, C., Miller, S., Morey, B., Oldshue, J., Priday, G., Silverblatt, C., Slottee, J., Smith, J., Todd, D. (1999). “Liquid-Solid Operations and Equipment”. In Perry’s Chemical Engineers’ Handbook, by Perry, R. H., D. W. Green. and J. O. Maloney, 7th edition, McGraw-Hill, section 18, pp 58-59.

- Dai, J., Mumper, R. (2010). “Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties”. *Molecules*, **15**: 7313-7352.
- Danh, L., Triet, N., Han, L., Zhao, J., Mammucari, R., Foster, N. (2012). “Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender essential oil extracted by supercritical CO₂”. *Journal of Supercritical Fluids*, **70**: 27– 34.
- Dean, R. J. (1998). “Extraction Methods for Environmental Analysis”. John Wiley & Sons. Ltd. England, 301 p.
- del Valle, J.M., Aguilera, J.M. (1999). “Revisión: extracción con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos”. *Food Science and Technology International*, **5**: 1-24.
- del Valle, M. (2012). “Composición química y actividad antifúngica de los aceites esenciales de *rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) contra *aspergillus flavus*”. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciado en química. Cumaya.
- Dias, A., Santos, P., Seabra, I., Júnior, N., Braga, M., de Sousa, H. (2012). “Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction”. *Journal of Supercritical Fluids*, **61**: 62–70.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). “Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds”. *Food Chemistry*, **97**: 654–660.
- Ebrahimabadi, A., Djafari-Bidgoli, Z., Mazoochi, A., Kashi, F., Batooli, H. (2010). “Essential oils composition, antioxidant and antimicrobial activity of the leaves and flowers of *Chaerophyllum macropodium* Boiss”. *Food Control*, **21**: 1173–1178.
- Ebrahimzadeh H., Yamini Y., Sefidkon F., Chaloosi M., Pourmortazavi S.M. (2003). “Chemical composition of the essential oil and supercritical CO₂ extracts of *Zataria multiflora* Boiss”. *Food Chemistry*, **83**: 357-361.
- Esquivel, F. A., Vargas, P. (2007). “Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales”. *The Marine Technology*, **20**: 41- 50.
- Ferreira, S. R. S., Nikolov, Z., Doraiswamy, L., Meireles, M., Petentate, J. (1999). “Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum*L.) Essential oil”. *The Journal of Supercritical Fluids*, **14**: 235–245.

- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M., Reglero, G. (2012). “Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction”. *Journal of Chromatography A*, **1250**: 34–48.
- Foti, M., Ingold, K. (2003). “Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by γ -terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2758.
- Gañán, N., Brignole, E. (2013). “Supercritical carbon dioxide fractionation of *T. minuta* and *S. officinalis* essential oils. Experiments and process analysis”. *The Journal of Supercritical Fluids*, **78**: 12–20.
- García, M., Hernández, E., Vicente, G., Fornari, T., Señoráns, J., Reglero, G. (2011). “Kinetic study of pilot-scale supercritical CO₂ extraction of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves”. *Journal of Supercritical Fluids*, **55**: 971–976.
- Gaspar F., Santos R., King M.B. (2000). “Extraction of essential oils and cuticular waxes with compressed CO₂: effects of matrix pretreatment”. *Industrial Engineering Chemistry Research*, **39**: 4603–4608.
- Gaspar F., Santos R., King M.B. (2001). “Disruption of glandular trichomes with compressed CO₂: alternative matrix pre-treatment for CO₂ extraction of essential oils”. *The Journal of Supercritical Fluids*, **21**: 11–22.
- Gaspar, F., Leeke, L., Al-Duri, B., Santos, R. (2003). “Modelling the disruption of essential oils glandular trichomes with compressed CO₂”. *Journal of Supercritical Fluids*, **25**: 233/245.
- Gholivanda, M., Nasrabadi, M., Batooli, H., Ebrahimabadi, A. (2010). “Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*”. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 24–28.
- Goswami, T., Singh, M.; (2003). “Role of feed rate and temperature in attrition grinding of cumin”. *Journal of Food Engineering*, **59**: 285–290.
- Gounder, D., Lingamallu, J. (2012). “Comparison of chemical composition and antioxidant potential of volatile oil from fresh, dried and cured turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes”. *Industrial Crops and Products*, **38**: 124–131.
- Gouveia, S., Lopes, G., Fatibello, O., Nogueira, A., Nóbrega, J. (2002). “Homogenization of breakfast cereal using cryogenic grinding”. *Journal of Food Engineering*, **51**: 59–63.
- Grace, U. (2001). “Aromaterapia para practicantes”. Grupo editorial Tomo, México.

- Guenther, E. (1972). “The essentials Oils”. Vol. I Robert. E., Krieger publishing company NY.
- Halliwell, B. (1996). “Antioxidants in human health and disease”. *Annual Review of Nutrition*, **16**: 33-50.
- Hatano, T, Kagawa, H, Yasura, T., Okuda, T. (1998). “Two new flavonoids and other constituent in licorice rot: their relative astringency and radical scavenging effects”. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **36**: 2090-2097.
- Hernández, P. (2011). “Encapsulación de Aceite Esencial de Clavo para su aplicación en la Industria Alimentaria”. Tesis doctoral. Universidad Católica de San Antonio. Murcia
- Herzia, N., Camy, S., Bouajila, J., Destrac, P., Romdhane, M., Condoret, J. (2013). “Supercritical CO₂ extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling”. *Journal of Supercritical Fluids*, **82**: 72–82.
- Hinneburg, I., Dorman, D., Hiltunen, R. (2006). “Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices”. *Food Chemistry*, **97**: 122–129.
- Hoffmann, A. (2005). “Flora silvestre de Chile, Zona Araucanía”. Ediciones Fundación Claudio Gay. Quinta edición. Chile.
- Huang, Z., Luan, D., Shen, S., Hidajat, K., Kawi, S. (2005). “Supercritical fluid extraction of the organic template from synthesized porous materials: effect of pore size”. *Journal of Supercritical Fluids*, **35**: 40–48.
- Huerta, M. (2005). “Evaluación microestructural de substratos herbáceos en procesos de molienda controlada previo a la extracción de aceites esenciales”. Trabajo para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de La Frontera, Temuco.
- Iemonisa, L., Tsimogiannis, D., Loulia, V., Voutsas, E., Oreopoulou, V., Magoulasa, K. (2013). “Extraction of Dittany (*Origanum dictamnus*) using supercritical CO₂ and liquid Solvent”. *Journal of Supercritical Fluids*, **76**: 48–53.
- Ivanovic, J., Ristic, R., Skala, D. (2011). “Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO₂ density and moisture content of plant material”. *Journal of Supercritical Fluids*, **57**: 129–136.
- Khajeh, M, Yamini, Y., Sefidkon, F., Bahramifar, N. (2004). “Comparison of essential oil composition of *Carumcopticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods”. *Food Chemistry*, **8**: 587–591.

- Koleva, I., Van Beek, T., Linssen, J., De Groot, A., Evstatieva, L. (2002). “Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods”. *Phytochem Analysis*, **13**: 8-17.
- Koski, A., Psomiadou, E., Tsimidou, M., Hopia, A., Kefalas, P., Wahala, K., Heinonen, M. (2002). “Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil”. *European Food Research and Technology*, **214**: 294–298.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milosa, M. (2004). “Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil”. *Food Chemistry*, **85**: 633–640.
- Lee, S. Najiah, M. Wendy, W. Nadirah, M. (2009). “Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites”. *Frontiers of Agriculture in China*, **3**: 332-336.
- Li, Y., Ambrosone, C., McCullough, M., Ahn, J., Stevens, V., Thun, M., Hong, C. (2009). “Oxidative stress related genotypes, fruit and vegetable consumption, and breast cancer risk”. *Carcinogenesis*, **30**: 777-784.
- Mandiola, J., Jaime, L., Antoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E., Señorans, F.J. (2007). “Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*”. *Food Chemistry*, **102**: 1357-1367.
- Martínez, M. (2013). “Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”. Trabajo para optar al título de Ingeniero en alimentos. Universidad de La Frontera. Temuco.
- Mella J.M. (2002). “Diseño y construcción a nivel de planta piloto de un equipo extractor de aceites esenciales y puesta en marcha utilizando boldo (*Peumus boldus*)”. Trabajo para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de La Frontera, Temuco.
- Milan, K. S. M., Dholakia, H., Tiku, P. K., and Vishveshwaraiah, P. (2008). “Enhancement of digestive enzymatic activity by cumin (*Cuminum cyminum* L.) and role of spent cumin as a bionutrient”. *Food Chemistry*, **110**: 678-683.
- Moon, J.K. Shibamoto, T. (2009). “Antioxidant assays for plant and food components”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 1655-1666.
- Mukhopadhyay M. (2000). “Natural extracts using supercritical carbon dioxide”. CRC Press. U.S.A.

- Murthy, C., Bhattacharya, S. (2008) “Cryogenic grinding of black pepper”. *Journal of Food Engineering*, **85**: 18–28.
- Nagy, B., Simándi, B. (2008). “Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika”. *Journal of Supercritical Fluids*, **46**: 293–298.
- Niemeyer, H. (2009). “Composition of essential oils from the five aromatic species of *Asteraceae*”. *Journal of Essential Oil Research*, **43**: 50-353.
- Pastene, E., Gómez, M., Speisky, H., Núñez, L. (2009). “Un sistema para la detección de antioxidantes volátiles comúnmente emitidos desde especias y hierbas medicinales”. *Química Nova*, **32**, nº 2, 482-487. Chile.
- Perakis, C., Louli, V., Voutsas, E., Magoulas, K. (2010). “Supercritical CO₂ extraction of dittany oil: Experiments and modelling”. *Journal of Supercritical Fluids*, **55**: 573–578.
- Pérez M. (2005). “Salvia lavándula efoliavahl ssp. oxyodon: Evaluación de su aceite esencial e incidencia en el medio ambiente según intensidades de recolección”. Trabajo para optar al grado de doctor. Universidad de Granada, Granada-España.
- Pourmortazavi, S., Hajimirsadeghi, S. (2007). “Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis”. *Journal of Chromatography A*, **1163**: 2–24
- Povh, N.P., Marques, M.O.M., Meireles M.A.A. (2001). “Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomillarecutita* [L.] Rauschert)”. *The Journal of Supercritical Fluids*, **21**: 245–256.
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K. (2005). “Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements”. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **53**: 4290-4302.
- Rebolleda, S., Rubio, N., Beltran, S., Sanz, M., Gonzalez-Sanjose, M. (2012). “Supercritical fluid extraction of corn germ oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality”. *Journal of Supercritical Fluids*, **72**: 270– 277.
- Reglero, G., Señoráns, J., Ibañez, E. (2005). “Supercritical fluid extraction: an alternative to isolation natural food preservatives”. En G. Barbosa-Cánovas, M.S Tapia y M.P. cano (Eds). *Novel food processing Technologies*. CRC Press. Boca Raton. Fla. EE.UU. pp 539-550.

- Reverchon, E., De Marco, I. (2006). “Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter”. *Journal of Supercritical Fluids*, **38**: 146-166.
- Riedemann, P., Aldunate, G. (2003). “Flora Nativa de Valor Ornamental. Identificación y Propagación. Chile, Zona Sur”. Editorial Andes Bello. Primera Edición. Santiago, Chile. 516 pp.
- Roca E., Guillard V., Guilbert S., Gontard N. (2006). “Moisture migration in a cereal composite food at high water activity: Effects of initial porosity and fat content”. *Journal of Cereal Science*, **43**: 144–151.
- Rodrigues, V. M., Rosa, P. T. V., Marques, M. O. M., Petenate, A. J., Meireles, M. A. A. (2003). “Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum L.*) using CO₂: Solubility, kinetics, and composition data”. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**: 1518–1523.
- Rodrigues, V. M., Sousa, E. M. B. D., Monteiro, A. R., Chiavone-Filho, O., Marques, M. O. M., Meireles, M. A. (2002). “Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent”. *The Journal of Supercritical Fluids*, **22**: 21–36.
- Rojo, L., Benites, J., López, J., Rojas, M., Díaz, P., Ordóñez, J., Pastene, E. (2009). “Antioxidant capacity and polyphenolic content of twelve traditionally used herbal medicinal infusions from the South American Andes”. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **8**: 498 - 508
- Russo, M., Gallet, G. C., Bocchini, P., and Carnacini, A. (1998). “Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare ssp. hirtum* (Link) Iets waart: Preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: Inflorescences”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 3741-3746.
- Saldaña, M., Zetzl, C., Mohamed, R. S., Brunner, G. (2002). “Extraction of methylxanthines from guarana seeds, mate leaves, and cocoa beans using supercritical carbon dioxide and ethanol”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 4820–4826.
- Sánchez, F.J. (2006). “Extracción De Aceites Esenciales”. Experiencia colombiana. II Segundo congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

- Sandoval, A. (2008). “Efecto del pretratamiento de sustratos sobre la cinética de extracción de aceites esenciales de orégano (*Origanum Vulgare L.*) y boldo (*Peumus Boldus M.*)”. Trabajo para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de La Frontera. Temuco.
- Santos, W., Hatje, V., Lima, L. N., Trignano, S.V., Barros, F., Castro, J.T., Korn, M. (2008). “Evaluation of sample preparation (grinding and sieving) of bivalves, coffee and cowpea beans for multi-element analysis”. *Microchemical Journal*, **89**: 123–130.
- Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I. (2006). “Natural products isolation”. Humana Press. 515 p.
- Sharma, O., Bhat, T. (2009). “DPPH antioxidant assay revisited”. *Food chemistry*, **113**: 1202-1205.
- Siddhuraju, P., Mohan, P.S., Becker, K. (2002). “Studies on the antioxidant activity of *Indian Laburnum (Cassia fistula L.)*: a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp”. *Food Chemistry*, **79**: 61-67.
- Singleton, V., Rossi, J. (1965). “Colorimetry of total phenol with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**: 144-158.
- Sonsuzer, S., Sahin, S. and Yilmaz, L. (2004). “Optimization of supercritical CO₂ extraction of *Thymbra spicata* oil”. *Journal of Supercritical Fluids*, **30**: 189, 2004.
- Stanshenko, E. (2009). “Aceites esenciales”. Santander: División de Publicaciones UIS.
- Tafurt G., Jairo R. Martínez, S., Stashenko, E. (2005). “Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta”. *Revista Colombiana de Química*, **34**, No. 1.
- Tatsadjieu, N.L., Yaoub, A., Nukenine, E.N., Ngassoum, M.B., Mbofung, C. (2010). “Comparative study of the simultaneous action of three essential oils on *Aspergillus flavus* and *Sitophilus zeamais* Motsch.” *Food Control*, **21**: 186-190.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng N., Nogueira, L., Saraiva, J., Nunes, M. (2013). “Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils”. *Industrial Crops and Products*, **43**: 587– 595.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros, L., Byrne, D.H. (2006). “Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant

- activity from guava fruit extracts”. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**: 669-75.
- Uquiche, E., Huerta, E., Sandoval, A., del Valle, J. (2012). “Effect of boldo (*Peumus boldus M.*) pretreatment on kinetics of supercritical CO₂ extraction of essential oil”. *Journal of Food Engineering*, **109**: 230–237.
 - Vázquez, D. (2012). “El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía: Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos”. Universidad Nacional de Colombia. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Químicas. Bogotá D.C., Colombia.
 - Veillet, S., Tomao, V., Ruiz, K., Chemat, F. (2010). “Green procedure using limonene in the Dean–Stark apparatus for moisture determination in food products”. *Analytica Chimica Acta*, **674**: 49–52.
 - Velasco, R., Villada, H., Carrera, J. (2007). “Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria”. *Información tecnológica*, **18**: 53-65.
 - Viera de Melo, S. A. B., Costa, G. M. N., Casula, A., Pittau, B. (2000). “Supercritical CO₂ extraction of essential oils from *Thymus vulgaris*”. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **17**: 367–371.
 - Wannan, W., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M., Marzouk, B. (2010). “Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower”. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 1362–1370.
 - Wenqiang, G., Shufen, L., Ruixiang, Y., Shaokun, T., Can, Q. (2007). “Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods”. *Food Chemistry*, **101**: 1558–1564.
 - Wong, S., Leong L., Koh, W. (2006). “Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants”. *Food Chemistry*, **99**: 775–783.
 - Yahya, F., Lua, T., Santos, R., Fryer, P., Bakalis, S. (2010). “Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of 2-acetyl-1-pyrroline from Pandan leaf: The effect of pre-treatment”. *Journal of Supercritical Fluids*, **55**: 200–207.
 - Yoshikawa M., Murakami T., Matsuda H., Yamahara J., Murakami N., Kitagawa I. (1996). “Bioactive saponins and glycosides. III. Horse chestnut. (1): the structures, inhibitory effects on ethanol absorption, and hypoglycemic activity of escins Ia, Ib, IIa,

- Ib, and IIIa from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L.”. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **44**: 1454-1464.
- Zarnowski, R., Suzuki, Y. (2004). “Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains”. *Journal Food Composition Analysis*, **17**: 649–664.
 - Zizovic, I., Stameni, M., Orlovic, A., Skala, D. (2007). “Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale”. *Journal of Supercritical Fluids*, **39**: 338–346.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A. Caracterización de sustrato (hojas de *L. rivularis*).**Tabla A-1.** Determinación de la humedad del lote inicial de hojas de *L. rivularis*, luego de 5 días en el desecador.

Peso vidrio	Peso muestra húmeda	Peso vidrio más muestra seca	Peso muestra seca	Humedad	Humedad promedio
27,6645	1,0015	28,6197	0,9552	4,62	4,76
25,3102	1,0024	26,2636	0,9534	4,89	

Tabla A-2 Distribución del tamaño de partícula de las hojas de *L. rivularis*, para la molienda a baja temperatura.

malla (mm)	dpi (malla, mm)	Masa (g)	Masa retenida i (g)	Fracción de masa retenida Δxi	dpi * Δxi	dp (mm)
0,18-0,30	0,24	8,11	1,9464	0,01902781	0,0046	
0,30-0,50	0,4	12,68	5,072	0,04958335	0,0198	
0,50-0,60	0,55	6,32	3,476	0,03398102	0,0187	
0,60-0,71	0,655	8,85	5,798	0,05668065	0,0371	
0,71-0,85	0,78	6,47	5,047	0,04933895	0,0385	
0,81-1,00	0,925	26,5	24,513	0,23963657	0,2216	
1	1	56,44	56,44	0,55175165	0,5517	
Total		125,37	102,2924	1		0,81592406

Tabla A-3 Distribución del tamaño de partícula de las hojas de *L. rivularis*, para la molienda convencional.

mallas (mm)	dpi (malla, mm)	Masa (g)	Masa retenida i (g)	Fracción de masa retenida Δxi	dpi * Δxi	dp (mm)
0,18-0,30	0,24	9,09	2,1816	0,021	0,0051	
0,30-0,50	0,4	17,16	6,864	0,06705712	0,0268	
0,50-0,60	0,55	8,17	4,4935	0,04389877	0,0241	
0,60-0,71	0,655	10,93	7,1592	0,06994104	0,0458	
0,71-0,85	0,78	7,68	5,9904	0,05852257	0,0456	
0,85-1,00	0,925	28,91	26,7418	0,26125117	0,241	
1	1	48,93	48,93	0,47801642	0,478	
Total		130,87	102,3605	1		0,78215405

Tabla A-4 Fracción de masa de cada tamiz para obtener una muestra homogénea de carga en el extractor en molienda a baja temperatura.

Abertura (mm)	Peso tamiz (g)	Peso tamiz + muestra (g)	Peso muestra (g)	Carga (g)
1,00	410,71	467,15	56,44	9,0
0,85	598,72	625,22	26,50	4,2
0,71	618,15	624,62	6,47	1,0
0,60	602,77	611,62	8,85	1,4
0,50	379,00	385,32	6,32	1,0
0,30	543,10	555,78	12,68	2,0
Ultima fracción	491,18	499,29	8,11	1,3
			125,37	20,0

Tabla A-5 Fracción de masa de cada tamiz para obtener una muestra homogénea de carga en el extractor para la molienda convencional.

Abertura (mm)	Peso tamiz (g)	Peso tamiz + muestra (g)	Peso muestra (g)	Carga (g)
1,00	410,71	459,64	48,93	7,5
0,85	598,72	627,63	28,91	4,4
0,71	618,15	625,83	7,68	1,2
0,60	602,77	613,70	10,93	1,7
0,50	379,00	387,17	8,17	1,2
0,30	543,10	560,26	17,16	2,6
Ultima fracción	491,18	500,27	9,09	1,4
			130,87	20,0

ANEXO B. Análisis estadístico para la respuesta rendimiento de extracción.**Tabla B-1** Análisis de varianza de los resultados de rendimiento de extracción.

Factor de variación	S.C	G/L	Varianza	F _{Exp}	F _{Tabla}	R
Presión	613,31	5	122,662	18,577	3,33	0,2309
Pre-tratamiento	1976,38	2	988,190	149,658	4,1	0,744
Error	66,03	10	6,603			
Total	2655,72	17				

Donde S.C: sumatoria cuadrados, G/L: grados de libertad, R: coeficiente de determinación.

Tabla B-2 Resultados análisis Duncan para la variable presión de extracción.

	192 bar			108 bar		
	41,66	40,2	40,02	30,44	29,89	27,18
41,66	0	1,46 ^{NS}	1,64 ^{NS}	11,22*	11,77*	14,48*
40,2		0	0,18 ^{NS}	9,76*	10,31*	13,02*
40,02			0	9,58*	10,13*	12,84*
30,44				0	0,55 ^{NS}	3,26 ^{NS}
29,89					0	2,71 ^{NS}
27,18						0

NS: no significativo, * significativo

Tabla B-3 Resultados análisis Duncan para la variable pre-tratamiento a 108 bar.

	DR	CR	BT
	41,48	31,85	14,19
41,48	0	9,63*	27,29*
31,85		0	17,66*
14,19			0

NS: no significativo, * significativo

Tabla B-4 Resultados análisis Duncan para la variable pre-tratamiento a 192 bar.

	DR	CR	BT
	51,09	43,00	27,79
41,48	0	8,09*	23,30*
31,85		0	15,21*
14,19			0

NS: no significativo, * significativo

ANEXO C. Análisis estadístico para la respuesta actividad antioxidante, método DPPH.**Tabla C-1** Análisis de varianza de los resultados de actividad antioxidante, Método DPPH.

Factor de variación	S.C	G/L	Varianza	F _{Exp}	F _{Tabla}	R
Presión	9,27	5	1,85	32,25	3,33	0,892
Pre-tratamiento	0,55	2	0,27	4,74	4,1	0,052
Error	0,57	10	0,06			
Total	10,39	17				

Donde S.C: sumatoria cuadrados, G/L: grados de libertad, R: coeficiente de determinación.

Tabla C-2 Resultados análisis Duncan para la variable presión de extracción.

	108 bar			192 bar		
	2,11	2,07	2,01	0,64	0,63	0,63
2,11	0	0,04 ^{NS}	0,1 ^{NS}	1,47*	1,48*	1,48*
2,07		0	0,06 ^{NS}	1,43*	1,44*	1,44*
2,01			0	1,37*	1,38*	1,38*
0,64				0	0,01 ^{NS}	0,01 ^{NS}
0,63					0	0 ^{NS}
0,63						0

NS: no significativo, *significativo

Tabla C-3 Resultados análisis Duncan para la variable pre-tratamiento a 108 bar.

	DR	BT	CO
	0,74	0,643	0,5
1,58	0	0,11 ^{NS}	0,25*
1,27		0	0,14*
1,18			0

NS: no significativo, *significativo.

Tabla C-4 Resultados análisis Duncan para la variable pre-tratamiento a 192 bar

	BT	CO	DR
	2,53	1,860	1,79
2,53	0	0,67*	0,74*
1,860		0	0,07 ^{NS}
1,79			0

NS: no significativo, *significativo

ANEXO D. Análisis estadístico para la respuesta actividad antioxidante, método FRAP.

Tabla D-1 Análisis de varianza de los resultados de actividad antioxidante FRAP.

Factor de variación	S.C	G/L	Varianza	F _{Exp}	F _{Tabla}	R
Presión	0,87	5	0,174	1,170	3,33	0,330
Pre-tratamiento	0,28	2	0,141	0,950	4,1	0,107
Error	1,48	10	0,148			
Total	2,63	17				

Donde S.C: sumatoria cuadrados, G/L: grados de libertad, R: coeficiente de determinación.

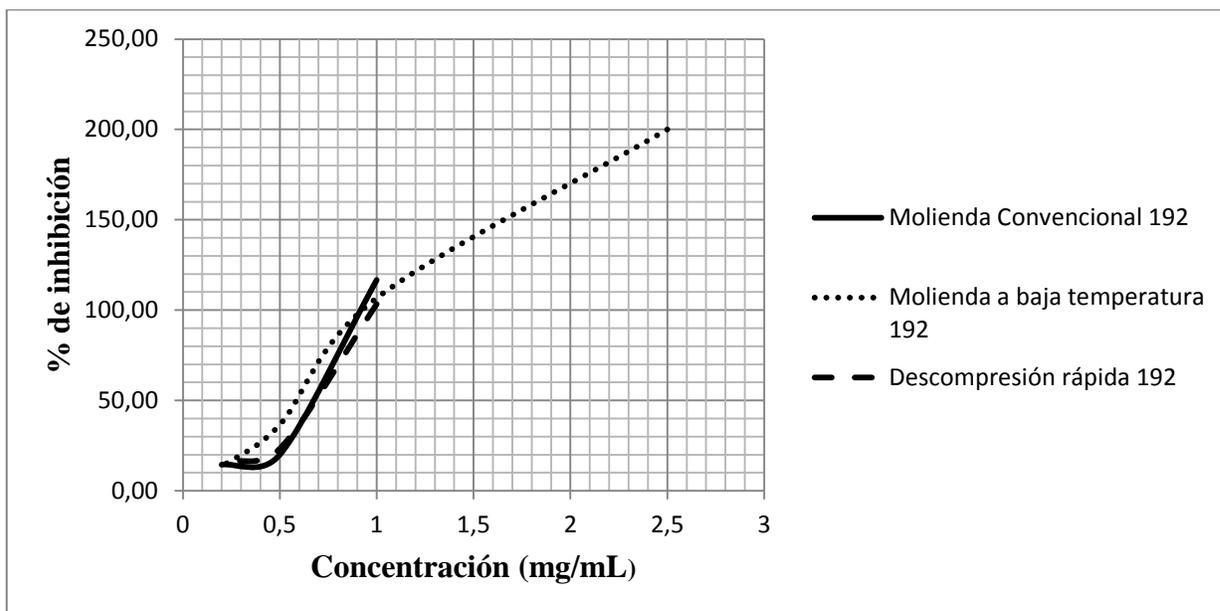
ANEXO E. Curvas para obtención del porcentaje de inhibición IC₅₀

Figura E-1 Curva para la obtención del porcentaje de inhibición (192 bar).

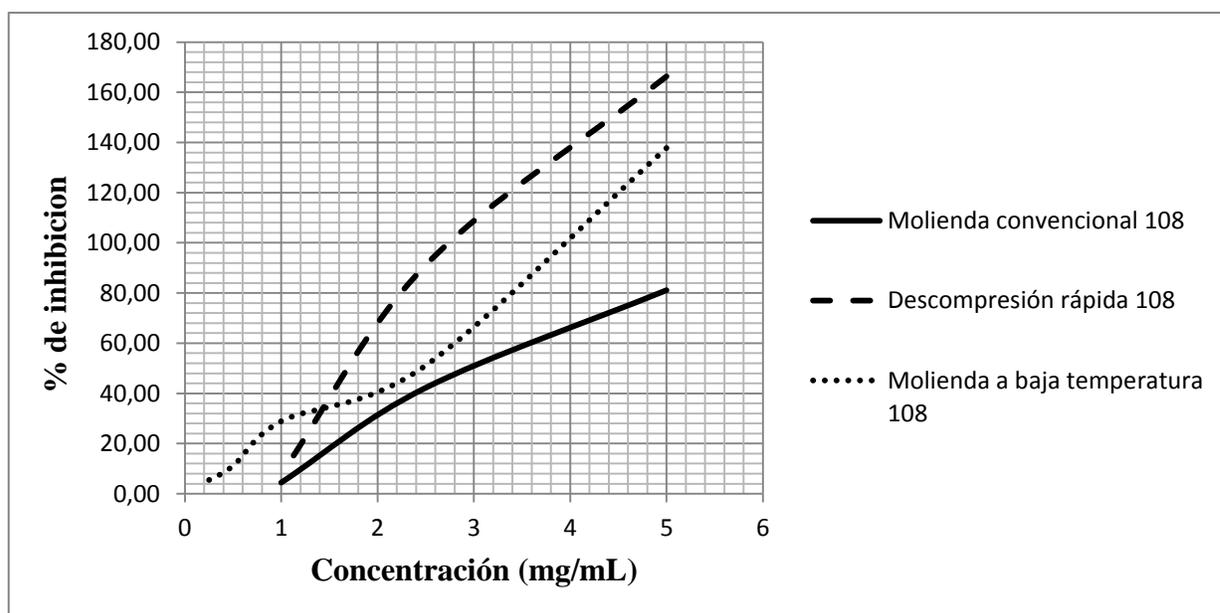


Figura E-2 Curva para la obtención del porcentaje de inhibición (108 bar).

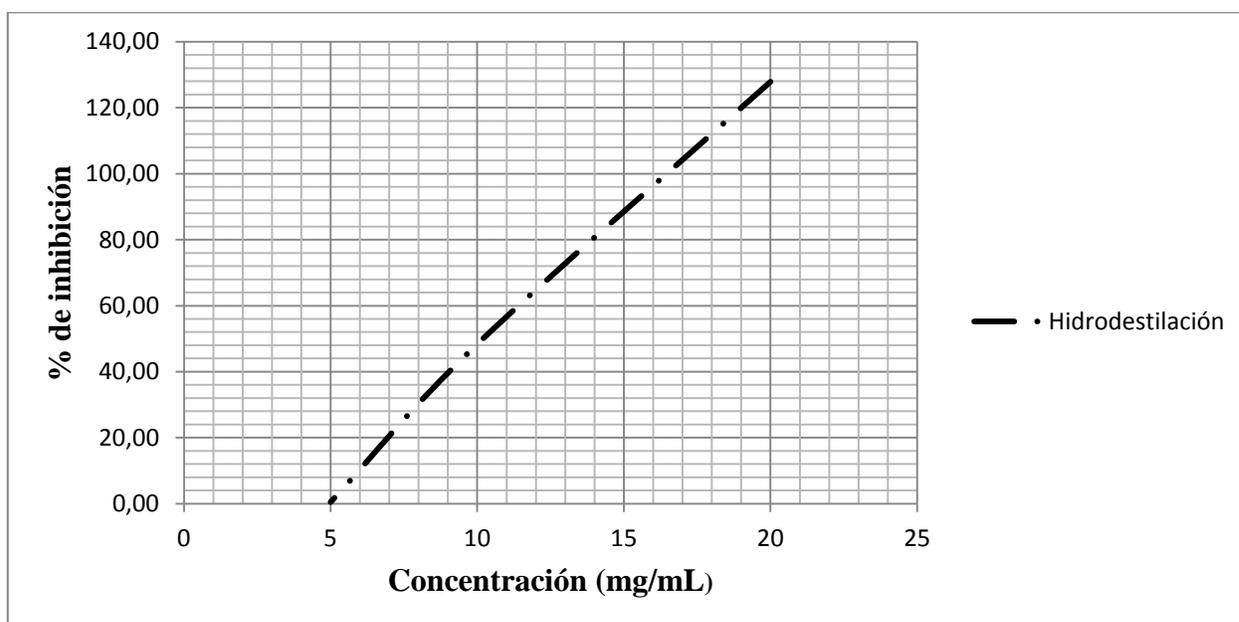


Figura E-3. Curva para la obtención del porcentaje de inhibición (Hidrodestilación).

ANEXO F. Análisis estadístico para la respuesta actividad antioxidante, método blanqueamiento del β -caroteno.

Tabla F-1 Análisis de varianza de los resultados de actividad antioxidante.

Factor de variación	S.C	G/L	Varianza	F _{Exp}	F _{Tabla}	R
Presión	9,27	5	1,85	32,253	3,33	0,892
Pre-tratamiento	0,55	2	0,27	4,74	4,1	0,052
Error	0,57	10	0,06			
Total	10,39	17				

Donde S.C: sumatoria cuadrados, G/L: grados de libertad, R: coeficiente de determinación.

Tabla F-2 Resultados análisis Duncan para la variable presión de extracción.

	108 bar			192 bar		
	2,47	2,45	2,42	0,67	0,66	0,66
2,47	0	0,02 ^{NS}	0,05 ^{NS}	1,8*	1,81*	1,81*
2,45		0	0,03 ^{NS}	1,78*	1,79*	1,79*
2,42			0	1,75*	1,76*	1,76*
0,67				0	0,01 ^{NS}	0,01 ^{NS}
0,66					0	0 ^{NS}
0,66						0

NS: no significativo, *significativo

Tabla F-3 Resultados análisis Duncan para la variable pre-tratamiento a 108 bar.

	DR	CO	BT
	3,0	2,50	1,8
3,0	0	0,510*	1,210*
2,50		0	0,70*
1,8			0

*significativo, NS: no significativo

Tabla F-4 Resultados análisis Duncan para la variable pre-tratamiento a 192 bar.

	DR	CO	BT
	0,70	0,69	0,60
0,70	0	0,010 ^{NS}	0,10*
0,69		0	0,09*
0,60			0

NS: no significativo, *significativo

ANEXO G. Análisis estadístico para la respuesta contenido de fenoles totales.**Tabla G-1** Análisis de varianza de los resultados de Fenoles totales.

Factor de variación	S.C	G/L	Varianza	F _{Exp}	F _{Tabla}	R
Presión	18,73	5	3,746	0,841	3,33	0,266
Pre-tratamiento	7,21	2	3,607	0,810	4,1	0,102
Error	44,52	10	4,452			
Total	70,46	17				

Donde S.C: sumatoria cuadrados, G/L: grados de libertad, R: coeficiente de determinación

ANEXO H. Rendimiento de extracción obtenido en Hidrodestilación.**Tabla H-1** Rendimiento de extracción de aceites de hojas de *L. rivularis* obtenido en hidrodestilación.

Extracción	Peso matraz	Peso			Promedio	Desviación estándar
		matraz más muestra	Extracto	Rendimiento		
1	8,6028	8,6798	0,077	1,925	2,011	0,12
2	8,0001	8,084	0,0839	2,0975		

ANEXO I. Curvas de calibración.

Tabla I-1. Datos utilizados para la calibración para la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH en aceites esenciales extraídos de hojas de *L. rivularis*.

Tubo	Etanol (ml)	Trolox (µl)	DPPH (µl)	Absorbancia	Abs 0 - Abs	Trolox (µg)	Trolox (mmol/L)
1	3,2	0	800	0,915	0	0	0
2	3,18	20	800	0,790	0,125	5	0,005
3	3,16	30	800	0,733	0,182	7,5	0,0075
4	3,14	50	800	0,623	0,292	12,5	0,0125
5	3,12	70	800	0,499	0,416	17,5	0,0175
6	3,1	100	800	0,341	0,574	25	0,025

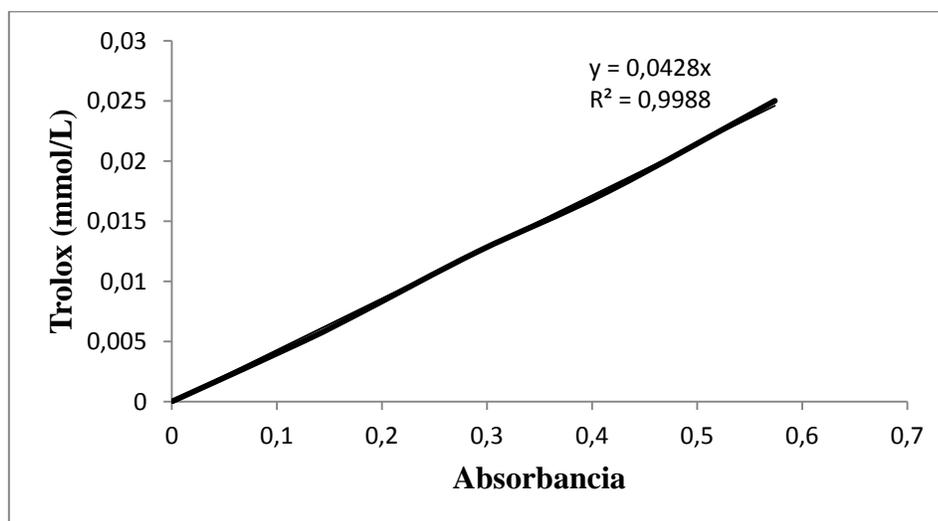


Figura I.1 Curva de calibración para Trolox equivalente.

Tabla I-2 Datos utilizados para la calibración para la determinación de la actividad antioxidante por el método de reducción del hierro III en aceites esenciales extraídos de hojas de *L. rivularis*.

Tubo	Agua destilada (μL)	Trolox (μL)	FRAP (μL)	Absorbancia	abs-abs0	Trolox ($\mu\text{mol/L}$)
1	150	50	1500	0	0	0
2	150	50	1500	0,318	0,133	100
3	150	50	1500	0,445	0,26	200
4	150	50	1500	0,746	0,561	350
5	150	50	1500	0,896	0,711	450
6	150	50	1500	0,95	0,765	500

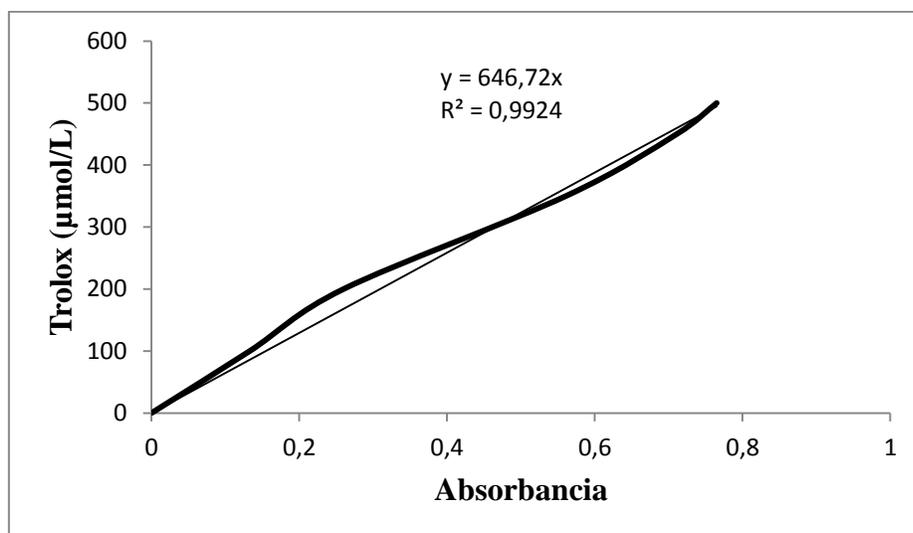


Figura I-2 Curva de calibración para reducción del hierro III.

Tabla I-3 Datos utilizados en la calibración para la determinación de fenoles totales en aceites esenciales extraídos de hojas de *L. rivularis*

Folin (mL)	Na ₂ CO ₃ (mL)	Absorbancia	GAE (mg/mL)	Absorbancia
0,5	1	0,000	0	0,000
0,5	1	0,240	0,025	0,141
0,5	1	0,447	0,050	0,252
0,5	1	0,593	0,100	0,456
0,5	1	0,611	0,150	0,646

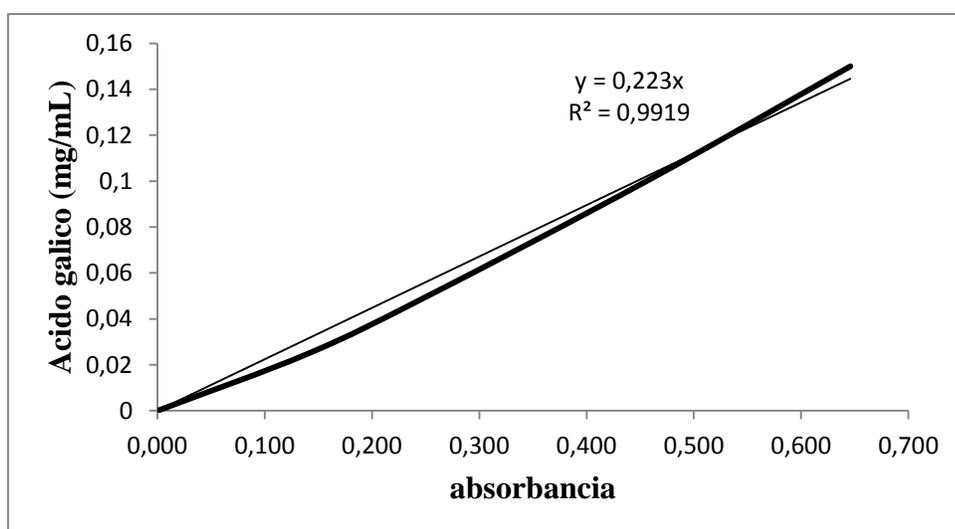


Figura I-3 Curva de calibración para fenoles totales.