



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

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

MAURICIO ANDRÉS MARTÍNEZ VERA

2013



**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE INGENIERÍA, CIENCIAS Y ADMINISTRACIÓN
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA**

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpa rivularis* por rápida descompresión con CO₂ 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

MAURICIO ANDRÉS MARTÍNEZ VERA

2013

**“PRETRATAMIENTO DE HOJAS DE *LEPTOCARPHA RIVULARIS* POR RÁPIDA
DESCOMPRESIÓN CON CO₂ COMO ACONDICIONAMIENTO PARA LA
EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE ACEITES ESENCIALES”**

MAURICIO ANDRÉS MARTÍNEZ VERA

COMISIÓN EXAMINADORA

EDGAR LUCIANDO UQUICHE CARRASCO
Profesor Guía

CAROLINA SHENE DE VIDTS
Profesora Examinadora

FRANCISCA ACEVEDO CANALA-ECHEVARRIA
Profesora Examinadora

Nota trabajo escrito :

Nota examen :

Nota final :

RESUMEN

Desde tiempos pasados se han utilizado diversas hojas de plantas para el tratamiento de distintas enfermedades así como también para la conservación de diferentes alimentos. Estas cualidades se obtienen a partir de los aceites esenciales contenidas en las hojas. Existen diferentes metodologías que permiten extraer aceite esenciales de las hojas de las plantas, entre las cuales están la extracción con solventes orgánicos, hidrodestilación y arrastre con vapor. Las principales desventajas de estas metodologías son la utilización de solventes, los cuales dejan residuos en el aceite extraído, la utilización de calor la cual daña las propiedades del aceite esencial y largos tiempos de extracción. Con el fin de mejorar la velocidad de extracción de aceites esenciales es que se han aplicados distintos pretratamientos al substrato vegetal que favorecen la liberación del aceite esencial desde el tejido vegetal. Uno de estos pretratamientos es la rápida descompresión con dióxido de carbono (CO₂). Este pretratamiento se caracteriza por afectar directamente las estructuras vegetales que contiene los aceites esenciales de las plantas, conocidos como tricomas. El CO₂ se pone en contacto con el tejido vegetal a altas presiones, éste penetra lentamente las membranas de los tricomas, hasta que ésta se satura. Luego de un cierto tiempo se libera rápidamente el CO₂, el tricoma no es capaz de liberar tan rápidamente el CO₂ provocando su ruptura y posterior liberación de aceite esencial.

Por lo tanto el objetivo general de esta investigación fue estudiar la ruptura celular de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como método de pretratamiento para aumentar el rendimiento de extracción de aceite esencial. Para analizar el rendimiento de extracción y la actividad antioxidante de los extractos, se trabajó en base a un diseño central compuesto con 5 niveles, 2 factoriales, 2 axiales y un punto central. En ella se analizó el efecto que ejercía las variables independientes tales como la presión de descompresión (P) y temperatura de descompresión (T) sobre el rendimiento de extracción y actividad antioxidante. Los resultados muestran que el mayor rendimiento de extracción de aceite esencial se obtuvo a una temperatura y presión de descompresión de 21 °C y 130 bar, obteniendo 55,45 g/kg SS de aceite esencial. Este alto rendimiento se debe principalmente a que a altas presiones mayor es la ruptura celular y con ello se produce más liberación de aceite esencial desde los tricomas. Mientras que la mayor actividad antioxidante de los extractos (2,31 mmol Teac/g aceite) se obtuvo a condiciones de descompresión de 21 °C y 60 bar.

La mejor condición de extracción predicha por el modelo cuadrático fue de 21 °C y 130 bar, donde se obtuvo un rendimiento de extracción de $49,17 \pm 0,68$ g/kg SS y una actividad antioxidante de $1,85 \pm 0,03$ mmol Teac/g aceite. Se compararon estos valores con la metodología de hidrodestilación; en ésta se obtuvo 1,28 g/kg SS de extracción de aceite esencial y 0,46 mmol Teac/g aceite de actividad antioxidante. Se concluye que la utilización de la descompresión rápida como pretratamiento es mucho más efectivo para extraer aceite esencial que la hidrodestilación. Esta efectividad se debe principalmente a que la descompresión favorece la liberación de aceite esencial desde las glándulas tricomas aumentando el rendimiento de extracción. Esto se verifica de igual forma mediante la microscopía óptica donde se observa la ruptura de tricomas glandulares por acción de la rápida descompresión con CO₂.

Se agradece el financiamiento de CONICYT Regional/GORE Araucanía/CGNA/R10C1001, al proyecto Fondecyt 1131066 y a la Dirección de Investigación de la Universidad de La Frontera.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo general.....	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
CAPITULO 2: ANTECEDENTES GENERALES	5
2.1. <i>Leptocarpha rivularis</i>	5
2.2. Aceites esenciales	6
2.3. Tricomas	6
2.4. Extracción de aceite esencial	8
2.5. Extracción con fluidos supercríticos	10
2.6. Dióxido de carbono (CO₂) como fluido supercrítico	13
2.7. Extracción de aceites esenciales utilizando CO₂ como fluido supercrítico	13
2.8. Tipos de pretratamiento	15
2.9. Descompresión rápida como pretratamiento	16
2.10. Aceites esenciales y actividad antioxidante	17
CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Materiales	20
3.1.1. Materia prima.....	20
3.1.2. Equipo e instrumentos.....	20
3.1.3. Reactivos.....	20
3.1.4. Material de vidrio y otros.....	21
3.2. Análisis de sustrato	22
3.2.1. Determinación de humedad por método gravimétrico.....	22
3.2.2. Tamaño de partícula.....	22
3.2.3. Extracción de aceite esencial.....	22
3.3. Metodología	23
3.3.1. Descompresión rápida con CO ₂	23
3.3.2. Extracción supercrítica.....	24
3.3.3. Diseño experimental y análisis estadístico.....	24
3.4. Análisis de extractos	26

3.4.1. Determinación de capacidad antioxidante de trolox equivalente.....	26
3.4.2. Método de blanqueamiento de β -caroteno.....	27
3.4.3. Determinación de fenoles totales.....	28
3.5. Microscopía óptica.....	29
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	32
4.1. Caracterización de sustrato.....	32
4.2. Análisis estadístico de resultados.....	33
4.3. Rendimiento de extracción de aceite esencial.....	37
4.4. Efecto de la descompresión sobre el rendimiento de extracción.....	40
4.5. Capacidad antioxidante.....	43
4.6. Comparación de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por fluido supercrítico e hidrodestilación.....	46
CAPITULO 5: CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	53
ANEXOS.....	60
Anexo A. Caracterización de sustrato.....	60
Anexo B. Análisis estadístico.....	61
Anexo C. Curvas de calibración.....	63
Anexo D. Extracción de aceite esencial.....	65
Anexo E. Cálculo de t-student.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Condiciones críticas de temperatura y presión para algunos fluidos.	12
Tabla 2.2.	Condiciones de extracción de aceite esencial en diversas hierbas.	14
Tabla 3.1.	Variables independientes y sus niveles para el diseño central compuesto rotatorio.	25
Tabla 4.1	Rendimientos de extracción de aceite y actividad antioxidante en base a la temperatura y presión de descompresión con CO ₂ .	33
Tabla 4.2.	Análisis de varianza para el modelo cuadrático.	34
Tabla 4.3.	Indicadores estadísticos para el modelo de superficie respuesta.	34
Tabla 4.4.	Comparación de la capacidad antioxidante entre extracción supercrítica en la condición ideal (130 bar, 21 °C) e hidrodestilación (100 °C).	46
Tabla A-1	Determinación de la humedad inicial a la muestra de <i>Leptocarpha rivularis</i> .	60
Tabla A-2	Determinación del tamaño de partícula a la muestra inicial de <i>Leptocarpha rivularis</i> .	60
Tabla A-3	Determinación de la cantidad de aceite esencial de la muestra de <i>Leptocarpha rivularis</i> mediante hidrodestilación.	60
Tabla B-1.	Análisis de varianza para el rendimiento de extracción de aceite.	61
Tabla B-2.	Análisis de varianza para la actividad antioxidante.	62
Tabla C-1	Datos curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante utilizando la metodología de Trolox equivalente en aceite esencial de <i>Leptocarpha rivularis</i> .	63
Tabla C-2	Curva de calibración para la determinación de polifenoles totales en muestra de aceite esencial de <i>Leptocarpha rivularis</i> .	64
Tabla D-1	Rendimiento de extracción para dos muestras sin rápida descompresión con CO ₂ .	65

Tabla D-2	Rendimiento de extracción para la validación, a las mejores condiciones predichas por el modelo cuadrático (130 bar y 21 °C).	65
Tabla E-1	Datos para el cálculo del valor t experimental para la metodología trolox equivalente.	66
Tabla E-2	Datos para el cálculo del valor t experimental para la determinación de polifenoles totales.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Hoja de <i>Leptocarpha rivularis</i> tomada en la zona de Caburgua, IX región de la Araucanía.	5
Figura 2.2	Diferentes estructuras de tricomas presentes en plantas de la familia Asteraceae. (A) Glándula tricoma capitada. (B) Ductos secretores. (C) Glándulas tricomas peltadas.	7
Figura 2.3	Diagrama de fases general para un fluido supercrítico, donde P_c es la presión crítica y T_c es la temperatura crítica.	11
Figura 3.1	(A) Destilador tipo Clavenger. (B) Baño termocirculador (Labtech, modelo LCB-R20, Corea).	23
Figura 4.1	Diferencias entre el valor medido experimentalmente y predicho por el modelo de superficie de respuesta para: (A) Rendimiento de extracción de aceite esencial (Y_{Oil}) y (B) actividad antioxidante (Y_{Antiox}).	36
Figura 4.2	Superficie de respuesta de rendimiento de extracción de aceite (Y_{oil}) como una función de la temperatura (T , °C) y presión (P , bar).	38
Figura 4.3	(A) Imagen tomada por microscopia óptica (20x) de una hoja de <i>Leptocarpha rivularis</i> antes del pretratamiento con rápida descompresión con CO_2 . (B) Imagen tomada por microscopia óptica (20x) de una hoja de <i>Leptocarpha rivularis</i> después de realizada la rápida descompresión con CO_2 . Glándulas tricomas indicadas por flechas.	42
Figura 4.4	Superficie de respuesta de rendimiento de actividad antioxidante (Y_{Antiox}) como una función de la temperatura (T , °C) y presión (P , bar).	44
Figura A-1	Distribución del tamaño partícula obtenido del tamizado de la muestra de <i>Leptocarpha rivularis</i> .	61
Figura C-1	Curva de calibración para trolox equivalente.	63
Figura C-2	Curva de calibración para polifenoles totales.	64

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La *Leptocarpha rivularis* conocida también como “palo negro”, es una planta endémica, muy abundante, 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 *Leptocarpha rivularis* son usados como tratamiento para diferentes enfermedades y se basa en parte de la medicina ancestral mapuche. Estos extractos corresponden principalmente a aceites esenciales. La aplicación de aceites esenciales a partir de *Leptocarpha rivularis* han sido estudiados en el tratamiento contra el cáncer y la hipoglicemia (Martínez *et al.*, 2006).

Se han aplicado diferentes tecnologías para la obtención de aceites esenciales, como por ejemplo extracción por arrastre con vapor, la extracción con solventes e hidrodestilación. En general las desventajas de estas técnicas son el bajo rendimiento, por pérdidas de compuestos volátiles y tiempos de extracción prolongados. Uno de los principales problemas de extraer con vapor y en la hidrodestilación es la degradación de compuestos insaturados por acción del calor, mientras que para la extracción con solventes su principal problema es la incorporación al producto de residuos de solventes tóxicos (Pérez, 2005). Por esta razón es de interés el investigar nuevas tecnologías que permitan mejorar la calidad de los extractos, como la extracción con fluidos supercrítico utilizando CO₂ como solvente. Esta metodología ha sido ampliamente estudiada para la separación de aceites esenciales desde sustratos 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. Por esta razón es posible pensar en minimizar las pérdidas en la extracción de aceites esenciales aplicando rápida descompresión con CO₂.

Las desventajas de pretratamientos convencionales como 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). Otro pretratamiento es la molienda criogénica. Esta técnica consiste en sumergir la muestra en un líquido criogénico (nitrógeno líquido) con el fin de congelar el sustrato vegetal por contacto directo, y posteriormente someterlo a molienda. Ambas metodologías ineficientes, al no romper la totalidad de la muestra, y lentas, por estar “Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

condicionadas al tamaño del molino, junto además de ocupar compuestos peligrosos como el nitrógeno líquido que en contacto con la piel produce quemaduras.

Una alternativa a los pretratamientos convencionales para extraer aceites esenciales es la rápida descompresión con CO₂, que afecta directamente en la ruptura de tricomas, que son órganos que producen y contienen los aceites esenciales. En este pretratamiento, el substrato 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). Existe interés en buscar pre-tratamientos de substratos vegetales que reduzcan las pérdidas de componentes volátiles, y mejorar el rendimiento y la composición de los aceites esenciales.

Así se propone estudiar la ruptura celular y extracción de aceite esencial de hojas de *Leptocarpha rivularis* usando CO₂ supercrítico con el propósito de aumentar el rendimiento de extracción de aceite esencial mediante el uso de adecuadas condiciones de temperatura y presión para la ruptura celular por descompresión.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

- Estudiar la aplicación de la tecnología de fluido supercrítico para la ruptura celular de *Leptocarpha rivularis* por descompresión rápida con CO₂, como método de pretratamiento para aumentar el rendimiento de extracción de aceite esencial.

1.1.2 Objetivos específicos

- Definir condiciones de temperatura y presión para la ruptura celular de *Leptocarpha rivularis* mediante la descompresión rápida con CO₂ supercrítico.
- Evaluar la capacidad antioxidante del aceite esencial obtenido bajo condiciones seleccionadas de extracción con CO₂ supercrítico.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

CAPÍTULO 2
ANTECEDENTES GENERALES

CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES GENERALES

2.1 *Leptocarpha rivularis*.

La *Leptocarpha rivularis*, conocida comúnmente como palo negro, es una especie chilena, muy abundante que pertenece a la familia de las Asteraceae. Esta familia se caracteriza por contener aceites esenciales, flavonoides y triterpenos, menos taninos y aminoácidos no proteicos (Martínez *et al.*, 2006). Es un arbusto ramoso, de 1 a 2 m de altura, con ramas delgadas, peludas cuando nuevas, poco leñosa, de corteza casi negra y finamente estriada. Sus hojas (Figura 2.1) son opuestas o alternadas, simples, con el borde aserrado, de tono verde oscuro, pecioladas, de 5 a 10 cm de largo; olor penetrante, parecido a la manzanilla. Crece en el plano como en los cerros y primeros cordones de ambas cordilleras, entre el Maule y Valdivia, en lugares húmedos y expuestos al sol, junto a cursos de agua y en las orillas de los bosques (Hoffmann, 2005). Sus hojas son usadas en medicina popular para curar afecciones estomacales y en casos de menstruaciones difíciles (Doroso y Ramírez, 1994).



Figura 2.1. Hoja de *Leptocarpha rivularis* tomada en la zona de Caburgua, IX región de la Araucanía. (Michail Belov, 2009)

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

2.2 Aceites esenciales.

Los aceites esenciales se componen de sustancias lipofílicas que se encuentran en las fracciones líquidas volátiles de las plantas; éstas contienen los componentes responsables del aroma y que también están involucrados en la defensa de las plantas (Fornari *et al.*, 2012). Estos aceites son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes) (Martínez, 2001). Los aceites esenciales representan a lo más un 5% de la materia vegetal seca. Aunque todas las partes de la planta pueden contener aceites esenciales, su composición puede variar con la parte de la planta empleada como materia prima. Otros factores, tales como el cultivo, el suelo y las condiciones climáticas y también el tiempo de cosecha pueden determinar la composición y calidad del aceite esencial (Fornari *et al.*, 2012).

Los aceites esenciales son líquidos con escasa solubilidad en agua, solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos. La mayoría de los aceites son menos densos que el agua y con un alto índice de refracción (López, 2004). La complejidad en los aceites esenciales se debe a los hidrocarburos de terpeno como también derivados oxigenados como aldehídos, alcoholes, cetonas, ácidos y ésteres que presentan las plantas (Lawrence y Lawrence, 2011). Los principales compuestos de los aceites esenciales son los terpenos, que están formados por unidades de isopreno (5 carbonos), monoterpenos (10 carbonos), los cuales pueden constituir más del 80% del aceite esencial, y sesquiterpenos (15 carbonos) (Fornari *et al.*, 2012). Estos monoterpenos y sesquiterpenos pueden ser, a su vez, acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, y también oxigenados y no oxigenados (López, 2004). La gran mayoría de los aceites esenciales se encuentran en estructuras especiales dentro de las plantas llamados tricomas.

2.3 Tricomas.

La mayoría de las plantas superiores producen aceites esenciales. De este modo muchos antófilos contienen en el citoplasma de sus células epidérmicas (Tricomas) gotitas de aceites esenciales, que se evaporan hacia el exterior a unas determinadas temperaturas. Sin embargo, en algunas especies, el aceite esencial, muy fluido, se almacena en unas cavidades oleíferas (Strasburger *et*

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

al., 1994). En hojas de la especie Asteraceae es común la presencia de estructuras secretoras entre las que se destacan conductos, cavidades y tricomas de diferentes tipos (Figura 2.2). Sus secreciones pueden contener diferentes compuestos químicos, entre ellos terpenos, presentes en aceites esenciales y resinas, carbohidratos u otras sustancias, lo que les confiere un gran valor fitoquímico (Delbon *et al.*, 2012).

Los tricomas se podrían definir entonces como estructuras superficiales tanto unicelulares como multicelulares que se originan a partir de células de la epidermis y se desarrollan sobre la superficie exterior de diversos órganos de la planta. Su contacto directo con el entorno circundante determina su función de protección contra adversos biológicos, químicos o físicos, además cumple funciones de absorción y secreción (Krak y Mráz, 2008). Los tricomas se clasifican en dos grupos, primero están los tricomas capitadas, que consisten en una célula basal, con un tallo alargado de una o varias células y unas pocas células secretoras en su punta, y están los tricomas peltadas, que comprende un célula basal en la epidermis, un tallo corto y una cabeza secretora que consta de varias células secretoras dispuestas en una capa. Cualquiera que sea la naturaleza exacta de los productos de secreción de glándulas capitadas, está claro que la mayor parte de los compuestos orgánicos volátiles se desarrollan y se almacenan en los tricomas glandulares peltadas (Maffei, 2010).

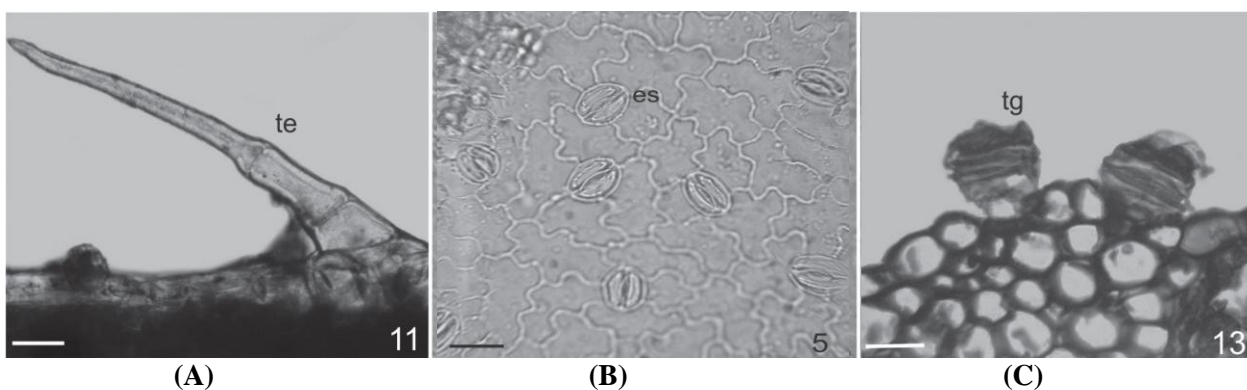


Figura 2.2. Diferentes estructuras de tricomas presentes en plantas de la familia Asteraceae. **(A)** Glándula tricoma capitada. **(B)** Ductos secretores. **(C)** Glándulas tricomas peltadas (Delbon *et al.*, 2012).

Durante la maduración el aceite esencial en una planta se acumula en un espacio subcuticular entre la pared celular y la cutícula, conocidos como ductos o conductos secretores. Estos ductos consisten en espacios intracelulares relativamente grandes revestidos con un epitelio de células secretoras, ahí es donde se almacenan los aceites esenciales y están listos para ser entregados (Maffei, 2010). De igual forma esos aceites esenciales pueden evaporarse a través de la cutícula levantada debido a su naturaleza lipófila. En otros casos, la cutícula se desgarrar y permite también la salida de secreciones hidrófilas (Strasburger *et al.*, 1994).

Los ductos o cavidades secretoras son propios de la familia Asteraceae. Es así como en la manzanilla (*Matricaria chamomilla*), que pertenece a la familia Asteraceae, se encontró que sus aceites esenciales se localizaban en los conductos secretores (Sharma y Bhat, 2009). Stamenic *et al.* (2008) establecen de igual forma que los ductos secretores son característicos de las familias Asteraceae, Apiaceae, Hypericaceae y Coniferae, mientras que las glándulas peltadas son característicos de la familia Lamiaceae, a la cual pertenece el orégano, laurel, romero, etc.

Micrografías de las glándulas tricomas después de aplicado un pretratamiento con rápida descompresión, evidenciaron una acción de ruptura desde dentro del interior de las glándulas. La alteración en estas glándulas fue probablemente causada por el desarrollo de un gradiente de presión a través de las paredes de la glándula durante la descompresión del lecho empacado (Gaspar *et al.*, 2003). Por ello es de interés el investigar las condiciones idóneas que favorezcan esta ruptura celular utilizando rápida descompresión con CO₂.

2.4 Extracción de aceites esenciales.

La extracción de los aceites esenciales de las partes vegetales se realiza de diversas formas, en función de la calidad del aceite por extraer y de la estabilidad de sus constituyentes, ya que en la mayoría de los casos éstos tienden a degradarse cuando se someten a altas temperaturas u otro tipo de tratamiento extremo (Salazar y Mayanquer, 2009). Por otro lado, el carácter lipofílico de los aceites esenciales requiere disolventes tales como fracciones parafínicas (pentano y hexano) para alcanzar una selectividad adecuada de la extracción. Además, disolventes líquidos deben tener puntos de ebullición bajos, con el fin de ser fácilmente separado del extracto y se puedan

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

reutilizar (Fornari *et al.*, 2012). Existen tres tipos diferentes de extracción de aceite esencial, el primero arrastre con vapor, utilización de solventes orgánicos e hidrodestilación.

En el arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Martínez, 2001). Este método utilizado para el aislamiento de aceites esenciales tiene varias desventajas. Las altas temperaturas y el agua pueden causar modificaciones químicas de los aceites esenciales. El arrastre con vapor por lo general resulta en la pérdida de los componentes altamente volátiles y algunos constituyentes solubles en agua (Khajeh *et al.*, 2010).

En el método de extracción con solventes orgánicos, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles (Martínez, 2001).

La hidrodestilación se realiza utilizando agua, en cual se mezcla con la muestra en un aparato modificado del tipo Clavenger. El cuerpo de este aparato consiste en dos tubos concéntricos. El tubo interno se conecta a un balón de vidrio donde está la muestra. Y presenta otro tubo que cumple la función de un condensador en base al frío, donde se obtiene el aceite esencial (Kulisic *et al.*, 2004). Las principales desventajas de esta metodología es la degradación de compuestos termolábiles, debido a la alta temperatura de funcionamiento (aprox. 100 °C para que ebulle el agua), la hidrólisis de compuestos sensibles al agua, es una extracción incompleta y se tiene que realizar un tratamiento post-extracción para eliminar el agua del aceite esencial (Thai Danh *et al.*, 2012).

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

Nuevos enfoques tecnológicos más eficaces para extraer y aislar sustancias a partir de materias primas están ganando mucha atención en el campo de la investigación y del desarrollo. Los enfoques tradicionales para recuperar aceite esencial desde la matriz de la planta incluyen arrastre por vapor, hidrodestilación y extracción líquido-solvente. Todas ellas afectan la termolabilidad y por lo tanto la calidad del aceite esencial extraído (Fornari *et al.*, 2012). Es por ello que se ha investigado un nuevo método de extracción en base a fluidos supercríticos.

2.5 Extracción con fluidos supercríticos.

En años recientes los fluidos supercríticos han recibido una gran atención como una importante alternativa al método convencional de extracción con solventes, puesto que la extracción con fluidos supercríticos es rápida y eficiente, elimina etapas por su simplicidad lo que nos ahorra tiempo, y evita el uso de solventes orgánicos, lo que favorece al medio ambiente. La extracción con fluidos supercríticos es un método de extracción/fraccionamiento que explota la única propiedad de los gases sobre su punto crítico de extraer compuestos solubles desde materiales puros (Mendiola *et al.*, 2007).

Un fluido supercrítico es una sustancia en condiciones por encima de su temperatura crítica y su presión crítica (Figura 2.3). En estas condiciones, varias propiedades del fluido se encuentran entre el gas y el líquido, la densidad de un fluido supercrítico es similar a la de un líquido y su viscosidad es similar a la del gas (Esquivel y Vargas, 2007). Los fluidos supercríticos poseen propiedades disolventes especiales, estas son: (i) un poder disolvente manejable, debido a las grandes variaciones en la densidad del fluido al modificar la presión y la temperatura cerca del punto crítico, (ii) posee excelentes propiedades de transporte como un gas, tales como la alta difusividad y la baja viscosidad, lo que permite procesos de extracción mucho más rápida, (iii) una baja tensión superficial lo que mejora la penetración en matrices porosas, tales como tejidos vegetales, y, (iv) una fácil separación entre el sustrato y el extracto, lo que nos permite recuperar el solvente sin mayor inconvenientes luego de una extracción (del Valle *et al.*, 2004).

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

Otras de las ventajas de usar un fluido supercrítico es que se obtienen altos rendimientos de extracción, es una tecnología limpia que no deja residuos, se ocupa bajas temperaturas de extracción, evita la alteración química en el aceite, su fácil manejabilidad permite cambiar los parámetros operacionales cambiando la composición del aceite extraído. Dentro de las desventajas de esta metodología es su elevado costo, y que ácidos grasos, pigmentos y ceras pueden ser extraídos junto con el aceite esencial, disminuyendo su calidad (Esquivel y Vargas, 2007).

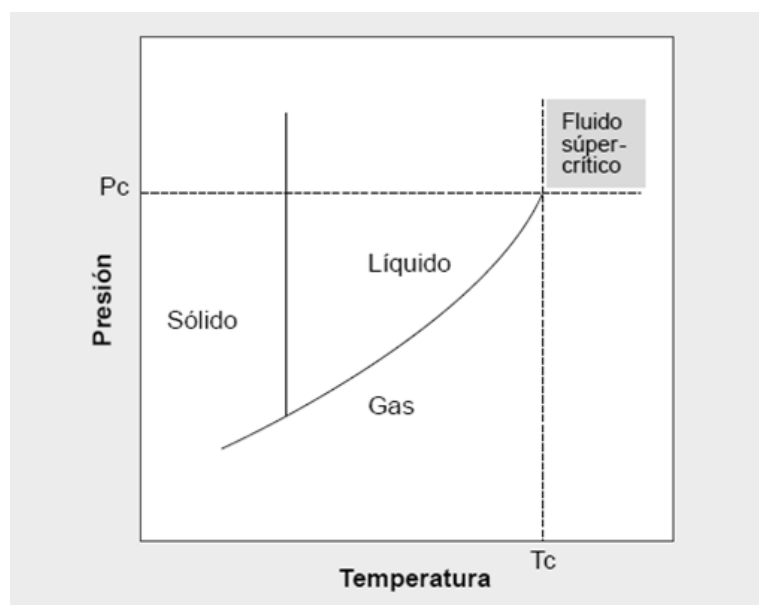


Figura 2.3. Diagrama de fases general para un fluido supercrítico, donde P_c es la presión crítica y T_c es la temperatura crítica (Esquivel y Vargas, 2007).

En la Tabla 2.1. se presentan las propiedades críticas de algunos fluidos que pueden utilizarse como solventes en condiciones supercríticas. Para que sea una extracción efectiva es necesario que la extracción se lleve a cabo entre los 10 y 100 °C y una presión entre 50 y 300 bar. Es importante considerar extraer a condiciones más cercanas a las temperaturas ambientales, ya que los aceites esenciales presentan compuestos termolábiles los que se ven afectados y se degradan a temperaturas elevadas (del Valle y Aguilera, 1999).

Tabla 2.1. Condiciones críticas de temperatura y presión para algunos fluidos.

Solvente	Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (bar)
Propano	97	42,5
Metano	-83	46,9
Oxígeno	-118	50,4
Etano	32	48,7
Acetileno	36	62,5
Agua	374	220,9
Dióxido de carbono	31	72,9
Dióxido de nitrógeno	36,7	71,7

Fuente: del Valle y Aguilera, (1999); Velasco y Villada, (2006).

Al considerar las condiciones antes descritas, quedan excluidos los solventes para la extracción de aceite esencial el oxígeno y metano por presentar temperaturas críticas muy bajas, además del propano, etano y acetileno por presentar escaso poder solvente a temperaturas bajas y presentar de igual forma problemas de inflamabilidad (del Valle y Aguilera, 1999). El agua a menudo se ha utilizado para la destrucción de compuestos orgánicos peligrosos, pero como necesita de una alta temperatura y presión crítica, ha limitado su aplicación en análisis de aceite esencial, junto además que a esas condiciones el agua adopta una naturaleza corrosiva (Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007).

Tal como se mostró en la Tabla 2.1 el dióxido de carbono (CO₂) y el dióxido de nitrógeno (N₂O) son los mejores fluidos supercríticos para extraer, junto además de que prácticamente presentan las mismas condiciones supercríticas de extracción. Es por eso que ya en 1990 algunos reportes publicaban acerca de la elección del dióxido de nitrógeno como fluido supercrítico en vez de dióxido de carbono. Este gas era considerado uno de los más adecuados para la extracción de compuestos polares, debido a que presentaba un momento dipolar permanente. Una de las aplicaciones a las que se utilizaba dióxido de nitrógeno en desmedro del dióxido de carbono, era en la extracción de dibenzodioxinas policloradas a partir de cenizas volantes. A pesar que era mayormente utilizado, se descubrió que este fluido provocaba explosiones violentas al ser utilizado en la extracción de muestras con un alto contenido orgánico. Es así que se dejó de utilizar y se ocupó exclusivamente el dióxido de carbono (Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007).

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

2.6 Dióxido de carbono (CO₂) como fluido supercrítico.

El dióxido de carbono (CO₂) es generalmente el disolvente más deseable para realizar extracción con fluidos supercríticos. La presión crítica es de 72,9 bar y la temperatura crítica del dióxido de carbono es de sólo 304 K o 31 °C, lo que lo hace ser atractivo para la extracción de compuestos sensibles al calor. Además, es un material inerte, no inflamable, no explosivo, de bajo costo, inodoro, incoloro, un disolvente limpio que no deja residuos en el producto, es también no tóxico y es generalmente aceptable como un ingrediente inocuo en los productos farmacéuticos y en alimentos. Además, el dióxido de carbono tiene una baja tensión superficial y baja viscosidad y una elevada difusividad que lo hacen atractivo como un disolvente supercrítico. La difusividad del dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) es uno de los dos órdenes de magnitud más alto que existe para fluidos, lo que permite conferir una transferencia de masa más rápida, dando como resultado en una tasa de extracción mayor que la obtenida por el método convencional (Khajeh *et al.*, 2010).

Las principales características del dióxido de carbono son que se disuelve en compuestos no polares o ligeramente polares, su poder disolvente para compuestos de bajo peso molecular es alto, tiene alta afinidad con compuestos orgánicos oxigenados de peso molecular medio, es insoluble en proteínas, polisacáridos, aminoácidos, taninos, azúcares y sales minerales, lo que se traduce en una ventaja si se quiere extractos libres de estos compuestos (Thai Danh *et al.*, 2012), y a medida que aumenta la presión es capaz de separar compuestos menos volátiles, con un peso molecular más alto y más polar (Sahena *et al.*, 2009).

2.7 Extracción de aceites esenciales utilizando CO₂ como fluido supercrítico.

Los aceites esenciales se pueden extraer fácilmente utilizando dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) a presiones y temperaturas moderadas. Esto es, desde un punto de vista del equilibrio, presiones relativamente bajas (90 a 120 bar) que se requieren para extraer los aceites esenciales desde la matriz de la planta. Sin embargo, presiones más altas también se aplican para extraer aceite esencial con el fin de comprimir la célula vegetal, con lo que se mejora la transferencia de masa y la liberación de los aceites desde los tricomas o cavidades secretoras. Las altas presiones

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

originan la co-extracción de sustancias distintas a los del aceite esencial. Por lo tanto la regla general es: cuanto mayor es la presión, mayor es el poder disolvente y menor es la selectividad de la extracción (Fornari *et al.*, 2012). A mayor presión se obtienen compuestos de mayor peso molecular, menos soluble y menos volátiles, tales como (en orden decreciente) pigmentos (clorofilas y carotenos), resinas, ceras, aceites, ácidos grasos libres, esteroides, terpenos más pesados y finalmente aceites esenciales (del Valle y Aguilera, 1999). Por lo tanto si se desea un aceite esencial de gran calidad es ideal extraer a condiciones bajas de presión y temperatura. Una de las grandes ventajas de la utilización del dióxido de carbono como fluido supercrítico es su alta selectividad a la hora de extraer compuestos. Se puede manejar sin mayores problemas las condiciones de extracción (presión y temperatura), lo que permite obtener aceites con composiciones diferentes (Donelian *et al.*, 2009).

Diversas investigaciones han estudiado las condiciones del dióxido de carbono como fluido supercrítico para la extracción de aceite esencial en hierbas. En la Tabla 2.2 se observan los resultados. La mayoría de las hierbas para una adecuada extracción de aceite esencial ocupan presiones bajo los 200 bar y temperaturas bajo los 50 °C. Por lo tanto la condición elegida para la extracción de aceite esencial en esta investigación es de 100 bar y 40 °C.

Tabla 2.2. Condiciones de extracción de aceite esencial en diversas hierbas.

Materia prima	Familia	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Referencia
Manzanilla	Asteraceae	35-50	80-200	Del Valle y Aguilera, (1999)
Milenrama	Asteraceae	40	100	Bocevaska y Sovova, (2007)
Romero	Lamiaceae	38-48	100-160	Velasco <i>et al.</i> (2007)
Lavanda	Lamiaceae	37	100	Thai Danh <i>et al.</i> (2012)
Orégano	Lamiaceae	40	100	Sandoval, (2008)
Boldo	Monimiáceas	40	100	Sandoval, (2008)

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

2.8 Tipos de pretratamientos.

Existen distintos tipos de pretratamientos que se realizan a substratos herbáceos para aumentar el rendimiento de extracción y procurar dañar lo menos posible los componentes volátiles que le dan la capacidad antioxidante a los aceites esenciales extraídos.

El pretratamiento convencional más usado es la reducción de tamaño producido por la molienda. En ésta se usa un molino de martillo, rodillos, bolas, etc., el cual tritura la muestra a través de golpes y fricciones. Este procedimiento presenta una gran desventaja que es el incremento de la temperatura por la fricción, la cual afecta la estabilidad y ocasiona pérdidas de aceites esenciales. Para evitar estas pérdidas ocasionadas por el calor, es que se ha perfeccionado la molienda agregando un compuesto frío al proceso. Ahí es donde nace la molienda criogénica. Esta técnica consiste en sumergir la muestra en un líquido criogénico (nitrógeno líquido) por un cierto tiempo, para luego molerla en un molino para su posterior extracción. Dentro de las ventajas de moler en frío están que la muestra se vuelve más quebradiza lo que favorece la trituración y además los aceites esenciales y otros componentes se mantienen en el producto al no verse afectados por el calor. Otro tipo de pretratamiento es la molienda en ausencia de aire, esta técnica es muy poco usada e investigada. Esta trata en obstaculizar la circulación de aire durante la molienda para evitar el arrastre de partículas volátiles fuera del molino (Huerta, 2005).

Los tipos de pretratamientos antes descritos resultaron ser menos eficaces que la rápida descompresión con CO₂. Sandoval (2008) analizó distintos tipos de pretratamientos en hojas boldo y orégano, encontrando que el rendimiento de extracción de aceites esenciales (g aceite esencial/100 g sólido seco) fueron más altos para sustratos pretratados por descompresión rápida con SC-CO₂ (boldo: 1,065 y orégano: 0,542) y por molienda criogénica (boldo: 1,060 y orégano: 0,533), en comparación a los rendimientos obtenidos por el método convencional (boldo: 0,878 y orégano: 0,506) y molienda en ausencia de corriente de aire (boldo: 0,733 y orégano: 0,415). Como el mejor rendimiento de extracción se obtuvo con descompresión con CO₂, en esta investigación sólo se analizará la rápida descompresión como pretratamiento.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

2.9 Descompresión rápida como pretratamiento.

La descompresión rápida, en términos generales, es un tipo de pretratamiento que implica poner en contacto el substrato vegetal con dióxido de carbono (CO₂) a una presión elevada por un cierto tiempo, para luego ejercer un cambio brusco de presión que libera rápidamente el CO₂ y libera el aceite esencial del substrato vegetal (Meyer *et al.*, 2012).

Este tipo de pretratamiento está especialmente diseñado para la ruptura de tricomas y cavidades secretoras. Gaspar *et al.* (2003) investigaron el efecto de la descompresión en muestras de orégano (familia Lamiaceae). Encontró que las glándulas tricomas peltadas eran permeables al dióxido de carbono, el cual penetró y se disolvió en la fase oleosa. El proceso de solubilización del CO₂ en la matriz herbácea ocurre en cuatro etapas. Primero el contacto del CO₂ con la matriz, luego la difusión del CO₂ en la matriz ejercida por la presión, luego la solubilización del fluido supercrítico con el aceite esencial e inmediata hinchazón de la glándula provocando el estiramiento de la membrana, y finalmente el proceso de descompresión, rompimiento de la membrana y extracción del aceite esencial. Se ha encontrado que la mayor ruptura celular se produce a 70 bar (Gaspar *et al.*, 2003) y que a presiones mayores a 100 y menores de 290 bar el incremento en la permeabilidad de la glándula por acción de la presión es poco notorio. Esto nos indica que existe una dependencia entre la permeabilidad de las glándulas y la presión (Stamenic *et al.*, 2010).

La estructura física de la matriz es de suma importancia, ya que la eficacia de la extracción se relaciona con la capacidad del fluido supercrítico para difundirse dentro de la matriz. Por esa razón, las condiciones de extracción del mismo grupo de aceites pueden diferir de una matriz a otra (Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007).

Zizovic *et al.* (2007) estudiaron el efecto de la rápida descompresión en la extracción de aceite esencial de la flor de milenrama y manzanilla, ambas de la familia Asteraceae. Informó que el tamaño de partícula no afectó la tasa de extracción, esto explicado por los fenómenos que tienen lugar en la estructura secretora que en ambos casos son conductos oleoríferos, en donde el aceite esencial se almacena. El efecto de descompresión es similar al de la familia Lamiaceae. Los conductos se ramifican por todo el ancho de la hoja, por lo tanto el dióxido de carbono puede

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

penetrar por ambos lados, lo que conduce a un tiempo de solubilización más rápido ya que no existe una alta resistencia de transferencia de masa. Esto causa el aumento del conducto e hinchazón de la pared, lo que provoca su ruptura y liberación de aceite esencial.

Es importante la rápida descompresión como pretratamiento ya que reduce el consumo de CO₂ y ahorra energía en el proceso de extracción con fluidos supercríticos (Stamenic *et al.*, 2008). En esta investigación se estudiará el efecto de distintas condiciones de temperatura y presión sobre la extracción de aceite esencial y su actividad antioxidante.

2.10 Aceites esenciales y actividad antioxidante.

Es un hecho conocido que los radicales libres juegan un papel importante en la vida biológica. Los radicales libres pueden causar peroxidación de lípidos en alimentos con lo cual conduce a su deterioro. Aunque muchos alimentos contienen antioxidantes para evitar ese tipo de deterioro, éstos son de origen sintéticos, como el BHT (butil-hidroxi-tolueno) o el BHA (butil-hidroxi-anisol), por lo que están asociados a efectos secundarios, como enfermedades cancerígenas. Por esta razón existe un interés cada vez mayor en los estudios de aditivos naturales como antioxidantes. Muchas fuentes de antioxidantes de origen vegetal se han estudiado en los últimos años. Entre éstos las propiedades antioxidantes de muchas plantas aromáticas y especias han demostrado ser eficaces en el retraso del proceso de peroxidación de lípidos en los aceites y los alimentos grasos y han ganado el interés de muchos grupos de investigación (Kulisic *et al.*, 2004).

Esta propiedad biológica está estrechamente relacionada con los aceites esenciales de la planta (Lawrence y Lawrence, 2011). Esta es la razón por la cual se estudiará la actividad antioxidante de los extractos de aceite esencial de *Leptocarpha rivularis*, utilizando dos metodologías la primera que determina la capacidad antioxidante por trolox equivalente y la segunda por el método de blanqueamiento del β -caroteno. De igual forma se determinará el contenido de fenoles totales.

La determinación de la capacidad antioxidante utilizando 1,1-difenil-2-picrylhydrazine (DPPH) fue descrita por primera vez por Blois en 1958. Es uno de los ensayos de determinación de antioxidantes más utilizados para muestras de plantas. DPPH es un radical libre estable que

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

reacciona con compuestos que pueden donar un átomo de hidrógeno. Este método se basa en el barrido de DPPH a través de la adición de una especie de radical o un antioxidante que decolorize la solución de DPPH. La actividad antioxidante se mide entonces por la disminución en la absorción a 515 nm (Krishnaiah *et al.*, 2011).

Por otra parte el método de determinación de la capacidad antioxidante por el blanqueamiento del β -caroteno se basa en la pérdida del color del β -caroteno debido a su reacción con los radicales que se forman por la oxidación de ácido linoleico en una emulsión. Como las moléculas de β -caroteno pierden sus enlaces dobles por la oxidación, el compuesto pierde su cromóforo y el color naranja característico, el cual se mide espectrofotométricamente a 470 nm (Yang *et al.*, 2008). La tasa de blanqueo β -caroteno puede ser frenado en la presencia de antioxidantes (Kulisic *et al.*, 2004).

Muchas hierbas y especias son una excelente fuente de compuestos fenólicos, que han sido investigados por presentar una buena actividad antioxidante (Hinneburg *et al.*, 2006). Por esta razón se determinará el contenido de polifenoles totales en la *Leptocarpha rivularis* y si existe alguna relación con la capacidad antioxidante determinada. La determinación de polifenoles se realiza mediante el método de Folin-Ciocalteu. Esta trata de la oxidación de fenoles en una solución alcalina la cual cambia de un color amarillo a azul. Estos pigmentos azules tienen un máximo de absorción en función de la composición cuantitativa y cualitativa de la mezcla fenólica junto además del pH de la solución, que se obtiene al agregar el carbonato de sodio. Esta absorción se mide espectrofotométricamente a 765 nm (Cai Lee *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 3
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES.

3.1.1 Materia prima.

El sustrato a ocupar corresponde a hojas de *Leptocarpha rivularis*, conocido también como palo negro, recolectadas en la zona de Valdivia, XIV Región de los Ríos. Se obtuvieron hojas libres de tallos y ramas. Se almacenó las hojas 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 del calor.

3.1.2 Equipos e instrumentos.

- Agitador de tubos vortex (VELP Scientifica, Europa)
- Balanza analítica, sensibilidad $\pm 0,0001$ g (Ohaus MJ-510, Corporation USA)
- Baño termo-circulador (Labtech, modelo LCB-R20, Corea)
- Baño termoregulado (Memert, Alemania)
- Baño ultrasónico 2,75 L (Elma, Alemania)
- Espectrofotómetro (Bausch y Lomb, Espectronic, SP-2000 UV, Estados Unidos)
- Estufa (Electro Thermostatic Oven, modelo DHG-9037A, China)
- Extractor de aceite esencial por arrastre con vapor (Equipo Clavenger)
- Extractor supercrítico (Applied Separation Speed 2, INC Allentown, Estados Unidos)
- Placa eléctrica con agitador magnético (Magnetic Stirrers, modelo SH-3, China)
- Tamices de la serie Tyler
- Tamiz vibratorio Ro-Tap (Gilson Company, INC, Estados Unidos)

3.1.3 Reactivos.

- 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)
- Ácido gálico
- Ácido linoleico
- Agua desionizada
- Agua destilada

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

- Alcohol
- β -caroteno, tipo I, aprox. 95% UV
- Butil-hidroxi-tolueno (BHT)
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Cloroformo p.a.
- CO_2 99,8% de pureza
- Etanol p.a.
- Metanol p.a.
- n-Hexano p.a.
- Nitrógeno
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Surfactante Tween 40
- Tolueno p.a.
- Trolox

3.1.4 Material de vidrio y otros.

- Balón de 1000 mL
- Cubeta de vidrio
- Desecador con sílica gel
- Matraz aforado de 5, 10, 25 y 200 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 y 1000 mL
- Micropipetas de 10-100 μL y 100-1000 μL
- Picnómetro de 25 mL
- Probeta de 100 y 500 mL
- Recipientes de vidrio (viales) de 60 mL
- Material de vidrio de uso corriente

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO_2 como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

3.2 ANÁLISIS DE SUSTRATO

3.2.1 Determinación de humedad por método gravimétrico.

La humedad se determinó por medio del método gravimétrico (AOAC, 1990), basado en la diferencia de pesada mediante secado en estufa a 105 °C hasta alcanzar un peso constante. Se pesaron 2 g de hojas de *Leptocarpha rivularis* en placas Petri previamente taradas. Este análisis fue aplicado al sustrato inicial y al sustrato agotado después de la extracción y se realizó en duplicado. Para la determinación de la humedad en base húmeda se utilizó la Ecuación 3.1.

$$\text{Humedad (\%)} = \left[\frac{(m_i - m_f)}{m_i} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

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

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

3.2.2 Tamaño de partícula.

A las hojas de *Leptocarpha rivularis* se les determinó la distribución del tamaño de partículas usando tamices de la serie Tyler. Los tamices usados fueron los N° 25 (0,7 mm), N° 20 (0,9 mm), N° 18 (1,0 mm), N° 14 (1,4 mm), N° 8 (2,4 mm) y N° 6 (3,4 mm). Una cierta cantidad de muestra se colocó en el Tamiz vibratorio Ro-Tap y se tamizó por 15 min. Las muestras tamizadas se envolvieron en bolsas de papel oscuras y fueron almacenadas en un refrigerador (5° C) hasta su análisis.

3.2.3 Extracción de aceite esencial.

La extracción de aceites esenciales se llevó a cabo por la metodología de hidrodestilación. Se cargaron 20 g de muestra de *Leptocarpha rivularis* seca, con un tamaño de partícula superior a los 500 μm , junto con 300 mL de agua destilada en un destilador tipo Clavenger (Figura 3.1 A), y se conectó el baño termocirculador (Figura 3.1 B) por aproximadamente 4 h (Khajeh *et al.*, 2004). El destilado volátil fue cuantificado en una bureta de 10 mL. Se dejó decantar, para separar fases por diferencia de densidades entre el aceite y el agua. El aceite fue recolectado en “Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

frascos de vidrio oscuro y se mantuvo bajo refrigeración. Para determinar el porcentaje de extracción se utilizó la Ecuación 3.2.

$$\%extraccion = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \quad (3.2)$$

Dónde: m_i : Lectura inicial del extracto en la bureta.

m_f : Lectura final en la bureta una vez extraído el aceite esencial.

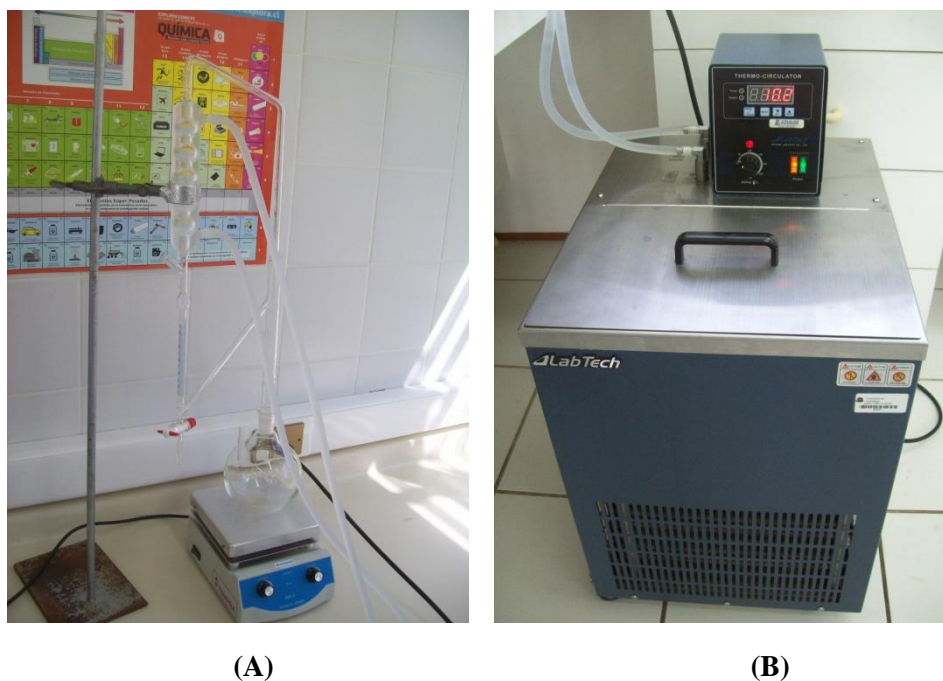


Figura 3.1. (A) Destilador tipo Clavenger. (B) Baño termocirculador (Labtech, modelo LCB-R20, Corea).

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Descompresión rápida con CO₂.

Para efectuar la descompresión se utilizó un extractor supercrítico, el cual se cargó con una muestra de hoja seca, previamente pesada en el extractor de 50 mL de capacidad. La extracción fue realizada usando CO₂ de un 99,8% de pureza. La descompresión se realizó a un tiempo

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

constante de 60 min. A este tiempo constante se utilizaron diferentes combinaciones de temperatura (21, 25, 35, 45, 49 °C) y presiones (60, 70, 95, 120, 130 bar) de acuerdo a un diseño experimental compuesto rotatorio. A continuación se abrió la llave para dar paso al CO₂ (descarga del extractor), lo que provocó una rápida caída de presión. Se cerró la válvula de liberación de CO₂ para seguir inmediatamente con la extracción del aceite esencial.

3.3.2 Extracción supercrítica.

Ya realizada la descompresión rápida de CO₂, se procedió a colocar las condiciones de extracción fijada para todos los ensayos en 100 bar y 40 °C por un tiempo de 26 min y con una velocidad superficial de CO₂ de 1 mm/s. La recolección de aceite esencial se realizó en viales de 60 mL previamente pesados. La diferencia de peso entre el frasco con aceite extraído y su peso vacío determinó la cantidad de aceite que se obtiene en el tiempo de extracción. Las muestras agotadas fueron descargadas del extractor y se determinó su contenido de humedad. Esta información fue útil para determinar el rendimiento de extracción, y su relación con su condición de ruptura (temperatura y presión). Las extracciones se realizaron en duplicado.

3.3.3. Diseño experimental y análisis estadístico.

Se usó un diseño de superficie de respuesta para evaluar el efecto de las variables independientes temperatura codificada X_1 (ecuación 3.3, donde T es la temperatura en °C) y la presión codificada X_2 (ecuación 3.4, donde P es la presión en bar), sobre el rendimiento de extracción de aceite Y_1 (g/kg sustrato seco) y actividad antioxidante Y_2 (mmol Teac/g aceite). Las variables independientes del diseño central compuesto rotatorio con o sin decodificar se muestran en la Tabla 3.1.

$$X_1 = \frac{T - 35}{10} \quad (3.3)$$

$$X_2 = \frac{P - 95}{25} \quad (3.4)$$

El diseño experimental está basado en un diseño central compuesto rotatorio. El diseño consiste de un diseño factorial de 2 factores ($n = 2$) con dos niveles (-1, +1). El diseño tiene 4 ($2n$) puntos experimentales y 4 ($2n$) puntos estrellas con una distancia axial de 1,41 ($\alpha = 2^{n/4}$) y 3 mediciones en el punto central para la determinación del error experimental. Los experimentos se realizaron “Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

en orden aleatorio para minimizar el efecto de variabilidad de factores externos. Se utilizó la Ecuación 3.5 de segundo orden para expresar la variable respuesta Y como una función de las variables independientes X₁ y X₂, como sigue:

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_{12}X_1X_2 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 \quad (3.5)$$

Donde A₀ es una constante, A₁ y A₂ son los coeficientes lineales; A₁₂ es el coeficiente de interacción, y A₁₁ y A₂₂ son los coeficientes cuadráticos. Se construyeron superficies de respuesta variando el valor de las variables dentro de la región de estudio. El buen ajuste del modelo se evaluó mediante un análisis de varianza. Los coeficientes de la ecuación cuadrática fueron estimados usando el programa Design Expert (Stat-Easy, Inc. Minneapolis, MN). La significancia estadística de los coeficientes se analizó a un nivel de significancia α=0,05. Adicionalmente se realizó un análisis de correlación entre las distintas respuestas. Finalmente se realizó extracciones adicionales con el propósito de validar la ecuación con el valor de las variables óptimas. A los extractos obtenidos bajo estas condiciones se les evaluó su actividad antioxidante.

Tabla 3.1. Variables independientes y sus niveles para el diseño central compuesto rotatorio.

Variables independientes	Símbolos		Niveles	
	No codificada	Codificada	No codificada	Codificada
Temperatura (°C)	<i>T</i>	<i>X</i> ₁	21	-1,41
			25	-1
			35	0
			45	+1
			49	+1,41
Presión (bar)	<i>P</i>	<i>X</i> ₂	60	-1,41
			70	-1
			95	0
			120	+1
			130	+1,41

$$X_1 = (T-35)/10; X_2 = (P-95)/25;$$

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

3.4 ANÁLISIS DE EXTRACTOS.

Bajo condiciones seleccionadas de extracción con CO₂, obtenidas del análisis de superficie de respuesta, se obtuvieron extractos de aceite esencial a los que se les analizó su capacidad antioxidante.

3.4.1 Determinación de capacidad antioxidante de trolox equivalente.

Para este análisis se realizó como lo describe Brand-Williams *et al.* (1995) y Bondet *et al.* (1997). Se preparó dos soluciones, la primera la solución de DPPH, donde se disolvió 0,00394 g de DPPH en 25 mL de etanol p.a. en un vaso precipitado cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz, para luego agitarlo por 30 min. Y la segunda solución de trolox, que se preparó con 0,0025 g de trolox en 5 mL de etanol p.a. y 5 mL de agua desionizada. Luego se preparó la curva de calibración (Anexo C, Figura C-1), utilizando 6 matraces aforo de 10 mL, se le adicionó a cada matraz una alícuota de trolox que va desde el 0 hasta los 0,1 mL, para luego completar con cloroformo hasta obtener 3,2 mL de volumen total, donde el blanco correspondía al valor de 0. A cada tubo se le agregó 0,8 mL de reactivo DPPH. Se mezcló homogéneamente y se dejó en un lugar oscuro por 30 min, transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 520 nm. Luego, se construyó la curva con el patrón de trolox, graficando la absorbancia *versus* la concentración de trolox (mmol de Teac/g aceite) añadido a cada matraz, y se obtuvo de esta forma la ecuación de regresión característica.

Para el análisis de las muestras se prepararon diluciones, adicionando a cada matraz de aforo de 10 mL lo siguiente: 2,2 mL de etanol, 1 mL de muestra y 0,8 mL de DPPH. La mezcla se agitó y se dejó reposar por 15 min en la oscuridad. Se trabajó en duplicado y se midió la absorbancia a 520 nm en cubeta de vidrio. A partir de la ecuación de la curva obtenida con el patrón trolox se calculó la actividad antirradicalaria de las muestras expresadas en mmol de trolox equivalente/g de aceite utilizando la Ecuación 3.6.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

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

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

m: Pendiente de la curva patrón de trolox

A: Absorbancia de la muestra analizada en longitud de onda de 520 nm

FD: Factor de dilución

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

g: gramos de la muestra utilizada.

3.4.2. Método de blanqueamiento del β -caroteno

El procedimiento para determinar la actividad antioxidante utilizando el método del blanqueamiento del β -caroteno, se basó en el método señalado por Kulisic *et al.* (2004) y Mendiola *et al.* (2007). Se preparó primeramente una solución de β -caroteno (1 mg/mL en cloroformo). Luego se elaboró una emulsión A consistente en 0,1 mL de β -caroteno, 0,022 mL de ácido linoleico y 0,1 mL de Tween 40. Se evaporó el cloroformo de la muestra bajo una corriente de nitrógeno seco. La muestra seca se disolvió en 50 mL de agua destilada oxigenada y se emulsificó en un sonificador durante 1 min. De igual forma se elaboró una emulsión B sin β -caroteno (0,022 mL de ácido linoleico, 0,1 mL de Tween 40 y 50 mL de agua destilada oxigenada). La muestra de aceite esencial fue diluida en metanol y se elaboró las siguientes concentraciones (10, 5, 2,5, 1 y 0,5 mg/mL). Se agregó 0,2 mL de muestra diluida a cada tubo de ensayo junto con 5 mL de la emulsión A. Se realizó un control sin antioxidante donde se agregó 0,2 mL de metanol y 5 mL de emulsión A. La emulsión B se utilizó como blanco, se añadió a un tubo de ensayo 0,2 mL de metanol junto con 5 mL de emulsión B. Las muestras fueron leídas inmediatamente ($t=0$) en espectrofotómetro a 470 nm en cubeta de vidrio. Una vez leídas las muestras fueron sometidas a una autooxidación térmica a 50°C por 2 h. Se leyó la absorbancia cada 15 min. Todas las muestras se realizaron en triplicado. El Butil-hidroxi-tolueno (BHT) fue usado como estándar. El porcentaje de inhibición fue calculado usando la Ecuación 3.7.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{(A_{A(120)} - A_{C(120)})}{A_{C(0)} - A_{C(120)}} \right] \times 100 \quad (3.7)$$

Dónde: $A_{A(120)}$: 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

3.4.3 Determinación de fenoles totales.

La extracción de los fenoles de los extractos de aceite esencial se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Koski *et al.* (2002), mientras que la determinación de fenoles mediante el método Folin-Ciocalteu se realizó en base a la metodología descrita por Hossain y Shah (2011) con algunas modificaciones.

Primeramente se preparó la muestra para poder extraer los fenoles desde el aceite esencial. Para ello se ocuparon 10 mg de aceite esencial, los cuales se disolvieron en 2 mL de n-hexano. La mezcla se agitó en un agitador de tubos Vortex por 2 min a una frecuencia de 30 mHz. El n-hexano se retiró de la solución mediante evaporación con nitrógeno. Se volvió a realizar el mismo procedimiento una vez más. El residuo es disuelto en 2 mL de metanol antes de someter a la prueba de Folin-Ciocalteu.

Para la determinación fenoles totales, es necesario preparar previamente tres reactivos. El primero, se preparó disolviendo el reactivo Folin-Ciocalteu en agua desionizada en una relación de 1:10 v/v. En este caso se diluyeron 3 mL del reactivo en 30 mL de agua desionizada. El segundo reactivo a preparar fue el Carbonato de sodio (Na_2CO_3) a una concentración del 7,5% p/v. Y el tercer reactivo fue la solución patrón de ácido gálico a una concentración de 0,5 mg/mL. Se disolvieron 0,01 g de ácido gálico en 20 mL de agua desionizada.

Primeramente se preparó la curva de calibración adicionando a 6 matraces de aforo de 10 mL la solución patrón (0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 mL) a cada matraz (el primero se considero como blanco). Inmediatamente, 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu fue añadido a cada matraz más 1 mL de la solución de Na_2CO_3 . 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

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO_2 como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

las demás soluciones, obteniéndose de esta forma el gráfico de la curva patrón. (Anexo C, Figura C-2).

Una vez preparada la curva de calibración se realiza el análisis de las muestras. Una alícuota de aceite esencial en metanol (1 mL) se diluyó en 5 mL de agua destilada. Inmediatamente se añadió 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 3 min se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio y se aforó a 10 mL con agua destilada. Después de 30 min se midió la absorbancia a 765 nm. Se utilizó ácido gálico para la curva de calibración y los resultados de los análisis son expresados en mg de ácido gálico equivalente por g de aceite esencial. Se calculó el contenido de fenoles totales mediante la Ecuación 3.8.

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

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

m: pendiente de la curva patrón de ácido gálico

A: absorbancia de la muestra analizada a 765 nm

FD: factor de dilución.

V: Volumen de solvente utilizado en la preparación de la muestra (mL)

g: gramos de aceite esencial utilizado.

3.5 MICROSCOPIA ÓPTICA.

Las muestras frescas se sometieron a fijación por 48 h con una solución compuesta por la mezcla (1:1:13:5) de formalina, ácido acético, etanol y agua. 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 las 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

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

el corte se utilizó un micrótopo manual (Jung, Heidelberg, Alemania), obteniendo láminas delgadas de 30 μm de grosor, las que fueron colocadas sobre 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.

La tinción de las láminas se realizó con safranina (para marcar de rojo los cromosomas, núcleos y paredes lignificadas), y ‘fast green’ (para marcar otras estructuras celulares con color verde), seguido por un lavado con eugenol para eliminar el exceso de tinte. Las imágenes de las muestras se obtuvieron mediante un microscopio óptico Olympus BX50 (Tokio, Japón) equipado con una cámara fotográfica JVC TK-1280E (Yokohama, Japón) (Sandoval, 2008).

CAPÍTULO 4
RESULTADOS Y DISCUSIONES

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1 Caracterización de sustrato.

Se determinó en primera instancia la humedad de la *Leptocarpha rivularis*, la cual fue de $9,24 \pm 0,09$ % (Anexo A, Tabla A-1). Es de interés conocer el contenido de humedad, ya que el agua presente en la muestra vegetal interfiere en la interacción soluto-CO₂, así como también la difusión de lípidos desde el interior de la muestra lo que se traduce en una disminución en el rendimiento de extracción (Sahena *et al.*, 2009). Por esta razón, se recomienda el secado de la materia prima. En general, la muestra vegetal no debe tener un contenido de humedad superior al 12%. La presencia de agua puede causar otros efectos indeseables tales como la formación de hielo en las tuberías debido a la rápida descompresión, y la hidrólisis de algunos compuestos (Fornari *et al.*, 2012). Hierbas de la familia Asteraceae mostraron humedad de 10,65% para la caléndula y 10,25% para la manzanilla (Zizovic *et al.*, 2007).

Se estableció el tamaño de partícula de la muestra de *Leptocarpha rivularis* (Anexo A, Tabla A-2, Figura A-1). La mayor cantidad de muestra quedó retenida entre las mallas de abertura de 1,0 mm a 1,4 mm. Se ha encontrado evidencia que para hierbas de la familia Asteraceae, el tamaño de partícula no influye en el rendimiento de extracción. Esta cualidad es propia de la familia Asteraceae ya que estas últimas presentan estructuras rígidas que secretan o liberan el aceite esencial, conocidos como ductos secretores, los cuales están presente en toda la hoja, y al reducirla de tamaño no se ven afectados en gran medida (Stamenic *et al.*, 2008).

Se determinó el contenido de aceite presente en la *Leptocarpha rivularis* mediante hidrodestilación. Se obtuvo $1,28 \pm 0,07$ g/kg SS (Anexo A, Tabla A-3). En comparación con otras hierbas de la misma familia (Asteraceae) en la *Leptocarpha rivularis* se obtuvo menos aceite esencial. Roby *et al.* (2013) analizaron la hierba *Matricaria chamomilla* obteniendo mediante hidrodestilación un rendimiento de 7,3 g/kg SS. De igual forma se obtuvo con la *Artemisia scoparia* un rendimiento de 1,7 g/kg SS (Singh *et al.*, 2009), *Pteronia incania* con un 10,8 g/kg SS de rendimiento (Hulley *et al.*, 2010) y la *Achillea umbellata* con un 1,7 g/kg SS (Radulovic *et al.*, 2012).

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

4.2 Análisis estadístico de resultados.

El efecto de la temperatura (T) y presión de descompresión (P) sobre las respuestas rendimiento de extracción de aceite esencial (Y_{Oil}) y actividad antioxidante (Y_{Antiox}) se observan en la Tabla 4.1. Ambas respuestas son expresadas como un valor promedio resultante entre dos mediciones. Los valores para la respuesta de extracción de aceite esencial (Y_{Oil}) van desde los $29,42 \pm 1,42$ g/kg SS hasta los $50,42 \pm 0,14$ g/kg SS, mientras que los valores de la respuesta actividad antioxidante (Y_{Antiox}) están entre los $1,33 \pm 0,02$ y $2,31 \pm 0,03$ mmol Teac/g aceite.

Tabla 4.1. Rendimientos de extracción de aceite y actividad antioxidante en base a la temperatura y presión de descompresión con CO₂.

Temperatura	Presión	X ₁	X ₂	Y _{Oil}	Y _{Antiox}
(T, °C)	(P, bar)	(-)	(-)	(g/kg SS)	(mmol Teac/g aceite)
25	70	-1	-1	30,22 ± 1,28	2,18 ± 0,02
45	70	1	-1	29,77 ± 0,11	1,58 ± 0,03
25	120	-1	1	45,86 ± 2,27	1,93 ± 0,03
45	120	1	1	44,73 ± 0,25	1,35 ± 0,01
21	95	-1,41	0	39,99 ± 0,37	2,31 ± 0,03
49	95	1,41	0	30,36 ± 0,48	1,33 ± 0,02
35	60	0	-1,41	29,42 ± 1,42	1,90 ± 0,05
35	130	0	1,41	50,42 ± 0,14	1,64 ± 0,06
35	95	0	0	30,55 ± 0,22	1,82 ± 0,02
35	95	0	0	33,12 ± 1,60	1,87 ± 0,03
35	95	0	0	35,65 ± 1,51	1,91 ± 0,04

Y_{Oil} : rendimiento de extracción de aceite; Y_{Antiox} : Actividad antioxidante (DPPH)

Con los resultados es necesario conocer la idoneidad del modelo cuadrático. Para ello se realizó un análisis de varianza y posteriormente se evaluó el efecto de las variables temperatura (T) y presión de descompresión (P) sobre las respuestas, utilizando como base la metodología de superficie de respuesta. El análisis de varianza para el modelo cuadrático es presentado en la Tabla 4.2. Se observa en ella que el modelo cuadrático para describir tanto la respuesta rendimiento de extracción de aceite esencial (Y_{Oil}) y actividad antioxidante (Y_{Antiox}) es adecuado. Esto se debe principalmente al valor p descrito por las variables independientes (T y P) el cual es significativo ($p < 0,01$). Al ser el valor p muy pequeño nos indica que tenemos una respuesta “Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

robusta, lo que se traduce en un sistema muy controlado con pocas opciones al error experimental.

Tabla 4.2. Análisis de varianza para el modelo cuadrático.

Modelo		Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	Valor p
Y _{Oil}	Regresión	549,90	5	109,98	17,63	0,0034
	Residuo	31,20	5	6,24		
	Total	581,10	10			
Y _{Antiox}	Regresión	0,94	5	0,19	76,10	0,0001
	Residuo	0,013	5	0,0025		
	total	0,95	10			

Y_{Oil}: rendimiento de extracción de aceite; Y_{Antiox}: Actividad antioxidante (DPPH)

La Tabla 4.3 muestra los indicadores del modelo cuadrático. Estos indicadores son el valor F, el coeficiente de determinación (R²), la falta de ajuste, la relación señal/ruido y el coeficiente de variación (CV). Con los resultados del análisis de varianza, es de interés conocer si cumple con las características necesarias para la construcción de una gráfica de superficie de respuesta y ecuación cuadrática, y con ello obtener una estimación del comportamiento de nuestro modelo cuadrático.

Tabla 4.3 Indicadores estadísticos para el modelo de superficie respuesta.

Indicadores estadísticos	Variable Respuesta	
	Y _{Oil} (g/kg SS)	Y _{Antiox} (Teac/kg SS)
F	17,63*	76,10*
R ²	0,9463	0,9870
Falta de ajuste	0,94 ^{ns}	1,53 ^{ns}
Señal/ruido	12,086	24,778
CV	6,87	2,76

* Significante (p<0,01); ** Significante (p<0,05); y ^{ns} No-significante (p>0,05).

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

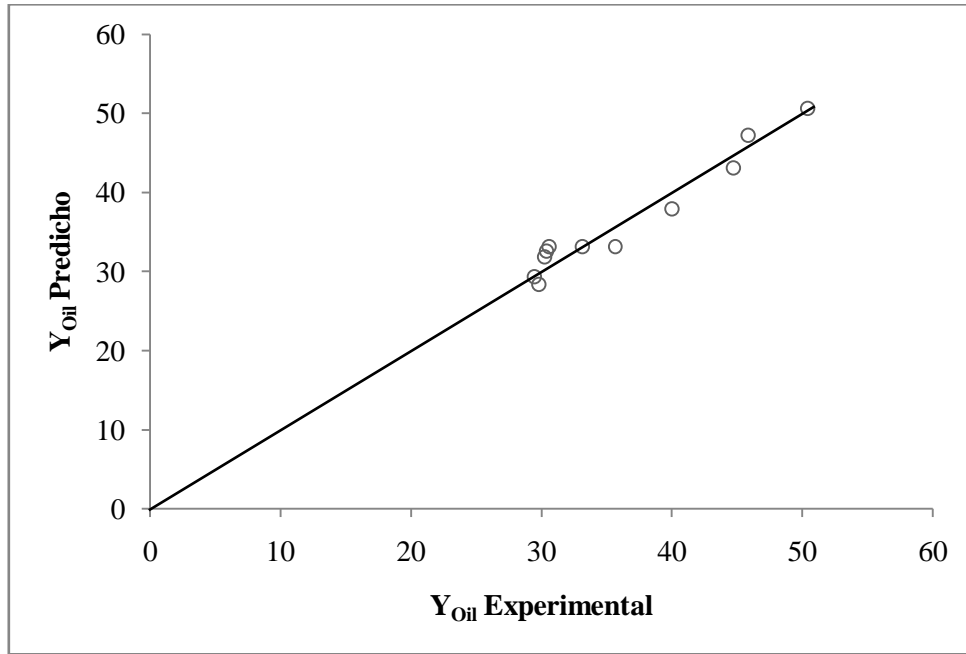
Como se mencionó anteriormente el valor F para ambas respuestas resultó ser significativo ($p < 0,01$). El valor del coeficiente de determinación (R^2) fue para la respuesta extracción de aceite esencial de 0,9463 y para la respuesta de actividad antioxidante de 0,9870. El R^2 nos indica la relación que existe entre los valores experimentales y los valores predichos por la respuesta. Ambos valores fueron altos y cercanos a 1 lo que nos demuestra que el modelo es significativo.

La falta de ajuste es no significativa para la respuesta rendimiento de extracción de aceite esencial (Y_{Oil}) y actividad antioxidante (Y_{Antiox}) ($P > 0,05$). La relación señal/ruido mide la calidad de la respuesta y esta debe ser superior a 4 para que el ruido (error no controlable) sea mínimo. El valor de la señal/ruido para ambas respuestas (12,086 y 24,778) fue muy superior a 4, lo que nos indica que durante la realización de los ensayos, el error propio de un análisis no influyó en la calidad de nuestros resultados.

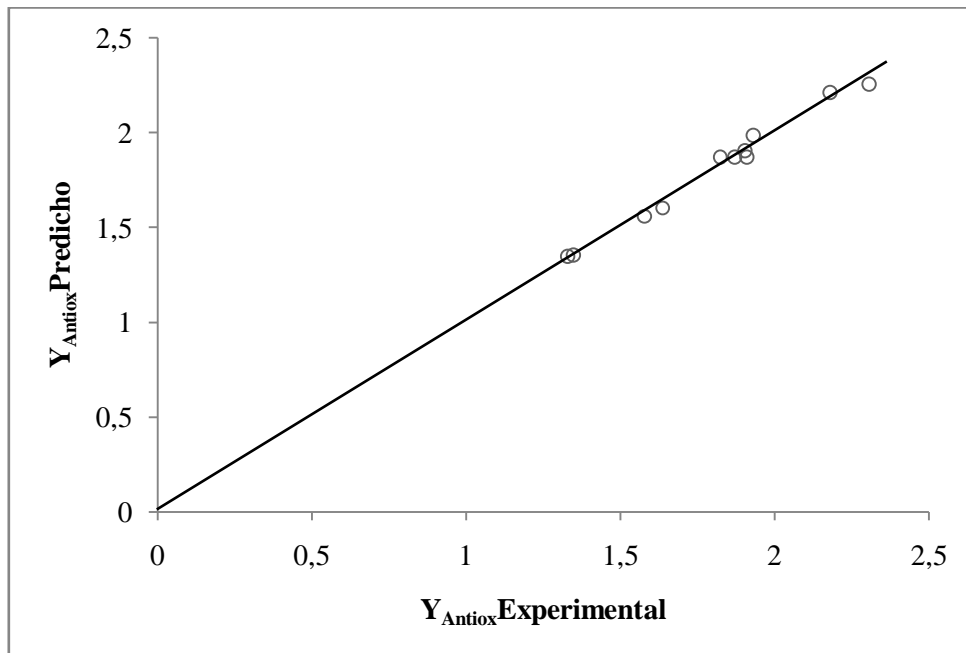
Y finalmente se determinó el coeficiente de variación (CV). Esta mide la variación de nuestros resultados respecto de una media de la variable respuesta, entre más baja sea esta variación con la media, menos dispersos son nuestros valores. Para ambas respuestas el coeficiente de variación fue menor (6,87 y 2,76), lo que nos indica que existe poca dispersión entre los datos. Esto se comprueba en la Figura 4.1 que nos muestra la diferencia entre el valor predicho y el valor experimental. En ambos gráficos se observa que los resultados cayeron muy cerca de la línea media de los resultados, lo que se tradujo en una baja diferencia entre el valor predicho por el modelo y el valor obtenido experimentalmente.

En función de los resultados obtenidos en los indicadores estadísticos descritos anteriormente, es posible afirmar que nuestro modelo es idóneo para describir la respuesta rendimiento de extracción de aceite esencial (Y_{Oil}) y actividad antioxidante (Y_{Antiox}) en función de las variables independientes temperatura (T) y presión de descompresión (P), junto además de la construcción de las gráficas de superficie de respuesta.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO_2 como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”



(A)



(B)

Figura 4.1. Diferencias entre el valor medido experimentalmente y predicho por el modelo de superficie de respuesta para: **(A)** Rendimiento de extracción de aceite esencial (Y_{Oil}) y **(B)** actividad antioxidante (Y_{Antiox}).

4.3 Rendimiento de extracción de aceite esencial.

El rendimiento de extracción de aceite esencial se expresó como una ecuación (Ecuación 4.1), en la cual se muestra que variables independientes temperatura (T) y presión de descompresión (P) son más significativas sobre el rendimiento de extracción de aceite esencial.

$$Y_{Oil} = 33,11 - 1,90 \frac{(T - 35)}{10} + 7,54 \frac{(P - 95)}{25} + 1,06 \frac{(T - 35)^2}{10} + 3,43 \frac{(P - 95)^2}{25} - 0,17 \frac{(T - 35)(P - 95)}{10 \cdot 25} \quad (4.1)$$

En la Ecuación 4.1 se observa que para la respuesta rendimiento de extracción de aceite esencial (Y_{Oil}) la variable independiente más significativa es la presión de descompresión (P), al presentar los valores más altos, tanto en su forma lineal (7,54) como en su forma cuadrática (3,43). Ambos valores son de signo positivo lo que nos indica que afectan directamente proporcional a la respuesta, es decir que, a una mayor presión de descompresión mayor es el rendimiento de extracción de aceite esencial. Esto es reafirmado al ver el análisis de varianza para la extracción (Anexo B, Tabla B-1), donde la componente lineal de la presión ($p < 0,001$) y la componente cuadrática de la presión ($p < 0,05$) son significativos.

Para ver más claramente este fenómeno, se construyó una gráfica de superficie de respuesta (Figura 4.2) a partir de la Ecuación 4.1. En ella se observa más detalladamente el efecto de las variables independientes temperatura (T) y presión de descompresión (P) sobre el rendimiento de extracción de aceite esencial.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

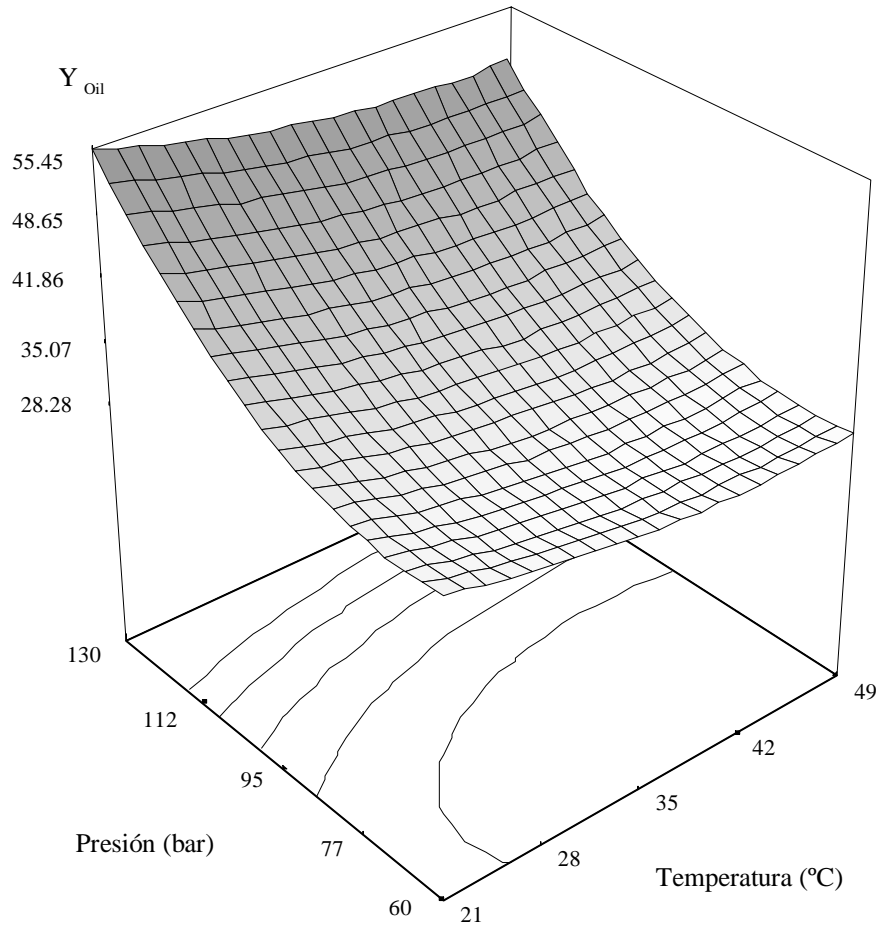


Figura 4.2. Superficie de respuesta de rendimiento de extracción de aceite (Y_{oil}) como una función de la temperatura (T , °C) y presión (P , bar).

En la Figura 4.2 se observa que a temperatura constante, a medida que aumenta la presión, desde los 60 bar a 130 bar, aumenta el rendimiento de extracción. Se ve claramente que la presión de descompresión (P) es la única variable que afecta significativamente el rendimiento de extracción de aceite esencial. De igual forma se menciona que la presión tiene un mayor efecto a menor temperatura (21 °C).

De acuerdo al modelo estadístico y la gráfica de superficie de respuesta se encontró la mejor condición en donde se extrae la mayor cantidad de aceite esencial. Para la variable independiente temperatura de descompresión (T), ésta fue de 21 °C mientras que para la variable independiente presión de descompresión (P) fue de 130 bar. Según el modelo a estas condiciones de

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO_2 como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

descompresión (130 bar y 21 °C) el rendimiento de extracción es de 55,45 g/kg SS, valor superior a lo obtenido experimentalmente, donde el máximo de extracción fue a 130 bar y 35 °C con un rendimiento de 50,42 g/kg SS de aceite esencial.

El efecto de la rápida descompresión con CO₂ en hierbas aromáticas ocurre de la siguiente forma, las membranas de las glándulas tricomas y de los ductos secretores son permeables por lo tanto el dióxido de carbono penetra a través de ellas por alta presión y se disuelve en la fase oleosa. Una vez disuelto el CO₂ aumenta el volumen de la glándula tricoma o del ducto secretor, provocando el estiramiento de la membrana. Luego de un cierto tiempo se produce la rápida descompresión liberando lo más rápido posible el CO₂, esto provoca un diferencial de presión entre las paredes y la membrana de las glándulas con el exterior, lo que provoca el rompimiento de éstas y la liberación del aceite esencial (Stamenic *et al.*, 2010). Entre más grande sea este diferencial de presión mayor será la ruptura celular y mejor será la extracción de aceite esencial ya que aumentará la disponibilidad de éste. Por ello obtenemos mayor rendimiento de extracción de aceite esencial a una alta presión de descompresión (130 bar).

De acuerdo al análisis de varianza, el efecto de la presión de descompresión es la más significativa en el rendimiento de extracción. Esto se debe primero por el efecto significativo que incide la presión en la ruptura de glándulas tricomas, y de igual forma a que la resistencia a la transferencia de masa de aceite esencial en las plantas de la familia Apiaceae y Asteraceae es muy bajo, prácticamente insignificante (Sovova, 2012), por lo tanto no existe gran barrera que impida la solubilidad del dióxido de carbono en los tricomas glandulares o cavidades oleoríferas.

La temperatura también afecta a la volatilidad del soluto. Como se observó en la Figura 4.2 la temperatura no fue significativa, a pesar que el mejor rendimiento de extracción de aceite esencial se encontró a menor temperatura (21 °C). Esto nos indicaría que el aceite esencial de *Leptocarpha rivularis* es soluble a baja temperatura de descompresión. De igual forma Thai Danh *et al.* (2012) encontraron que el aceite esencial de lavanda es fácilmente soluble en dióxido de carbono supercrítico a baja temperatura. Para un soluto no volátil, una temperatura más elevada daría como resultado en una menor recuperación de la extracción, debido a una disminución de la solubilidad (Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007).

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

Al no existir tratamientos previos a *Leptocarpha rivularis* con descompresión rápida con CO₂, se comparó el rendimiento de extracción con el estudio de Gaspar *et al.* (2003) los cuales analizaron la ruptura celular a través de la descompresión en hojas de orégano, la cual pertenece a la familia Lamiaceae. Según los autores se obtiene la mayor solubilidad del CO₂ a 70 bar y 37 °C, y con ello mayor ruptura celular y mejor rendimiento de extracción. De igual forma Sandoval (2008) analizó el rendimiento de extracción utilizando rápida descompresión (70 bar y 40 °C) a hojas de orégano y boldo obteniendo 10,6 g aceite/kg SS y 5,4 g aceite/kg SS. La muestra de *Leptocarpha rivularis* obtuvo un mayor rendimiento de extracción (55,45 g/kg SS) en comparación a las mencionadas anteriormente. Esta gran diferencia se debe principalmente a que la mejor condición de presión de descompresión en este estudio es mucho más alta (130 bar), lo que se traduce en un mayor rompimiento celular y extracción de aceite esencial.

Se realizó la validación del modelo cuadrático, extrayendo aceite esencial a las condiciones ideales predichas por el modelo cuadrático (Anexo D, Tabla D-2). A 130 bar y 21 °C se obtuvo experimentalmente $49,17 \pm 0,68$ g/kg SS, valor muy cercano a lo descrito por el modelo cuadrático que a esas condiciones se debiera extraer 55,45 g/kg SS. Se comparó el rendimiento de extracción con hidrodestilación. Con SC-CO₂ el mayor rendimiento de extracción fue de 49,17g/kg SS mientras que con hidrodestilación lo máximo de aceite esencial que se obtuvo fue de 1,28 g/kg SS. Sin dudas algunas el efecto de la descompresión favorece la extracción de aceite esencial.

4.4 Efecto de la descompresión sobre el rendimiento de extracción.

Para comprobar que la rápida descompresión con CO₂ influye directamente en el rendimiento de extracción de aceite esencial se realizó una extracción supercrítica sin descompresión a presión y temperatura constante, a 100 bar y 40 °C específicamente (Anexo D, Tabla D-1). Se obtuvo sin descompresión un rendimiento de extracción de 17,78 g/kg SS. Este valor es muy inferior a los 55,45 g/kg SS obtenidos a la mejor condición de descompresión (130 bar y 21°C) predicho por el modelo cuadrático. Más del doble en recuperación de aceite esencial se puede obtener utilizando rápida descompresión con CO₂. A pesar que no se usó descompresión igual se obtuvo un alto rendimiento de extracción, esto debido a que el dióxido de carbono alcanzó a solubilizarse

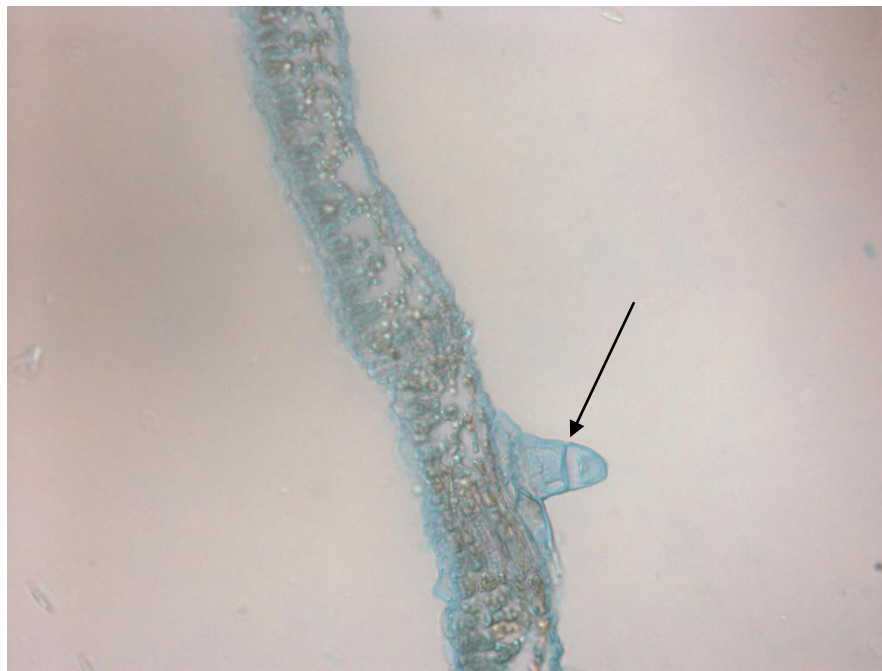
“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

levemente en la matriz, mientras se ambientaba la muestra por 15 min antes de empezar la extracción. El tiempo necesario para una solubilización efectiva es sobre los 20 min (Meyer *et al.*, 2012).

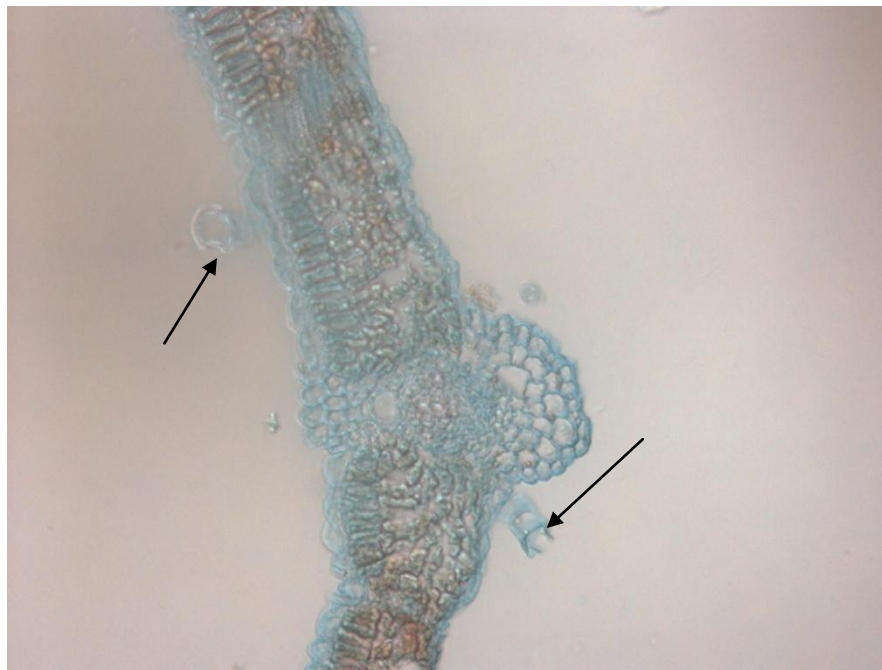
Para observar más detalladamente el efecto de la descompresión sobre la ruptura de glándulas tricomas se tomaron imágenes utilizando la microscopia óptica. En la Figura 4.3. se muestran imágenes tomadas por microscopia óptica, con un zoom óptico de 20x a hojas de *Leptocarpha rivularis* cortadas transversalmente. En la Figura 4.3 (A) se muestra una hoja de *Leptocarpha rivularis* antes de realizar el pretratamiento con rápida descompresión con CO₂. La flecha indica un tricoma glandular del tipo peltado intacto en una de las superficies de la hoja. Estos tipos de tricomas se caracterizan por tener una base ancha, con un tallo corto y varias células secretoras en su punta. Es interesante observar la poca presencia de tricomas glandulares en la superficie de la planta, esto debería ser por que las hierbas de las familias Asteraceae son más ricas en ductos oleoríferos que en tricomas (Sharma y Bhat, 2009). En la Figura 4.3 (B) se muestra una hoja de *Leptocarpha rivularis* después de realizado el pretratamiento con rápida descompresión con CO₂. Se observa dos tricomas glandulares, indicados por las flechas, con sus puntas destruidas. Esto nos indica que la rápida descompresión con CO₂ es un método de pretratamiento efectivo para la ruptura de glándulas tricomas. Gaspar *et al.* (2003) mostraron que por la rápida descompresión hasta en un 86% de los tricomas glandulares puede ser destruido.

Si comparamos ambas fotografías se deduce que el efecto de la presión de descompresión es efectiva, ya que se observa un aumento en el grosor de la hoja. Por lo tanto el dióxido de carbono no tuvo problemas en ingresar a las estructuras herbáceas. En la Figura 4.3 (B) los órganos celulares se rellenaron de dióxido de carbono, razón por la cual se observa una estructura celular que destaca por su expansión por sobre el grosor de la hoja.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”



(A)



(B)

Figura 4.3. (A) Imagen tomada por microscopía óptica (20x) de una hoja de *Leptocarpha rivularis* antes del pretratamiento con rápida descompresión con CO₂. (B) Imagen tomada por microscopía óptica (20x) de una hoja de *Leptocarpha rivularis* después de realizada la rápida descompresión con CO₂. Glándulas tricomas indicadas por flechas.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

4.5 Capacidad Antioxidante.

La capacidad antioxidante de los extractos se expresó como una ecuación (Ecuación 4.2), en la cual se muestra que variables independientes temperatura (T) y presión de descompresión (P) son más significativas sobre la actividad antioxidante.

$$Y_{Antiox} = 1,87 - 0,32 \frac{(T - 35)}{10} - 0,11 \frac{(P - 95)}{25} - 0,034 \frac{(T - 35)^2}{10} - 0,058 \frac{(P - 95)^2}{25} + 0,00511 \frac{(T - 35)(P - 95)}{10 \cdot 25} \quad (4.2)$$

En la Ecuación 4.2 se observa que para la respuesta actividad antioxidante (Y_{Antiox}) la variable independiente más significativa es la temperatura (T) y presión de descompresión (P), en su forma lineal y cuadrática. Los coeficientes son negativos, lo que nos indica que las variables independientes temperatura y presión afectan inversamente proporcional a la respuesta, es decir que, a una mayor temperatura de descompresión se obtendrá una menor actividad antioxidante, y en igual forma a una mayor presión se tendrá menor actividad antioxidante. Ambas variables actúan de manera independiente, puesto que su interacción resultó ser no significativa. Esto es ratificado al ver el análisis de varianza para la extracción (Anexo B, Tabla B-2), donde la componente lineal de la temperatura ($p < 0,001$), la componente lineal de la presión ($p < 0,01$) y la componente cuadrática de la presión ($p < 0,05$) son significativos.

Para ver más claramente este fenómeno, se construyó una gráfica de superficie de respuesta (Figura 4.4) a partir de la Ecuación 4.2. En ella se observa más detalladamente el efecto de las variables independientes temperatura (T) y presión de descompresión (P) sobre la actividad antioxidante.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

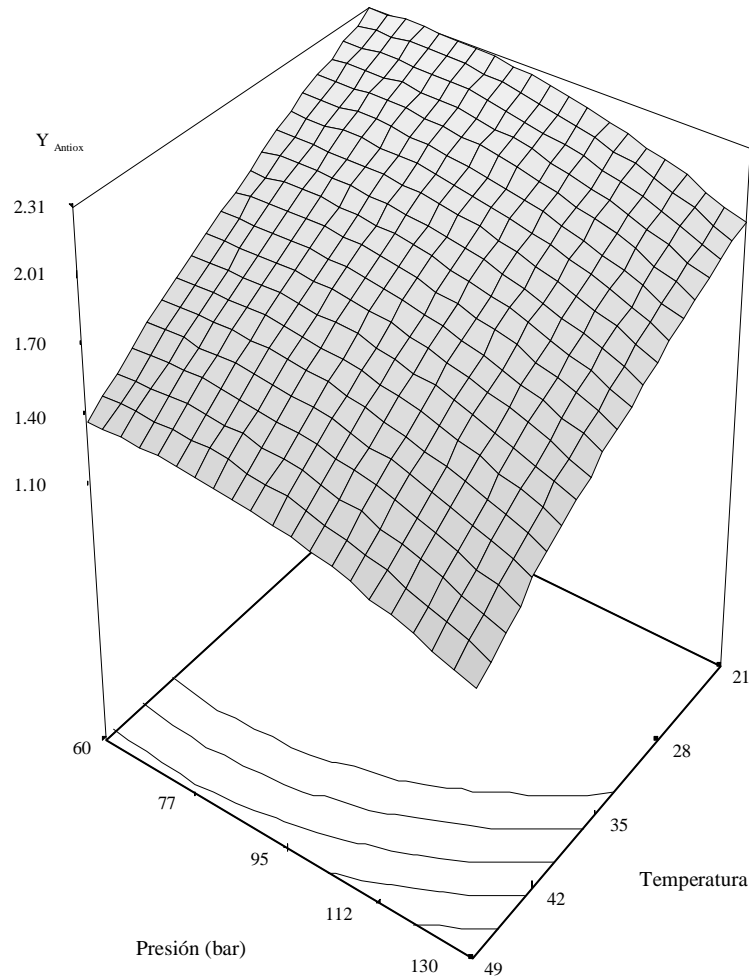


Figura 4.4. Superficie de respuesta de rendimiento de actividad antioxidante (Y_{Antiox}) como una función de la temperatura (T , °C) y presión (P , bar).

En la Figura 4.4 se observa que a medida que aumenta la temperatura se tiene menor actividad antioxidante. De igual forma, se obtiene una mayor actividad antioxidante a una menor presión. Como se mencionó anteriormente existe un efecto significativo de la presión y la temperatura sobre la actividad antioxidante. A una presión de 130 bar y temperatura de 21 °C se obtiene cerca de 2,01 mmol Teac/g aceite, y a 49 °C se obtiene cerca de 1,10 mmol Teac/ g aceite. Mientras que a 21 °C y una presión de 60 bar se obtiene cerca de 2,31 mmol Teac/g aceite, y para 130 bar se obtiene 2,01 mmol Teac/g aceite. Esto nos indica que a pesar que ambas variables son significativas en la actividad antioxidante, el efecto de la temperatura sobre la actividad

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

antioxidante es mucho mayor, puesto que presenta una pendiente mucho más inclinada que la presión y con ello el cambio es más notorio entre distintas temperaturas.

De acuerdo al modelo estadístico y la gráfica de superficie de respuesta se encontró la mejor condición en donde se obtiene la mayor capacidad antioxidante. Para la variable independiente temperatura de descompresión (T), ésta fue de 21 °C mientras que para la variable independiente presión de descompresión (P) fue de 60 bar. Según el modelo a estas condiciones de descompresión (60 bar y 21 °C) la actividad antioxidante es de 2,31 mmol Teac/g aceite.

Como se observó en el rendimiento de extracción, a mayores presiones de descompresión mayor es la ruptura celular y con ello mayor rendimiento de extracción de aceite esencial. El efecto negativo que adquiere la presión de descompresión en la actividad antioxidante, se debe a que a mayores presiones de descompresión aumenta la ruptura celular y con ello la liberación de más compuestos desde la glándula tricoma, la cual contiene diferentes compuestos químicos, entre ellos terpenos, presentes en aceites esenciales y resinas, carbohidratos u otras sustancias (Delbon *et al.*, 2012). Estos compuestos no presentan actividad antioxidante por lo tanto al extraer estos compuestos, disminuyen la actividad antioxidante del aceite esencial, al interferir en las mediciones.

Es sabido que la alta temperatura tiene un efecto perjudicial sobre la calidad del extracto debido a las posibles reacciones de degradación térmica. Es por ello que es mejor extraer aceite esencial mediante SC-CO₂ que con hidrodestilación, ya que con SC-CO₂ la extracción de compuestos volátiles se torna más eficiente a baja temperatura (Ghasemi *et al.*, 2007). A presión constante, a medida que aumenta la temperatura de descompresión disminuye la solubilidad y con ello el poder disolvente del dióxido de carbono (Thai Danh *et al.*, 2009). Por esta razón la mejor actividad antioxidante se observó a baja temperatura de descompresión, donde el dióxido de carbono solubilizó de mejor manera los compuestos antioxidantes del aceite esencial.

Para hierbas de la familia Asteraceae se ha encontrado que para la *Artemisia herba halba* presentó una actividad antioxidante de 11,60 mmol Teac/g aceite, *Juniperus oxycedrus* 10,70 mmol Teac/g aceite y *Ruta montana* 9,41 mmol Teac/g aceite (Djeridane *et al.*, 2006). Estos valores son superiores a lo obtenido en la *Leptocarpha rivularis* con un 2,31 mmol Teac/g aceite.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

4.6 Comparación de la capacidad antioxidante de los extractos extraídos por fluidos supercríticos e hidrodestilación.

Se analizó la capacidad antioxidante de los extractos de *Leptocarpha rivularis* obtenidos por hidrodestilación y los extractos obtenidos por extracción supercrítica. Estos últimos extractos se analizaron a la mejor condición de descompresión de extracción que fue a 130 bar y 21 °C. Los resultados de la capacidad antioxidante obtenidos por 2 metodologías (DPPH y β-Caroteno) y el contenido de fenoles totales se muestran en la Tabla 4.4

Tabla 4.4. Comparación de la capacidad antioxidante entre extracción supercrítica en la condición ideal (130 bar, 21° C) e hidrodestilación (100° C).

Metodología	Extracción Supercrítica	Hidrodestilación.
DPPH (mmol Teac/g aceite)	1,85 ± 0,03	0,46 ± 0,01
β-Caroteno (IC ₅₀)	8,70 mg/mL	10,10 mg/mL
Fenoles totales (mg GAE/g muestra)	11,16 ± 0,88	19,59 ± 1,48

Se obtuvo que en la extracción supercrítica fue mayor la capacidad antioxidante de los extractos que los mismos extraídos por hidrodestilación. En la metodología de trolox equivalente o DPPH se obtuvo 1,85 ± 0,03 mmol Teac/g aceite, mientras que para hidrodestilación se obtuvo 0,46 ± 0,01 mmol Teac/g aceite. Más del triple de capacidad antioxidante se obtiene mediante extracción supercrítica. Se realizó un análisis estadístico t-student (Anexo E, Tabla E-1). Se encontró que el valor de t-student experimental (76,13) es muy superior al valor teórico (2,13), por lo tanto nos indica que existe una diferencia significativa entre las dos metodologías. Esta gran diferencia es causada principalmente porque en la hidrodestilación se ocupa calor, y esto afecta la termolabilidad de los compuestos antioxidantes presentes en el aceite esencial. Al contrario, la temperatura de descompresión (21 °C) y la temperatura de extracción supercrítica (40 °C) fueron bajas, por lo tanto no hubo daño térmico junto a demás que a bajas temperaturas la densidad del fluido se ve aumentada y en consecuencia su solubilidad también, extrayendo mayor cantidad de compuestos antioxidantes (Thai Danh *et al.*, 2009). Igualmente Krishnaianh *et al.* (2011) encontraron que en extractos por hidrodestilación de *Uncaria tormentosa* la capacidad

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

antioxidante fue de 0,34 mmol Teac/g aceite, valor cercano a lo obtenido en la *Leptocarpha rivularis*.

La metodología de blanqueamiento de β -caroteno emplea un emulsificador lipídico, por lo tanto este método es especial para investigaciones de antioxidantes lipofílicos (Kulisic *et al.*, 2004), como los aceites esenciales de *Leptocarpha rivularis*. Los resultados para la determinación de la capacidad antioxidante utilizando la metodología de blanqueamiento de β -caroteno se expresan en base al porcentaje de inhibición IC_{50} . Este valor nos indica la concentración necesaria (g/L o mg/mL) para inhibir el 50% de β -caroteno y así evitar su oxidación. En la extracción supercrítica se necesitan 8,70 mg/mL de concentración para inhibir el 50% de β -caroteno mientras que en la extracción con hidrodestilación se necesita de 10,10 mg/mL. Sin dudas la extracción supercrítica mantiene los compuestos antioxidantes más intactos que por la extracción con hidrodestilación, de ahí que su capacidad antioxidante sea más alta. Además los antioxidantes polares extraídos por hidrodestilación quedan en la fase acuosa de la emulsión, y por lo tanto son menos eficaces en la protección del ácido linoleico (Kulisic *et al.*, 2004).

Se comparó la capacidad antioxidante por la metodología de blanqueamiento de β -caroteno con la capacidad de un antioxidante sintético, como el BHT. Este presenta un IC_{50} de 3,8 mg/mL. Es sumamente mejor la capacidad antioxidante de un antioxidante sintético que uno natural. Kulisic *et al.* (2004) encontraron igualmente que el BHT fue mucho mejor que un antioxidante natural, éste presentó un IC_{50} de < 0,1 mg/mL mientras que el aceite esencial de orégano presentó un IC_{50} de 0,5 mg/mL.

En hierba de la misma familia Asteraceae, se ha encontrado que la *Bidens pilosa* presentó un IC_{50} de 61 mg/mL (Krishnaianh *et al.*, 2011). La capacidad antioxidante de la *Leptocarpha rivularis* es menor a hierbas de otras familias, pero es similar a hierbas de la misma familia Asteraceae.

Para el rendimiento de extracción de polifenoles se observa que se extrae mayor cantidad de polifenoles mediante la hidrodestilación en vez de la extracción con SC-CO₂. En la hidrodestilación se extrae 19,59 mg GAE/g muestra, mientras que para extracción supercrítica se extrae 11,16 mg GAE/g muestra. Se realizó un análisis estadístico de t-student para establecer si existen diferencias en ambas metodologías (Anexo E, Tabla E-2). El valor t experimental fue de 8,48, este valor es superior al t teórico el cual es de 2,13. Esto nos indica que si existe diferencia

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

entre las dos metodologías. La razón de esta diferencia es que en la hidrodestilación se ocupa agua, y los compuestos fenólicos son solubles en ella (Hinneburg *et al.*, 2006). De igual forma en los fluidos supercríticos la presión de descompresión tuvo un efecto significativo en la selectividad de la extracción, sobre los 100 bar se solubilizan tanto compuestos fenólicos como no fenólicos, los cuales disminuyen e interfieren en la medición del contenido de polifenoles totales (Herrero *et al.*, 2010). Por lo tanto se puede decir que la hidrodestilación es más selectiva a la hora de extraer compuestos fenólicos que la extracción con fluidos supercríticos.

Los rendimientos de extracción de polifenoles por hidrodestilación de la *Leptocarpha rivularis* son cercanos a encontrados en otras hierbas de la misma familia Asteraceae. Es así como a la *Achillea campestris*, se encontró un contenido de polifenoles de 53,84 mg GAE/g muestra (Boulanouar *et al.*, 2013) y *Matricaria chamomilla* 3,7 mg GAE/g muestra (Roby *et al.*, 2013).

Si comparamos los rendimientos de extracción de polifenoles por hidrodestilación con otras hierbas de otras familias, utilizando la misma metodología, nos encontramos con que la *Leptocarpha rivularis*, y en general la familia Asteraceae, presentan muy pocos polifenoles. Se ha encontrado que la Albahaca (*Ocimum basilicum*) presenta 147 mg GAE/g muestra y el Laurel (*Laurum nobilis*) presenta 92 mg CAE/g muestra (Hinneburg *et al.*, 2006). De igual forma Viuda-Martos *et al.* (2011) analizó la concentración de polifenoles de aceites esenciales de otras especies encontrando que para la *Thymus vulgaris* se encontró una concentración de 913,17 mg GAE/g muestra, *Nigella sativa* 726,67 mg GAE/g muestra, *Lavandula officinalis* 140,33 mg GAE/g muestra, *Petroselinum crispum* 370,32 mg GAE/g muestra, *Foeniculum vulgare* 146,51 mg GAE/g muestra.

Como es sabido los compuestos fenólicos presentes en plantas constituyen una clase especial de sustancia bioactiva, ya que presentan capacidad antioxidante (Fornari *et al.*, 2012). Debido a que los antioxidantes actúan por la donación de átomos de hidrogeno a los radicales lipídicos y los radicales obtenidos a partir de fenoles son especies estables que detienen la cadena de oxidación (Bondet *et al.*, 1997). Pero a pesar que se ha señalado que los polifenoles presentan principios activos que pueden actuar como antioxidante (Amadio *et al.*, 2011), se ha encontrado que no existe ninguna relación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad de neutralizar el “Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

DPPH (Hinneburg, 2006). Por ello no se puede relacionar el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante, ya que esta última depende de la concentración de los distintos componentes presentes en el extracto.

Hay un indicio de que las hierbas de la familia Asteraceae exhiben capacidades antioxidantes débiles. Los principales compuestos que dan propiedades antioxidantes a los aceites esenciales son del tipo fenólico. Niemeyer (2009) estudió la composición química de distintas hierbas de la familia Asteraceae utilizando cromatografía de gases, encontrando escasa presencia de compuestos fenólicos en la mayoría de las hierbas. En *Leptocarpha rivularis* encontró solo monoterpenos y sesquiterpenos, compuestos característicos de un aceite esencial.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.

- La rápida descompresión con CO₂, es un pretratamiento eficaz para la ruptura de tricomas glandulares. Mediante la utilización de microscopía óptica se pudo apreciar la ruptura de tricomas después de realizado la rápida descompresión. Esta ruptura aumentó el rendimiento de extracción de aceite esencial. Sin rápida descompresión se obtuvo un rendimiento de 17,78 g/kg SS, mientras que con rápida descompresión se obtuvo un rendimiento de 49,17 g/kg SS.
- Las mejores condiciones de presión y temperatura de descompresión donde se obtuvo la mayor extracción de aceite esencial fue a 130 bar y 21 °C. A estas condiciones se obtuvo 49,17 ± 0,68 g/kg SS de aceite esencial. El rendimiento de extracción se vio afectado solo por la variable presión de descompresión (P), donde a mayor presión de descompresión mayor es el rendimiento de extracción de aceite esencial.
- La mejor condición de presión y temperatura de descompresión donde se obtuvo la mayor capacidad antioxidante fue a 60 bar y 21 °C. A estas condiciones se obtuvo 1,85 ± 0,03 mmol Teac/g aceite. La capacidad antioxidante se vio afectada tanto por la variable independiente presión de descompresión (P) como la temperatura de descompresión (T), donde a una mayor temperatura de descompresión había menor actividad antioxidante, y en igual forma a una mayor presión se tendrá menor actividad antioxidante.
- En términos generales la *Leptocarpha rivularis* presenta una mayor cantidad de aceite esencial que otras hierbas como el orégano o el laurel, pero este con una menor capacidad antioxidante, causado por la poca presencia de compuestos fenólicos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Amadio, C., Medina, R., Dediol, C., Zimmermann, M., Miralles, S. (2011). “Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario”. *Revista Facultad de Ciencias Agrarias*. Tomo 43. **1**: 237-245.
2. AOAC (1990). “Official Methods of Analysis of the Association of Official analytical Chemists”. 15 th. edition. Washington DC, Estados Unidos.
3. Belov, M., (2009). “*Leptocarpha rivularis*”. Visitada en 13 de Abril de 2013. <http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/LowResPages/SH0107.htm>.
4. Bocevaska, M., Sovova, H. (2007). “Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow”. *Journal of Supercritical Fluids*, **40**: 360–367.
5. Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. (1997). “Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method”. *LWT- Food Science and Technology*, **30**: 609–615.
6. Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., Graça Miguel, M. (2013). “Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils”. *Industrial Crops and Products*, **46**: 85-96.
7. Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). “Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity”. *LWT- Food Science and Technology*, **28**: 25-30.
8. Cai Lee, W., Mahmud, R., Pillai, S., Perumal, S., Ismail, S. (2012). “Antioxidant Activities of Essential Oil of *Psidium guajava* L. Leaves”. *APCBEE Procedia*, **2**: 86 – 91.
9. del Valle, J.M., Aguilera, J.M. (1999). “Review: high pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry”. *Food Science and Technology*, **5**: 1-24.
10. del Valle, J.M., Godoy, C., Asencio, M., Aguilera, J.M. (2004). “Recovery of antioxidants from boldo (*Peumus boldus* M.) by conventional and supercritical CO₂ extraction”. *Food Research International*, **37**: 695–702.
11. Delbon, N., Cosa, M., Bernardello, G. (2012). “Exomorfología y anatomía de órganos vegetativos aéreos en especies de *Flourensia* DC. (Asteraceae) con importancia fitoquímica”. *Acta Botanica Brasilica*, **26**: 2-10.

12. 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.
13. Donelian, A., Carlson, L., Lopes, T., Machado, R. (2009). “Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation”. *Journal of Supercritical Fluids*, **48**: 15–20.
14. Doroso, C., Ramírez, C. (1994). “Arbustos nativos de Chile”. Guía de reconocimiento, Marisa Cureo Ediciones, 2ª Ed. Valdivia-Chile.
15. Esquivel, A., Vargas, P. (2007). “Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales”. *Tecnología en Marcha*, **20**: 41-50.
16. Fornari, T., Vicente, G., Vasquez, E., Garcia-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.
17. Gaspar, F., Leeke, G.A., Al-Duri, B., Santos, R. (2003) “Modelling the disruption of essential oils glandular trichomes with compressed CO₂”. *The Journal of Supercritical Fluids*, **25**: 233-245.
18. Ghasemi, E., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F. (2007). “Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Artemisia sieberi*”. *Journal of Food Engineering*, **79**: 306–311.
19. Herrero, M., Mendiola, J., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2010). “Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications”. *Journal of Chromatography A*, **1217**: 2495-2511.
20. Hinneburg, I., Dorman, H., Hiltunen, R. (2006). “Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices”. *Food Chemistry*, **97**: 122–129.
21. Hoffmann, A. (2005). “Flora silvestre de Chile, Zona Araucanía”. Ediciones Fundación Claudio Gay. Quinta edición. Chile.
22. Hossain, M., Shah, M. (2011). “A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*”. *Arabian Journal of Chemistry*, Available online.

23. Huerta, M. (2005). “Evaluación microestructural de sustratos herbáceos en procesos de molienda controlada previo a la extracción de aceites esenciales”. Trabajo de tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.
24. Hulley, I., Viljoen, A., Tilney, P., Van Vuuren, S., Kamatou, G., Van Wyk, B. (2010). “The ethnobotany, leaf anatomy, essential oil variation and biological activity of *Pteronia incana* (Asteraceae)”. *South African Journal of Botany*, **76**: 668–675.
25. Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., Bahramifar, N. (2004). “Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods”. *Food Chemistry*, **86**: 587–591.
26. Khajeh, M., Yamini, Y., Shariatic, S. (2010). “Comparison of essential oils compositions of *Nepeta persica* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation methods”. *Food and Bioproducts Processing*, **88**: 227–232.
27. Koski, A., Psomiadou, E., Tsimidou, M., Hopia, A., Kefalas, P., Wähälä, 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.
28. Krak, K., Mráz, P. (2008). “Trichomes in the tribe *Lactuceae* (Asteraceae) – taxonomic implications”. *Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences*, **63**: 616 – 630.
29. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2011). “A review of the antioxidant potential of medicinal plant species”. *Food and bioproducts processing*, **89**: 217-233.
30. Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. (2004). “Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil”. *Food Chemistry*, **85**: 633- 640.
31. Lawrence, R., Lawrence, K. (2011). “Antioxidant activity of garlic essential oils (*Allium Sativum*) grown in north indian plains”. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **S51**: 1-3. India.
32. López, M. (2004). “Los aceites esenciales: aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias”. *Ambito Farmaceutico, Fitoterapia*, **23**: 88-91.
33. Maffei, M. E. (2010). “Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volátiles”. *South African Journal of Botany*, **76**: 612–631.
34. Martínez, A. (2001). “Aceites esenciales”. Facultad Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

35. Martínez, R., Kesternich, V., Carrasco, H., Álvarez, C., Montenegro, C., Ugarte, R., Gutiérrez, E., Moreno, J., García, C., Werner, E., Cárcamos, J. (2006). “Synthesis and conformational analysis of leptocarpin derivatives. Influence of modification of the oxirane ring on leptocarpin's cytotoxic activity”. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **51**: 1010-1014.
36. 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.
37. Mendiola, J.A., Jaime, L., Santoyo, 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.
38. Meyer, F., Jaeger, P., Eggers, R., Stamenic, M., Milovanovic, S., Zizovic, I. (2012). “Effect of CO₂ pre-treatment on SC-CO₂ extraction of natural material”. *Chemical Engineering and Processing*, **56**: 37-45.
39. Niemeyer, H. (2009). “Composition of essential oils from five aromatic species of Asteraceae”. *Journal of Essential Oil Research*, **4**: 350-353.
40. Pérez M. (2005). “*Salvia lavandulaefolia* vahl 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.
41. Pourmortazavi, S., Hajimirsadeghi, S. (2007). “Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis”. *Journal of Chromatography A*, **1163**: 2–24.
42. Radulovic, N., Dekic, M., Randelovic, P., Stojanovic, N., Zarubica, A., Stojanovi-Radic, Z. (2012). “Toxic essential oils: Anxiolytic, antinociceptive and antimicrobial properties of the yarrow *Achillea umbellata* Sibth. et Sm. (Asteraceae) volátiles”. *Food and Chemical Toxicology*, **50**: 2016–2026.
43. Roby, M., Sarhan, M., Selim, K., Khalel, K. (2013). “Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.)”. *Industrial Crops and Products*, **44**: 437- 445.
44. Sahena, F., Zaidul, I., Jinap, S., Karim, A., Abbas, K., Norulaini, N., Omar, A. (2009). “Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review”. *Journal of Food Engineering*, **95**: 240–253.

45. Salazar, A., Mayanquer, S. (2009). “Obtención de aceites esenciales de cedrón (*aloesia triphylla*), sunfo (*clinopodium nubigenum (kunth) kuntze*) y hierba luisa (*cymbopogon citratus*), en un alambique tipo cachimbo por cohobación”. Tesis previa a la obtención del título de ingeniero agroindustrial. Universidad Técnica del Norte. Ecuador.
46. 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 de tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.
47. Sharma, O., Bhat, T. (2009). “DPPH antioxidant assay revisited”. *Food Chemistry*, **113**: 1202–1205.
48. Singh, H., Mittal, S., Kaur, S., Batish, D., Kohli, R. (2009). “Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*”. *Food Chemistry*, **114**: 642–645.
49. Sovova, H. (2012). “Modeling the supercritical fluid extraction of essential oils from plant materials”. *Journal of Chromatography A*, **1250**: 27–33.
50. Stamenic, M., Zizovic, I., Eggers, R., Jaeger, P., Heinrich, H., Roj, E., Ivanovica, J., Skala, D. (2010). “Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide”. *Journal of Supercritical Fluids*, **52**: 125-133.
51. Stamenic, M., Zizovic, I., Orlovic, A., Skala, D. (2008). “Mathematical modelling of essential oil SFE on the micro-scale—Classification of plant material”. *Journal of Supercritical Fluids*, **46**: 285-292.
52. Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schinger, A. (1994). “Tratado de botánica”. Ediciones Omega. Octava edición. España.
53. Thai Danh, L., Anh Triet, N., Ngoc Hana, 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.
54. Thai Danh, L., Mammucari, R., Truong, P., Foster, N. (2009). “Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil”. *Chemical Engineering Journal*, **155**: 617-626.
55. Velasco, R., Villada, H. (2006). “Modelado de los fluidos supercríticos”. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Vol. 4. N°1. Colombia.

-
56. Velasco, R., Villada, H., Carrera, J. (2007). “Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria”. *Información Tecnológica*, **18**: 53-65.
57. Viuda-Martos, M., Mohamady, M., Fernandez-Lopez, J., Elrazik, K., Omer, E., Perez-Álvarez, J., Sendra, E. (2011). “In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants”. *Food Control*, **22**: 1715-1722.
58. Yang, J., Guo, J., Yuan, J. (2008). “In vitro antioxidant properties of rutin”. *LWT - Food Science and Technology*, **41**: 1060–1066.
59. Zizovic, I., Stamenic, 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.

Tabla A-1. Determinación de la humedad inicial a la muestra de *Leptocarpha rivularis*.

Peso placa (g)	Muestra (g)	Muestra + placa (g)	Muestra seca (g)	Humedad (% b.h.)
28,0491	1,0043	28,9608	0,9117	9,22
27,7964	1,0001	28,7031	0,9067	9,34
28,0597	1,0020	28,9698	0,9101	9,17
Promedio				9,2 ± 0,1

Tabla A-2. Determinación del tamaño de partícula a la muestra inicial de *Leptocarpha rivularis*.

Tamiz (Nº)	Abertura (mm)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Retenido (g)
Fondo	0,0	489,1	495,8	6,7
25	0,7	615,6	616,1	0,5
20	0,9	596,2	600,0	3,8
18	1,0	440,2	446,0	5,8
14	1,4	435,7	442,3	6,6
8	2,4	491,8	494,6	2,8
6	3,4	509,3	511,9	2,6
Total				28,8

Tabla A-3. Determinación de la cantidad de aceite esencial de la muestra de *Leptocarpha rivularis* mediante hidrodestilación.

Extracción	Peso matraz de 5 mL (g)	Peso matraz + muestra (g)	Extracto (g)	Rendimiento (g/kg SS)
1	7,9067	7,9310	0,0243	1,33
2	7,5900	7,6124	0,0224	1,23
Rendimiento total				1,28 ± 0,07

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

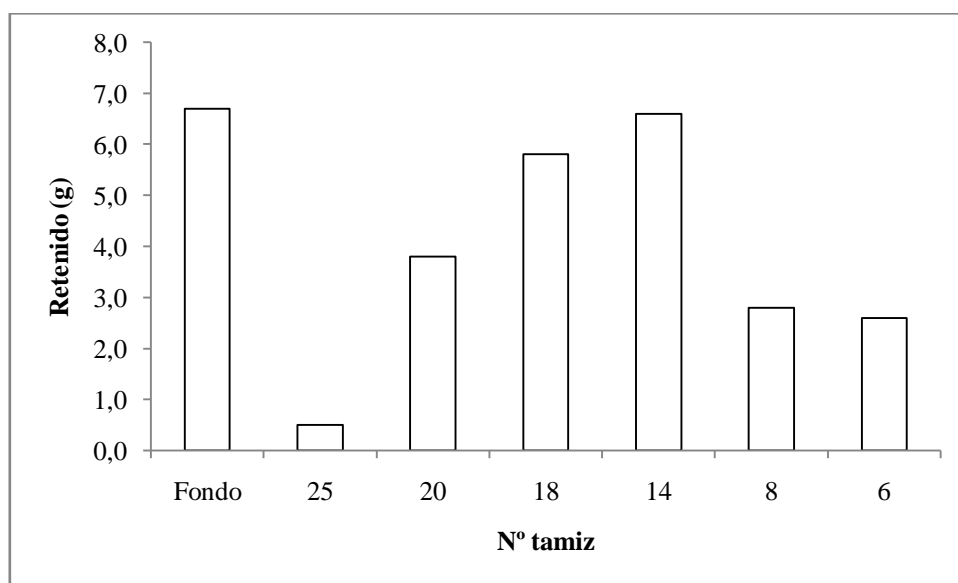


Figura A-1. Distribución del tamaño partícula obtenido del tamizado de la muestra de *Leptocarpha rivularis*.

ANEXO B. Análisis estadísticos.

Tabla B-1. Análisis de varianza para el rendimiento de extracción de aceite.

Factor	Suma de Cuadrados	Grados libertad	Varianza	Valor F_{exp}	Prob > F
X_1	28,85	1	28,85	4,62	0,0842
X_2	454,47	1	454,47	72,84	0,0004
X_1^2	6,33	1	6,33	1,01	0,3600
X_2^2	66,45	1	66,45	10,65	0,0224
X_1X_2	0,11	1	0,11	0,018	0,8973

Donde: $X_1 = (T-35)/10$; $X_2 = (P-95)/25$;

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO_2 como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

Tabla B-2. Análisis de varianza para la actividad antioxidante.

Factor	Suma de Cuadrados	Grados libertad	Varianza	Valor F_{exp}	Prob > F
X_1	0,83	1	0,83	334,85	<0,0001
X_2	0,092	1	0,092	37,18	0,0017
X_1^2	$5,56 \times 10^{-3}$	1	$5,56 \times 10^{-3}$	2,66	0,1639
X_2^2	0,019	1	0,019	7,66	0,0395
$X_1 X_2$	$1,046 \times 10^{-4}$	1	$1,046 \times 10^{-4}$	0,042	0,8450

Donde: $X_1 = (T-35)/10$; $X_2 = (P-95)/25$;

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO_2 como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

ANEXO C. Curvas de calibración.

Tabla C-1. Datos curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante utilizando la metodología de Trolox equivalente en aceite esencial de *Leptocarpha rivularis*.

Tubo	Etanol (ml)	Trolox (μl)	DPPH (μl)	Absorbancia	Abs 0 - Abs	Trolox (μg)	Trolox (mmol/L)
1	3,2	0	800	1,129	0,000	0	0,000
2	3,18	20	800	0,921	0,208	5	0,005
3	3,16	40	800	0,695	0,434	10	0,010
4	3,14	60	800	0,505	0,624	15	0,015
5	3,12	80	800	0,345	0,784	20	0,020
6	3,1	100	800	0,191	0,938	25	0,025

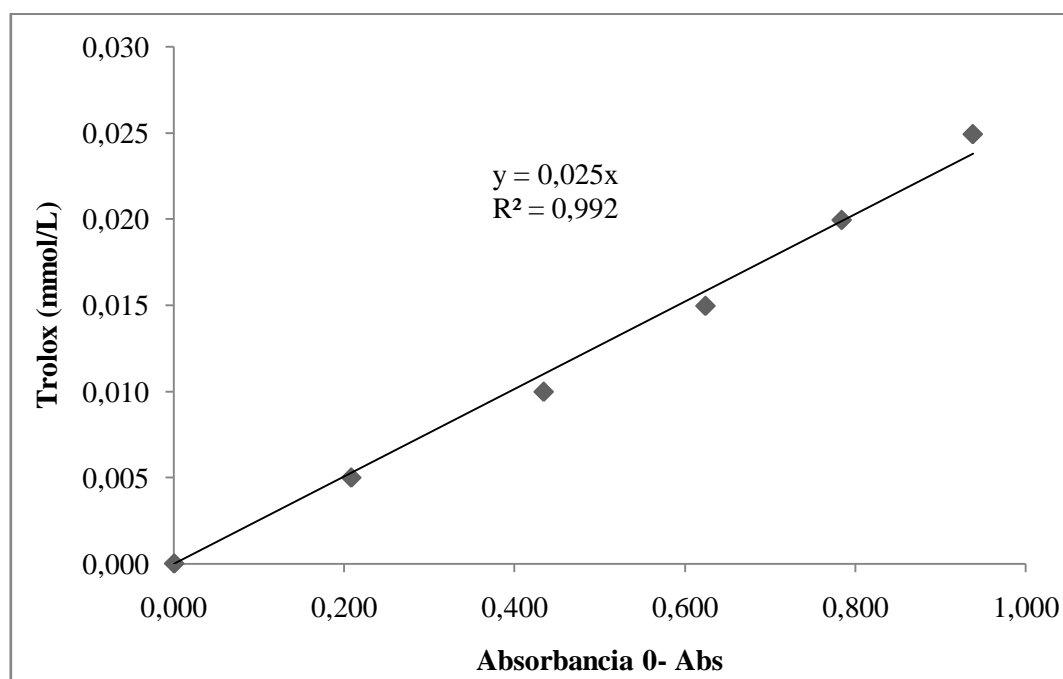


Figura C-1. Curva de calibración para trolox equivalente.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

Tabla C-2. Datos curva de calibración para la determinación de polifenoles totales en muestra de aceite esencial de *Leptocarpha rivularis*.

GAE (mL)	H ₂ O (mL)	Folin (mL)	Na ₂ CO ₃ (mL)	Absorbancia	GAE (mg)
0,0	8,5	0,5	1	0,000	0
0,05	8,5	0,5	1	0,240	0,025
0,1	8,4	0,5	1	0,447	0,050
0,2	8,3	0,5	1	0,593	0,100
0,3	8,2	0,5	1	0,611	0,150

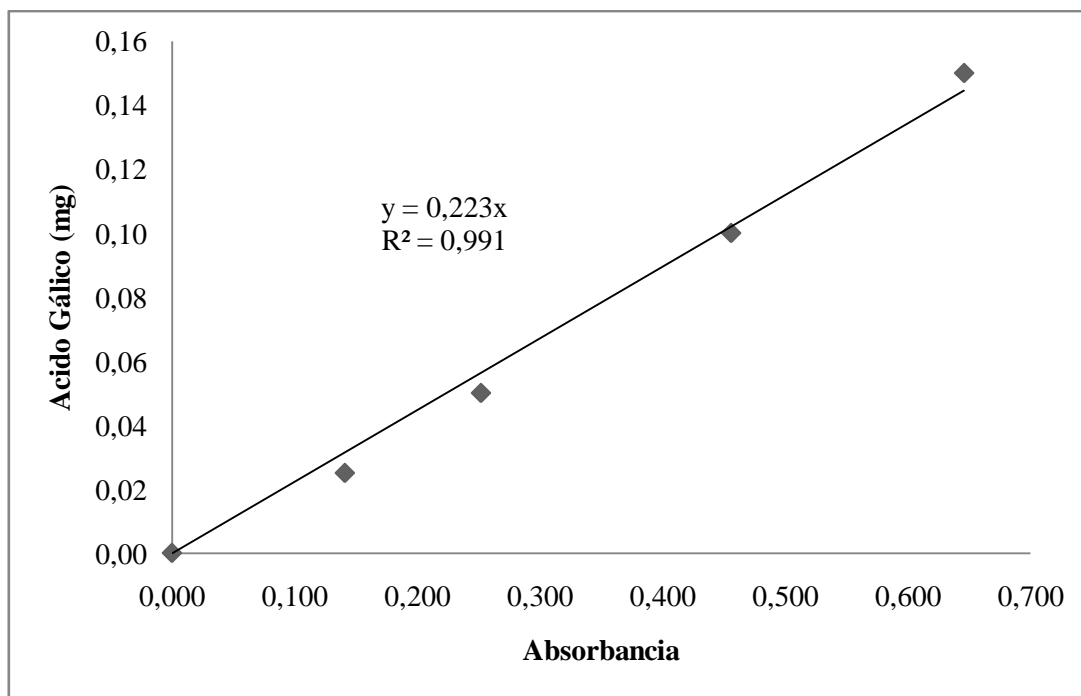


Figura C-2. Curva de calibración para polifenoles totales.

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

ANEXO D. Extracción de aceite esencial.

Tabla D-1. Rendimiento de extracción para dos muestras sin rápida descompresión con CO₂.

Nº Replica	Peso Inicial (g)	Inicial Base seca (g)	Agotado (g)	Humedad (b.h)	Agotado Base seca (g)	Rendimiento de extraccion (g/kg SS)
1	5,0081	4,5474	4,7657	0,0625	4,4681	17,44
2	5,0006	4,5405	4,7429	0,0600	4,4582	18,13
Rendimiento total						17,78 ± 0,49

Tabla D-2. Rendimiento de extracción para la validacion, a las mejores condiciones predichas por el modelo cuadratico (130 bar y 21 °C).

Nº Replica	Peso Inicial (g)	Inicial Base seca (g)	Agotado (g)	Humedad (b.h)	Agotado Base seca (g)	Rendimiento de extraccion (g/kg SS)
1	10,0302	9,1074	9,5505	0,0936	8,6561	49,5526
2	10,0158	9,0943	9,5411	0,0935	8,6490	48,9714
3	10,0072	9,0865	9,5485	0,0958	8,6335	49,8551
4	10,0189	9,0972	9,5683	0,0952	8,6576	48,3160
Rendimiento total						49,17 ± 0,68

ANEXO E. Cálculo de t-student.

$$t_{\text{Teórico}}(gl:4;\alpha:0,05) = 2,132$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{(n-1)s_1^2 + (m-1)s_2^2}{n+m-2} \times \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m}\right)}}$$

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”

Tabla E-1. Datos para el cálculo del valor t experimental para la metodología trolox equivalente.

Factor estadístico	Valor
\bar{x}	1,85
\bar{y}	0,46
s_1	0,03
s_2	0,01
n	3
m	3

$$t_{\text{exp}} = \frac{1,85 - 0,46}{\sqrt{\frac{(3-1)0,03^2 + (3-1)0,01^2}{3+3-2}}} \times \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}} = 76,13$$

Tabla E-2. Datos para el cálculo del valor t experimental para la determinación de polifenoles totales.

Factor estadístico	Valor
\bar{x}	11,16
\bar{y}	19,59
s_1	0,88
s_2	1,48
n	3
m	3

$$t_{\text{exp}} = -\frac{11,16 - 19,59}{\sqrt{\frac{(3-1)0,88^2 + (3-1)1,48^2}{3+3-2}}} \times \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}} = 8,48$$

“Pretratamiento de hojas de *Leptocarpha rivularis* por rápida descompresión con CO₂ como acondicionamiento para la extracción supercrítica de aceites esenciales”