

**Estudio de la obtención de extractos de los residuos de destilación
de especies vegetales, usando un sistema bifásico compuesto
por CO₂ supercrítico-etanol-agua**

María Fernanda Estupiñán García

Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Químico

Director

Jairo René Martínez Morales

Químico, PhD.

Codirector

Ánderson Julián Arias Velandia

Ingeniero Químico, PhD.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

A mi familia, por ser mi apoyo incondicional en todo lo que hago y ser mi mayor alegría.

A mis padres Carlos y Nhora, por estar para mí en todo momento y su amor infinito.

A mi hermana Kathe, por creer en mí e impulsarme a ser mejor.

A Dios, por permitirme recorrer este camino y encontrar a personas maravillosas en él.

A mis amigos por acompañarme y ser parte de mi crecimiento.

María Fernanda Estupiñán García

Agradecimientos

A los profesores Jairo Martínez, Elena Stashenko y Julián Arias por abrirme las puertas del centro de investigación CENIVAM. Por ser mis maestros en la investigación y guías en el desarrollo de este proyecto.

A todos mis compañeros del centro de investigación, por sus enseñanzas y ayuda.

A mis maestros, por transmitirnos con pasión su conocimiento y cultivar en mí el amor a mi profesión.

A todos mis amigos de pregrado, por ser el mejor equipo en este proceso académico.

Al capítulo estudiantil AIChE UIS, por hacer parte de todo mi proceso universitario y formación integral.

Agradecimientos a Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica.

Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

Al Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación – FCT.

EI del Sistema General de Regalías – SGR, Proyecto BPIN-2018000100044

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. ESTADO DEL ARTE	15
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivos generales	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	20
3.1. Estudio de la obtención de extracto y fenoles totales.....	20
3.1.1. Extracción con fluido supercrítico	21
3.1.2. Metodología de cuantificación de fenoles totales.....	25
4.1.2.1. Método de Folin-Ciocalteu	25
4.1.2.2. Espectroscopia UV-VIS	26
3.2. Modelamiento de la cinética de extracción.....	27
4. RESULTADOS	30
4.1. Estudio de la obtención de extracto y fenoles totales.....	30
4.1.1. Extracción con fluido supercrítico	30
4.1.2. Metodología de cuantificación de fenoles totales.....	32
4.2. Modelamiento de la cinética de extracción.....	38
4.3. Evaluación del rendimiento del proceso	40

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES EN ESTADO SUPERCRÍTICO	5
5. CONCLUSIONES	44
6. RECOMENDACIONES.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	46
APÉNDICES.....	53

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Rendimiento de extracción supercrítica a los 120 minutos llevada a cabo a 50 °C 30 MPA, parámetros de ajuste del modelo empírico $Y = Y\omega (1 - e - kt)$ y criterios de bondad de ajuste suma de cuadrados de los errores (<i>SCE</i>) y coeficiente de determinación (R^2).	32
Tabla 2. Contenido de fenoles totales para las seis especies estudiadas obtenido por medio del método de cuantificación de fenoles totales <i>Folin-Ciocalteu</i>	34
Tabla 3. Comportamiento de la extracción supercrítica de <i>Calea peruviana</i> a 50 °C y 30 MPa .	36
Tabla 4. Parámetros ajustados del modelo teórico de transferencia de masa	39
Tabla 5. Contenido de fenoles totales para especies vegetales declaradas como potenciales fuentes de fenoles para diferentes técnicas extractivas	43

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fases del desarrollo metodológico	20
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de extracción supercrítica de especies vegetales. Donde (1) cilindro de CO ₂ , (2) enfriador, (3) Bomba de CO ₂ , (4) tanque de alimentación de cosolvente, (5) bomba de cosolvente, (6) mezclador, (7) calentador, (8) tanque de extracción, (9) ABPR controlador automático de presión, (10) tanque de separación, (11) válvula de control manual de presión.	23
Figura 3. Rendimiento experimental del proceso de extracción supercrítico a 50 °C y 30 MPa y ajuste a modelo empírico $Y = Y_{\infty} (1 - e^{-kt})$. (A) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$. (B) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$. (C) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$. (D) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$. (E) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$. (F) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$	23
Figura 4. Curva de calibración de patrón de ácido gálico medida a 750 nm por medio del método de cuantificación de fenoles totales Folin-Ciocalteu.	33
Figura 5. Rendimiento total y de fenoles para extracción supercrítica de Calea peruviana a 50 °C y 30MPa.	35
Figura 6. Área bajo la curva de absorbancia en función de la longitud de onda medida por espectroscopia UV-VIS para soluciones de seis especies vegetales a 250 mg/L	37
Figura 7. Rendimiento experimental del proceso de extracción supercrítico a 50 °C y 30 MPa y ajuste a modelo teórico de transferencia de masa.	39
Figura 8. Rendimiento de extracción (barras) y porcentaje de fenoles en el extracto total (entre paréntesis) presentes en los extractos de las seis especies.	41

Figura 9. Cantidad de fenoles presentes en el extracto según la especie. Obtenidos mediante extracción supercrítica a 50 °C y 30 MPa.....41

LISTA DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice A. Extracción homogénea de fenoles	53
Apéndice B. Determinación de las condiciones de operación	54
Apéndice C. Resultados de las extracciones supercríticas en dos fases.....	57
Apéndice D. Resultados de la cuantificación de fenoles mediante <i>Folin-Ciocalteu</i>	58
Apéndice E. Resultados de las mediciones espectroscópicas a los extractos	61
Apéndice F. Comportamiento del extracto durante el proceso.....	70

RESUMEN

Título: Estudio de la obtención de extractos de los residuos de destilación de especies vegetales, usando un sistema bifásico compuesto por CO₂ supercrítico-etanol-agua*

Autor: María Fernanda Estupiñán García**

Palabras Clave: Fenoles totales, extracción supercrítica, cinética de extracción, transferencia de masa, equilibrio de fases, sistema bifásico

Descripción: Las especies vegetales representan una fuente potencial de compuestos fenólicos con demanda en las industrias farmacéutica y alimentaria. En este trabajo se estudió cómo aumentar la selectividad del proceso extractivo de polifenoles mediante extracción con CO₂ supercrítico modificado con etanol acuoso formando un sistema de dos fases. Se utilizaron residuos de destilación de seis especies vegetales aromáticas con el fin de aprovechar un subproducto de la industria de aceites esenciales, lo cual aumenta la rentabilidad y la cadena de valor de este proceso. Se determinó la relación entre las cinéticas de obtención del extracto y de los fenoles totales además de describir la cinética del proceso extractivo con un modelo matemático de transferencia de masa. Se identificaron las especies vegetales que podrían ser fuentes de ingredientes naturales en una aplicación industrial. Los resultados mostraron que la extracción de un grupo de componentes minoritarios, como los fenoles, presentó el mismo comportamiento a lo largo del proceso que la oleorresina total. La especie *Calea peruviana* mostró los mejores resultados, con un rendimiento de extracción de 78,52 mg_{ext}/g_{mv} y con contenido de fenoles totales de 38,36 mg_{EAG}/g_{ext} siendo así una fuente potencial para la obtención de compuestos fenólicos a nivel industrial.

*Proyecto de grado en modalidad investigación

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Jairo René Martínez Morales. Químico, Ph.D. Codirector: Anderson Julián Arias Velandia. Ingeniero Químico, Ph.D.

ABSTRACT

Título: Study of obtaining extracts from distillation residues of plant species, using a biphasic system composed of supercritical CO₂-ethanol-water*

Autor: María Fernanda Estupiñán García**

Palabras Clave: Total phenols, supercritical extraction, extraction kinetics, mass transfer, phase equilibrium, biphasic system

Descripción: Plant species represent a potential source of phenolic compounds in demand in the pharmaceutical and food industries. In this work, it was studied how to increase the selectivity of the polyphenol extractive process by means of modified supercritical CO₂ extraction with aqueous ethanol forming a two-phase system. Distillation residues of six aromatic plant species were used to take advantage of a by-product of the essential oil industry, which increases the profitability and the value chain of this process. The relationship between the kinetics of obtaining the extract and the total phenols was determined, in addition to describing the kinetics of the extractive process with a mathematical model of mass transfer. Plant species that could be sources of natural ingredients in an industrial application were identified. The results showed that the extraction of a group of minority components, such as phenols, presented the same behavior throughout the process as the total oleoresin. The *Calea peruviana* species showed the best results, with an extraction yield of 78,52 mg_{ext}/g_{mv} and a total phenol content of 38,36 mg_{EAG}/g_{ext} thus being a potential source for obtaining phenolic compounds at an industrial level.

*Research project

**Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Jairo René Martínez Morales. Chemical, Ph.D. Codirector: Anderson Julián Arias Velandia. Chemical Engineer, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Frente al alto potencial de valorización de las especies botánicas de Colombia, desde la academia se han incentivado investigaciones conducentes a obtener beneficios económicos tangibles a través del desarrollo de procesos extractivos. Metabolitos secundarios de las plantas, presentes en los extractos, tales como los polifenoles, han captado la atención debido a sus posibles beneficios para la salud humana (Montenegro *et al.*, 2021; Poudel *et al.*, 2008). Este grupo de compuestos actúa como antioxidantes naturales y su ingesta puede ayudar a prevenir enfermedades crónicas, cardiovasculares y hasta diferentes tipos de cáncer (Valadez *et al.*, 2018; Jalloul *et al.*, 2022; Seyrekoglu *et al.*, 2022). Los polifenoles se presentan como una alternativa a los tratamientos tradicionales y evitan los efectos secundarios de los antioxidantes sintéticos, que han sido restringidos por algunos países (Arango *et al.*, 2012), ya que pueden ocasionar daño hepático y efectos toxicológicos de larga duración. El interés de los investigadores continúa siendo buscar alternativas seguras y ecológicas de aditivos de origen natural (de Elguea *et al.*, 2022; Adouni *et al.*, 2022).

En los últimos años el mercado de aceites esenciales se ha incrementado como causa de la alta demanda de productos naturales. En esta industria se genera gran cantidad de subproductos sólidos (de Elguea *et al.*, 2022). Es por esto, que es conveniente aprovechar los residuos y valorizarlos mediante la extracción de compuestos bioactivos que aún quedan retenidos en el subproducto. De esta manera es posible aumentar la rentabilidad y complementar la cadena de valor del proceso (Arias *et al.*, 2020; Arias *et al.*, 2022). El material vegetal posterior a su destilación puede ser sometido a diferentes técnicas de extracción. Estas buscan, además de obtener una alta concentración en polifenoles, garantizar que sus propiedades se conserven y que el extracto pueda ser utilizado de forma segura como ingrediente natural. De esta forma se valoriza

el material vegetal, lo cual repercute en ganancias para la industria. Métodos de extracción convencionales como la extracción sólido-líquido, presentan limitaciones debido al consumo excesivo de tiempo y solventes, baja calidad de los extractos y degradación térmica de los compuestos. Por tanto, es conveniente emplear procesos que superen las limitaciones mencionadas (Ameer *et al.*, 2017). La extracción con CO₂ supercrítico (scCO₂) es un proceso con potencial aplicación industrial debido a que reduce los tiempos de operación y el consumo de solventes orgánicos, tiene mayor velocidad de extracción, mejor reproducibilidad y permite extraer compuestos termosensibles (Valadez *et al.*, 2018). Sin embargo, el principal inconveniente del scCO₂ es que no es afín con especies polares, como los polifenoles.

Para mejorar el proceso extractivo, es posible añadir otros disolventes como el etanol acuoso, el cual actúa como modificador de la polaridad y del equilibrio de fases. Esto ocurre cuando el etanol acuoso es agregado en proporciones tales que mezclado con el scCO₂ se forman dos fases fluidas, de lo cual se hipotetiza, que aceleran de forma selectiva los fenómenos de transferencia de masa (del Valle *et al.*, 2019). Esta metodología de extracción supercrítica (SC), en la que se forman dos fases en equilibrio, mejora la obtención de polifenoles en el extracto y mantiene las propiedades de alta densidad, solubilización y difusividad del solvente, que proporcionan los fluidos SC (Mesquita *et al.*, 2021). En este proyecto se buscó aumentar la selectividad del proceso extractivo de polifenoles mediante la implementación de la extracción con scCO₂ modificado con etanol acuoso formando un sistema de dos fases, por primera vez en nuestro centro de investigación.

Se determinaron las condiciones de operación que permitieran realizar las extracciones SC en dos fases, basándose en reportes de equilibrio de fases de la literatura. Se estudiaron los extractos obtenidos a partir del material vegetal posterior a su destilación de seis especies: *Satureja*

viminea (SAV), *Satureja sp.* (SAT), *Tagetes filifolia* (TAF), *Calea peruviana* (CAP), *Cymbopogon martinii* (CYM) e *Hyptis colombiana* (HYC). Se presentan los resultados de las extracciones en términos de rendimiento, cinética y contenido de fenoles totales (CFT). Se analizó cómo se comporta la extracción conjunta de los compuestos minoritarios (fenoles) frente a la extracción de la oleoresina total durante del proceso extractivo. Además, se profundizó en el modelamiento de la cinética de obtención del extracto mediante ajuste de un modelo matemático que describe la transferencia de masa entre las dos fases. Finalmente se hizo un estudio del potencial que tendrían estas especies como fuente de polifenoles en una eventual aplicación industrial. Para esto se tuvieron en cuenta el rendimiento y la cantidad de fenoles totales de cada especie, además de compararlas con otras especies vegetales que destacan en la literatura por su alto CFT.

1. ESTADO DEL ARTE

Los polifenoles son compuestos solubles en agua, que han ganado importancia debido a que presentan propiedades benéficas para la salud humana. Estos componentes se presentan en pequeñas cantidades dentro de las matrices vegetales y se caracterizan por su capacidad antioxidante siendo de especial interés en industrias como la alimentaria, cosmética y farmacéutica. En la actualidad existe la tendencia de sustituir los antioxidantes sintéticos, por antioxidantes naturales, lo que ocasiona interés por buscar fuentes naturales de estos compuestos (Arango *et al.*, 2012).

Encontrar una técnica adecuada para obtener compuestos fenólicos es tema de gran interés entre los investigadores, quienes buscan procesos que además de presentar altos rendimientos, sean selectivos hacia los compuestos y repercutan en bajo impacto ambiental (Adouni *et al.*, 2022). La extracción con fluido SC ha sido ampliamente usada para extracciones de matrices vegetales ya que reduce el consumo de disolventes y el tiempo de operación. Además, permite una fácil separación del solvente debido a su cambio de fase, de SC a gaseoso, ocasionado por la caída de presión (Carlqvist *et al.*, 2022). El interés hacia dicha técnica ha incrementado, lo cual se refleja en la cantidad de publicaciones y patentes relacionadas con el tema (Herrero *et al.*, 2010).

El principal disolvente SC es el CO₂ debido a que su condición crítica (31 °C y 7,3 MPa), se puede alcanzar sin incrementar considerablemente los costos de operación debido al consumo energético (Ameer *et al.*, 2017). Sin embargo, debido a su polaridad, tiene limitaciones para extraer polifenoles y por ello usualmente se emplean modificadores tales como la acetona, metanol, éter etílico, etanol y agua (Ameer *et al.*, 2017; King, 2014). Entre estos modificadores destaca el uso de etanol debido a que es generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés)

lo cual mantiene las ventajas de baja toxicidad del CO₂ como solvente y mejora la solubilidad del sistema hacia compuestos más polares (Ameer *et al.*, 2017; del Valle *et al.*, 2019).

Estudios han demostrado que, al incluir etanol como solvente modificador, los rendimientos de extracción se incrementan de manera considerable en comparación a una extracción convencional con scCO₂. Esto se explica por el cambio en la polaridad del solvente y el hinchamiento de la matriz vegetal que facilita la salida de los analitos de interés (Prakash *et al.*, 2013). Además, aumenta la selectividad del proceso hacia la recuperación de compuestos fenólicos (Valadez *et al.*, 2018). Algunos autores, más recientemente, han observado que las mezclas hidroalcohólicas presentan aún mejores eficiencias de extracción que cada solvente puro por separado, esto debido a que se pueden lograr propiedades específicas al mezclar dos o más solventes, tal como una polaridad intermedia o la presencia de más de una fase fluida. Incluir agua en la mezcla mejora la extracción por el incremento de la solubilidad y la reducción de la resistencia a la transferencia de masa (Fuentes *et al.*, 2019).

En los últimos años se ha propuesto la implementación de etanol acuoso como modificador para la extracción de compuestos polifenólicos a partir de matrices vegetales. Esta modificación del proceso ha demostrado ser efectiva porque disminuye la tensión superficial y la viscosidad del fluido, de modo que facilita la transferencia de masa desde el sólido hasta el solvente (del Valle *et al.*, 2019).

En el año 2010 J. Seabra observó que la extracción de antocianinas presentes en el saúco mejora al utilizar scCO₂ modificado con etanol y agua, lo que se probó a diferentes relaciones volumétricas bajo condiciones de 40 °C y 21 MPa. En sus experimentos encontró que la mezcla de cosolvente tuvo un efecto positivo sobre el rendimiento y la composición de los extractos que resultaron con mayor contenido de antocianinas (Seabra *et al.*, 2010). En 2017 Kühn realizó

experimentos de extracción con scCO_2 , tanto puro como en mezcla ternaria con etanol y agua, para la obtención de compuestos bioactivos del orujo de arándano. Los investigadores observaron que la presencia del cosolvente fue esencial para la recuperación de polifenoles. Los autores compararon los resultados con una extracción sólido-líquido convencional con etanol acuoso acidificado al 70% v/v y encontraron que se logró extraer cantidades equivalentes de fenoles y antocianinas entre las dos técnicas. Además, lograron reducir hasta en un 88% la cantidad de etanol en la extracción supercrítica cuando se compara con la extracción sólido-líquido (Kühn *et al.*, 2017).

Una de las investigaciones más recientes en el tema es la llevada a cabo por José M. del Valle quien hipotetiza lo que ocurre con el proceso de transferencia de masa de los componentes de interés, desde la matriz vegetal hasta el solvente modificado. En su publicación expone que este tipo de extracción es un proceso de dos etapas que consiste en la transferencia lenta del soluto desde el sustrato sólido a una fase líquida de etanol acuoso expandido con CO_2 , seguido de una transferencia rápida, regida por el equilibrio, del soluto a una fase de scCO_2 modificada con etanol acuoso. Los investigadores destacan que garantizar la formación de dos fases en el sistema ternario mejora la extracción de sus compuestos de interés (del Valle *et al.*, 2019). De esta forma trabajar dicha mezcla de solventes en una extracción SC podría ser conveniente para la obtención selectiva de polifenoles.

Cuantificar este tipo de compuestos en un extracto vegetal ha sido de interés para múltiples autores en sus investigaciones, en las cuales se determina su concentración mediante el método de *Folin-Ciocalteu*. El método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo Folin es una mezcla de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico que se reduce en un medio alcalino y reacciona con cualquier tipo de fenol presente en la muestra. Los

ácidos que reaccionan cambian la coloración de amarillo a azul. La intensidad del color es proporcional al número de grupos hidroxilos presentes en la muestra y puede cuantificarse mediante espectrofotometría. Basándose en este principio la presencia de compuestos fenólicos es cuantificable (Martins *et al.*, 2021; Carmona *et al.*, 2021; Marina *et al.*, 2008). El método ha sido ampliamente usado y las investigaciones sobre el CFT se basan en este, donde se reportan los resultados con base en un patrón de ácido gálico.

Las especies estudiadas en este trabajo hasta la fecha han sido utilizadas para la obtención de aceite esencial mediante arrastre con vapor o por hidrodestilación asistida por radiación de microondas. Sin embargo, no han sido aún evaluados los subproductos de su destilación como fuente de fenoles. En la presente investigación se aplica y se explora el efecto de la formación de dos fases en equilibrio, al utilizar como modificador etanol acuoso, para obtener los extractos de esos subproductos y determinar nociones sobre el potencial de estos como materias primas de compuestos antioxidantes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

Estudiar la obtención de extractos de los residuos de destilación de seis especies vegetales aromáticas, usando CO₂ supercrítico, etanol y agua, cuando los parámetros de equilibrio condicionan a que el fluido extractor se encuentre en dos fases.

2.2. Objetivos específicos

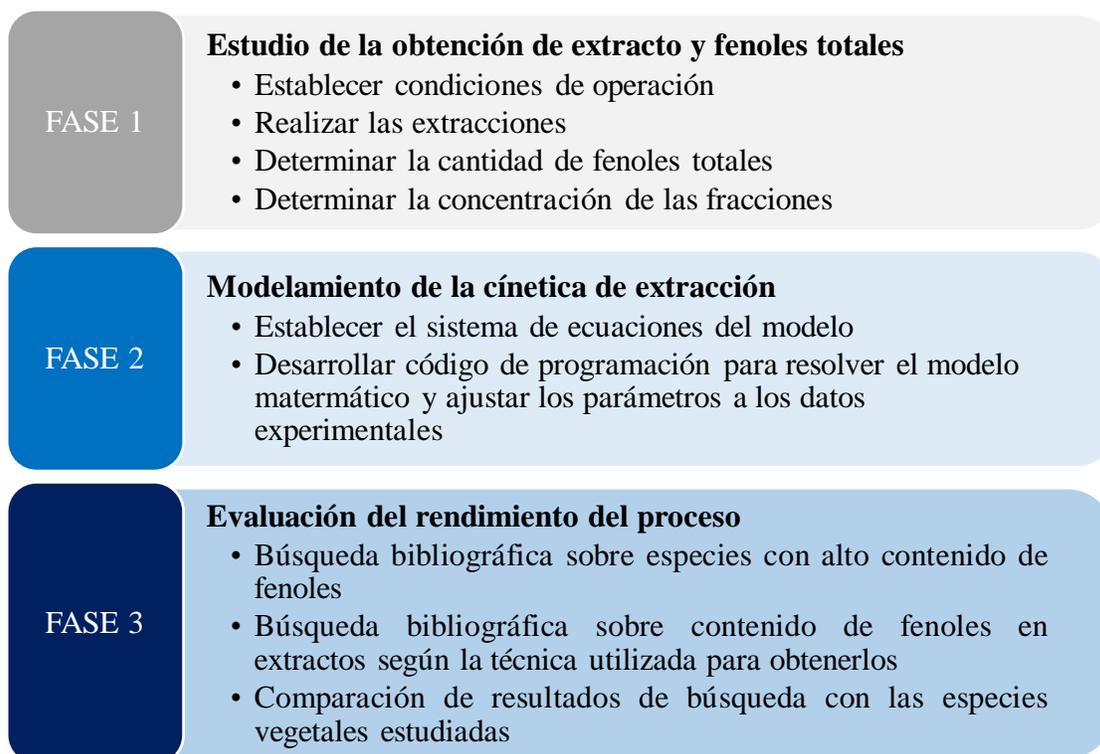
- Determinar la relación entre las cinéticas de obtención del extracto y de los fenoles totales al emplear un sistema bifásico compuesto por CO₂ supercrítico-etanol-agua.
- Describir matemáticamente la cinética del proceso extractivo con un modelo matemático de transferencia de masa para todas las especies vegetales estudiadas.
- Identificar las especies vegetales que, según el rendimiento del proceso de extracción bifásico con CO₂ supercrítico-etanol-agua, podrían ser fuentes de ingredientes naturales en una aplicación industrial.

3. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

Para el desarrollo metodológico, del presente trabajo, se llevaron a cabo las siguientes actividades divididas en tres fases (**Figura 1**).

Figura 1.

Fases del desarrollo metodológico



3.1. Estudio de la obtención de extracto y fenoles totales

Para determinar la relación entre la cinética de obtención del extracto y de los fenoles totales presentes, fue necesario trabajar en dos etapas. La primera etapa consistió en obtener la oleorresina (extracto total) de las seis especies vegetales y la segunda en la determinación de los fenoles totales coextraídos en el proceso.

La obtención de la oleorresina se llevó a cabo mediante extracción simultánea en dos fases, una líquida expandida con CO₂ y otra formada con scCO₂ modificado. Durante el proceso se recolectó oleorresina en función del tiempo, con el fin de conocer su cinética. Para la cuantificación de los fenoles totales en cada una de las fracciones recolectadas se asumió que su proporción de extracción fue homogénea a lo largo del proceso. Esto basado en que estudios previos muestran que el rendimiento de compuestos minoritarios se puede describir aproximadamente con una función lineal dependiente del rendimiento de los compuestos mayoritarios, cf. Apéndice A de (Arias *et al.*, 2022). De esta forma se estimó la cantidad de fenoles extraídos mediante la cinética de extracción total y su relación en masa obtenida a partir del extracto total. La cuantificación de los fenoles totales se llevó a cabo mediante el método de *Folin-Ciocalteu* y la concentración del extracto y sus fenoles a la salida se estimó a partir de curvas de calibración que relacionaron la concentración con la absorbancia medida.

3.1.1. Extracción con fluido supercrítico

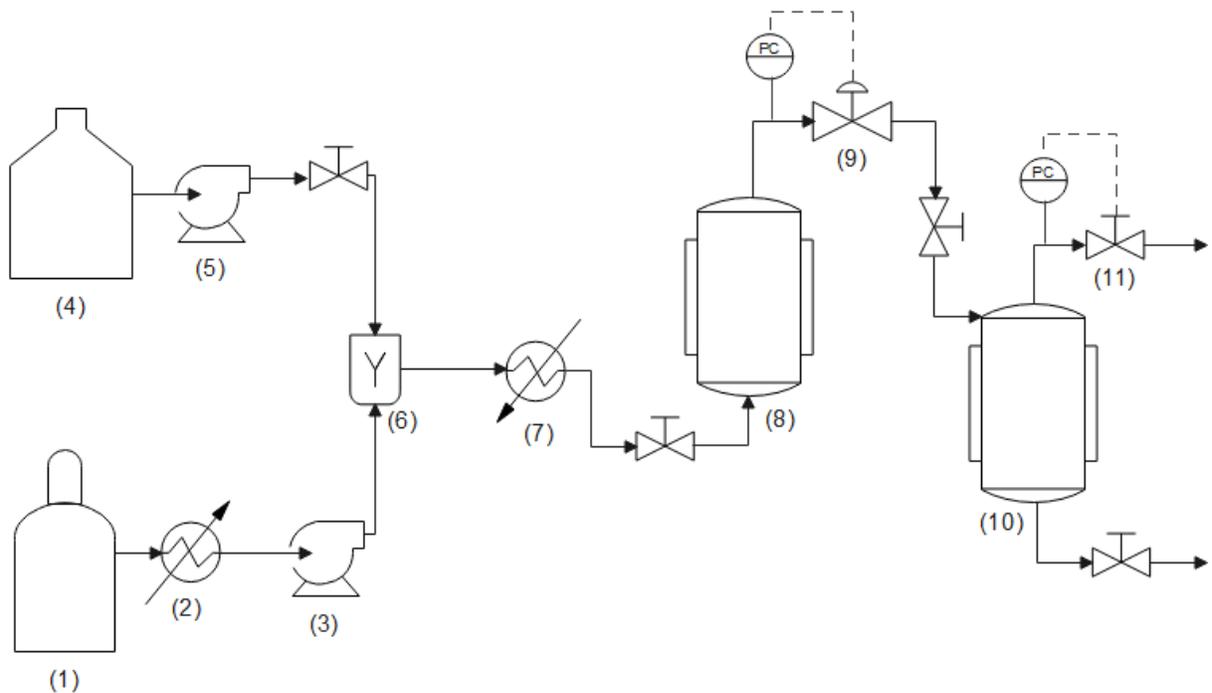
La extracción de la oleorresina presente en el material vegetal (MV) se llevó a cabo en un equipo modificado de extracción con fluido supercrítico a escala piloto (**Figura 2**) *Thar instruments SFE-2000-2-FMC50* (Pittsburgh, PA). El montaje consistió en una cámara de extracción cilíndrica de $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$; un tanque de separación y recolección de los extractos tipo ciclón de $5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$, con una válvula manual reguladora de presión a su salida; dos bombas de pistones, una P200 para impulsar el CO₂ (*Thar Technologies*) y P50 para el agente modificador (*Thar Technologies*); una válvula automática reguladora de presión (*Thar Technologies*) ABPR (*Automated back pressure regulator*) a la salida de la cámara de extracción; y un medidor de flujo Sitrans FC Massflo tipo MASS 6000 (*Siemens AG*, Berlín, Alemania). Tanto la cámara de extracción como el tanque de separación estaban equipados con chaquetas de calentamiento. El

control de las presiones, temperaturas y flujo del sistema se llevó a cabo desde un computador, mediante el Software *Process Suite* (*Thar Technologies*).

Las extracciones se llevaron a cabo con MV destilado. Ese MV fue secado a la sombra y posteriormente picado en una licuadora clásica Oster de tres velocidades. La extracción se realizó usando scCO₂ puro al 99,8% (Messer, Bucaramanga, Colombia) modificado con una mezcla de etanol (Suquin, Bucaramanga, Colombia) y agua destilada. Las condiciones de operación se fijaron considerando la formación de dos fases en equilibrio dentro del sistema (del Valle *et al.*, 2019). Se trabajó a 50 °C y 30 MPa con base en mediciones de equilibrio de fases reportadas en la literatura (Durling *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2007) y la optimización en el rendimiento y la extracción selectiva de fenoles (Bahar *et al.*, 2013; Tong *et al.*, 2011).

Figura 2.

Diagrama de flujo del proceso de extracción supercrítica de especies vegetales.



Donde (1) cilindro de CO₂, (2) enfriador, (3) Bomba de CO₂, (4) tanque de alimentación de cosolvente, (5) bomba de cosolvente, (6) mezclador, (7) calentador, (8) tanque de extracción, (9) ABPR controlador automático de presión, (10) tanque de separación, (11) válvula de control manual de presión.

Se llevaron a cabo 6 extracciones, una para cada especie (*Satureja viminea*, *Satureja sp.*, *Tagetes filifolia*, *Calea peruviana*, *Cymbopogon martinii* e *Hyptis colombiana*), bajo las mismas condiciones de operación. Estas condiciones fueron estimadas teniendo en cuenta el diagrama ternario (CO₂ + etanol + agua) descrito por la ecuación de estado de Peng-Robinson y las reglas de mezcla de Wong-Sandler a 40 °C y 30 MPa (Durling *et al.*, 2007). Se trabajó en un punto de operación por debajo de la curva que delimita la región de dos fases de la región de una sola fase, buscando que operacionalmente se garantizara que el sistema se dividiera en las dos fases, véase Apéndice B.

Para cada extracción, se aseguró que el material vegetal ocupara las dos terceras partes del volumen total del tanque, con el fin de mejorar la separación de las fases en la parte superior del recipiente. Al recipiente se le adicionó una solución hidroetanólica 50% v/v, previo al inicio de la extracción, teniendo en cuenta la composición global de la mezcla de solventes determinada mediante el diagrama ternario. El volumen de la mezcla de etanol acuoso inicial se estableció arbitrariamente como un tercio del volumen total disponible para la mezcla de solventes en el recipiente (1 mL de etanol-agua por cada 0,88 g de MV cargado al extractor), el cual se estimó al asumir que la densidad de partículas de las especies en estudio era aproximadamente 1.051 g/cm³. Medida y obtenida en un trabajo previo para *Lippia origanoides* (Arias *et al.*, 2022).

La extracción se dividió en dos etapas, una estática y otra una dinámica tal y como lo reportado en la literatura por (Tong *et al.*, 2011). En la primera etapa, el sistema se presurizó con scCO₂ hasta alcanzar 50 °C y 30 MPa. El sistema en estas condiciones se mantuvo durante una hora asumiendo que era tiempo suficiente para que el sistema ternario alcanzara el equilibrio y con ello formara las dos fases fluidas dentro del extractor. Durante el tiempo dinámico, se inyectaron simultáneamente al sistema 40 g/min para el CO₂ y 2,65 g/min de etanol acuoso al 89% v/v durante dos horas. Estas condiciones se determinaron con base en la composición de la fase supercrítica en equilibrio, de tal manera que la velocidad superficial con la que la mezcla de solventes pasaba por el lecho fuese lo suficientemente pequeña como para suponer que el equilibrio alcanzado con el tiempo estático se mantuviera. Los cálculos detallados se muestran en el Apéndice B.

Usando la válvula de salida por el fondo del tanque de separación, con ayuda de una probeta, se recolectaron las fracciones de oleorresina en solución durante los (10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos). El tanque de separación se operó a 3 MPa y 60 °C. De cada una de estas fracciones se tomó una muestra de 500 µL para analizar. Las fracciones recolectadas, en cada intervalo, fueron depositadas en cajas Petri de forma individual y secadas en un horno de convección forzada, con un flujo de aire a 60 °C, hasta remover completamente los solventes. Para esto se empleó una cámara con orificios de entrada y salida de aire, un termómetro de mercurio y un impulsor de aire caliente.

Después del secado, se pesaron las cajas Petri en una balanza *Mettler-Tolledo AL204* (Nanicon, Suiza) para determinar los rendimientos en función del tiempo. Finalizado el proceso, se mezclaron todas las fracciones de extracto en un frasco ámbar y este se almacenó en la nevera a 4 °C.

3.1.2. Metodología de cuantificación de fenoles totales

Se aplicó el método de *Folin-Ciocalteu* con el fin de cuantificar los de fenoles presentes en el extracto y analizar el comportamiento de su extracción en el tiempo. Además, se buscó encontrar relaciones entre la absorbancia, la concentración y la cantidad de fenoles para cada una de las fracciones recolectadas. Para ello, además del método de *Folin*, se realizaron mediciones espectroscópicas tomando alícuotas a cada una de las fracciones, con el fin de hallar la concentración del extracto.

4.1.2.1. Método de Folin-Ciocalteu

Para poder determinar la concentración de los fenoles totales presentes en cada una de las fracciones recolectadas, se utilizó el método de *Folin-Ciocalteu*. El contenido de fenoles totales se determinó a partir de un patrón de ácido gálico (AG). Esta molécula de referencia es comúnmente utilizada para expresar los resultados, en datos cuantitativos, equivalentes (EAG) por unidad de muestra.

Las mediciones se llevaron a cabo en un lector de multiplacas *Turner Biosystems Modulus™ II Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, CA). La longitud de onda a la cual se registró la absorbancia de la mezcla fue 750 nm y la temperatura de operación 25 °C. Para el desarrollo del método se preparó una solución *stock* de 100 mg/mL de extracto en etanol absoluto (99.9%), a partir de la cual se prepararon cinco diluciones de 500 a 3000 mg/L en agua tipo uno, para cada una de las seis especies por triplicado. Las diluciones se prepararon en microplacas de 96 pozos, que constaban de 12 filas y 8 columnas, donde cada fila se cargaba con solución a una misma concentración por medio de una pipeta multicanal *Transferpette electronic Brand* (Whertheim, Alemania).

Preparada la placa de diluciones, se pasó a montar la placa de reacción en la cual se completó un volumen de 200 μL , de los cuales, 50 μL eran de extracto en solución, 50 μL de reactivo *Folin* y 100 μL de solución básica. La solución básica se agregó al final, ya que con esta la reacción empezaba a ocurrir. Para el reactivo de *Folin* se preparó una solución al 20% v/v partiendo del reactivo a una concentración 2 N. Para la solución básica se utilizó NaOH y se preparó la solución a una concentración de 0,35 M. Las dos soluciones fueron preparadas en agua tipo uno.

Para la curva patrón de ácido gálico se siguió el mismo procedimiento con la diferencia de que se trabaja con una solución stock en etanol absoluto de 2 mg/mL de ácido gálico y la placa se preparaba a concentraciones de 5 a 70 mg/L.

4.1.2.2. Espectroscopia UV-VIS

Para determinar la concentración en cada una de las fracciones recolectadas se utilizó un espectrofotómetro en miniatura FLAME-S-UV-VIS-ES *Ocean Optics* (Dunedin, FL). El espectro de absorbancia se midió para cada fracción tres veces en un rango de longitud de onda de 200 a 850 nm. Las muestras para el análisis espectroscópico se prepararon tomando de 10 a 20 μL de la fracción, y diluyendo en etanol al 96% v/v hasta completar 5 mL. Con la medición se estimó la concentración de extracto durante el proceso, empleando curvas de calibración para relacionar la concentración con la absorbancia.

Para construir las curvas de calibración se prepararon cinco soluciones, de 125 a 750 mg/L de extracto en etanol al 96% v/v. A cada solución se le midió su absorbancia en el mismo rango de longitudes de onda que las fracciones. Las curvas de calibración se construyeron a partir de las absorbancias máximas que se observaban en el espectro a unas longitudes de onda fijas para las

cinco concentraciones, según la especie. Entre estas longitudes de onda se seleccionó una para cada especie y se determinó su valor de absorbancia correspondiente. Los criterios para la elección de la longitud de onda fueron que en ese punto se presentara una cresta de máxima absorbancia y que esta fuera detectable en el mayor rango lineal posible de concentraciones, garantizando así máxima cobertura. A partir de estos valores se correlacionó la absorbancia con la concentración a una sola longitud de onda mediante un modelo matemático que sigue una tendencia lineal.

La cuantificación del extracto se determinó partiendo de la absorbancia que tenía cada una de las fracciones a la longitud de onda correspondiente y reemplazando en el modelo matemático de la curva de calibración según la especie. Conocidas las concentraciones del extracto durante el proceso, se estimó el perfil de concentración de los fenoles totales con base en el resultado de la metodología en la sección 4.1.2.1.

3.2. Modelamiento de la cinética de extracción

Para describir matemáticamente la cinética del proceso extractivo, se asumió un modelo de parámetros concentrados, basado en la transferencia de masa, que asume mezcla perfecta en el extractor durante el tiempo dinámico (del Valle *et al.*, 2019).

Se da por hecho que, a las condiciones de operación, en el sistema coexisten dos fases, una líquida compuesta por etanol y agua expandida con CO₂ y una supercrítica formada por CO₂ modificado con etanol y agua. Por esta razón son necesarios tres balances de masa para describir el sistema: el primero alrededor del material vegetal que contiene el sustrato cf. (Ec. 1), el segundo en la fase líquida cf. (Ec. 2) y el tercero en la fase supercrítica cf. (Ec. 3).

$$\frac{\partial(MC_{EMV})}{\partial t} = -F_1 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\frac{\partial(V_L C_{EL})}{\partial t} = F_1 - F_2 \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\frac{\partial(V_{SC} C_{ESC})}{\partial t} = F_2 - F_3 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde M es la masa de material vegetal cargada (g), C_{EMV} es la concentración de extracto en el material vegetal (mg/g), F_1 es el flujo de extracto del material vegetal a la fase líquida (mg/min), V_L es el volumen de la fase líquida en el extractor (cm^3), C_{EL} es la concentración de extracto en la fase líquida (mg/cm^3), F_2 es el flujo de extracto de la fase líquida a la fase supercrítica (mg/min), V_{SC} es el volumen de la fase supercrítica en el extractor (cm^3), C_{ESC} es la concentración de extracto en la fase supercrítica (mg/cm^3) y F_3 es el flujo de extracto que sale del sistema de extracción (mg/min).

Para el desarrollo del sistema de ecuaciones diferenciales se asumió que el flujo de extracto a la fase líquida es regido por un modelo de fuerza impulsora lineal de transferencia de masa descrito en la Ec.4 y que la concentración de extracto en las fases líquida y supercrítica está regida por el equilibrio Ec.5 (del Valle *et al.*, 2019)

$$F_1 = K_a \left(K_1 C_{EMV} - \frac{C_{ESC}}{K_2} \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

$$C_{ESC} = K_2 C_{EL} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde K_1 es el coeficiente de partición lineal de extracto entre el material vegetal y la fase líquida, K_2 es el coeficiente de partición lineal de extracto entre la fase líquida y la fase supercrítica y K_a es coeficiente de transferencia de masa global para la transferencia convectiva de extracto del material vegetal a la fase líquida.

Para el rendimiento de extracción del proceso cf. (Ec. 6) como función del tiempo se tuvo en cuenta el cambio de concentración del extracto a la salida del sistema descrito por los balances de masa.

$$\frac{\partial Y}{\partial t} = \frac{QC_{\text{ESC}}}{M\rho_{\text{sc}}} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde Y es el rendimiento de extracción (mg/g), Q el flujo másico de CO_2 (g/min) y ρ_{sc} la densidad del CO_2 a las condiciones de operación (g/cm^3).

Con este sistema de cuatro ecuaciones diferenciales ordinarias y haciendo uso del sistema de cómputo numérico MATLAB R2021a se ajustaron los parámetros del modelo. La estrategia de ajuste se basó en minimizar la suma de los cuadrados residuales, entre los valores predichos y las observaciones experimentales para cada punto de datos mediante la función *fminsearch*. Esta función corresponde al algoritmo de minimización simplex de Nelder-Mead. Para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales se utilizó el solucionador ode45 que se basa en el método de integración de *Runge-Kutta* de orden (4,5) *Dormand-prince*.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de la obtención de extracto y fenoles totales

4.1.1. Extracción con fluido supercrítico

Para llevar a cabo las extracciones de las especies vegetales, se trabajó a 323 K y 3×10^7 Pa según la metodología descrita anteriormente. Para cada una, se construyó su respectiva experimental, la cual se ajustó a un modelo empírico cinético de extracción, propuesto por Brunner en 2013, que se utiliza comúnmente para describir este tipo de procesos extractivos (Bojanić *et al.*, 2019). Este modelo describe el rendimiento total de extracción Y en función del tiempo y los parámetros de: rendimiento total obtenido para un tiempo infinito Y_{∞} y la constante de velocidad de extracción k

$$Y = Y_{\infty} (1 - e^{-kt}) \quad (\text{Ec. 7})$$

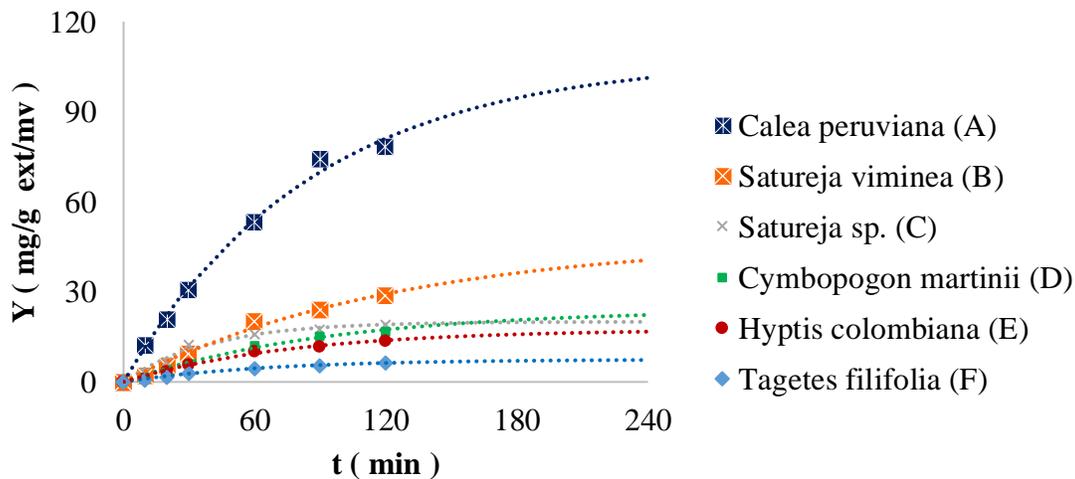
En la **Figura 3** se muestran los resultados obtenidos para las extracciones de las especies estudiadas. Para el cálculo del rendimiento de extracción, se tuvo en cuenta la cantidad de extracto recolectado en cada momento y la masa de material vegetal cargado según la especie. En esta figura se pueden observar los rendimientos experimentales y las curvas descritas por el modelo empírico ajustado. En el Apéndice C se muestran los datos detallados de las extracciones realizadas.

A partir de la predicción del modelo matemático, para tiempos mayores que el tiempo dinámico de operación usado (120 min), aún se logra ver un incremento en el rendimiento de extracción. Es decir, que en el momento en que se detuvo la operación aún no se había obtenido la totalidad, pero sí la mayor cantidad de extracto posible. A pesar de esto se observa que se logra superar la tasa de extracción constante y buena parte del periodo de extracción descendente, según se describe para la extracción supercrítica dinámica (Sovová *et al.*, 2012). En cuanto al rendimiento

de extracción, de la especie *Calea peruviana* se obtuvo mayor cantidad de extracto, con un rendimiento de dos a tres veces más que los de las demás especies estudiadas.

Figura 3.

Rendimiento experimental del proceso de extracción supercrítico a 50 °C y 30 MPa y ajuste a modelo empírico $Y = Y_{\infty} (1 - e^{-kt})$. (A) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$. (B) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$. (C) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$. (D) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$. (E) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$. (F) $Y_{\infty} = 108,97$ $k = 0,012$



En la **Tabla 1** se muestra el rendimiento de extracción para cada especie a los 120 minutos. Además, se muestran los parámetros de ajuste del modelo empírico y los criterios de bondad de ajuste, suma de cuadrados de los errores (SCE) y coeficiente de determinación (R^2). Con estos resultados se validó el ajuste entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. Esto al considerar que el valor de SCE es bajo y tiende a cero y el R^2 es de aproximadamente la unidad para las seis especies. Además, se observó que las especies cuyo rendimiento a los 120 minutos es más cercano el predicho en un tiempo infinito, tienen mayor constante de velocidad, lo que implica

que *Satureja sp.* y *Tagetes filifolia* a pesar de no presentar los valores máximos de rendimientos frente a las otras especies, sí logran alcanzar su rendimiento máximo más rápidamente.

Tabla 1.

Rendimiento de extracción supercrítica a los 120 minutos llevada a cabo a 50 °C 30 MPA, parámetros de ajuste del modelo empírico $Y = Y_{\omega} (1 - e^{-kt})$ y criterios de bondad de ajuste suma de cuadrados de los errores (SCE) y coeficiente de determinación (R^2).

Especie	Y	Y_{ω}	k	SCE	R^2
<i>Calea peruviana</i>	78,52	108,971	0,012	0,300	0,995
<i>Satureja viminea</i>	28,77	47,631	0,008	0,110	0,986
<i>Satureja sp.</i>	19,09	20,042	0,026	0,060	0,982
<i>Cymbopogon martinii</i>	16,86	24,22	0,011	0,025	0,991
<i>Hyptis colombiana</i>	13,73	17,52	0,013	0,021	0,988
<i>Tagetes filifolia</i>	6,38	7,491	0,015	0,002	0,994

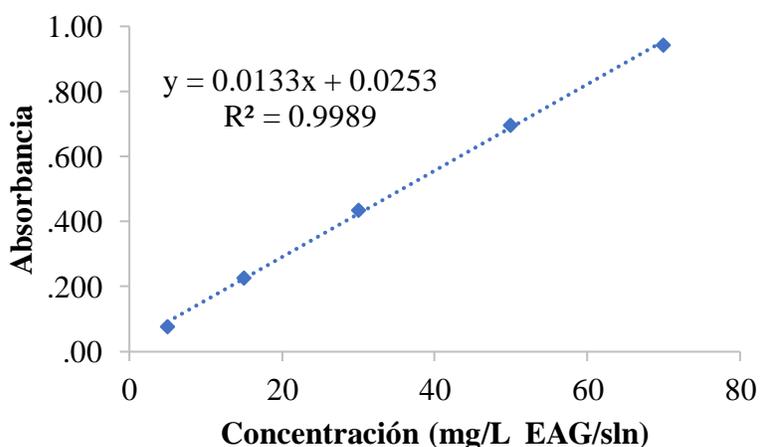
4.1.2. Metodología de cuantificación de fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales (CFT) presentes en cada gramo de extracto obtenido, los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (EAG). Este ácido sirve como patrón de referencia para expresar resultados que puedan ser comparables entre especies. La curva de calibración del ácido se llevó a cabo previo a la implementación del método de *Folin* para cada uno de los extractos. En la **Figura 4** se muestra la curva que correlaciona la concentración en EAG con la absorbancia de esta solución ácida. La absorbancia en esta curva es la que permite

correlacionar las mediciones del patrón de ácido gálico y de los extractos totales obtenidos. Para cada extracto se prepararon soluciones a diferentes concentraciones con el fin de asegurarse que la absorbancia en un punto del rango estudiado se encontrara dentro del rango de absorbancia de la curva de calibración. En el Apéndice D se presenta la **Tabla A.5** detallada de las mediciones realizadas, donde en color rojo se muestran las absorbancias fuera de este rango y en color amarillo el punto escogido para cada especie con el que se cuantificó el CFT. El proceso se llevó a cabo siguiendo el método de *Folin-Ciocalteu*.

Figura 4.

Curva de calibración de patrón de ácido gálico medida a 750 nm por medio del método de cuantificación de fenoles totales *Folin-Ciocalteu*.



Considerando que los valores promedio de absorbancia para cada concentración tienen un ajuste lineal creciente del 99,89%, la curva de calibración se utilizó para determinar el CFT en el extracto total de cada especie. Así pues, utilizando la ecuación del modelo lineal de la curva de calibración y la concentración de la solución *stock* preparada para cada extracto, se calculó el CFT partiendo de la absorbancia promedio registrada para la reacción de los fenoles de cada extracto.

En la **Tabla 2** se muestra el CFT, en equivalentes de ácido gálico, presentes en cada gramo de extracto total obtenido según la especie, a partir del cual se estimó el comportamiento de la extracción conjunta de fenoles en el tiempo del proceso. De esta forma, el rendimiento de extracción de fenoles Y_f , fue calculado mediante la Ec.8, la cual impone una relación lineal entre el rendimiento total y el rendimiento parcial de un grupo de compuestos como los fenoles. Esto debido a que se supone que la extracción de los fenoles es homogénea.

$$Y_f = \frac{\text{CFT}}{1000} * Y \quad (\text{Ec. 8})$$

Tabla 2.

Contenido de fenoles totales para las seis especies estudiadas obtenido por medio del método de cuantificación de fenoles totales *Folin-Ciocalteu*.

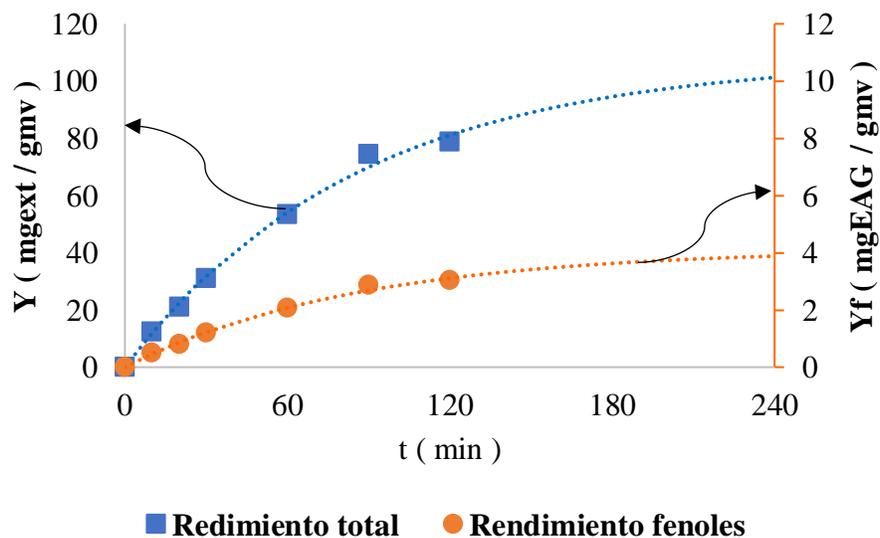
Especie	CFT (mgEAG /g_{ext})
<i>Calea peruviana</i>	38,36
<i>Satureja viminea</i>	33,40
<i>Satureja sp.</i>	29,05
<i>Cymbopogon martini</i>	10,44
<i>Hyptis colombiana</i>	11,88
<i>Tagetes filifolia</i>	18,54

En la **Figura 5** se muestra la cinética de extracción conjunta de la oleorresina y de los fenoles totales, para el caso específico de la especie *Calea peruviana*. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas punteadas corresponden al ajuste del modelo empírico descrito

por la Ec. 8. Esta ecuación se pudo aplicar para el rendimiento de los fenoles basándose en la consideración de extracción homogénea.

Figura 5.

Rendimiento total y de fenoles para extracción supercrítica de *Calea peruviana* a 50 °C y 30MPa.



Los parámetros de ajuste del modelo empírico para el rendimiento total de esta especie fueron $Y_{\infty} = 108,97$ y $k = 0,012$. Para el caso de los polifenoles, los parámetros de ajuste fueron $Y_{\infty} = 4,14$ y $k = 0,012$ para un $SCE = 0,044$ y $R^2 = 0,995$. Al comparar los parámetros de estos dos rendimientos se puede observar que la constante de velocidad es la misma y la diferencia al largo de todo el proceso entre los dos rendimientos es constante e igual a 3,84%, esto debido a la relación lineal entre estos dos dada por Ec.8.

Por otra parte, se buscó relacionar la absorbancia del extracto en solución que sale del sistema, con la concentración y su respectiva cantidad de fenoles. Para esto, se siguió la metodología descrita en la sección 4.1.2.2, donde era necesario hacer mediciones de absorbancia

para cada una de las fracciones recolectadas por especie y relacionarlas con su respectiva curva de calibración.

Para cada una de las especies se estableció una longitud de onda a la cual se monitoreó la absorbancia del extracto y con la cual, se construyeron las curvas de calibración. Las curvas de calibración y los espectros para cada concentración se muestran en el Apéndice E. Aquí se observa que para las seis especies se evidencia el mismo comportamiento y se cumple la relación lineal y directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración de la mezcla, establecida por la ley de Lambert-Beer (Skoog *et al.*, 2001; Rouessac *et al.*, 2003).

Construidas las curvas de calibración, se cuantificó el extracto que salía del sistema a lo largo del proceso. Las mediciones espectrales de las fracciones de extracto recolectadas en el proceso se muestran en el apéndice E. Adicionalmente se determinó la concentración de fenoles extraídos a partir de la concentración del extracto total en cada momento de la extracción y el CFT. En la **Tabla 3** se muestran los resultados de esta fase para la especie *Calea peruviana*. Los datos de las demás especies se encuentran en el apéndice F lo que amplía la descripción del proceso.

Tabla 3.

Comportamiento de la extracción supercrítica de *Calea peruviana* a 50 °C y 30 MPa

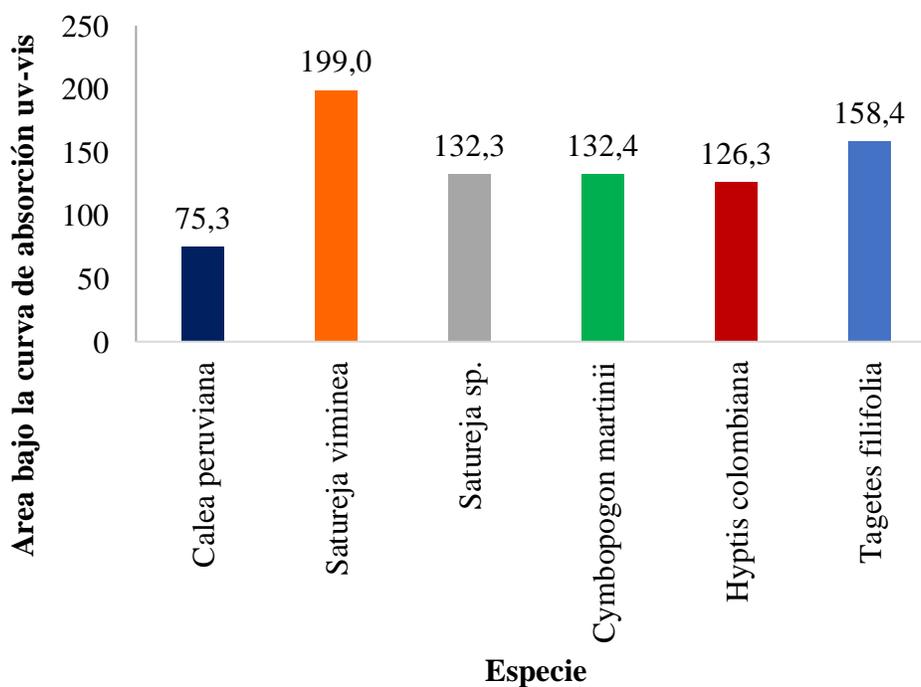
t (min)	M_{ext} (g)	Y (mg _{ext} /g _{mv})	Y_f (mgEAG/g _{mv})	C (g _{ext} /L _{sln})	C_f (gEAG/L _{sln})
0	0	0	0	0	0
10	3,81	12,34	0,47	91,36	3,50
20	6,43	20,83	0,80	201,27	7,72
30	9,48	30,71	1,18	328,30	12,59
60	16,45	53,29	2,04	413,06	15,84

90	22,94	74,31	2,85	472,33	18,12
120	24,24	78,52	3,01	516,99	19,83

A partir de estos resultados se validó que, para la misma especie, a mayor concentración mayor absorbancia. Sin embargo, esto no se mantiene al comparar entre especies, ya que a una misma concentración se pueden presentar absorbancias diferentes pues depende, además de la concentración, del tipo de compuestos y su absortividad molar. En la **Figura 6** se muestra el área bajo la curva para la concentración de 250 mg/L de extracto para cada especie.

Figura 6.

Área bajo la curva de absorbancia en función de la longitud de onda medida por espectroscopia UV-VIS para soluciones de seis especies vegetales a 250 mg/L



A pesar de ser soluciones a una misma concentración, cada una de ellas tiene una capacidad total de absorción diferente. Al contrastar estos resultados con el CFT se observa que una mayor absorbancia no implica directamente una mayor cantidad de fenoles. Como es el caso de la especie *Calea peruviana* que presentó la mayor cantidad de fenoles totales. Al contrario, es el caso de la especie *Tagetes filifolia* que presenta un área mayor y una cantidad de fenoles menor. De esta forma la capacidad de absorción del extracto total no predice entre especies cuál de ellas puede tener mayor cantidad de un compuesto. El área bajo la curva fue determinada mediante el método de integración múltiple trapezoidal. Los espectros uv-vis a 250 mg/L para estas dos especies se encuentra en el apéndice E.

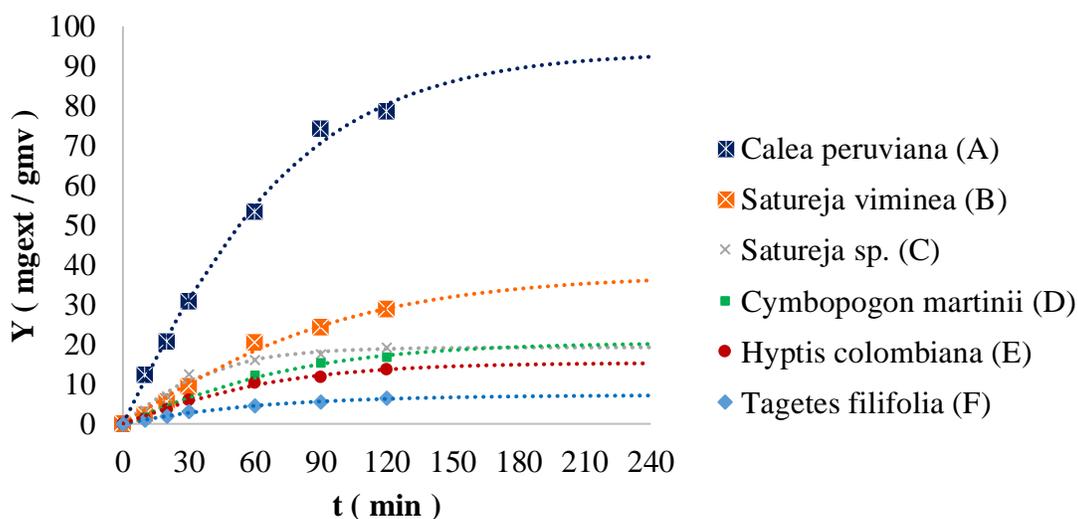
4.2. Modelamiento de la cinética de extracción

De acuerdo con la metodología descrita en la sección 3.2 y el desarrollo del sistema de ecuaciones diferenciales, se modeló la curva de extracción de la oleorresina y se ajustaron sus respectivos parámetros.

En la **Figura 7** se muestra gráficamente el ajuste a los datos experimentales de las seis especies, del modelo basado en la transferencia de masa en dos fases. A diferencia del modelo empírico presentado anteriormente, este modelo está descrito por parámetros físicos medibles que podrían llegar a describir el proceso y explicar el mecanismo del sistema, lo que facilita su entendimiento y es más útil en el planteamiento de etapas de escalamiento (Arias *et al.*, 2022b). Por otro lado, refuerza la hipótesis de que la transferencia de masa en este proceso se divide en dos etapas. (del Valle *et al.*, 2019).

Figura 7.

Rendimiento experimental del proceso de extracción supercrítico a 50 °C y 30 MPa y ajuste a modelo teórico de transferencia de masa.



Los parámetros del modelo matemático de transferencia de masa que lograron el mejor ajuste a los datos experimentales se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4.

Parámetros ajustados del modelo teórico de transferencia de masa

Especie	K₁	K₂	K_a	SCE	R²
<i>Calea peruviana</i>	150	0,557	0,049	0,222	0,996
<i>Satureja viminea</i>	179	0,464	0,028	0,083	0,989
<i>Satureja sp.</i>	4651	2,197	0,005	0,047	0,986
<i>Cymbopogon martinii</i>	218	0,503	0,031	0,015	0,995
<i>Hyptis colombiana</i>	294	0,706	0,027	0,016	0,991
<i>Tagetes filifolia</i>	456	0,302	0,070	0,002	0,995

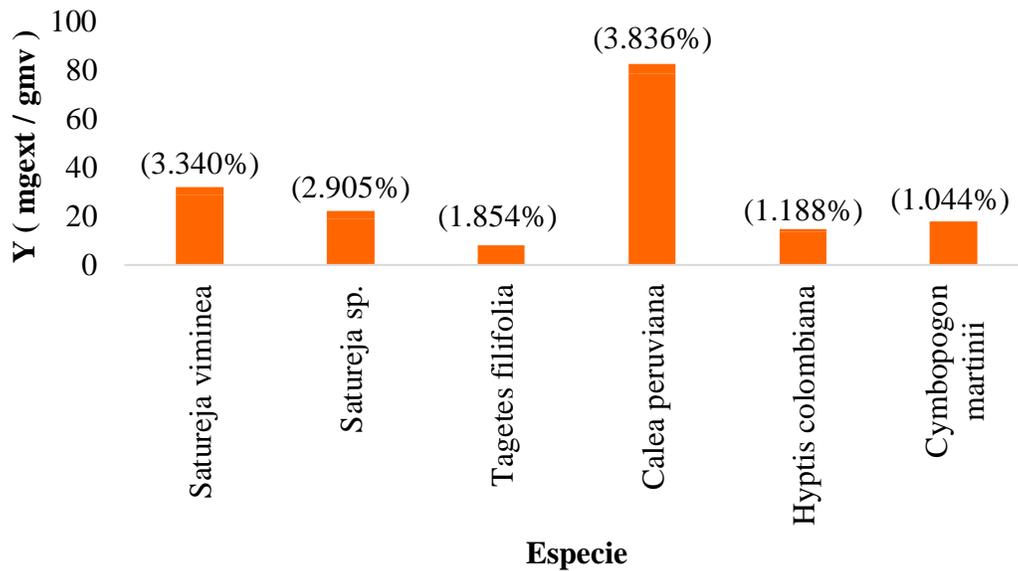
Así como se vio en la fase 1, la especie *Satureja sp.* presentó la tasa de extracción más alta, ya que tuvo los coeficientes más grandes. También se observa que el coeficiente de partición lineal K_2 tiene una magnitud mucho menor que K_1 , lo que robustece la teoría de una transferencia rápida regida por el equilibrio entre las fases fluidas y una transferencia lenta entre la matriz vegetal y la fase líquida. Por otro lado, se logró un buen ajuste para todas las cinéticas de extracción con una suma de cuadrados de los errores que tiende a cero y un coeficiente de determinación de aproximadamente uno para todos los casos. Esto indica que es posible describir el proceso mediante la transferencia de masa de dos fases en equilibrio, pues bajo esta hipótesis se planteó y desarrolló el sistema de ecuaciones diferenciales.

4.3. Evaluación del rendimiento del proceso

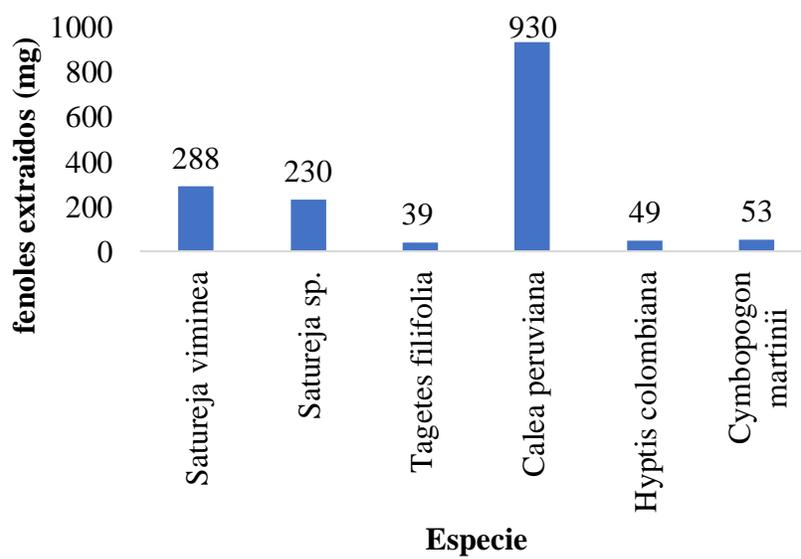
Con el fin de identificar las especies vegetales que podrían ser fuentes de ingredientes naturales en una aplicación industrial se evaluaron los resultados de rendimiento y CFT para las especies en estudio. En la **Figura 8** se muestra un diagrama de barras con los rendimientos de extracción y el porcentaje de fenoles totales entre paréntesis. La especie *Calea peruviana* destaca en este trabajo tanto en rendimiento como en CFT. Especies como las del género *Satureja* podrían también llegar a ser una buena fuente de fenoles a pesar de presentar menor rendimiento que *Calea peruviana*, debido a su alto porcentaje de CFT. La especie *Tagetes filifolia* aunque presenta el menor rendimiento entre las seis especies en estudio, no presenta la menor cantidad de fenoles, ya que a pesar de que la extracción pueda ser homogénea durante el proceso, esto no implica que la cantidad de fenoles extraída por gramo también sea menor. Los resultados que se muestran en esta figura corresponden al parámetro de respuesta más útil para la evaluación de este estudio. En la **Figura 9** se muestra la cantidad de fenoles totales en cada extracto. Se observa que la cantidad de fenoles de *Tagetes filifolia* es la menor, a pesar de no tener el menor porcentaje de fenoles.

Figura 8.

Rendimiento de extracción (barras) y porcentaje de fenoles en el extracto total (entre paréntesis) presentes en los extractos de las seis especies.

**Figura 9.**

Cantidad de fenoles presentes en el extracto según la especie. Obtenidos mediante extracción supercrítica a 50 °C y 30 MPa



Estudios relacionados al contenido de fenoles totales presentes en especies vegetales presentan resultados comparables con los mostrados en este estudio. En la **Tabla 5** se muestran los resultados de algunos estudios realizados con especies vegetales como potencial fuente de fenoles. Aquí se muestra el rango de resultados obtenido para las condiciones trabajadas en cada estudio y la respectiva técnica de extracción utilizada. Entre estas matrices vegetales, el té de assam y las diferentes variedades de té destacan entre las especies más atractivas para los investigadores en estudios enfocados en la relación entre el consumo del té, su composición y la salud humana (Zhu *et al.*, 2006) . Los reportes indican un importante contenido de compuestos fenólicos y alta capacidad antioxidante (Shao *et al.*, 2015). En cuanto a las demás especies mencionadas en la tabla, son reportadas por los autores como potenciales fuentes de fenoles. En este trabajo (cf. **Tabla 2**) se obtuvieron resultados para el CFT dentro del rango y mayores que los resultados mostrados en la **Tabla 5**. En el caso de las especies estudiadas, aún no se reporta en la literatura científica un estudio de sus extractos o su composición para material vegetal posterior a su destilación. Sin embargo, al compararla con las fuentes declaradas en la **Tabla 5**, destacan la especie *Calea peruviana* y las dos especies del género *Satureja* como potenciales fuentes de fenoles para una aplicación en industrias como la farmacéutica o alimentaria. Es el caso de la especie *Camellia sinensis*, que ha mostrado un efecto positivo en la disminución del colesterol total y en el riesgo a padecer diabetes tipo dos (Silva, 2013). De modo que especies como las estudiadas en la presente investigación son una alternativa de estudio como fuentes de fenoles, por lo que debería ampliarse su estudio en miras de determinar su composición, toxicidad y actividad antioxidante.

Tabla 5.

Contenido de fenoles totales para especies vegetales declaradas como potenciales fuentes de fenoles para diferentes técnicas extractivas

Matriz vegetal	Extracción	mg_{EAG} / g_{ext}	Referencia
<i>Camellia sinensis</i> var. Assamica	scCO ₂	0,067-0,269	(Muangrat et al., 2020)
		0,079	(Shao et al., 2015)
	Subcrítica	0,094-0,472	(Uoonlue et al., 2019)
	Soxhlet	0,078-0,378	(Uoonlue et al., 2019)
<i>Solidago gigantea</i>	scCO ₂	3,850-18,670	(Wrona et al., 2019)
Uvas silvestres Vitis (semillas)	Sólido-líquido	16,5	(Poudel et al., 2008b)
Uvas silvestres Vitis (piel)	Sólido-líquido	13,8	(Poudel et al., 2008b)
Cascara de cacao	scCO ₂ con etanol	3,970-13,630	(Valadez et al., 2018)

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo informa sobre el comportamiento de la extracción supercrítica modificada con etanol y agua formando un sistema de dos fases fluidas en contacto con el lecho extractor, para las especies *Satureja viminea*, *Satureja sp.*, *Tagetes filifolia*, *Calea peruviana*, *Cymbopogon martinii* e *Hyptis colombiana*. Bajo las condiciones de operación estudiadas se encontró que la extracción de compuestos minoritarios (fenoles) está fuertemente relacionada con la extracción de la oleorresina total. Además, es posible determinar la concentración del extracto en el tiempo, a partir de espectroscopia UV-VIS. En cuanto a la cantidad de fenoles totales presentes observa que la técnica de extracción permite obtener extractos con una alta cantidad de fenoles en comparación con extractos obtenidos para otras especies reportadas en la literatura para técnicas de extracción supercrítica sin agente modificador y modificada con etanol.

El modelo matemático de transferencia de masa desarrollado bajo la hipótesis de la formación de dos fases en equilibrio logró representar adecuadamente el comportamiento del proceso extractivo. Los resultados permiten resaltar la importancia de la repuesta combinada rendimiento y contenido total de fenoles pues de estos dos parámetros depende la cantidad total que se obtiene de estos compuestos al final del proceso. De las especies estudiadas *Calea peruviana* se presenta como la planta con mayor potencial para la obtención de compuestos fenólicos en una aplicación industrial, debido a que mostró los mejores resultados en este trabajo, con un rendimiento de extracción de $78,52 \text{ mg}_{\text{ext}}/\text{g}_{\text{mv}}$ y con contenido de fenoles totales de $38,36 \text{ mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{ext}}$. Adicionalmente las especies de la familia *Satureja* podrían ser atractivas como fuente de antioxidantes naturales ya que a pesar de no presentar rendimientos tan altos en comparación con *Calea peruviana*, si presentaron un alto contenido de fenoles totales: $33,40 \text{ mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{ext}}$ para *Satureja viminea* y $29,05 \text{ mg}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{ext}}$ para *Satureja sp*

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar optimización de las condiciones de operación ya que es posible que se puedan encontrar mejores resultados de extracción de fenoles en la región de dos fases fluidas en equilibrio.

Se identifica la importancia de realizar una caracterización química de los extractos obtenidos para así identificar los compuestos fenólicos específicos que determinan de forma más completa su posible aplicación industrial.

Para las tres especies que presentaron un mejor resultado se recomienda realizar un estudio comparativo entre la técnica propuesta en este trabajo y la extracción tradicional solido-líquido. Comparando tanto el rendimiento como el CFT. Además de realizar estas extracciones por triplicado y ver qué tanto varían los resultados de una extracción a otra según la técnica utilizada.

Se propone realizar un estudio de la actividad antioxidante de los extractos con el fin de complementar los resultados mostrados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adouni, K., Bendif, H., Zouaoui, O., Kraujalis, P., Flamini, G., Venskutonis, P. R., & Achour, L. (2022). *Antioxidant activity of extracts obtained by high-pressure extraction procedures from *Asparagus stipularis* Forssk.* South African Journal of Botany, 146, 789–793. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2021.12.027>
- Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). *Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16(2), 295–315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>
- Arango, O., Pantoja, D., Santacruz, L., & Hurtado, A. (2012). *Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del alto patía.* Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, 10(2), 79–86. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612012000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Arias, J., Martínez, J., Stashenko, E., del Valle, J. M., & de la Fuente, J. C. (2022). *Supercritical CO₂ extraction of pinocembrin from *Lippia origanoides* distillation residues. 1. Multicomponent solubility and equilibrium partition.* The Journal of Supercritical Fluids, 180, 105426. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2021.105426>
- Arias, J., Mejía, J., Córdoba, Y., Martínez, J. R., Stashenko, E., & del Valle, J. M. (2020). *Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO₂ after steam distillation.* Industrial Crops and Products, 146, 112170. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2020.112170>

- Arias, J., Martínez, J., Stashenko, E., del Valle, J. M., & Núñez, G. (2022). *Supercritical CO₂ extraction of pinocembrin from Lippia origanoides distillation residues. 2. Mathematical modeling of mass transfer kinetics as a function of substrate pretreatment* Elsevier Enhanced Reader.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844621003004>
- Bahar, B., Pelvan, E., Hasbay, I., & Alasalvar, C. (2013). *Decaffeinated black tea: Process optimization and phenolic profiles*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82, 116–121.
<https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2013.07.002>
- Bojanić, N., Teslić, N., Rakić, D., Brdar, M., Fišteš, A., Zeković, Z., Bodroža-Solarov, M., & Pavlić, B. (2019). *Extraction kinetics modeling of wheat germ oil supercritical fluid extraction*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(9).
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14098>
- Carlqvist, K., Wallberg, O., Lidén, G., & Börjesson, P. (2022). *Life cycle assessment for identification of critical aspects in emerging technologies for the extraction of phenolic compounds from spruce bark*. *Journal of Cleaner Production*, 333, 130093.
<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.130093>
- Carmona-Hernandez, J. C., Taborda-Ocampo, G., & González-Correa, C. H. (2021). *Folin-Ciocalteu Reaction Alternatives for Higher Polyphenol Quantitation in Colombian Passion Fruits*. *International Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1155/2021/8871301>
- da Silva Pinto, M. (2013). *Tea: A new perspective on health benefits*. In *Food Research International* (Vol. 53, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.038>

- de Elguea-Culebras, G. O., Bravo, E. M., & Sánchez-Vioque, R. (2022). *Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market – A review*. *Industrial Crops and Products*, 175, 114261. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.114261>
- del Valle, J. M., Martín, Á., Cocero, M. J., de la Fuente, J. C., & de la Cruz - Quiroz, R. (2019). *Supercritical CO₂ extraction of solids using aqueous ethanol as static modifier is a two-step mass transfer process*. *Journal of Supercritical Fluids*, 143, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.08.011>
- Skoog, D., West, D., Holler, F. (2001). *Fundamentos de química analítica*.
- Duarte, C., Aguiar-RICARDO, A., Ribeiro, N., Casimiro, T., & Da PONTE, M. N. (2007). *Correlation of Vapor–Liquid Equilibrium for Carbon Dioxide + Ethanol + Water at Temperatures from 35 to 70°C*. 35(14), 2187–2201. <https://doi.org/10.1081/SS-100102097>
- Durling, N. E., Catchpole, O. J., Tallon, S. J., & Grey, J. B. (2007). *Measurement and modelling of the ternary phase equilibria for high pressure carbon dioxide–ethanol–water mixtures*. *Fluid Phase Equilibria*, 252(1–2), 103–113. <https://doi.org/10.1016/J.FLUID.2006.12.014>
- Fuentes-Gandara, F., Torres, A., Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., Varela, R., Martínez de la Ossa-Fernández, E. J., & Macías, F. A. (2019). *Selective fractionation and isolation of allelopathic compounds from Helianthus annuus L. leaves by means of high-pressure techniques*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 143, 32–41. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2018.08.004>

- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010, April 16). *Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications*. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495–2511. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019)
- Jalloul, A. ben, Chaar, H., Tounsi, M. S., & Abderrabba, M. (2022). *Variations in phenolic composition and antioxidant activities of Scabiosa maritima (Scabiosa atropurpurea sub. maritima L.) crude extracts and fractions according to growth stage and plant part*. *South African Journal of Botany*, 146, 703–714. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2021.12.004>
- King, J. W. (2014). *Modern supercritical fluid technology for food applications*. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 215–238. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092447>
- Kühn, S., & Temelli, F. (2017). *Recovery of bioactive compounds from cranberry pomace using ternary mixtures of CO₂ + ethanol + water*. *Journal of Supercritical Fluids*, 130, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.07.028>
- Marina, D., Avella, G., Alberto, C., García, O., & Cisneros, A. M. (2008). *Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal*. *Simposio de Metrología*, 1–5.
- Martins, G. R., Monteiro, A. F., do Amaral, F. R. L., & da Silva, A. S. (2021). *A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açai (Euterpe oleracea Mart.) seeds extract*. *Journal of Food Science and Technology* 2021 58:12, 58(12), 4693–4702. <https://doi.org/10.1007/S13197-020-04959-5>
- Mesquita, P. C., Rodrigues, L. G. G., Mazzutti, S., da Silva, M., Vitali, L., & Lanza, M. (2021). *Intensified green-based extraction process as a circular economy approach to recover*

- bioactive compounds from soursop seeds (Annona muricata L.). Food Chemistry: X, 12, 100164. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2021.100164>*
- Montenegro, M. F., Tapia-Quirós, P., Vecino, X., Reig, M., Valderrama, C., Granados, M., Cortina, J. L., & Saurina, J. (2021). *Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview. Science of The Total Environment, 801, 149719. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149719>*
- Muangrat, R., & Jirattananangri, W. (2020). *Physicochemical properties and antioxidant activity of oil extracted from Assam tea seeds (Camellia sinensis var. assamica) by supercritical CO₂ extraction. Journal of Food Processing and Preservation, 44(3), e14364. <https://doi.org/10.1111/JFPP.14364>*
- Poudel, P. R., Tamura, H., Kataoka, I., & Mochioka, R. (2008a). *Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. Journal of Food Composition and Analysis, 21(8), 622–625. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2008.07.003>*
- Prakash Maran, J., Manikandan, S., Priya, B., & Gurumoorthi, P. (2013). *Box-Behnken design based multi-response analysis and optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid compounds from tea (Camellia sinensis L.) leaves. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0985-z>*
- Rouessac, F., Rouessac, F., Ourisson, G., & Cuadros Rodríguez, L. (2003). *Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas. McGraw-Hill.*
- Seabra, I. J., Braga, M. E. M., Batista, M. T., & De Sousa, H. C. (2010). *Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from*

elderberry pomace. *Journal of Supercritical Fluids*, 54(2), 145–152.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.05.001>

Seyrekoglu, F., Temiz, H., Eser, F., & Yildirim, C. (2022). *Comparison of the antioxidant activities and major constituents of three Hypericum species (H. perforatum, H. scabrum and H. organifolium) from Turkey*. *South African Journal of Botany*, 146, 723–727.
<https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2021.12.012>

Shao, P., Liu, Q., Fang, Z., & Sun, P. (2015). *Chemical composition, thermal stability and antioxidant properties of tea seed oils obtained by different extraction methods: Supercritical fluid extraction yields the best oil quality*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(3). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400259>

Sovová, H. (2012). *Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times*. *Journal of Supercritical Fluids*, 66.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.11.004>

Tong, Y., Gao, L., Xiao, G., & Pan, X. (2011). *Supercritical CO₂ Extraction of Chlorophyll a from Spirulina platensis with a Static Modifier*. *Chemical Engineering & Technology*, 34(2), 241–248. <https://doi.org/10.1002/CEAT.201000379>

Uoonlue, N., & Muangrat, R. (2019). *Effect of different solvents on subcritical solvent extraction of oil from Assam tea seeds (Camellia sinensis var. assamica): Optimization of oil extraction and physicochemical analysis*. *Journal of Food Process Engineering*, 42(2).
<https://doi.org/10.1111/jfpe.12960>

Valadez-Carmona, L., Ortiz-Moreno, A., Ceballos-Reyes, G., Mendiola, J. A., & Ibáñez, E. (2018). *Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic*

compounds. The Journal of Supercritical Fluids, 131, 99–105.
<https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2017.09.011>

Wrona, O., Rafińska, K., Możejński, C., & Buszewski, B. (2019). *Supercritical carbon dioxide extraction of Solidago gigantea Ait.: Optimization at quarter-technical scale and scale up the process to half-technical plant*. Industrial Crops and Products, 130.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.050>

Zhu, Y. X., Huang, H., & Tu, Y. Y. (2006). *A review of recent studies in China on the possible beneficial health effects of tea*. International Journal of Food Science and Technology, 41(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01076.x>

APÉNDICES

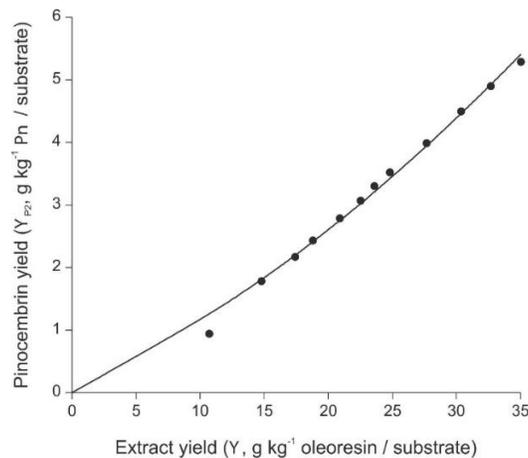
Apéndice A. Extracción homogénea de fenoles

Para la cuantificación de los fenoles totales en cada una de las fracciones recolectadas se asumió que su proporción de extracción fue homogénea a lo largo del proceso.

Un estudio llevado a cabo por (Arias *et al.*, 2022) muestra la relación entre el rendimiento de pinocembrina y el rendimiento de oleoresina para una extracción supercrítica a 50 °C y 34 MPa. La pinocembrina es uno de los compuestos presentes en el extracto. En este trabajo se demuestra que la relación entre estos dos rendimientos está dado por una ecuación de tipo cuadrática donde el coeficiente que acompaña el término cuadrático tiende a cero. Esto indica que la relación entre el rendimiento de un compuesto secundario representativo como la pinocembrina es casi una función lineal del rendimiento de los compuestos principales. En la **Figura A.1** se muestra el resultado de este trabajo llevado a cabo para la especie *Lippia origanoides* quimiotipo carvacrol.

Figura A.1

Relación entre rendimiento de pinocembrina y de extracto total. Tomado de (Arias *et al.*, 2022)



Apéndice B. Determinación de las condiciones de operación

Las condiciones de operación se fijaron considerando la formación de dos fases en equilibrio dentro del sistema. Estas condiciones fueron estimadas teniendo en cuenta el diagrama ternario (CO_2 + etanol + agua) descrito por la ecuación de estado de Peng-Robinson y las reglas de mezcla de Wong-Sandler a $40\text{ }^\circ\text{C}$ y 30 MPa (Durling *et al.*, 2007). Se trabajó en un punto de operación por debajo de la curva que delimita la región de dos fases de la región de una sola fase. En la **Figura A.2** se ve el punto de operación establecido a partir del cual se estimaron las composiciones en cada una de las fases. Donde (a) corresponde a la composición global del sistema, (b) la composición de la fase líquida y (c) la composición de la fase supercrítica. En la **Tabla A.1** se muestran las composiciones antes mencionadas.

Figura A.2

Diagrama ternario para la mezcla CO_2 -etanol-agua a $40\text{ }^\circ\text{C}$ y 30 MPa . Figura tomada y adaptada de (Durling *et al.*, 2007).

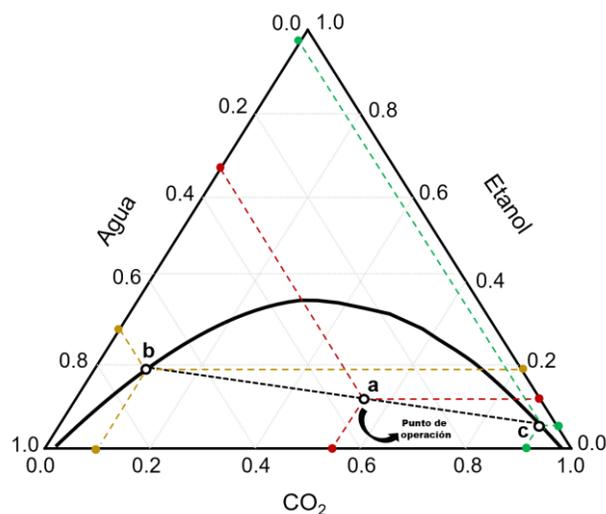


Tabla A.1

Composición de las fases dentro del sistema de extracción tomadas del diagrama ternario a 40 °C y 30 MPa tomada de (Durling *et al.*, 2007).

Región	XCO₂	XH₂O	XC₂H₅OH
Global	0,53	0,36	0,11
Supercrítica	0,93	0,02	0,05
Líquida	0,11	0,71	0,18

Para el cálculo de las condiciones de operación se siguió la siguiente secuencia de operaciones:

- Volumen de material vegetal en el tanque (V_{mv}) al considerar la masa cargada (M) que ocupó dos tercios del volumen total del tanque y la densidad estimada del material vegetal ($\rho_{mv} = 1,05 \text{ g/cm}^3$)

$$V_{mv} = M / \rho_{mv} \quad (\text{Ec. 9})$$

- Volumen del tanque (V_{TK}) calculado a partir del área transversal ($A = 45,6 \text{ cm}^2$) y la altura ($h = 41 \text{ cm}$).

$$V_{TK} = A * h \quad (\text{Ec. 10})$$

- Volumen disponible para la mezcla de solventes dentro del tanque (V_{dis}).

$$V_{dis} = V_{TK} - V_{mv} \quad (\text{Ec. 11})$$

- Volumen de la mezcla de modificadores líquidos (V_L) dentro del tanque, escogida arbitrariamente como una tercera parte del volumen disponible para la mezcla de solventes.

$$V_L = V_{dis} / 3 \quad (\text{Ec. 12})$$

- Volumen del scCO₂ dentro del tanque (V_{sc}) al considerar volumen disponible para la mezcla de solventes.

$$V_{SC} = V_{dis} - V_L \quad (\text{Ec. 13})$$

- Volumen de etanol (V_{et}) y agua (V_w) que se debe cargar previo al tiempo estático, considerando la composición global del sistema (punto a). Se debe calcular el porcentaje en volumen de la mezcla compuesta por etanol y agua.

$$V_{et} = V_L / 2 \quad (\text{Ec. 14})$$

$$V_w = V_L - V_{et} \quad (\text{Ec. 15})$$

- Determinación del flujo masico total (F_T) alimentado al sistema durante el tiempo dinámico al considerar un valor arbitrario de velocidad superficial del fluido (V_s) menor que la unidad y la densidad del flujo total ($\rho_{sc} = 0,91 \text{ g/cm}^3$) que se aproximó a la del CO₂ puro, pues la corriente está enriquecida en este compuesto.

$$F_T = V_S * A * \rho_{sc} \quad (\text{Ec. 16})$$

- Determinación del flujo másico de cada solvente alimentado al sistema durante el tiempo dinámico al considerar los valores de composición global de la fase que sale del sistema, que corresponde a la fase supercrítica en la **Tabla A.1**
- Para estos cálculos se estableció un valor de velocidad superficial condicionado a un flujo masico de CO₂ de 40 g/min. En este caso ($V_s = 1,03 \text{ cm/min}$)

Apéndice C. Resultados de las extracciones supercríticas en dos fases

Durante las extracciones se recolectó el extracto en fracciones durante seis momentos, en la **Tabla A.2** se muestra el rendimiento experimental acumulado de extracción para las seis especies en el tiempo y en la **Tabla A.3** se muestra su respectivo valor teórico predicho por el modelo empírico ajustado.

Tabla A.2

Rendimientos de extracción experimentales acumulados para las especies estudiadas. Extracción supercrítica a 50 °C y 30 MPa en dos fases.

t (min)	Y (mg _{ext} / g _{mv})					
	<i>Satureja viminea</i>	<i>Satureja sp.</i>	<i>Tagetes filifolia</i>	<i>Calea peruviana</i>	<i>Cymbopogon martinii</i>	<i>Hyptis colombiana</i>
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	2,13	3,23	0,83	12,34	1,70	1,05
20	5,50	6,92	1,84	20,83	4,03	3,60
30	9,46	12,42	3,07	30,71	6,09	5,86
60	20,41	16,13	4,54	53,29	12,31	10,30
90	24,23	17,60	5,46	74,31	15,32	11,82
120	28,77	19,09	6,38	78,52	16,86	13,73

Tabla A.3

Rendimientos de extracción teóricos acumulados para las especies estudiadas. Extracción supercrítica a 50 °C y 30 MPa en dos fases. Predicción a partir de modelo empírico.

t (min)	$\hat{Y}(\text{mg}_{\text{ext}} / \text{g}_{\text{mv}})$					
	<i>Satureja viminea</i>	<i>Satureja sp.</i>	<i>Tagetes filifolia</i>	<i>Calea peruviana</i>	<i>Cymbopogon martinii</i>	<i>Hyptis colombiana</i>
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	3,65	4,54	1,07	11,81	2,43	2,14
20	7,01	8,05	1,99	22,32	4,62	4,01
30	10,12	10,77	2,77	31,69	6,58	5,66
60	18,09	15,75	4,52	54,08	11,38	9,49
90	24,37	18,06	5,62	69,90	14,87	12,09
120	29,31	19,12	6,31	81,07	17,41	13,84
150	33,20	19,62	6,75	88,97	19,26	15,03
180	36,27	19,85	7,02	94,55	20,61	15,84
210	38,68	19,95	7,20	98,49	21,59	16,38
240	40,58	20,00	7,30	101,27	22,30	16,75

Apéndice D. Resultados de la cuantificación de fenoles mediante Folin-Ciocalteu

Para la cuantificación de fenoles totales presentes en el extracto total obtenido se calcularon los resultados a partir de una curva de calibración de ácido gálico. En la **Tabla A.4** se muestran los resultados obtenidos a partir de ácido gálico, con los cuales se construyó dicha curva de

calibración. Esta curva se preparó por duplicado ya que las desviaciones entre los valores obtenidos son pequeñas y por ende no fue necesaria una tercera réplica.

Tabla A.4

Resultados de absorbancia para experimento de *Folin-Ciocalteu* al patrón de ácido gálico

$\frac{mg_{ext}}{L}$	ABSORBANCIA			S
	R1	R2	PROM	
70	0,946	0,942	0,944	0,003
50	0,702	0,694	0,698	0,006
30	0,4353	0,4374	0,4364	0,0015
15	0,2261	0,2289	0,2275	0,0020
5	0,076	0,082	0,079	0,004

En la **Tabla A.5** se muestra la absorbancia obtenida para cada una de las cinco diluciones preparadas para las seis especies en el experimento para la determinación del CFT. Aquí se muestran los resultados del experimento por triplicado, su respectiva desviación estándar y cálculo del CFT. Inicialmente el cálculo se hizo para cada dilución y luego se recalculó para la solución madre usando el factor de dilución. Aquellas absorbancias que superaron el valor promedio máximo de absorbancia de la curva de calibración de ácido gálico no son consideradas (estas se presentan en color rojo). Aquí se puede observar que el CFT es definido en un punto de absorbancia central de la curva de calibración (este punto se muestra en color amarillo).

En la columna uno se indica la concentración de la solución stock y en la tres la concentración de la dilución que se preparó y montó en la respectiva placa de lectura junto con los reactivos.

Tabla A.5

Resultados de absorbancia experimento de *Folin-Ciocalteu* para las seis especies estudiadas.

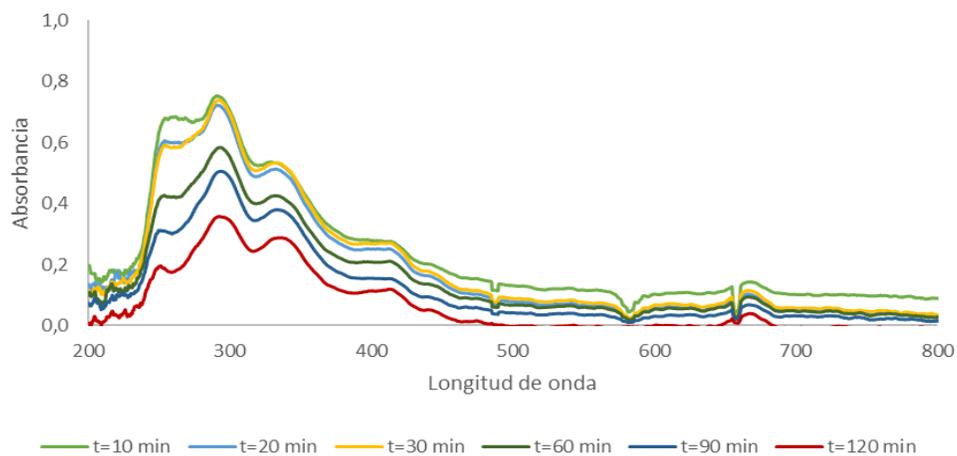
$\frac{mg_{ext}}{mL}$	Especie	$\frac{mg_{ext}}{L}$	ABSORBANCIA				S	$\frac{mg_{EAG}}{L}$	$\frac{mg_{EAG}}{L_{sln stock}}$	$\frac{mg_{EAG}}{g_{ext}}$
			R1	R2	R3	PROM				
100,6	<i>Calea peruviana</i>	3000	1,26	1,28	1,38	1,31	0,07	96,31	3230	32,10
		2000	0,93	0,92	1,07	0,97	0,08	71,23	3583	35,62
		1500	0,75	0,72	0,82	0,76	0,05	55,37	3713	36,91
		1000	0,52	0,52	0,56	0,54	0,025	38,36	3859	38,36
		500	0,26	0,27	0,27	0,26	0,007	17,87	3595	35,74
100,5	<i>Tagetes filifolia</i>	3000	0,66	0,68	0,68	0,67	0,014	48,72	1632	16,24
		2000	0,55	0,49	0,51	0,52	0,031	37,09	1864	18,54
		1500	0,43	0,40	0,42	0,42	0,019	29,36	1967	19,57
		1000	0,28	0,31	0,32	0,30	0,020	20,65	2076	20,65
		500	0,17	0,19	0,19	0,18	0,013	11,69	2349	23,37
100,7	<i>Satureja viminea</i>	3000	1,36	1,41	1,46	1,41	0,053	104,22	3498	34,74
		2000	0,93	0,92	1,00	0,95	0,038	69,66	3508	34,83
		1500	0,72	0,72	0,75	0,73	0,016	52,84	3547	35,23
		1000	0,46	0,47	0,48	0,47	0,011	33,40	3363	33,40
		500	0,21	0,22	0,23	0,22	0,007	14,78	2976	29,56
100,9	<i>Hypis colombiana</i>	3000	0,49	0,52	0,49	0,50	0,016	35,63	1198	11,88
		2000	0,37	0,36	0,36	0,36	0,008	25,32	1277	12,66
		1500	0,29	0,30	0,30	0,29	0,006	20,20	1359	13,46
		1000	0,21	0,22	0,21	0,21	0,007	14,21	1433	14,21

100,6	<i>Satureja sp.</i>	500	0,12	0,14	0,13	0,13	0,009	7,84	1583	15,69
		3000	1,06	1,11	1,06	1,08	0,027	79,09	2652	26,36
		2000	0,73	0,75	0,78	0,75	0,022	54,84	2758	27,42
		1500	0,58	0,59	0,64	0,60	0,033	43,58	2923	29,05
		1000	0,42	0,40	0,44	0,42	0,021	29,61	2979	29,61
		500	0,21	0,21	0,23	0,22	0,013	14,56	2929	29,12
100,9	<i>Cymbopogon martinii</i>	3000	0,41	0,46	0,46	0,44	0,028	31,31	1053	10,44
		2000	0,30	0,34	0,34	0,33	0,019	22,60	1140	11,30
		1500	0,24	0,27	0,26	0,26	0,015	17,46	1174	11,64
		1000	0,19	0,20	0,20	0,20	0,009	12,78	1290	12,78
		500	0,12	0,12	0,12	0,12	0,004	7,10	1433	14,21

Apéndice E. Resultados de las mediciones espectroscópicas a los extractos

Figura A.3

Espectros de absorbancia para las fracciones recolectadas en el tiempo de extracción para la especie *Satureja viminea*.



En las **Figuras A.3 a A.8** se muestran los espectros obtenidos para cada una de las fracciones recolectadas en el tiempo para cada especie. A partir de estas mediciones y con ayuda de una curva de calibración por especie, posteriormente se determinó la concentración de extracto para cada fracción.

Figura A.4

Espectros de absorbancia para las fracciones recolectadas en el tiempo de extracción para la especie *Satureja sp.*

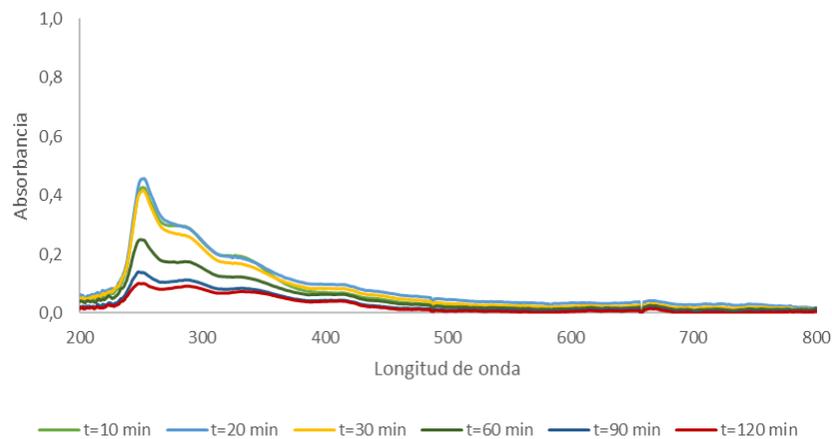


Figura A.5

Espectros de absorbancia para las fracciones recolectadas en el tiempo de extracción para la especie *Tagetes filifolia*.

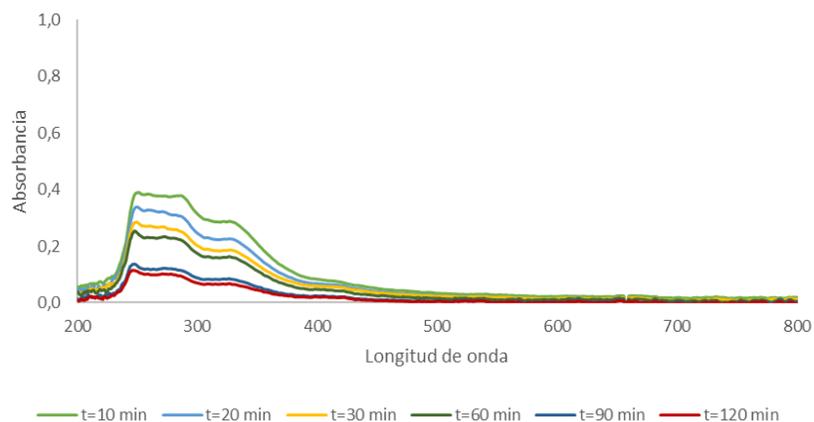
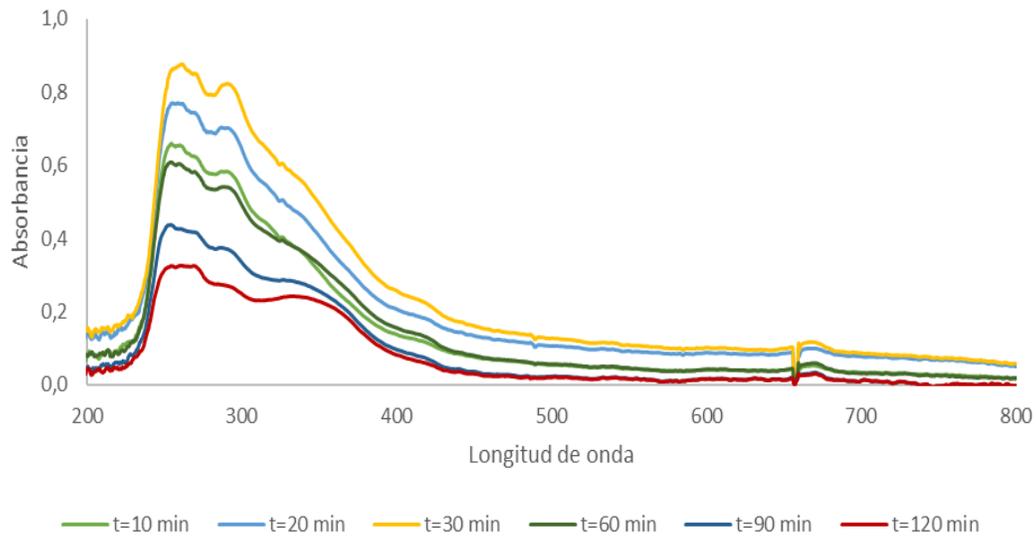


Figura A.6

Espectros de absorbancia para las fracciones recolectadas en el tiempo de extracción para la especie *Calea peruviana*.

**Figura A.7**

Espectros de absorbancia para las fracciones recolectadas en el tiempo de extracción para la especie *Cymbopogon martinii*.

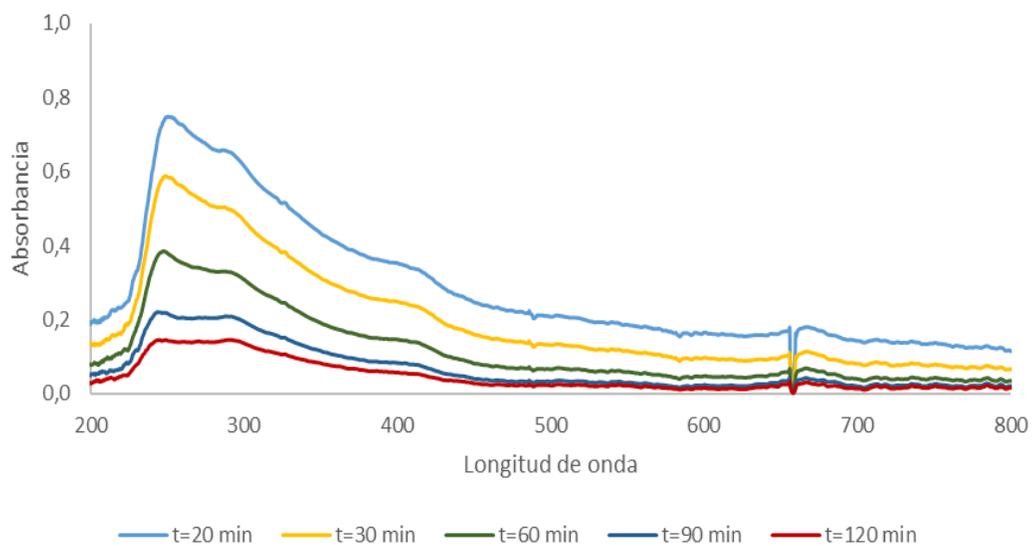
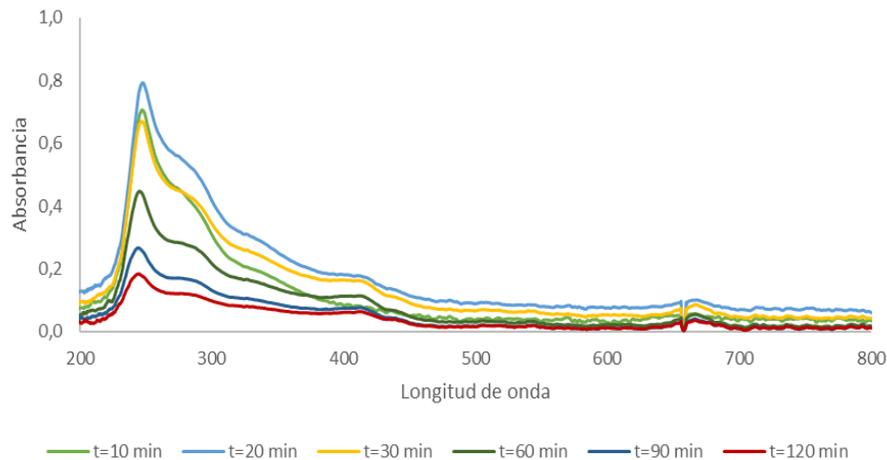


Figura A.8

Espectros de absorbancia para las fracciones recolectadas en el tiempo de extracción para la especie *Hyptis colombiana*



De la **Figura A.9 a A.14** se muestran los espectros para las cinco soluciones preparadas para cada especie, esto para la construcción de sus respectivas curvas de calibración con el fin de determinar de la concentración del extracto en las fracciones recolectadas durante la extracción.

Figura A.9

Espectros de absorbancia para Las curvas de calibración a partir del extracto total para la especie *Satureja viminea*

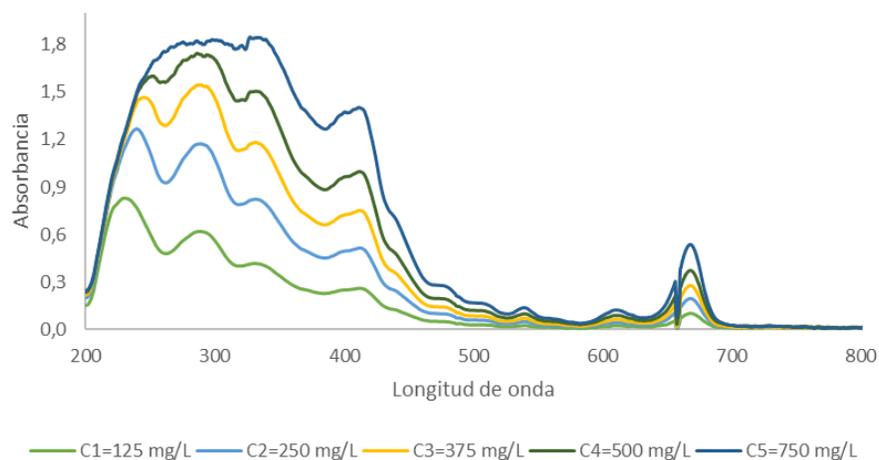
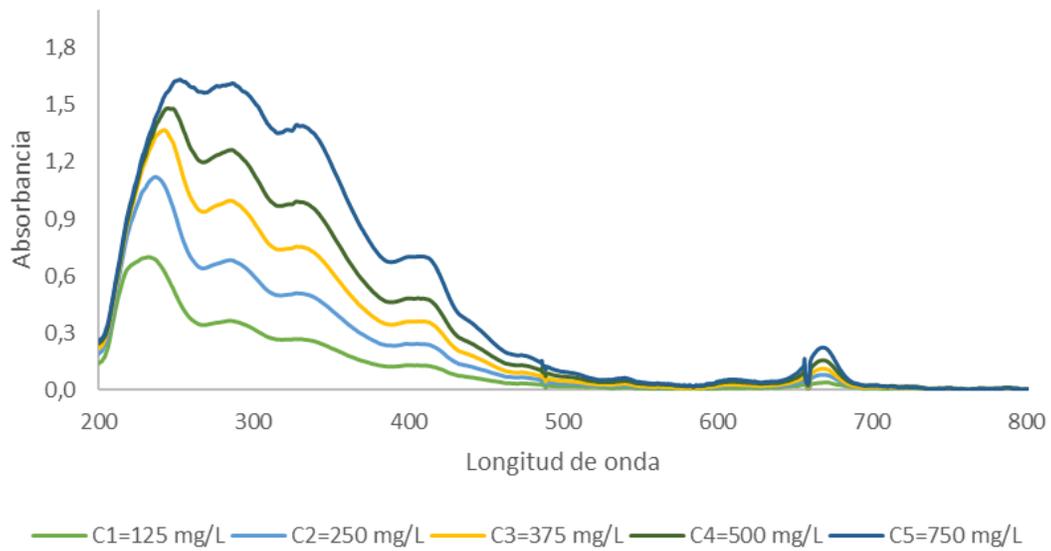


Figura A.10

Espectros de absorbancia para Las curvas de calibración a partir del extracto total para la especie *Satureja sp.*

**Figura A.11**

Espectros de absorbancia para Las curvas de calibración a partir del extracto total para la especie *Tagetes filifolia.*

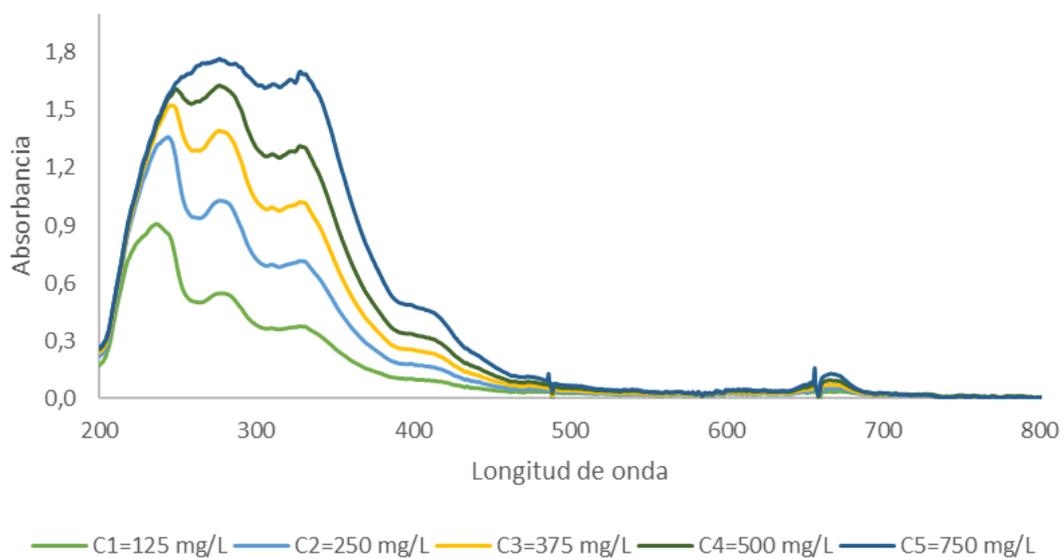
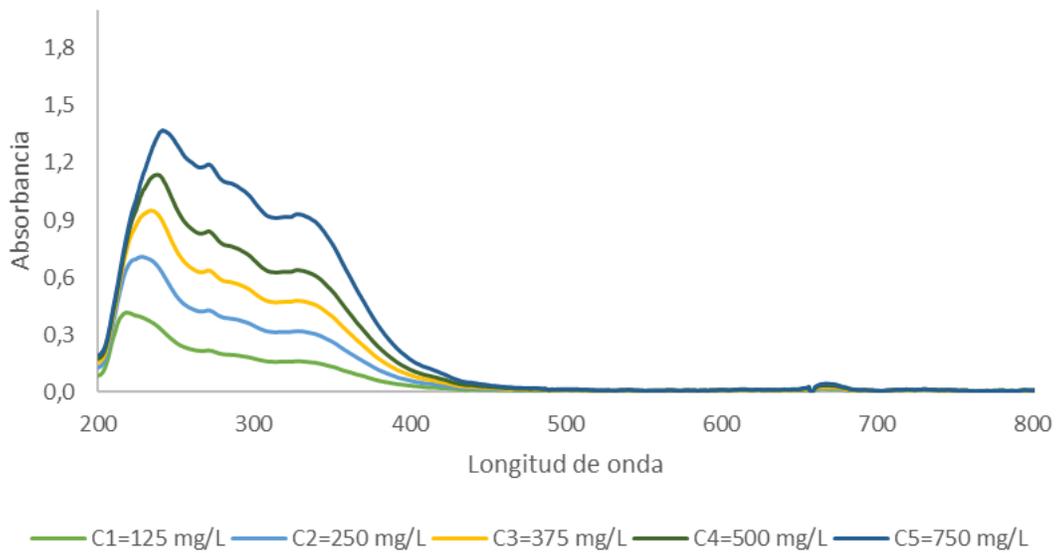


Figura A.12

Espectros de absorbancia para Las curvas de calibración a partir del extracto total para la especie *Calea peruviana*.

**Figura A.13**

Espectros de absorbancia para Las curvas de calibración a partir del extracto total para la especie *Cymbopogon martinii*.

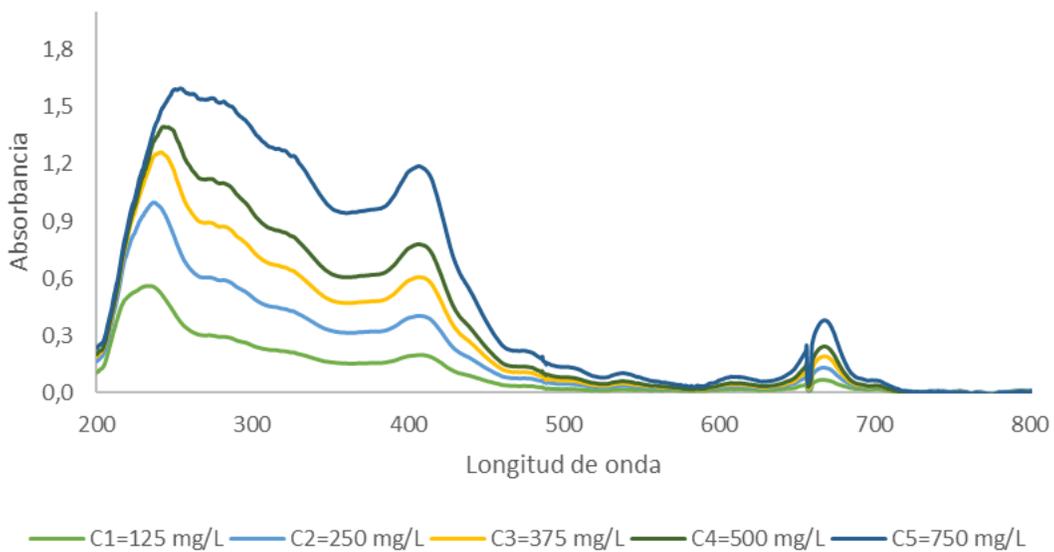
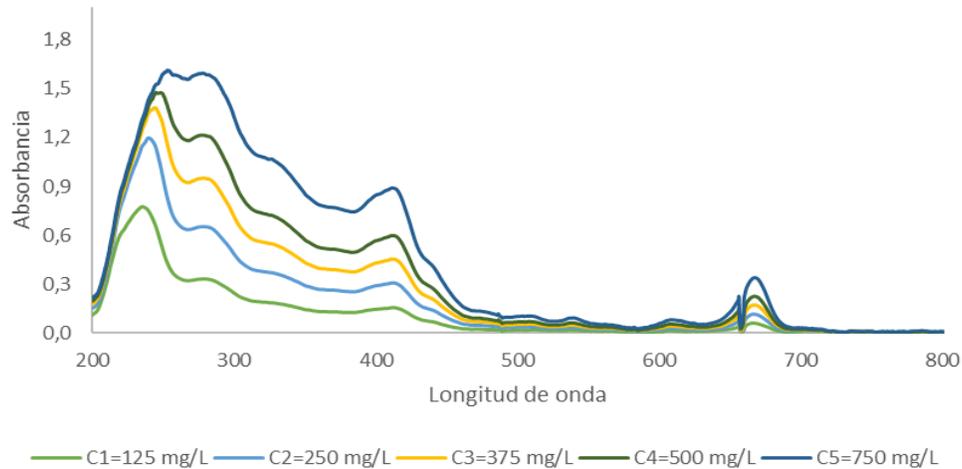


Figura A.14

Espectros de absorbancia para Las curvas de calibración a partir del extracto total para la especie *Hyptis colombiana*.



De la **Figura A.15** a la **A.20** se muestran las curvas de calibración que se construyeron a partir de los espectros antes presentados. Cada curva fue construida a una longitud de onda según la especie en estudio.

Figura A.15

Curva de calibración construida a partir de los espectros de absorbancia a partir del extracto total para la especie *Satureja viminea* a una longitud de onda de 331 nm.

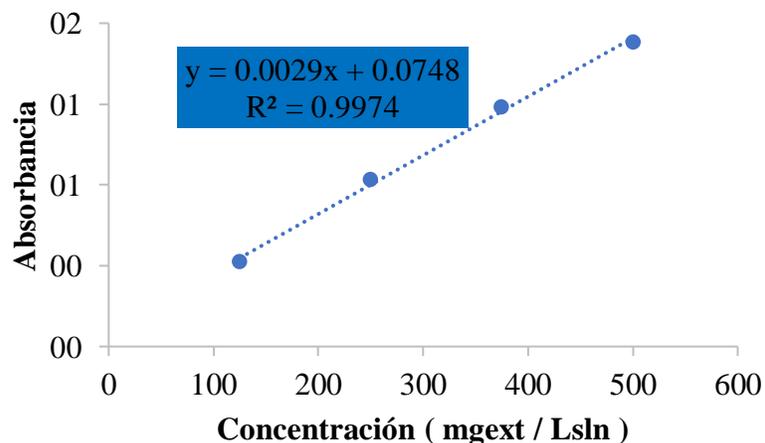
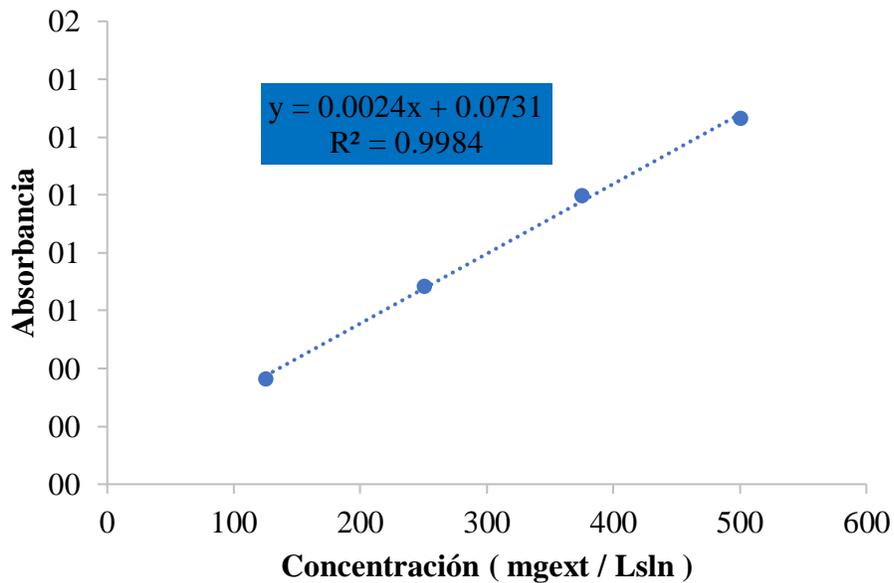


Figura A.16

Curva de calibración construida a partir de los espectros de absorbancia a partir del extracto total para la especie *Satureja sp.* a una longitud de onda de 285 nm.

**Figura A.17**

Curva de calibración construida a partir de los espectros de absorbancia a partir del extracto total para la especie *Tagetes filifolia* a una longitud de onda de 327 nm.

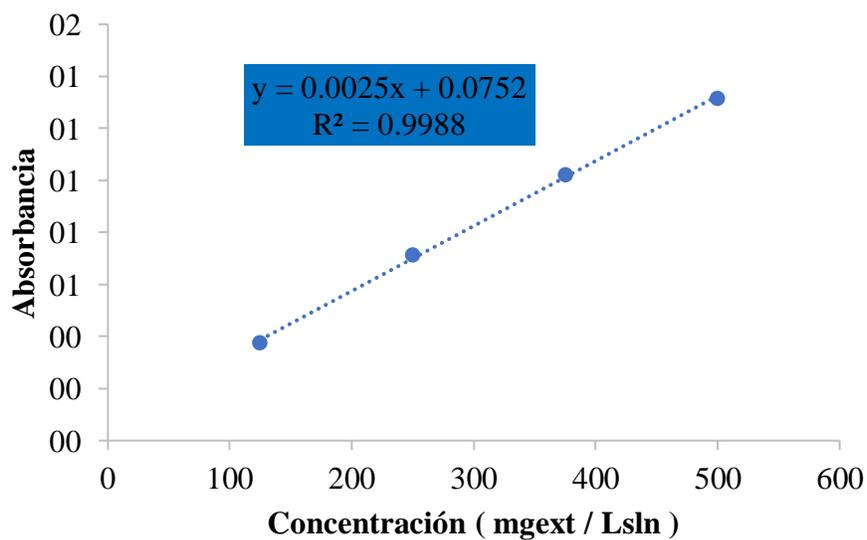
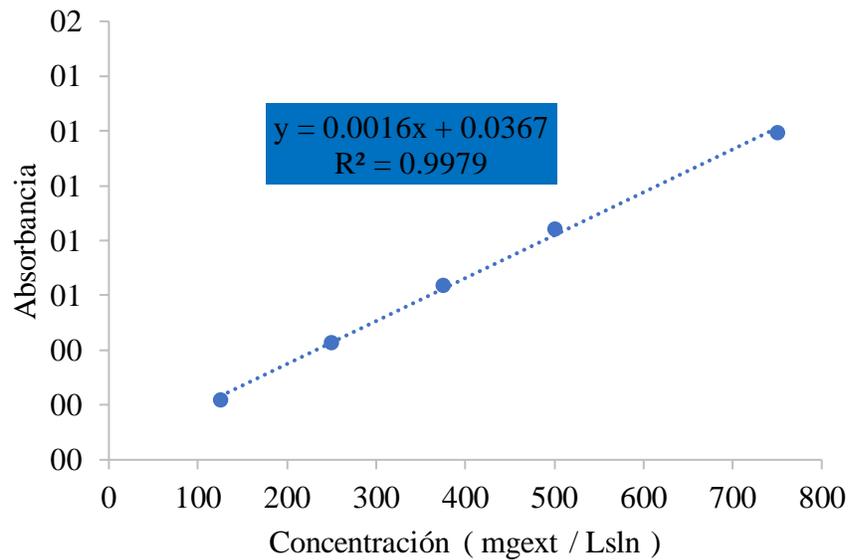


Figura A.18

Curva de calibración construida a partir de los espectros de absorbancia a partir del extracto total para la especie *Calea peruviana* a una longitud de onda de 271 nm.

**Figura A.19**

Curva de calibración construida a partir de los espectros de absorbancia a partir del extracto total para la especie *Cymbopogon martinii* a una longitud de onda de 407 nm

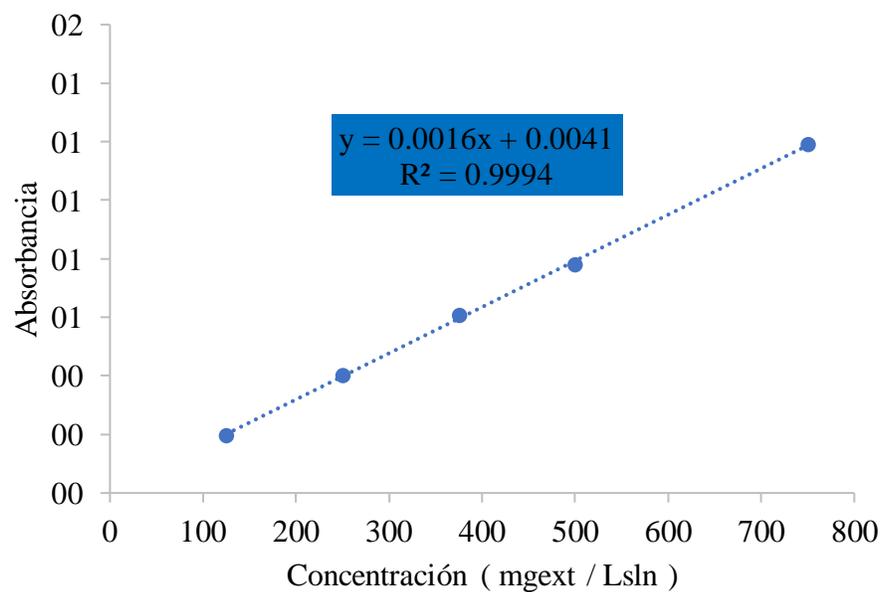
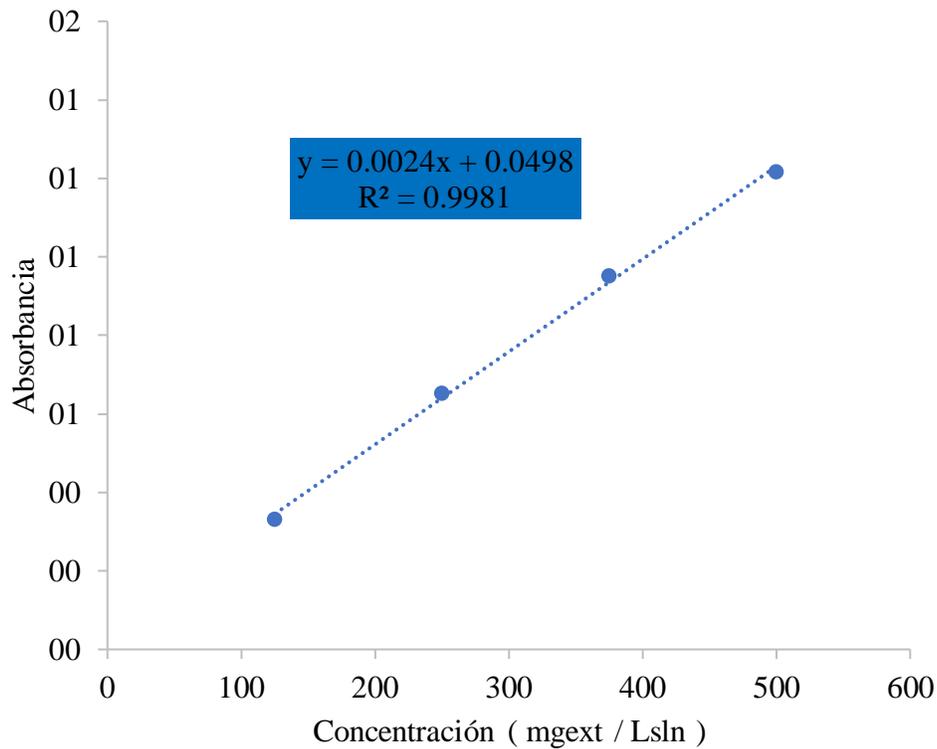


Figura A.20

Curva de calibración construida a partir de los espectros de absorbancia a partir del extracto total para la especie *Hyptis colombiana* a una longitud de onda de 277 nm.

**Apéndice F. Comportamiento del extracto durante el proceso**

De la **Tabla A.6** a la **Tabla A.11** se muestran los resultados compilados de la fase 1. Aquí se puede observar el comportamiento de la extracción durante el proceso. Se muestra la masa de extracto, el rendimiento total, el rendimiento de extracción de fenoles, la concentración de extracto total y la concentración de fenoles. Estos datos son acumulados conforme transcurre el proceso.

Tabla A.6Comportamiento de la extracción supercrítica de *Satureja viminea* a 50 °C y 30 MPa.

t (min)	M_{ext} (g)	Y (mg _{ext} /g _{mv})	Y_f (mgEAG/g _{mv})	C (g _{ext} /L _{sln})	C_f (gEAG/L _{sln})
0	0	0	0	0	0
10	0,6402	2,13	0,07	79,11	2,64
20	1,6494	5,50	0,18	154,58	5,16
30	2,8394	9,46	0,32	233,36	7,79
60	6,1218	20,41	0,68	293,81	9,81
90	7,2686	24,23	0,81	346,14	11,56
120	8,6318	28,77	0,96	382,44	12,77

Tabla A.7Comportamiento de la extracción supercrítica de *Satureja sp.* a 50 °C y 30 MPa.

t (min)	M_{ext} (g)	Y (mg _{ext} /g _{mv})	Y_f (mgEAG/g _{mv})	C (g _{ext} /L _{sln})	C_f (gEAG/L _{sln})
0	0	0	0	0	0
10	1,3391	3,23	0,09	46,16	1,34
20	2,8725	6,92	0,20	91,96	2,67
30	5,1546	12,42	0,36	131,77	3,83
60	6,6947	16,13	0,47	152,96	4,44
90	7,3032	17,60	0,51	161,09	4,68
120	7,9221	19,09	0,55	164,89	4,79

Tabla A.8Comportamiento de la extracción supercrítica de *Tagetes filifolia* a 50 °C y 30 MPa.

t (min)	M_{ext} (g)	Y (mg _{ext} /g _{mv})	Y_f (mgEAG/g _{mv})	C (g _{ext} /L _{sln})	C_f (gEAG/L _{sln})
0	0	0	0	0	0
10	0,27	0,83	0,02	28,28	0,52
20	0,6	1,84	0,03	48,33	0,90
30	1,00	3,07	0,06	63,13	1,17
60	1,48	4,54	0,08	74,65	1,38
90	1,78	5,46	0,10	75,75	1,40
120	2,08	6,38	0,12		

Tabla A.9Comportamiento de la extracción supercrítica de *Calea peruviana* a 50 °C y 30 MPa.

t (min)	M_{ext} (g)	Y (mg _{ext} /g _{mv})	Y_f (mgEAG/g _{mv})	C (g _{ext} /L _{sln})	C_f (gEAG/L _{sln})
0	0	0	0	0	0
10	3,81	12,34	0,47	91,36	3,50
20	6,43	20,83	0,80	201,27	7,72
30	9,48	30,71	1,18	328,30	12,59
60	16,45	53,29	2,04	413,06	15,84
90	22,94	74,31	2,85	472,33	18,12
120	24,24	78,52	3,01	516,99	19,83

Tabla A.10Comportamiento de la extracción supercrítica de *Cymbopogon martinii* a 50 °C y 30 MPa.

t (min)	M_{ext} (g)	Y (mg _{ext} /g _{mv})	Y_f (mg _{EAG} /g _{mv})	C (g _{ext} /L _{sln})	C_f (g _{EAG} /L _{sln})
0	0	0	0	0	0
10	0,5105	1,70	0,02	32,41	0,34
20	1,2085	4,03	0,04	85,25	0,89
30	1,8279	6,09	0,06	122,24	1,28
60	3,6939	12,31	0,13	143,76	1,50
90	4,5945	15,32	0,16	155,65	1,62
120	5,0565	16,86	0,18	163,47	1,71

Tabla A.11Comportamiento de la extracción supercrítica de *Hyptis colombiana* a 50 °C y 30 MPa.

t (min)	M_{ext} (g)	Y (mg _{ext} /g _{mv})	Y_f (mg _{EAG} /g _{mv})	C (g _{ext} /L _{sln})	C_f (g _{EAG} /L _{sln})
0	0	0	0	0	0
10	0,3158	1,05	0,01	41,20	0,49
20	1,0814	3,60	0,04	93,26	1,11
30	1,7585	5,86	0,07	134,51	1,60
60	3,0886	10,30	0,12	158,72	1,89
90	3,5473	11,82	0,14	171,25	2,03
120	4,1184	13,73	0,16	178,72	2,12