

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO DE**  
***Lippia origanoides*, QUIMIOTIPO TIMOL**

**DIEGO EDUARDO ESTANISLAO CASTIBLANCO TOPÍA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**  
**FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**BUCARAMANGA**

**2015**

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO DE**

***Lippia origanoides*, quimiotipo timol**

**DIEGO EDUARDO ESTANISLAO CASTIBLANCO TOPÍA**

**Trabajo de grado en modalidad de investigación, presentado para optar al  
título de Ingeniero Químico**

**Director**

**JAIRO RENÉ MARTINEZ**

**Químico. Ph.D**

**Co-director**

**Ing. ANDERSON JULIÁN ARIAS**

**Estudiante Doctorado**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTADO DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2015**

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>4. MARCO TEÓRICO</b>	<b>16</b>
4.1 <i>Lippia origanoides</i> :	16
4.2 FLAVONOIDES:	16
4.3 FLUIDO SUPERCRÍTICO:	17
4.4. EXTRACCIÓN CON CO <sub>2</sub> SUPERCRÍTICO (CO <sub>2</sub> -SE)	18
4.4.1 DIÓXIDO DE CARBONO, CO <sub>2</sub>	18
4.4.2 PROCESO CO <sub>2</sub> -SE	20
4.5 DISEÑO EXPERIMENTAL:	23
4.6 OPTIMIZACIÓN SIMPLEX:	24
4.7 CALIBRACIÓN MULTIVARIADA	25
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>26</b>
5.1 ACONDICIONAMIENTO DE MATERIA PRIMA.	26
5.2 EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO	26
5.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL Y CONDICIONES DE OPERACIÓN	28
5.2.2. OPTIMIZACIÓN POR EL MÉTODO “SIMPLEX”	29
5.3 HPLC	29
5.4 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	30
<b>6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.</b>	<b>31</b>
6.1 DISEÑO FACTORIAL FRACCIONADO 2 <sup>6-2</sup> .	31
ANÁLISIS DE VARIANZA	33
6.2 OPTIMIZACIÓN SIMPLEX	39
6.3 CALIBRACIÓN	44
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>

<b>8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>47</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>53</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>59</b>

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Orden de magnitud de las propiedades físicas de solventes en diferentes estados. ....	18
<b>Tabla 2.</b> Variables y sus respectivos niveles usados en el diseño experimental $2^{6-2}$ . ....	29
<b>Tabla 3.</b> Masas de extracto entre 0 y 1 g. ....	31
<b>Tabla 4.</b> Masas de extracto entre 1 y 3 g. ....	32
<b>Tabla 5.</b> Masa de extracto mayor de 3 g. ....	33
<b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza para las fracciones uno y dos como observables. ...	34
<b>Tabla 7.</b> ANOVA para los efectos estandarizados del total de extracto <b>M</b> . ....	38
<b>Tabla 8.</b> Resultados obtenidos al realizar la optimización Simplex. ....	40
<b>Tabla 9.</b> Puntos de mayor rendimiento por extracción. ....	41

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras para los flavonoides hallados en los tres quimiotipos de <i>Lippia origanoides</i> . .....	17
<b>Figura 2.</b> Esquema del equipo SFE .....	27
<b>Figura 3.</b> Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de la totalidad de la muestra obtenida <b>M</b> . .....	36
<b>Figura 4.</b> Gráfico de probabilidad media. ....	37
<b>Figura 5.</b> Gráfico de superficie de respuesta usando un porcentaje de etanol del 6.6%, un tiempo de extracción de 94 minutos en el modelo obtenido. ....	43

## LISTADO DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Diagrama de densidades para el $\text{CO}_2$ .....	59
<b>Anexo B.</b> Molino de corte .....	60
<b>Anexo C.</b> Planta piloto de extracción con fluido supercrítico.....	61
<b>Anexo D.</b> Datos complementarios.....	62
<b>Anexo E.</b> Cromatograma obtenido a partir de los extractos de la fracción 1 y 2...	73

## RESUMEN

TITULO: OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO DE *Lippia origanoides*\*, quimiotipo timol.

AUTOR: Diego Eduardo Estanislao Castiblanco Topía.\*\*

PALABRAS CLAVES: Fluido supercrítico, extracción, productos naturales, antioxidantes, HPLC, Optimización Simplex.

*Lippia origanoides* es una planta que fue estudiada en repetidas ocasiones para obtener compuestos útiles en diversos ámbitos. Se le ha encontrado utilidad en las industrias farmacéutica y cosmética, esto la hace una especie promisoría. Se realizaron extracciones de esta planta usando CO<sub>2</sub> supercrítico, para determinar las variables que gobiernan el proceso a partir de 6 básicas, manipulables por el equipo de extracción a escala piloto instalado en el CENIVAM. Estas variables son Presión (P), Temperatura (T), Flujo de Solvente (F), Tamaño de partícula (Z), tiempo de extracción (t) y porcentaje de cosolvente o modificador de polaridad (E). Se usó un diseño factorial fraccionado 2<sup>6-2</sup> con dos niveles, para las variables seleccionados, de esta manera: E (0–15 %), t (60–120 min), Z (0,5-2 mm), F (10–60 g/min), T (40–60°C), P (100–450 bar). Las variables con mayor relevancia fueron la presión, el flujo de solvente, tiempo de extracción y el porcentaje de etanol; lo que se comprobó por medio de un análisis de varianza y se pudo observar que la presión gobierna el proceso representando el 40% de variabilidad. Una vez obtenidas las variables de mayor relevancia se realizó una optimización "Simplex", con el fin de determinar las condiciones en las cuales el proceso daba por resultado la mayor cantidad de extracto. Se obtuvo un rendimiento máximo del 1,24 % a partir de 500 gramos de material a unas condiciones de P (400 bar), F (50 g/min), t (120 min) y E (10%); adicionalmente se encontró un punto en el cual el rendimiento fue de 1,16 %, pero con la ventaja de que las condiciones fueron más bajas: P (307 bar), F (43 g/min), t (92 min), E (4,5 %); la pérdida de extracto es pequeña al emplear estas condiciones.

---

\* Proyecto de Grado

\*\*Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.  
Director: Jairo René Martínez. Codirector: Julián Arias.

## ABSTRACT

TITULO: OPTIMIZATION OF EXTRACTION WITH SUPERCRITICAL FLUID OF *Lippia origanoides*\*, timol chemotype.

AUTHOR: Diego Eduardo Estanislao Castiblanco Topía.\*\*

KEY WORDS: Supercritical fluid, natural products, antioxidants, HPLC, Simplex Optimization.

*Lippia origanoides* is a plant that has been studied on many occasions with the goal of obtaining compounds that could be useful in different situations. It has been found to have uses in the pharmaceutical and cosmetic industries. This has made it a promising substance. Different extractions have been made using supercritical CO<sub>2</sub> with the goal of determining the variables that govern the process according to 6 principles which are manipulated by an extraction team of an experimental scale determined by the CENIVAM. These variables are pressure (P), temperatura (T), flow of solvent (F), size of the particle (Z), time of extraction (t) and percent of cosolvent or polarization modifier (E). For this end, a factorial fractional 2<sup>6-2</sup> design is used. , with two levels for selected variables in this manner: E (0–15 %), t (60–120 min), Z (0,5-2 mm), F (10–60 g/min), T (40–60°C), P (100–450 bar). the variables with the most relevance were pressure, flow of solvent, time of extraction and percentage of etanol, which was confirmed by an analysis of variance and it was observed that the pressure governed 40% of the variability. Once the most important variables were obtained, an optimization SIMPLEX was done to determine the conditions in which the process produced the greatest amount of extract. It obtained a maximum percent yield of 1.24% from 500g of material whit P (400 bar), F (50 g/min), t (120 min) y E (10%); additionally there was a point found where the percent yield was 1.16 percent with the advantage of less extreme conditions: P (307 bar), F (43 g/min), t (92 min), E (4,5 %); The loss of extract is small when employing these condition.

---

\* Graduation Project

\*\* Faculty of Engineering Physicochemical. School of Chemical Engineering.  
Director: Jairo René Martínez. Codirector: Julián Arias.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Lippia origanoides* es una planta característica de climas áridos y semidesérticos encontrada en Venezuela, Guatemala, México, Brasil, Cuba y Colombia. Dentro de los departamentos de Colombia en los que habita esta planta se encuentra Santander. Allí es posible hallarla en forma silvestre coexistiendo y formando asociaciones vegetales con otras especies [1]. Los efectos antimalárico, sedativo, hipotensivo y antiinflamatorio de la planta, junto con la capacidad antioxidante [2] y citotóxica [3] del extracto, han promovido el interés como fuente de productos naturales.

Estudios de extracción de ésta planta por medio de técnicas como hidrodestilación, arrastre con vapor y extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, identificaron compuestos de interés para las industrias farmacéuticas, cosmética y de alimentos. Stashenko et al. [4], diferenciaron tres quimiotipos con base en los componentes mayoritarios en los aceites esenciales de *L. origanoides*; donde,  $\alpha$  y  $\beta$  felandreno,  $p$ -cimeno y limoneno fueron encontrados en el quimiotipo A, carvacrol en el quimiotipo B y timol en el quimiotipo C.

Las moléculas de mayor peso molecular encontradas en los extractos son: Quercetina, Naringenina, Pinocembrina y Luteolina [4]. Estos últimos son flavonoides cuya capacidad antioxidante es reconocida y útil en productos cosméticos y alimentos funcionalizados [5].

La técnica de extracción con fluido supercrítico (SFE por sus siglas en inglés) es versátil para la obtención de extractos [6], ya que pequeñas variaciones de la presión y temperatura representan grandes cambios en la densidad, viscosidad, tensión superficial y constante dieléctrica del fluido. Después de superado el punto crítico, pequeños cambios en estas variables termodinámicas modifican las

propiedades de solvatación del soluto en el solvente. Por otra parte, es una técnica que permite el procesamiento de compuestos termo-sensibles y no presenta contaminación por residuos de solventes [7].

Extraer eficientemente los flavonoides presentes en la *Lippia origanoides* por medio de la técnica SFE requiere, en primer lugar identificar los parámetros de extracción que afectan el rendimiento y posteriormente encontrar los valores de éstos que lo maximizan. El equipo de extracción supercrítica instalado en el centro de Investigación en Biomoléculas CIBIMOL, permite realizar el proceso de extracción en operación semicontinua y obtener dos fracciones de extracto. Son seis los parámetros ajustables en la extracción supercrítica al usar este equipo; pero solamente algunos tienen incidencia significativa en el rendimiento de extracción. Un diseño de experimentos de cribado permite seleccionar apropiadamente aquellos parámetros que son verdaderamente relevantes en el proceso. Una vez encontrados esos parámetros es preciso usar un método de optimización con el fin de encontrar experimentalmente las condiciones óptimas de las variables del proceso.

De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones de mejor rendimiento en la extracción supercrítica de *Lippia origanoides* quimiotipo timol de manera que se contribuya al desarrollo de la industria de base biotecnológica del país, haciendo viable el uso de ingredientes naturales.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Colombia es conocida por poseer una gran riqueza vegetal que ha sido usada por la medicina tradicional para desarrollar tratamientos eficaces contra afecciones comunes, usando diversidad de plantas [8]. En los últimos años se ha incrementado el estudio de los compuestos activos presentes en las plantas aromáticas y medicinales de Colombia, con la intención de tecnificar la extracción e incrementar la posibilidad de crear un nuevo sector económico basado en la obtención sostenible de productos naturales, útiles para las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica.

El creciente interés en los compuestos naturales se debe a que algunos de estos pertenecen a la familia de flavonoides, que son moléculas antioxidantes que previenen el daño celular oxidativo producido por los radicales libres y la generación de componentes reactivos del oxígeno [9,10]. Los flavonoides se obtienen de las plantas mediante técnicas de separación con solventes [11]; uno de los más convenientes es el CO<sub>2</sub> supercrítico, debido a su naturaleza “verde”. Estudios realizados han demostrado que los extractos del género *Lippia* poseen capacidad antioxidante debida a la presencia de flavonoides y terpenoides [12].

Para tecnificar la extracción de los componentes activos de la *L. origanoides* y avanzar en el conocimiento del proceso, se hace indispensable establecer cuáles son las variables que afectan el rendimiento de extracción, al igual que determinar los valores para los cuales el rendimiento es máximo. El propósito de este trabajo fue identificar y optimizar las variables que afectan el rendimiento de extracción de la *Lippia origanoides* quimiotipo timol, de tal manera que la cantidad de extracto obtenido sea la mayor posible, usando el equipo de extracción a escala piloto del Centro de investigación en Biomoléculas CIBIMOL.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo General

- Avanzar en el conocimiento de la extracción de productos naturales, por medio de la identificación y optimización las variables de proceso que afectan el rendimiento de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de *Lippia origanoides* (quimiotipo timol)

#### Objetivos específicos

- Identificar por medio de un diseño experimental factorial fraccionado las variables del proceso de extracción supercrítica, que tienen un efecto significativo en el rendimiento.
- Encontrar las condiciones de operación, para que el rendimiento sea el mayor posible, mediante la aplicación de la metodología simplex.
- Cuantificar los compuestos presentes en el extracto supercrítico de *Lippia origanoides*.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 *Lippia origanoides*:

*Lippia origanoides* es una especie de arbusto perenne aromático apto para el consumo humano perteneciente a la familia *Verbenaceae* que posee particularmente tres quimiotipos identificados (timol, carvacrol y felandreno) [4]. Caracterizada por crecer entre 3 y 5 metros de altura, esta planta es muy ramificada y el tamaño de sus hojas varía de 3,5 a 5 cm de largo y 1,5 a 2,5 cm de ancho. Su fruto posee semillas color café que miden hasta 0,25 mm. Es conocida en Colombia como orégano de monte y es posible encontrarla en: la Guajira, Magdalena, Cauca, Cundinamarca, Norte de Santander y en Santander, principalmente en la región del cañón del Chicamocha [1,14]. Esta planta es comúnmente usada en la medicina tradicional para aliviar dolores estomacales, indigestiones, diarrea y flatulencia [1], problemas gastrointestinales y respiratorios [13]. Sus metabolitos secundarios le confieren efecto sedativo, hipotensivo y antiinflamatorio en humanos [2]. Su extracto evidencia capacidad antioxidante, antimicrobiana, antígenotóxica, antimalárica [12].

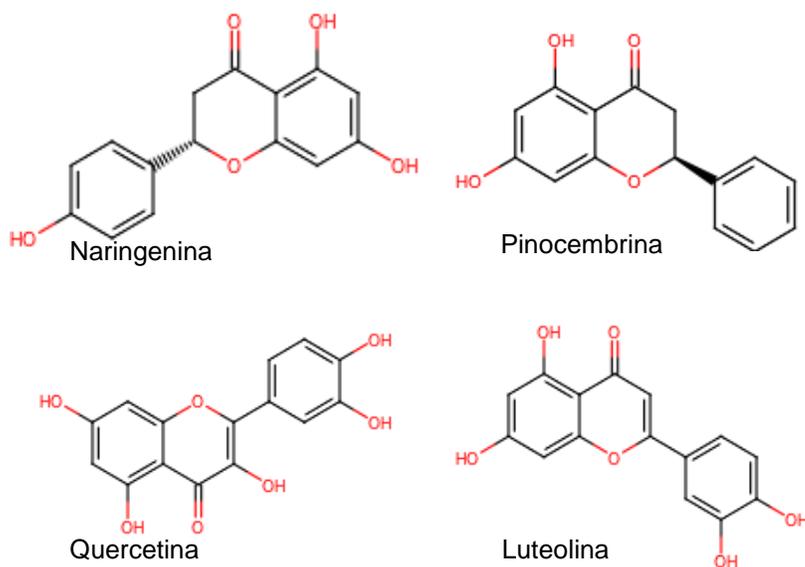
### 4.2 FLAVONOIDES:

Son metabolitos secundarios provenientes generalmente de plantas y se caracterizan por poseer dos anillos de fenilo ligados a través de un anillo de pirano heterocíclico [15] (Véase **Figura 1**). Los flavonoides se han estudiado a profundidad, porque sus propiedades antioxidantes pueden ser usadas para prevenir el proceso de oxidación natural. Esto debido a la capacidad de óxido-reducción de los grupos hidroxifenólicos que componen su estructura [15]. Entre los flavonoides con actividad biológica conocida se encuentran: la Luteolina que posee capacidades antimicóticas [16], la Apigenina y Quercetina que presentan propiedades citotóxicas

en carcinomas [17] y la pinocembrina que posee la capacidad de atenuar la inflamación del hipocampo y previene la apoptosis para la isquemia cerebral en ratas [18].

En estudios realizados por Stashenko *et al.* [12], se aislaron e identificaron cinco flavonoides presentes en la especie *Lippia organoides* a saber: Naringenina, Pinocembrina, Quercetina y Luteolina.

**Figura 1.** Estructuras para los flavonoides hallados en los tres quimiotipos de *Lippia organoides*.



#### 4.3 FLUIDO SUPERCRÍTICO:

Una sustancia que ha superado su punto crítico es conocida como un fluido supercrítico, esto indica que se encuentra por encima de la máxima temperatura y presión donde coexiste un equilibrio líquido-vapor. En esta región el fluido se comporta como un líquido y un gas al mismo tiempo [19] y sus propiedades se

confunden entre sí, impidiendo definir el fluido como líquido o como gas. Allí, el fluido no cambia de estado por más que se incremente la presión y la temperatura.

La densidad del fluido puede modificarse con pequeñas variaciones de presión o temperatura, lo que permite un cierto grado de selectividad en el proceso de extracción y un excelente poder de solvatación [20]. El fluido también posee un alto coeficiente de difusión, lo que facilita los procesos de extracción. La **Tabla 1** muestra la cercanía en el orden de magnitud, y por tanto la semejanza, entre las propiedades del fluido supercrítico, el líquido y el gas.

**Tabla 1.** Orden de magnitud de las propiedades físicas de solventes en diferentes estados.

Propiedad	Estado		
	Gas	Fluido Supercrítico	Líquido
Densidad, $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	10 <sup>-3</sup>	0,3	1
Difusividad, D (cm <sup>2</sup> /s)	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup>	5 x 10 <sup>-6</sup>
Viscosidad, $\eta$ (g/cm s)	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>

Fuente: *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. Mukhopadhyay. P.12.

#### 4.4. EXTRACCIÓN CON CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO (CO<sub>2</sub>-SE)

##### 4.4.1 DIÓXIDO DE CARBONO, CO<sub>2</sub>

El dióxido de carbono es un compuesto adecuado como solvente en procesos de extracción debido a que es inerte, inodoro, ambientalmente amigable y generalmente considerado como seguro [21]. En condiciones estándar se encuentra

en estado gaseoso, lo que permite su fácil separación. Sus condiciones críticas de presión y temperatura son bajas (73.8 bar y 31.1 °C).

Puesto que el CO<sub>2</sub> es apolar, el proceso de extracción se limita a compuestos no polares y ligeramente polares; sin embargo, es posible mezclarlo con un modificador de la polaridad, el cual facilita la disolución de compuestos polares [21]. La selección del modificador o cosolvente se realiza teniendo en cuenta las características de los compuestos de interés. Para los compuestos fenólicos, el metanol es el mejor modificador [22]; sin embargo, el uso es restrictivo debido a su toxicidad. Una alternativa frecuentemente usada para extraer este tipo de moléculas es el etanol.

Pequeños cambios en la presión y temperatura del CO<sub>2</sub>, generan variaciones en la densidad. El diagrama de densidades (Véase **Anexo A**), muestra que en la región cercana al punto crítico, la densidad se incrementa directa e inversamente proporcional a la presión y temperatura, respectivamente; pero, las pendientes de las líneas de densidad se acercan más rápido a cero cuando a presión constante la temperatura aumenta. Así mismo, al modificar la presión a temperatura constante, se observa un cambio diminuto en la densidad, lo que indica que la compresibilidad en la región cercana al punto crítico, es alta [23]. En otras palabras, el CO<sub>2</sub> supercrítico es un gas denso con poder disolvente controlable [24].

Es posible definir la compresibilidad del fluido por medio de la ecuación:

$$K_T = -\frac{1}{\rho} \left( \frac{\partial \rho}{\partial P} \right)_T \quad (1)$$

Donde  $K_T$  es el módulo de compresibilidad isotérmica, el cual mide la resistencia del fluido a ser comprimido,  $\rho$  la densidad molar,  $P$  la presión y  $T$  la temperatura (constante) del sistema. Esta ecuación representa la variación, que debe existir en la presión para cambiar el valor de la densidad del fluido.

## 4.4.2 PROCESO CO<sub>2</sub>-SE

### 4.4.2.1 Etapas del proceso de extracción

El proceso se lleva a cabo en las siguientes etapas:

1. **Alcanzar el punto crítico:** El CO<sub>2</sub> ingresa a 4 °C y 57 bar aproximadamente. Se somete a un incremento de presión y temperatura hasta superar los 73 bar y 31 °C. La presurización se realiza manteniendo un flujo constante de CO<sub>2</sub>, que es calentado una vez sale de la bomba.
2. **Extracción:** El CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas entra en la cámara de extracción donde tiene contacto con la matriz que se va a extraer. Dependiendo de las condiciones de extracción el CO<sub>2</sub> solubiliza diferentes compuestos de la matriz. Según lo propuesto por Sovová [25], la etapa de extracción puede dividirse en tres diferentes fases dependiendo de la velocidad con que se va agotando el soluto de la matriz. En la fase 1 el soluto expuesto por la rotura de las células durante el picado de la matriz vegetal es solubilizado. El fenómeno de transferencia de masa que gobierna esta fase es la convección forzada; en esta fase se obtiene la mayor cantidad de extracto por unidad de tiempo. La fase 2 es una fase transitoria donde se está agotando el soluto expuesto y la velocidad de extracción tiene un decremento. Dos fenómenos de transferencia de masa, la difusión en conjunto con la convección, tienen participación en esta fase. Por último ya no hay extracto al cual el solvente acceda fácilmente. Por lo que la transferencia de masa solo se lleva a cabo por difusión en la matriz bajo tratamiento y la velocidad de extracción cae considerablemente hasta llegar a cero.
3. **Separación y colección:** Una vez el fluido sale de la cámara de extracción, con el extracto disuelto, se pasa a un colector que modifica la solubilidad del

CO<sub>2</sub> por medio de la variación de la presión, lo cual precipita el extracto al fondo. Durante la despresurización, se genera un efecto ciclón, debido al ángulo de entrada del gas al colector, que separa el gas del extracto [26].

#### **4.4.2.2 Efecto de las variables básicas en el proceso CO<sub>2</sub>-SE**

- **Presión y Temperatura.**

Gopalakrishnan y Narayanan [27] realizaron estudios sobre el efecto de la presión en el rendimiento de extracción de compuestos no volátiles del jazmín. Encontraron que en el rango entre 100 y 500 bar se consiguen valores de rendimiento entre 4,5 y 9,5% respectivamente. De igual manera, Reverchon y de Marco [6], dedujeron que la presión define la selectividad del proceso y establecieron como regla general: que a mayor presión, mayor es la capacidad disolvente. Para el caso de la temperatura, el rango propicio para obtener componentes a partir de material vegetal está entre 35 y 60 °C.

- **Flujo de Solvente.**

Reverchon y de Marco [6], afirmaron que el flujo es relevante en procesos gobernados por una resistencia a la transferencia de masa. Cuando se mantiene un flujo continuo de CO<sub>2</sub> en la extracción, se observa que el extracto acumulado va aumentando a medida que pasa el tiempo, pero debido al agotamiento del soluto expuesto y la desaparición del fenómeno convectivo, el tamaño del incremento en el rendimiento irá disminuyendo paulatinamente hasta agotarse. En el proceso de extracción existe un flujo óptimo para saturar el solvente. A flujos mayores que el óptimo, el tiempo de residencia es muy corto y el solvente no extrae la suficiente cantidad de extracto para saturarse, por lo que se desperdicia. En flujos menores que el óptimo ocurre un fenómeno llamado dispersión axial, que es generado por las diferencias de concentración a lo largo de la cámara de extracción. Este fenómeno desfavorece a la extracción porque permite que haya una transferencia de masa en dirección inversa al flujo.

- **Tamaño de partícula.**

El tamaño de partícula en la matriz vegetal tiene relevancia en el fenómeno de transferencia de masa del proceso, puesto que su disminución incrementa la superficie de contacto entre la matriz vegetal y el solvente [23]. Reverchon y de Marco [6] aclararon que partículas pequeñas facilitan la extracción, pero un tamaño de partícula muy pequeño implicaría problemas en el montaje del proceso, ya que es posible que el material se compacte y se aisle a sí mismo. Un tamaño recomendable se encuentra entre 0,25 y 2 mm.

- **Cosolvente.**

En ocasiones se hace necesario adicionar al proceso un modificador de polaridad llamado cosolvente. Debido a que el CO<sub>2</sub> es apolar, la extracción se favorece hacia compuestos apolares. Al aplicar un modificador adecuado, el CO<sub>2</sub> en mezcla se comporta con cierta polaridad sin perder sus propiedades útiles para los procesos de extracción [28,29]. Lang y Chien [22] afirmaron que un porcentaje adecuado de modificador altera drásticamente las propiedades del fluido y mejora el rendimiento. Para el caso de obtención de compuestos vegetales se usa etanol debido a que tiene buenas propiedades de solvatación, es menos tóxico que el metanol [22] y es aceptado por la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*).

- **Tiempo de extracción.**

Según Reverchon y de Marco [6], el tiempo de extracción se relaciona con el flujo de solvente, el tamaño y porosidad de partícula, ya que el rendimiento depende del tiempo que tenga el fluido para interactuar con la matriz vegetal. Estudios de extracción de romero, salvia y hojas de guayaba han encontrado que en un lapso de aproximadamente dos horas se obtiene más del 50% del extracto total contenido en la matriz [30].

- **Presión de colecta.**

Usando la variación en las propiedades del fluido al cambiar la presión, es posible fraccionar el extracto para concentrar las moléculas cuya solubilidad en el CO<sub>2</sub> sea parecida [31]. Algunos de los ejemplos de esta separación son reportados por Reverchon y Senatore [28], quienes aislaron aceite esencial de hojas de romero por medio de una extracción, cuya colecta se hizo sin fraccionamiento (100 bar y 40 °C), donde se obtuvo  $\alpha$ -pineno; 1,8-cineol;  $\beta$ -cariofileno y 4, n-nonacosano. Una extracción más, se realizó con un fraccionamiento a 80 bar, 10 °C y 25 bar, 0 °C obteniendo  $\alpha$ -pineno; 1,8-cineol y  $\beta$ -cariofileno.

Un proceso semejante fue realizado por el mismo autor para hojas de *Origanum majorana*, obteniendo resultados similares [32].

#### **4.5 DISEÑO EXPERIMENTAL:**

El diseño factorial  $2^k$  es una secuencia de experimentos que permite estudiar la influencia de un número "k" de factores o variables sobre una respuesta u observable. El número 2 del diseño indica los niveles o valores que tomará cada variable en el estudio. Este tipo de diseños combina los factores con sus niveles, para encontrar cuáles de esos factores tienen efecto significativo y explicar la variabilidad de un observable. El número total de los experimentos a realizar es 2 elevado a la "k", por tanto es muy conveniente cuando se estudian pocas variables, pero largo y costoso en casos donde el número de variables es mayor que 4 [33,34]. El diseño factorial fraccionado es un diseño con un número menor de experimentos que toma como base el diseño factorial completo y jerarquiza la información para trabajar con los datos de mayor relevancia en el proceso, sacrificando el mínimo de información valiosa [35].

Un efecto es el cambio que realiza una variable o un factor en el resultado final de un experimento. Existe un número total de efectos para cada diseño y algunos de

estos pueden ignorarse, si son combinaciones entre las variables principales. Es decir, interacciones de mayor nivel (triples, cuádruples, etc.). El método para seleccionar los grupos de tratamientos adecuados es verificar aquellos que permitan estimar los efectos de mayor interés; esto es, los efectos sencillos y las interacciones dobles [35].

#### **4.6 OPTIMIZACIÓN SIMPLEX:**

La optimización simplex, usada en compañía de diseños factoriales, ha dado resultados favorables al determinar las condiciones óptimas de un proceso. Martínez *et al.* [36], Ramos *et al.* [37], Lancas *et al.* [38], Maio *et al.* [39], han sido algunos de los autores que han usado este método, consiguiendo valores óptimos de rendimiento por extracción. El método, conduce al punto máximo o mínimo de una respuesta en función de sus factores, paso a paso mediante experimentos.

El método simplex usa un principio básico que descarta sistemáticamente los valores para la respuesta, considerados "malos". Una vez encontrado un conjunto de valores en los cuales la respuesta no mejora por más que se realicen reflexiones, se indaga en el interior del simplex disminuyendo el tamaño del paso usado. De esta manera es posible acercarse al óptimo sin realizar demasiados experimentos, lo que ocurriría si el paso se mantiene constante.

Un simplex, se refiere a un espacio n-dimensional con n+1 vértices donde n es el número de variables o factores presentes en el sistema [40]. Inicialmente se calcula un punto central en el espacio (centroide) y se realiza una reflexión, expansión o contracción sobre éste y en el sentido contrario al peor vértice [41]. Ésta metodología se realiza las veces que sea necesaria hasta que la respuesta encuentre un punto en el cual no pueda mejorar más. Para el caso reportado por Lancas *et al.*, se realizaron 14 experimentos hasta encontrar el punto óptimo

respecto al rendimiento en la extracción de aceite de soya; Ramos *et al.*, realizaron un proceso similar, pero tratando de obtener un aroma lo más parecido posible entre el extracto de café y el café como bebida caliente. En ambos casos el método simplex consiguió determinar un punto óptimo. Martínez *et al.* [36], realizaron un cribado de variables por medio de un diseño experimental  $2^{7-2}$ , determinando las variables de mayor relevancia en la extracción con fluido supercrítico de *Salvia officinalis L.* y en conjunto con el método de optimización simplex, hallaron las condiciones en las cuales la combinación lineal del rendimiento de extracción, capacidad antioxidante y contenido total de fenoles, fue más alta.

#### 4.7 CALIBRACIÓN MULTIVARIADA

La calibración multivariada sirve como una estrategia para la obtención de información cuantitativa a partir de datos obtenidos de múltiples variables [42]. Usando el espectro de una muestra cuyas concentraciones se desconocen; pero, se conocen sus componentes, es posible relacionar estas concentraciones con la absorbancia obtenida en la muestra y con los patrones de dichos componentes a una concentración conocida en las mismas longitudes de onda [43] según:

$$R = C * S \quad (2)$$

Donde **R** es la matriz generada por las absorbancias medidas en la muestra en una determinada longitud de onda, **C** es la matriz para las concentraciones de los componentes de interés y **S** es la matriz del factor espectral medido para cada compuesto patrón en la misma longitud de onda que la muestra.

La predicción de la concentración puede obtenerse a partir de una serie de operaciones matriciales dadas por:

$$C = (S'S)^{-1}S'R \quad (3)$$

Donde **S'** es la matriz transpuesta de **S**.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 ACONDICIONAMIENTO DE MATERIA PRIMA.

El material vegetal fue colectado de una parcela experimental de 100 m<sup>2</sup>, localizada en la Universidad Industrial de Santander. Una vez colectado, el material fue secado al aire en viveros. Con el fin de acondicionar el material para el análisis, se realizaron 2 reducciones de tamaño. Inicialmente el material pasó por una picadora de material vegetal PE800 (Penagos, Girón, Colombia) y posteriormente por un molino de corte SM100 (*RETSCH*, Haan, Alemania) (Véase **Anexo B**). Los tamices usados en el molino de corte fueron de 0,5 mm y 2 mm. Como resultado fueron obtenidos 20 kg de material vegetal picado, 10 kg para cada tamaño de partícula.

El material fue almacenado en dos recipientes plásticos, cubiertos con aluminio para evitar el contacto directo del plástico con la planta picada. Los recipientes se mantuvieron sellados en ambiente controlado a 22 °C conservando la humedad constante. Un higrómetro digital registró la humedad en el ambiente durante cada extracción. La humedad del material vegetal seco, se mantuvo entre 8 y 12 %.

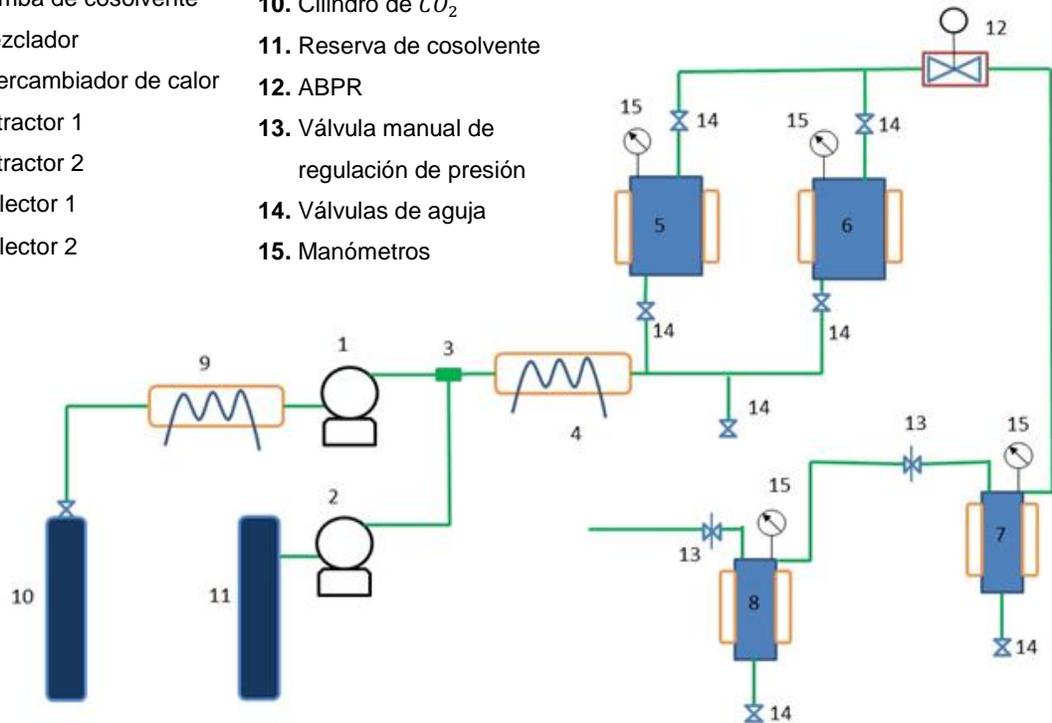
### 5.2 EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO

Un equipo de extracción con fluido supercrítico a escala piloto SFE 2000 (*Thar Technology, Pittsburgh, EEUU.*), fue usado para realizar las extracciones; (Véase **Anexo C**). El equipo cuenta con dos cámaras extractoras de 0,42 m de alto, diámetro interno de 0,076 m y volumen de carga 0,002 m<sup>3</sup>. Las cámaras están conectadas a un tren de dos colectores en serie, cada uno con una capacidad de 5 x 10<sup>-4</sup> m<sup>3</sup>. Todas las cámaras y colectores cuentan con control de temperatura y presión. Una válvula de aguja automática de estrangulamiento controla la presión

de la extracción. El diagrama del proceso de extracción supercrítica usado en este trabajo, se muestra en la **figura 2**.

**Figura 2.** Esquema del equipo SFE

- |                            |   |
|----------------------------|---|
| 1. Bomba de $CO_2$         | 9. Intercambiador de calor                  |
| 2. Bomba de cosolvente     | 10. Cilindro de $CO_2$                      |
| 3. Mezclador               | 11. Reserva de cosolvente                   |
| 4. Intercambiador de calor | 12. ABPR                                    |
| 5. Extractor 1             | 13. Válvula manual de regulación de presión |
| 6. Extractor 2             | 14. Válvulas de aguja                       |
| 7. Colector 1              | 15. Manómetros                              |
| 8. Colector 2              |   |



Para cada una de las extracciones, se cargaron 500 g de material vegetal en una canasta de malla metálica con diámetro de 0,2 mm y un volumen de 0,00178 m<sup>3</sup>. La densidad aparente de cada carga fue de 280 kg/m<sup>3</sup>. El CO<sub>2</sub> tomado de cilindros de 25 kg con un grado de pureza del 95,5%, fue enfriado a 4 °C y, por medio de una bomba de desplazamiento positivo, comprimido en la cámara de extracción hasta llegar a la presión de operación. Una vez alcanzada la presión de operación, la ABPR (Automated back pressure regulator) reguló el paso de CO<sub>2</sub> a los colectores los cuales se mantuvieron, por medio de válvulas manuales, a una presión de 80 y 40 bar, parámetros similares a los usados por Reverchon y Senatore en su estudio

de fraccionamiento de aceite esencial de romero [28]. El primer tanque de fraccionamiento, se mantuvo a 35 °C y el segundo a 25 °C. Una vez, el CO<sub>2</sub> pasó por todas las etapas del proceso, se expulsó al ambiente en estado gaseoso. Una vez terminado el tiempo de extracción, el sistema se despresurizó y el extracto fue colectado.

Para el caso de las extracciones con etanol como cosolvente, fue necesario aplicar un proceso de concentración del extracto, utilizando un rotavapor Büchi R Style (*BÜCHI Labortechnik AG*, Flawil, Suiza) y corriente de nitrógeno. Una vez colectado, el extracto fue almacenado a 4 °C en frascos ámbar para evitar la degradación debida a la fotosensibilidad de los flavonoides.

### **5.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL Y CONDICIONES DE OPERACIÓN**

Inicialmente se estudió la reproducibilidad de los ensayos, realizando tres réplicas de dos experimentos a diferentes condiciones. En las **tablas D1 y D2** (Véase **Anexo D**), se muestran las seis variables que fueron tenidas en cuenta en los experimentos que se llevaron a cabo con el fin de conocer el porcentaje de variación del observable. El primer experimento se realizó a las condiciones de extracción de 200 bar, 50°C, 50 g/min de CO<sub>2</sub>, 2 mm de tamaño de partícula y sin cosolvente. Para el segundo ensayo de reproducibilidad, solo se modificaron las condiciones de presión (300 bar) y flujo de solvente (30 g/min).

Para la selección de los niveles del diseño, se tuvieron en cuenta las capacidades del equipo, como la presión máxima de trabajo de la bomba y las limitaciones para la obtención de compuestos termolábiles de las plantas. Los niveles seleccionados se encuentran en la **tabla 2**. Posterior a la elaboración del diseño, se realizaron los respectivos análisis de varianza usando la prueba del estadístico F de Fisher de una cola, con un nivel de significancia del 5% para tres posibles observables, el peso de

la fracción uno (F1), el peso de la fracción dos (F2) y la suma de ambos pesos (F1 + F2).

**Tabla 2.** Variables y sus respectivos niveles usados en el diseño experimental  $2^{6-2}$ .

NIVELES	Abv.	1	-1
Presión, Bar	<b>P</b>	400	80
Temperatura, °C	<b>T</b>	60	40
Flujo de CO <sub>2</sub> , g/min	<b>F</b>	50	10
Tamaño, mm	<b>Z</b>	2	0,5
Tiempo de extracción, min	<b>t</b>	120	60
Porcentaje de cosolvente, %	<b>E</b>	10	0

### 5.2.2. OPTIMIZACIÓN POR EL MÉTODO “SIMPLEX”

Una vez identificadas las variables que tienen mayor influencia sobre el rendimiento, se realizó una réplica de los experimentos que reportaron mejores resultados en el diseño de cribado. Estos fueron la base del método simplex usado para la optimización. En la aplicación del diseño se usó un tamaño de paso variable según los resultados del rendimiento se acercaban al óptimo. Tres diferentes tipos de avances fueron tenidos en cuenta: reflexión, contracción y proyección

### 5.3 HPLC

El análisis por HPLC se llevó a cabo en un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 con un detector UV-Vis de arreglo de diodos G1315B y columna KINETICS 2.6u C18 (100 mm x 4,6 mm x 5 µm). La temperatura de la columna se mantuvo en 35 °C y el volumen de muestra inyectada fue de 20 µL. La fase móvil A fue ácido acético (0,3%), la fase móvil B fue acetonitrilo. Las siguientes fueron condiciones cromatográficas: 0-13 min, 4,5% B; 14-17 min, 15% B; 20-28 min, 22% B, 30-33

min, 100% B; 34-45 min, 4,5% B. Se utilizó un flujo de la fase móvil de 1 ml/min. Los extractos se disolvieron en metanol: ácido acético (0.5%) (1:1).

#### **5.4 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS**

El extracto obtenido, paso por una hidrolisis acida usando una mezcla 1:1 de metanol grado HPLC y ácido clorhídrico al 37 %, durante una hora a 100 °C. Posterior a esto, la mezcla se enfrió durante una hora a 4 °C y se sometió a un proceso de concentración con corriente de nitrógeno hasta llevar a sequedad.

Una vez concentrado el extracto, se reconstituyo con metanol grado HPLC y se llevó a cabo el análisis en un espectrofotómetro UV-Visible *Perkin-Elmer* Lambda 10. La velocidad de lectura se estableció en 240 nm/min, un smooth de 6 y se usaron lámparas para la región visible y ultravioleta.

## 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

### 6.1 DISEÑO FACTORIAL FRACCIONADO 2<sup>6-2</sup>.

Una vez realizados los ensayos preliminares, se calculó el coeficiente de variación  $CV = 6 \%$ , cuyo valor indica que la variación del rendimiento, realizando experimentos a las mismas condiciones de extracción, no supera el  $10 \%$ , límite máximo aceptable.

De acuerdo con el diseño, se realizaron 16 extracciones en orden aleatorio que se muestran en la **tabla D3** (Véase **Anexo D**). Las fracciones obtenidas para cada extracto (F1 y F2), fueron colectadas a 80 y 40 bar respectivamente. La masa total de extracto que corresponde a la suma de los pesos de F1 y F2; el rendimiento para la masa total de extracto **RTO**, se muestra en la última columna de la **tabla 3**. Según la masa total del extracto colectado (M (g)), es posible agrupar los resultados en tres grupos: ( $0 < M < 1$ ), ( $1 < M < 3$ ) y ( $M > 3$ ). Las **tablas 3, 4 y 5** representan los tres grupos de resultados ordenados en forma ascendente.

**Tabla 3.** Masas de extracto entre 0 y 1 g.

P, bar	T, °C	F, g/min	Z, mm	t, min	E, %	M, g	RTO, %
80	60	10	2	120	0	0,2	0,04
80	40	10	2	60	10	0,2	0,04
80	60	10	0,5	120	10	0,21	0,04
80	40	10	0,5	60	0	0,3	0,06
80	60	50	0,5	60	0	0,4	0,08
400	40	10	0,5	120	0	0,91	0,18

Los resultados de la **tabla 3** indican que en la región de presión cercana al punto crítico el rendimiento es bajo en la mayoría de los casos. Un único experimento de

la **tabla 3** no está cerca a la  $P_c$  y corresponde el rendimiento más alto. Se observa en general que el rendimiento aumenta a medida que la presión incrementa, como lo habían observado Leitao *et al.* [44] y Francisco *et al.* [45] para la extracción de *Anacardium occidentale* y *Lippia dulcis*, respectivamente. Para el caso de la temperatura, tamaño de partícula, tiempo de extracción y porcentaje de etanol en la **tabla 3**, hay una mezcla de los niveles que confunde el análisis. En cuanto al flujo de solvente, se observa una tendencia similar a la presión, teniendo un solo punto a 50 g/min en el segundo rendimiento más alto.

**Tabla 4.** Masas de extracto entre 1 y 3 g.

P, bar	T, °C	F, g/min	Z, mm	t, min	E, %	M, g	RTO, %
400	60	10	2	60	0	1,5	0,3
80	40	50	2	120	0	1,8	0,36
400	60	10	0,5	60	10	1,9	0,38
400	40	10	2	120	10	2,1	0,42
80	60	50	2	60	10	2,3	0,46

La **tabla 4** muestra el segundo grupo de experimentos cuyos valores de rendimiento total se encuentran entre 1 y 3 g. En los datos se observa una mezcla de niveles que propician un rendimiento ligeramente mayor que el anterior grupo. Para el caso de los niveles de flujo y porcentaje de etanol bajos, el incremento en el rendimiento no es considerable aun cuando aumente la cantidad de extracto obtenido, debido al aumento de la presión. En este grupo la única variable que mejora el rendimiento es el porcentaje de etanol, cuando está en su nivel alto. Los experimentos que están en este grupo con la presión de trabajo mínima, tienen un flujo de CO<sub>2</sub> máximo, lo que se relaciona con lo observado por Arias *et al.* [30] para romero, salvia y guayaba, quienes encontraron que la cantidad de extracto obtenido es mayor si el flujo de solvente incrementa

En el último grupo, se concentran los experimentos realizados a mayor presión y flujo (Véase **tabla 5**), por lo que se concluye que estas son las variables con mayor significancia en el proceso. Para el caso de la temperatura, el tiempo de extracción y el porcentaje de etanol, existen rendimientos altos en combinaciones de niveles. El tamaño de partícula no muestra una relevancia clara en ninguno de los casos.

**Tabla 5.** Masa de extracto mayor de 3 g.

<b>P, bar</b>	<b>T, °C</b>	<b>F, g/min</b>	<b>Z, mm</b>	<b>t, min</b>	<b>E, %</b>	<b>M, g</b>	<b>RTO, %</b>
400	40	50	2	60	0	3,4	0,68
80	40	50	0,5	120	10	3,5	0,7
400	40	50	0,5	60	10	4,2	0,84
400	60	50	0,5	120	0	4,9	0,98
400	60	50	2	120	10	8,5	1,7

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Se realizó el análisis de la varianza dividiendo el observable (rendimiento) en tres grupos: La masa en gramos del extracto colectada en la fracción uno (**F1**), la masa en gramos del extracto colectada en la fracción dos (**F2**) y la totalidad en gramos del extracto colectado que corresponde a la suma de las fracciones uno y dos (**M**). Los resultados del estudio estadístico se enumeran a continuación:

**1. F1 como observable:** El efecto con mayor influencia para este caso es la presión (**P**). La **tabla 6** muestra en “F1 como observable” que el efecto de la presión es el mayor de la columna. Con el valor de la suma de cuadrados (**SC**) calculada a partir del efecto generado por la presión, se realiza la prueba del estadístico F de Fisher de una cola, usando un nivel de significancia del 5%. El valor estadístico F para **P**, se muestra sombreado en la columna “Valor F”.

Al comparar el valor del estadístico F para **P** (107,1) con el valor estadístico F umbral (18,5) se observa que la presión es el factor dominante en la extracción supercrítica para el caso de coleccionar la mayor cantidad de masa de extracto en la fracción uno **F1** a 80 bar.

El diagrama de Pareto de los efectos estandarizados de la fracción uno se muestra en la **figura D1** (Véase **Anexo D**). La región sombreada muestra los factores que representan más del 80% de la variabilidad total del observable para cada factor y sus interacciones dobles. A la presión se le atribuye poco más del 60% de la variabilidad total de los datos, seguido de los efectos dobles confundidos tiempo/porcentaje de etanol **tE** y presión/tamaño de partícula **PZ**.

**Tabla 6.** Análisis de varianza para las fracciones uno y dos como observables.

F1 como observable				F2 como observable			
	EFECTO	SC	Valor F		EFECTO	SC	Valor F
<b>P</b>	9,1	5,2	107,1	<b>F</b>	21	27,5	569,2
<b>tE y PZ</b>	2,7	0,5	9,4	<b>P</b>	9,4	5,5	114,3
<b>Z y TF</b>	2,3	0,3	6,8	<b>E</b>	8,4	4,4	91,2
<b>Ft y PT</b>	2,3	0,3	6,8	<b>PF y Tt</b>	7,6	3,6	74,7
<b>T</b>	1,9	0,2	4,7	<b>FE y TZ</b>	7,4	3,4	70,8
<b>t</b>	1,9	0,2	4,7	<b>Ft y PT</b>	6,6	2,7	56
<b>Pt y ZE</b>	1,5	0,1	2,9	<b>t</b>	6	2,3	46,9
<b>E</b>	1,1	0,1	1,6	<b>PE y Zt</b>	3	0,6	11,5
<b>TE y FZ</b>	1,1	0,1	1,6	<b>T</b>	1,6	0,2	3,3
<b>FE y TZ</b>	-0,9	0,1	1	<b>Z y TF</b>	1,4	0,1	2,5
<b>F</b>	0,7	0	0,6	<b>Pt y ZE</b>	1,4	0,1	2,5
<b>PE y Zt</b>	-0,5	0	0,3	<b>TE y FZ</b>	1,2	0,1	1,9
<b>PF y Tt</b>	-0,1	0	0	<b>tE y PZ</b>	0,8	0	0,8

**SC:** Suma de cuadrados. **F1:** Fracción número uno. **F2:** Fracción número dos.

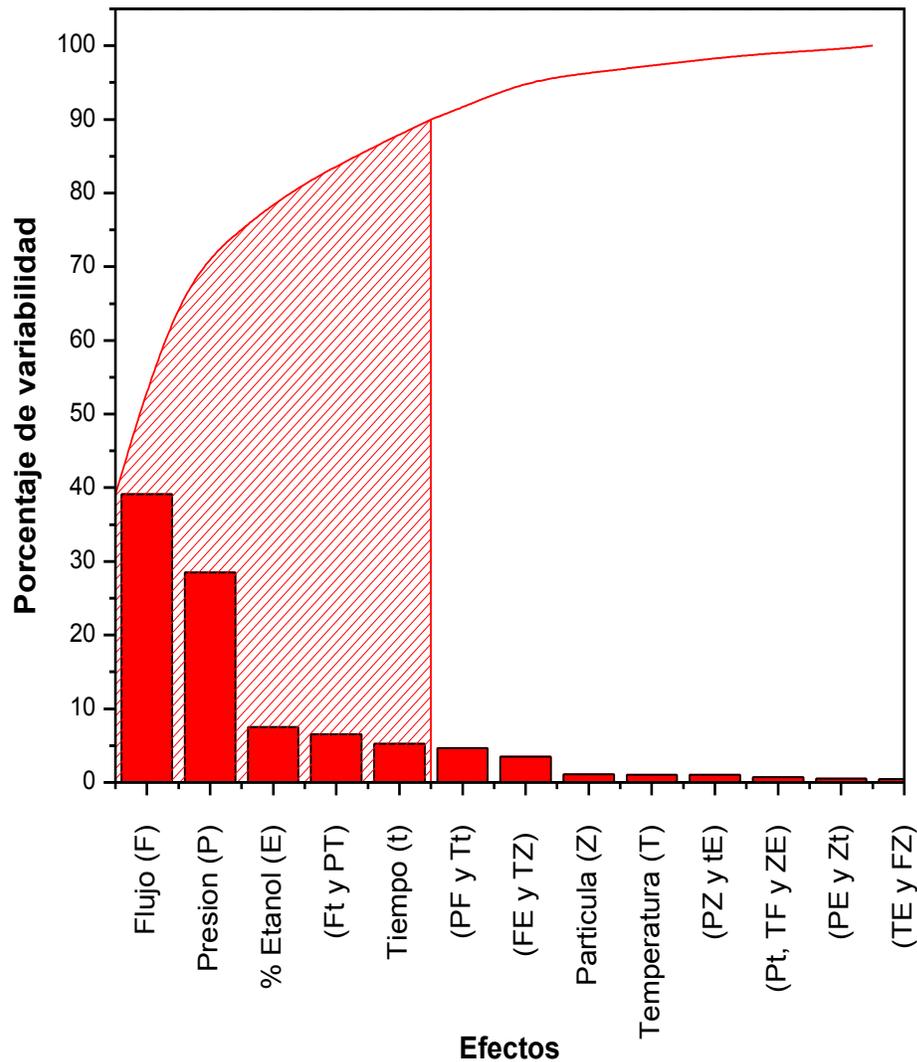
**2. F2 como observable:** Para el caso de la fracción dos como observable, en la **tabla 6** se muestran sombreados los factores correspondientes a los “valores F” mayoritarios y que tienen influencia significativa en la masa que es colectada. Los factores individuales que resalta el ANOVA como relevantes para este caso son: la presión (**P**), flujo de solvente (**F**), tiempo de extracción (**t**) y porcentaje de etanol (**E**). La **tabla 6** muestra los valores del estadístico F con un nivel de confianza del 95% y sus resultados califican como significativas a las interacciones (**PF**, **FE** y **Ft**) así como sus interacciones confundidas (**Tt**, **TZ** y **PT** respectivamente). Debido a que el diseño factorial fraccionado  $2^{6-2}$  sacrifica información confundiendo con interacciones dobles y triples, no se puede concluir exactamente cuáles de las interacciones binarias son las significativas. Sin embargo, debido a que la temperatura (**T**) no aparece como significativa individualmente se presume que las interacciones dobles (**PF**, **FE** y **Ft**) son las que explican mayor variabilidad del observable.

El diagrama de Pareto de los efectos estandarizados de la fracción dos se muestran en la **figura D2** (Véase **Anexo D**). La región sombreada muestra los factores que representan más del 80% de la variabilidad total del observable para cada factor y sus interacciones dobles. En este caso la presión no es el efecto mayoritario y representa menos del 10% de la variabilidad total del observable, lo que indica un cambio en el comportamiento de la separación respecto al fraccionamiento a 80 bar. El flujo de solvente representa poco más del 40% de la variabilidad total, lo que hace de esta la variable más relevante a la hora de aumentar la masa colectada en la fracción dos.

**3. RTO como observable:** La suma de la masa de extracto obtenido a partir de las fracciones uno y dos representa la totalidad del extracto M y **RTO** su rendimiento respecto a 500g de material extraído. El diagrama de Pareto mostrado en la **figura 3**, sombrea cuatro factores individuales **F**, **P**, **E**, **t** junto con dos interacciones dobles

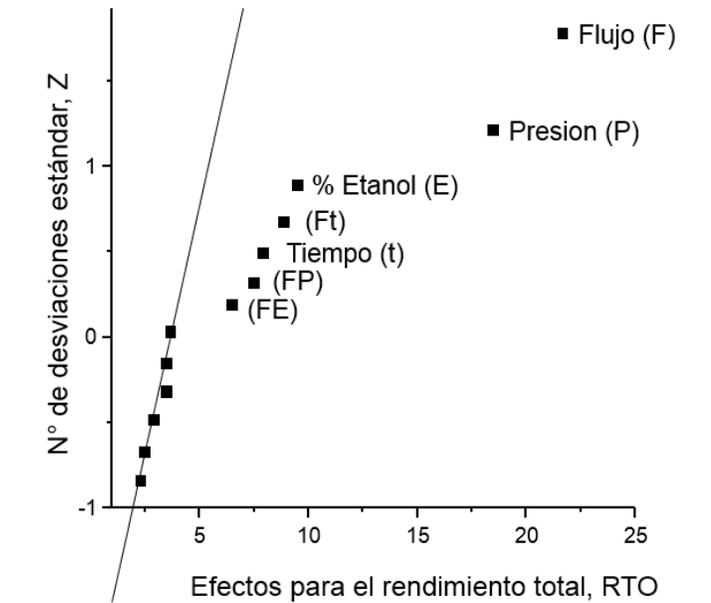
confundidas **Ft** y **PT**, cuyos efectos explican más del 80% de la totalidad de variabilidad del observable **RTO**.

**Figura 3.** Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados del observable **RTO**.



El gráfico de probabilidad media normal para los mismos datos se muestra en la **figura 4**. Allí se observa que los efectos **F** y **P** se encuentran más alejados de la línea que representa la distribución normal del rendimiento. Con esto se estima que **F** y **P** son dominantes en el proceso de extracción de la matriz de *Lippia origanoides*. **E**, **Ft**, **t**, **FP** y **FE** también se desvían de la distribución normal del rendimiento y muestran alguna significancia en el proceso aunque en menor grado que **F** y **P**.

**Figura 4.** Gráfico de probabilidad media.



La prueba F realizada a los factores teniendo como observable a RTO, muestra una similitud con las variables y sus interacciones analizadas cuando **F1** y **F2** eran el observable. Los resultados del ANOVA para este caso se observan en la **tabla 7**. El ANOVA de la **tabla 7** incluye una prueba de falta de ajuste que se calculó con el propósito de descartar con mayor criterio estadístico los factores individuales **Z** y **T**, además de identificar si hay evidencia que sugiera que los factores significativos no se comportan de forma lineal, sino que por el contrario uno o varios de ellos aportan términos cuadráticos al modelo. El valor claramente menor para los estadísticos F de la temperatura **T** y el tamaño de partícula **Z**, muestran que esas variables no son significativas en el proceso de extracción supercrítica de *Lippia origanoides*. El valor de la falta de ajuste muestra significancia, lo que indica que un modelo lineal no será adecuado para predecir el rendimiento de extracción de la matriz de *Lippia*

*origanoides*. En otras palabras será necesario realizar más experimentos con el propósito de que términos cuadráticos de los factores sean tenidos en cuenta. En el presente trabajo se calculó, y posterior a la siguiente sección se muestra, un modelo de predicción de rendimiento con base en los datos obtenidos del diseño factorial fraccionado y la optimización simplex.

**Tabla 7.** ANOVA para los efectos estandarizados del total de extracto **RTO**.

	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>P</b>	21,4	1	21,4	824,7	2,3,E-09
<b>T</b>	0,8	1	0,8	29,5	6,2,E-04
<b>F</b>	29,4	1	29,4	1132,6	6,6,E-10
<b>Z</b>	0,8	1	0,8	32,6	4,5,E-04
<b>t</b>	3,9	1	3,9	151,1	1,8,E-06
<b>E</b>	5,6	1	5,6	217,5	4,4,E-07
<b>Ft y PT</b>	4,9	1	4,9	190	7,4,E-07
<b>PF y Tt</b>	3,5	1	3,5	135,5	2,7,E-06
<b>FE y TZ</b>	2,6	1	2,6	101,8	7,9,E-06
<b>Falta ajuste</b>	3,6	1	3,6	140,5	2,4,E-06
<b>Error puro</b>	0,2	8	0		
<b>Total</b>	76,8	18			

GL: Grados de libertad. F: Valor para prueba F. P: Valor prueba P

## 6.2 OPTIMIZACIÓN SIMPLEX

Los experimentos con mayor rendimiento en el diseño factorial fraccionado (Véase **tabla 5**) fueron la base sobre la cual se realizó la optimización simplex. Los resultados para la totalidad de los experimentos realizados en optimización se muestran en la **tabla 8**. Los valores sombreados corresponden a los experimentos con mayor rendimiento obtenidos en la prueba.

Inicialmente, se realizó una réplica de los puntos más altos obtenidos en el diseño factorial. El primer punto a eliminar fue el que correspondía al rendimiento total de 0,74 %. Una vez retirado, se realizó una reflexión con un tamaño de paso de 1. El punto 6 incrementó ligeramente la cantidad obtenida; de esta manera se eliminó el punto 4. Las reflexiones continuaron hasta obtener el punto 9, donde se encontró un rendimiento alto y se decidió disminuir el tamaño de paso de 1 a 0,6. En el caso del punto 10 se presentó una disminución en el extracto obtenido, por lo cual se optó por incrementar el paso a 1,3 y se obtuvo uno de los puntos con mejor rendimiento. El método continuó igual hasta llegar al punto 14, en el cual se realizó una reflexión de manera que el nuevo punto estuviera fuera del espacio del diseño factorial. Para el caso del punto 16, la reflexión incrementó el tiempo y el flujo, pero el resultado fue menor que el último punto obtenido. Este resultado indica que los nuevos experimentos se estaban alejando del óptimo. Los puntos 19 y 20 presentaron rendimientos altos, pero no lograron superar los resultados de los experimentos realizados con las condiciones del punto 1.

Es posible dividir los resultados del simplex en tres grupos básicos tomando como criterio la cantidad de extracto total en gramos obtenidos durante cada extracción:

- Masa obtenida.  $2 < m < 4$
- Masa obtenida.  $4 < m < 5$
- Masa obtenida.  $m > 5$

**Tabla 8.** Resultados obtenidos al realizar la optimización Simplex.

	P, bar	F, g/min	t, min	E, %	F1, g	F2, g	M, g	RTO, %
1	400	50	120	10	0,5	5,7	6,2	1,24
2	400	50	120	11,4	1,4	3,2	4,6	0,92
3	400	50	60	5	1,5	2,9	4,4	0,88
4	100	50	120	4,5	1	2,8	3,8	0,76
5	400	50	60	8	1,3	2,4	3,7	0,74
6	134	31	106	8,5	1,1	2,8	3,9	0,78
7	417	24	46	8	2,4	0	2,4	0,48
8	132	47	113	13	0,6	3,4	4	0,8
9	359	45	66	0	1,6	2,6	4,2	0,84
10	438	33	46	10	1,6	1,2	2,8	0,56
11	160	46	106	2	1,8	3,4	5,2	1,04
12	220	45	90	9,3	1,8	3,3	5,1	1,02
13	154	32	101	11,4	1,4	2,4	3,8	0,76
14	449	54	52	10	2	4	6	1,2
15	307	43	92	4,5	1	4,8	5,8	1,16
16	112	62	130	0	0,7	1,8	2,5	0,5
17	334	53	139	12	0,3	4,6	4,9	0,98
18	420	60	144	1	2,3	1,1	3,4	0,68
19	380	40	96	10,6	2	3,4	5,4	1,08
20	307	60	120	5	1,4	4,4	5,8	1,16

Para el primer grupo se encontraron los puntos 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16 y 18; cuyo resultado máximo de masa obtenida es de 3,9 gramos. Observando los resultados, no hay una homogeneidad en los valores que toman las variables en los sectores estudiados. Con base en las dos variables más relevantes del proceso, se aprecian 3 puntos en los cuales la presión está por encima de 400 bar y 2 en los cuales el flujo se encuentra por encima de 50 g/min. Según lo reportado por Gopalakrishnan y Narayanan [27] respecto al rendimiento para la extracción de compuestos no volátiles del jazmín, se espera que el óptimo se encuentre cerca o superior a los 400 bar.

En el segundo grupo, comprendido entre los experimentos cuyos extractos colectados se encuentra entre 4 y 5 g y un rendimiento del 0,8 y 0,1 %, un flujo superior a 45 g/min generó un incremento en el rendimiento de la extracción. La mayoría de valores para la presión, se encuentran por encima de 350 bar, lo que indica que posiblemente el óptimo está por encima de este valor. El aumento del porcentaje de etanol muestra una tendencia a generar incremento en rendimiento. Por el momento es posible afirmar que un rango de presión entre 350 y 410 bar, un flujo entre 40 y 60 g/min, y un porcentaje de etanol superior al 5%, favorecen la extracción.

Por último, los puntos 1, 11, 12, 14, 15, 19 y 20; representan los experimentos a las condiciones donde mayor cantidad de extracto se obtiene (Véase **tabla 9**). Las condiciones de 400 bar, 50 g/min, 120 min de extracción y un 10% de etanol producen el mayor rendimiento para la extracción de *Lippia origanoides* encontrado.

**Tabla 9.** Puntos de mayor rendimiento por extracción.

Punto	P, Bar	F, g/min	t, min	E, %	Masa , g	Rto, %
1	400	50	120	10	6,2	1,24
2	449	54	52	11,4	6	1,2
3	307	43	92	4,5	5,8	1,16
4	380	40	96	8	5,4	1,08
5	160	46	106	8,5	5,2	1,04

Las ecuaciones **2** y **3** corresponden al modelo que predice el rendimiento de extracción de *Lippia origanoides* quimiotipo timol y la totalidad de masa obtenida respectivamente.

$$\begin{aligned}
 Rto = & -1,98334 + 0,00382239 * P + 0,0273057 * F + 0,0334374 * t + \\
 & 0,0194778 * E - 0,00000649898 * P^2 + 0,0000214367 * P * F - \\
 & 0,000322272 * F^2 - 0,000178175 * t^2 \quad (2)
 \end{aligned}$$

$$M = -9,91668 + 0,0191119 * P + 0,136528 * F + 0,167187 * t + 0,097389 * E - 0,000032494 * P^2 + 0,00010718 * P * F - 0,00161136 * F^2 - 0,000890876 * t^2$$

R-cuadrada = 90.83 %

R-cuadrada (ajustada) = 87.77 %

Donde:

- Rto es el rendimiento para una extracción.
- M es la masa obtenida por extracción.
- P es la presión de operación en bar.
- t es el tiempo de extracción en min.
- F es el flujo de solvente en g/min.
- E es el porcentaje de etanol en cada extracción.

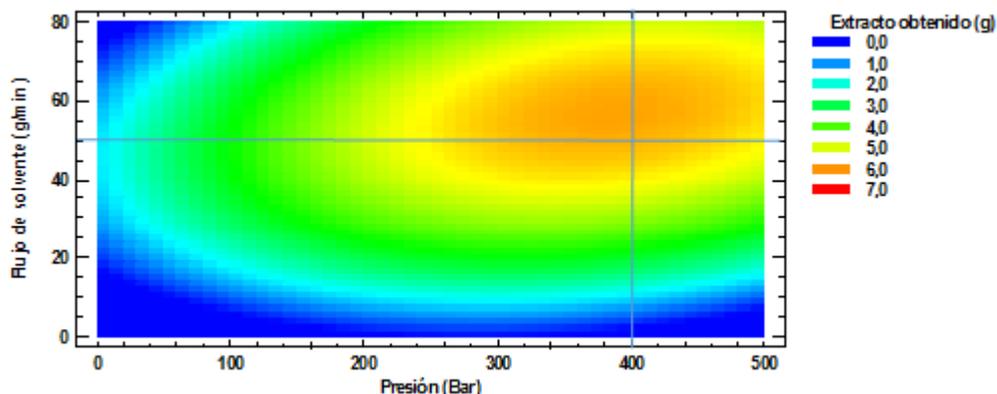
La tabla **D4**, muestra la comparación entre los valores obtenidos para el modelo de rendimiento en todos los experimentos usados y el rendimiento experimental. El modelo presenta únicamente 2 valores atípicos con un residuo estudentizado superior a dos, esto indica que el modelo consigue predecir eficientemente el rendimiento del proceso de extracción. El gráfico de contorno, generado a partir del modelo de la ecuación 3 para la totalidad de experimentos presentados en este trabajo, se muestra en la **figuras 5**. Aquí se observa la tendencia de mejorar el rendimiento a medida que los valores para presión y flujo de solvente incrementan, hasta llegar a un punto óptimo para luego iniciar un descenso en el rendimiento obtenido. La intersección en color azul, representa el punto donde debería ubicarse el valor experimental. Leitao *et al.* [44] observaron el mismo comportamiento y afirmaron que el incremento en el porcentaje de etanol, con un valor de presión alto, da como resultado un rendimiento igualmente alto.

Los resultados para el tiempo de extracción, muestran que las demás variables son capaces de agotar el material en tiempos cortos; es decir, si las condiciones de

presión, flujo de solvente y porcentaje de etanol son adecuadas, el tiempo de extracción se verá reducido. La **tabla 9** muestra los 5 puntos en los cuales el rendimiento por extracción fue mayor que 1% y es posible ver que en los puntos 2, 3 y 4, se obtiene más extracto en un lapso de tiempo menor que en los demás puntos reportados; El gráfico de superficie de respuesta de la figura **D3**, representa la aproximación generada por el modelo, al comportamiento del proceso y los gráficos de contorno de la figura **D4**, **D5**, **D6** y **D7**, muestran la cantidad de extracto predicha por el modelo para los puntos de la **tabla 9**.

El punto 5 de la **tabla 9** es interesante pues presenta un buen rendimiento a pesar de que el valor de la presión es bajo. Este punto demuestra lo analizado anteriormente respecto a las demás variables que intervienen en el proceso; al tener un flujo de solvente y un porcentaje de etanol altos, acompañados de un tiempo de extracción prolongado, es posible obtener un buen rendimiento; pero, el hecho de incrementar la presión por encima de 300 bar y mantener altas las demás condiciones implica un rendimiento mayor. Para el flujo de solvente, el punto 2 modifica la afirmación dada durante el análisis del segundo grupo de resultados, ya que su rendimiento es menor que el punto 1 que tiene un flujo de 50 g/min. Esto implica que el flujo en el punto 2, se encuentra por encima del óptimo e incrementarlo implica una disminución en el rendimiento.

**Figura 5.** Gráfico de contorno para el punto de mayor obtención de masa.



Ya que el punto 1 de la **tabla 9** posee el mayor rendimiento encontrado, se realizó el análisis por cromatografía líquida HPLC-DAD solo a este punto. Se encontró que las condiciones de extracción si favorecen la obtención de flavonoides.

Los cromatogramas obtenidos para **F1** y **F2** (Véase **Anexo E**), muestran que el fraccionamiento a la hora de colectar el extracto, genera una variación en la concentración de Pinocebrina extraída. Esto se evidencia, observando el área de cada uno de los picos: para el caso de la fracción 2 el área es de 211,33 mAU\*s, y para la fracción 1 es de 109,76 mAU\*s, lo que indica que existe una mayor concentración de Pinocebrina en la fracción 2. Sin duda alguna, el fraccionamiento es útil a la hora de variar las concentraciones de los compuestos a obtener; pero en este caso es mejor evitar el fraccionamiento ya que se obtiene una buena cantidad de Pinocebrina aislada a partir de ambas fracciones de *Lippia origanoides* quimiotipo timol, su separación no presentaría un cambio relevante en la composición del extracto.

### 6.3 CALIBRACIÓN

Con el fin de cuantificar los componentes presentes en los extractos obtenidos y determinar, si las condiciones de operación son relevantes en la obtención de los flavonoides identificados por Stashenko *et al.* [14]; se realizó un análisis por medio de calibración multivariada, usando los espectros obtenidos a partir de una solución de Pinocebrina, Naringenina, Quercetina y Luteolina en igual proporción, junto con los generados por los extractos del diseño factorial fraccionado  $2^{6-2}$ . Se decidió usar éstos ya que muestran un cambio más claro en las condiciones de operación usadas y como complemento, se realizó un barrido desde 273 a 390 nm para los puntos 1 y 3 de mayor rendimiento, en la **figura D8** (Véase **anexo D**) puede verse que a una concentración de 2000 ppm, el punto numero 3 presenta una mayor cantidad de

flavonoides que el punto 1. La **figura D9** (Véase **anexo D**), muestra la comparación entre los 4 flavonoides por separado y la **figura D10** (Véase **anexo D**) los espectros para el extracto hidrolizado junto a la mezcla patrón de los 4 flavonoides.

La **tabla D4** (Véase **anexo D**) muestra la cantidad de Pinocebrina, Naringenina, Quercetina, Luteolina y la masa total de flavonoides en el extracto obtenido; los experimentos 4, 9,11 y 15 del diseño factorial fraccionado presentan una cantidad de flavonoides superior a los demás puntos.

En el diagrama de Pareto mostrado en la **figura D11** (Véase **anexo D**) se observa que las variables presión (**P**), flujo de solvente (**F**), porcentaje de etanol (**E**) y una interacción binaria (**PF**) son las que tienen incidencia significativa sobre la cantidad de flavonoides obtenida y representan el 80 % de la variabilidad de los datos.

## 7. CONCLUSIONES

El análisis de varianza en el diseño factorial fraccionado  $2^{6-2}$ ; señaló a la variable presión como la de mayor relevancia en la obtención de extracto fraccionado a 80 bar (**F1**) y para el caso del extracto fraccionado a 40 bar, la variable de mayor significancia fue el flujo de solvente. La presencia de etanol en el proceso de extracción incrementó la cantidad de extracto obtenida en ambas fracciones y es posible saturar el solvente en un tiempo de extracción reducido si las variables ya mencionadas se encuentran en sus condiciones óptimas.

La extracción de *Lippia origanoides* quimiotipo timol realizada a una presión de 400 bar, un flujo de solvente de 50 g/ min y un porcentaje de etanol del 10% en un tiempo de extracción de 2 horas conseguirá el mayor rendimiento másico del proceso (1,24%) pero, a una presión de 307 bar, un flujo de solvente de 43 g/ min y un porcentaje de etanol del 8% en un tiempo de extracción de 2 horas se obtiene una concentración mayor de compuestos de interés; además de tener condiciones a las cuales es más fácil llegar.

El análisis obtenido a partir de la calibración multivariada mostró que la obtención de flavonoides se ve influenciada por las variables flujo, presión y porcentaje de etanol, lo que coincide con lo encontrado en análisis del diseño factorial fraccionado  $2^{6-2}$  y la optimización simplex; por lo tanto el proceso de extracción con fluido supercrítico de la *Lippia origanoides* está influenciado principalmente por cuatro variables principales que son: Presión, flujo de Solvente, porcentaje de etanol o cosolvente y tiempo de extracción.

## 8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1] OLIVEIRA, D; LEITAO, G; BIZZO, H; LOPES, D; ALVIANO, D; ALVIANO, C; LEITAO, S. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. En: *Food Chemistry*. Enero, 2007. Vol. 101. p, 192 – 202.
- [2] STASHENKO, E; RUIZ, C; MUÑOZ, A; CASTAÑEDA, M; MARTÍNEZ, J. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. En: *Natural Product Communications*. 2008. Vol. 3. No. 4. p, 563-566.
- [3] ZAPATA, B; DURÁN, C; STASHENKO, E; CORREA, J; BETANCUR, L. Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. En: *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud UIS*, 2009. Vol.41. No. p, 215-222.
- [4] STASHENKO, E; MARTINEZ, J; RUIZ, C; ARIAS, G; DURÁN, C; SALGAR, W; CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. En: *Journal of Separation Science*. 2010. Vol. 3. No. 1. p, 93-103.
- [5] ÁLVAREZ, A; TULIPANI J; ROMANDINI, S; VIDAL, S; BATTINO, A; Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honey: A review. En: *Analytical Chemistry*. Octubre, 2009. Vol. 5. No. 4. p, 293-302.
- [6] REVERCHON, E; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Marzo. 2006. Vol. 38, p. 146 – 166.
- [7] MEIRELES, A; CARVALHO Jr, R; MOURA, L; ROSA, P. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Octubre, 2005. Vol. 35. No. 3. p, 197-204.

- [8] FONNEGRA, Ramiro; JIMENEZ, Silvia. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2 Edición. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia, 2007. p. 193, ISBN 9789586559997
- [9] VENEREO, J; Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. En: *Revista Cubana de Medicina Militar*. Junio, 2002. Vol. 31. No. 2. p, 1-7.
- [10] RODRIGUEZ, J.M; MENÉNDEZ, J.R; TRUJILLO, Y; Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. En: *Revista Cubana de Medicina Militar*. Marzo, 2001. Vol. 30. No. 1. p, 1-6.
- [11] MOURA, P.M; PRADO, G.H.C; MEIRELES, M.A; PEREIRA, C.G; Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Febrero, 2012. Vol. 62. p, 116 -162.
- [12] STASHENKO, E; MARTINEZ, J; CALA, M; DURÁN, C; CABALLERO, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (*Verbenaceae*) aromatic plants. En: *Journal of Separación Science*. Enero, 2011. Vol. 36. No. 1. p, 192 – 202.
- [13] VICUÑA, G; STASHENKO, E; FUENTES, J. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. En: *Fitoterapia*. Octubre, 2009. Vol. 81. p, 343 – 349.
- [14] Herbario nacional colombiano, [Sitio de internet] disponible en: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/>. Fecha de consulta: 13 de Abril de 2015.
- [15] MARTINEZ, S; GONZÁLEZ, J; CULEBRAS, J. TUÑÓN, M. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. En: *Nutrición Hospitalaria*. 2002. Vol. 17. No. p, 271-278.
- [16] LUBNA, A; MOH, M; SHOWKAT, R. SHAH, A. Comparative assessment of extraction methods and quantitative estimation of luteolin in the leaves of *Vitex negundo* Linn. by HPLC En: *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014. Vol. 1. No. p, 289-293.

- [17] KUKULA, W; ALIGIANNIS, N; HALABALAKI, M; SKALTSOUNIS, A; KAZIMIERZ, G; KALPOUTZAKIS, E. Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb En: *Food Chemistry*. 2013. Vol. 138. No. p, 406-413.
- [18] SAAD, M; SALAM, A; KENAWY, S; ATIA, A. Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of global cerebral ischemia reperfusion En: *Pharmacological Reports*. 2015. Vol. 67. No. p, 115-122.
- [19] SMITH, Joseph; VAN NESS, Hendrik. Introducción a la termodinámica en ingeniería química. 5 edición. Mexico: Editorial McGRAW-HILL, 1997, p.60, ISBN 9701013336.
- [20] MEIRELES, Angela, Extracting bioactive compounds for food products. Theory and applications EEUU: Editorial CRC Press. 2009, p.272, ISBN 978142006237.
- [21] MUKHOPADHYAY, Mamata, Natural extracts using supercritical carbon dioxide. EEUU: Editorial CRC Press. 2000 p. 3-28, ISBN 0849308194.
- [22] LANG, Q; CHIEN M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. En: *Talanta*. Enero, 2001. Vol. 53. No.4. p, 771 - 782.
- [23] REVERCHON, E; SETSI OSSÉO, L; GORGOGLIONE, D. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of basil oil: characterization of products and process modeling. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Septiembre, 1994. Vol. 7. No. 3. p, 185-190.
- [24] DE CASTRO, Luque. M.D, Extracción con fluidos supercríticos en procesos analíticos. Barcelona: Editorial REVERTE S.A. 1993. p. 48, ISBN 8429179879.
- [25] SOVOVÁ, H. 1994, Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>. 1. Modeling of extraction curves. En: *Chemical Engineering Science*. Febrero, 1994. Vol. 49. No.3. p, 409 - 414.

- [26] COSTA, José, Curso de Ingeniería Química. Introducción a los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte. Barcelona: Editorial Reverté S.A. 2004 p. 81-82, ISBN 8429171266.
- [27] GOPALAKRISHNAN, N; NARAYANAN, C.S; Carbon dioxide extraction of Indian jasmine concrete. En: *Flavour and Fragrance Journal*. Junio, 2006, Vol. 6. No. 2. p. 135-138.
- [28] REVERCHON, E; SENATORE, F. Isolation of rosemary oil: comparison between hydrodistillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. En: *Flavour and Fragrance Journal*. Abril 2006, Vol. 7. No. 4. p.227-230.
- [29] LEE, Y; CHEN, C; YANG, H; LIN, C; MING, C. Isolation and purification of 3,5-dipranyl-4-hydroxycinnamic acid (*atepillin c*) in Brazilian *propolis* by SFE. En: *Separation and Purification Technology*. Marzo, 2007. Vol. 54. No.1. p, 130 - 138.
- [30] RODRÍGUEZ, E; ÁRIAS, J; VÁSQUEZ, G; MARTÍNEZ, J; STASHENKO, E. Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de Rosmarinus Officinalis, Salvia Officinalis Y Psidium Guajava obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico. En: *Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas*. Vol. 36. No. 140. p, 305-316.
- [31] REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Abril, 1997. Vol. 10. p, 1-37.
- [32] REVERCHON, E; Fractional separation of SCF extracts from marjoram leaves: mass transfer and optimization. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Diciembre, 1992. Vol. 5. No. 4. p, 256-261.
- [33] WALPOLE, R; MYERS, R; MYERS, S. Probabilidad y estadística para ingenieros. Sexta edición. México: PRENTICE HALL. 1999. p-560. ISBN 9701702646.
- [34] MONTGOMERY, D. Diseño y análisis de experimentos. Segunda Edición. México: Editorial LIMUS WILEY. 2004. p,304. ISBN 9681861566.

- [35] GUTIÉRREZ, P; DE LA VARA, R. Análisis y diseño de experimentos. Mexico: Editorial McGRAW HILL. 2008. p-260. ISBN 9701065263.
- [36] MARTÍNEZ, J; RUIZ, C; ARIAS, G; STASHENKO, E. Optimización de la extracción de antioxidantes de *Salvia officinalis* L. con CO2 supercrítico En: *Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas*. Septiembre, 2014. Vol. 38, p. 237-249.
- [37] RAMOS, E; VALERO, E; IBAÑEZ, E; REGLERO, G; TABERA, J. Obtention of a brewed coffee aroma extract by optimized supercritical CO2-based process. En: *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. Septiembre, 1998. Vol. 46, p. 4011-1016.
- [38] LANCAS, F; QUEIROZ, M; SILVA, I. Simplex optimization of extraction of soy bean oil by supercritical pentane. En: *Chromatoraphia*. Abril, 1995. Vol. 40, p. 421-424.
- [39] MAIO, G., VON HOLST, C., WENCLAWIAK, B. W., and DARSKUS, R. Supercritical fluid extraction of some chlorinated benzenes and ciclohexanes from soil: Optimization with fractional factorial design and simplex. En: *Analytical Chemistry*. Febrero, 1997. Vol. 69. p. 601-606.
- [40] MILLER, J.N; Estadística y quimiometria para química analítica. Cuarta Edición. Madrid: Editorial PRENTICE HALL. 2002. P-213. ISBN 8420535141.
- [41] TOMICK, Jhon. J. On convergence of the Nelder-Mead simplex algorithm for unconstrained stochastic optimización. Trabajo de grado Doctor en Filosofía, Statistics and operations researchs. EEUU: The Pennsylvania State University. Departamento de estadística, 1995. P-8.
- [42] KOWALSKI, B; BEEBE, K. An introduction to multivariate calibration and analysis. En: *Analytical Chemistry*. Septiembre, 19987. Vol. 59. No.17. p, 1007 - 1017.
- [43] BAUTISTA, R; JIMÉNEZ, A; JIMÉNEZ, F; ARIAS, J. Simultaneous determination of diazepam and pyridoxine in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations using graphical and multivariate calibration-

prediction methods. En: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Junio, 1996. Vol. 15. p, 183 - 192.

- [44] LEITAO, N; PRADO, G; VEGGA, P; MEIRELES, M; PEREIRA, C. *Anacardium occidentale L.* leaves extraction via SFE: Global yields, extractions, kinetics, mathematical modeling and economic evaluation. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Junio, 2014. Vol. 78. No. p, 114 - 123.
- [45] FRANCISCO, P; FRANCISCO, R; BOLZAN, A; BARTH, D. Supercritical fluid extraction of hernandulcin from *Lippia ducis trev.* En: *Journal of Supercritical Fluids*. Marzo, 2012. Vol. 63. No. p, 161 - 168.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- ÁLVAREZ, A; TULIPANI J; ROMANDINI, S; VIDAL, S; BATTINO, A; Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honey: A review. En: *Analytical Chemistry*. Octubre, 2009. Vol. 5. No. 4. p, 293-302.
- BAUTISTA, R; JIMÉNEZ, A; JIMÉNEZ, F; ARIAS, J. Simultaneous determination of diazepam and pyridoxine in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations using graphical and multivariate calibration-prediction methods. En: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Junio, 1996. Vol. 15. p, 183 - 192.
- COSTA, José, Curso de Ingeniería Química. Introducción a los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte. Barcelona: Editorial Reverté S.A. 2004 p. 81-82, ISBN 8429171266.
- DE CASTRO, Luque. M.D, Extracción con fluidos supercríticos en procesos analíticos. Barcelona: Editorial REVERTE S.A. 1993. p. 48, ISBN 8429179879.
- FONNEGRA, Ramiro; JIMENEZ, Silvia. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2 Edición. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia, 2007. p. 193, ISBN 9789586559997
- FRANCISCO, P; FRANCISCO, R; BOLZAN, A; BARTH, D. Supercritical fluid extraction of hernandulcin from *Lippia ducis trev*. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Marzo, 2012. Vol. 63. No. p, 161 - 168.
- GOPALAKRISHNAN, N; NARAYANAN, C.S; Carbon dioxide extraction of Indian jasmine concrete. En: *Flavour and Fragrance Journal*. Junio, 2006, Vol. 6. No. 2. p. 135-138.
- GUTIÉRREZ, P; DE LA VARA, R. Análisis y diseño de experimentos. Mexico: Editorial McGRAW HILL. 2008. p-260. ISBN 9701065263.

- Herbario nacional colombiano, [Sitio de internet] disponible en: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/>. Fecha de consulta: 13 de Abril de 2015.
- KOWALSKI, B; BEEBE, K. An introduction to multivariate calibration and analysis. En: *Analytical Chemistry*. Septiembre, 19987. Vol. 59. No.17. p, 1007 - 1017.
- KUKULA, W; ALIGIANNIS, N; HALABALAKI, M; SKALTSOUNIS, A; KAZIMIERZ, G; KALPOUTZAKIS, E. Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb En: *Food Chemistry*. 2013. Vol. 138. No. p, 406-413.
- LANCAS, F; QUEIROZ, M; SILVA, I. Simplex optimization of extraction of soy bean oil by supercritical pentane. En: *Chromatoraphia*. Abril, 1995. Vol. 40, p. 421-424.
- LANG, Q; CHIEN M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. En: *Talanta*. Enero, 2001. Vol. 53. No.4. p, 771 - 782.
- LEE, Y; CHEN, C; YANG, H; LIN, C; MING, C. Isolation and purification of 3,5-dipranyl-4-hydroxycinnamic acid (*atepillin c*) in Brazilian *propolis* by SFE. En: *Separation and Purification Technology*. Marzo, 2007. Vol. 54. No.1. p, 130 - 138.
- LEITAO. N; PRADO, G; VEGGA, P; MEIRELES, M; PEREIRA, C. *Anacardium occidentale* L. leaves extraction via SFE: Global yields, extractions, kinetics, mathematical modeling and economic evaluation. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Junio, 2014. Vol. 78. No. p, 114 - 123.
- LUBNA, A; MOH, M; SHOWKAT, R. SHAH, A. Comparative assessment of extraction methods and quantitative estimation of luteolin in the leaves of *Vitex negundo* Linn. by HPLC En: *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014. Vol. 1. No. p, 289-293.
- MAIO, G., VON HOLST, C., WENCLAWIAK, B. W., and DARSKUS, R. Supercritical fluid extraction of some chlorinated benzenes and ciclohexanes

from soil: Optimization with fractional factorial design and simplex. En: *Analytical Chemistry*. Febrero, 1997. Vol. 69. p. 601-606.

- MARTÍNEZ, J; RUIZ, C; ARIAS, G; STASHENKO, E. Optimización de la extracción de antioxidantes de *Salvia officinalis* L. con CO<sub>2</sub> supercrítico En: *Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas*. Septiembre, 2014. Vol. 38, p. 237-249.
- MARTINEZ, S; GONZÁLEZ, J; CULEBRAS, J. TUÑÓN, M. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. En: *Nutrición Hospitalaria*. 2002. Vol. 17. No. p, 271-278.
- MEIRELES, A; CARVALHO Jr, R; MOURA, L; ROSA, P. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Octubre, 2005. Vol. 35. No. 3. p, 197-204.
- MEIRELES, Angela, Extracting bioactive compounds for food products. Theory and applications EEUU: Editorial CRC Press. 2009, p.272, ISBN 978142006237.
- MILLER, J.N; Estadística y quimiometria para química analítica. Cuarta Edición. Madrid: Editorial PRENTICE HALL. 2002. P-213. ISBN 8420535141.
- MONTGOMERY, D. Diseño y análisis de experimentos. Segunda Edición. México: Editorial LIMUS WILEY. 2004. p,304. ISBN 9681861566.
- MOURA, P.M; PRADO, G.H.C; MEIRELES, M.A; PEREIRA, C.G; Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Febrero, 2012. Vol. 62. p, 116 -162.
- MUKHOPADHYAY, Mamata, Natural extracts using supercritical carbon dioxide. EEUU: Editorial CRC Press. 2000 p. 3-28, ISBN 0849308194.
- OLIVEIRA, D; LEITAO, G; BIZZO, H; LOPES, D; ALVIANO, D; ALVIANO, C; LEITAO, S. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. En: *Food Chemistry*. Enero, 2007. Vol. 101. p, 192 – 202.

- RAMOS, E; VALERO, E; IBAÑEZ, E; REGLERO, G; TABERA, J. Obtention of a brewed coffee aroma extract by optimized supercritical CO<sub>2</sub>-based process. En: *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. Septiembre, 1998. Vol. 46, p. 4011-1016.
- REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Abril, 1997. Vol. 10. p, 1-37.
- REVERCHON, E; Fractional separation of SCF extracts from marjoram leaves: mass transfer and optimization. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Diciembre, 1992. Vol. 5. No. 4. p, 256-261.
- REVERCHON, E; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Marzo. 2006. Vol. 38, p. 146 – 166.
- REVERCHON, E; SENATORE, F. Isolation of rosemary oil: comparison between hydrodistillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. En: *Flavour and Fragrance Journal*. Abril 2006, Vol. 7. No. 4. p.227-230.
- REVERCHON, E; SETSI OSSÉO, L; GORGOGNONE, D. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of basil oil: characterization of products and process modeling. En: *Journal of Supercritical Fluids*. Septiembre, 1994. Vol. 7. No. 3. p, 185-190.
- RODRÍGUEZ, E; ÁRIAS, J; VÁSQUEZ, G; MARTÍNEZ, J; STASHENKO, E. Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de Rosmarinus Officinalis, Salvia Officinalis Y Psidium Guajava obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico. En: *Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas*. Vol. 36. No. 140. p, 305-316.
- RODRIGUEZ, J. M; MENÉNDEZ, J.R; TRUJILLO, Y; Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. En: *Revista Cubana de Medicina Militar*. Marzo, 2001. Vol. 30. No. 1. p, 1-6.
- SAAD, M; SALAM, A; KENAWY, S; ATIA, A. Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat

model of global cerebral ischemia reperfusion En: *Pharmacological Reports*. 2015. Vol. 67. No. p, 115-122.

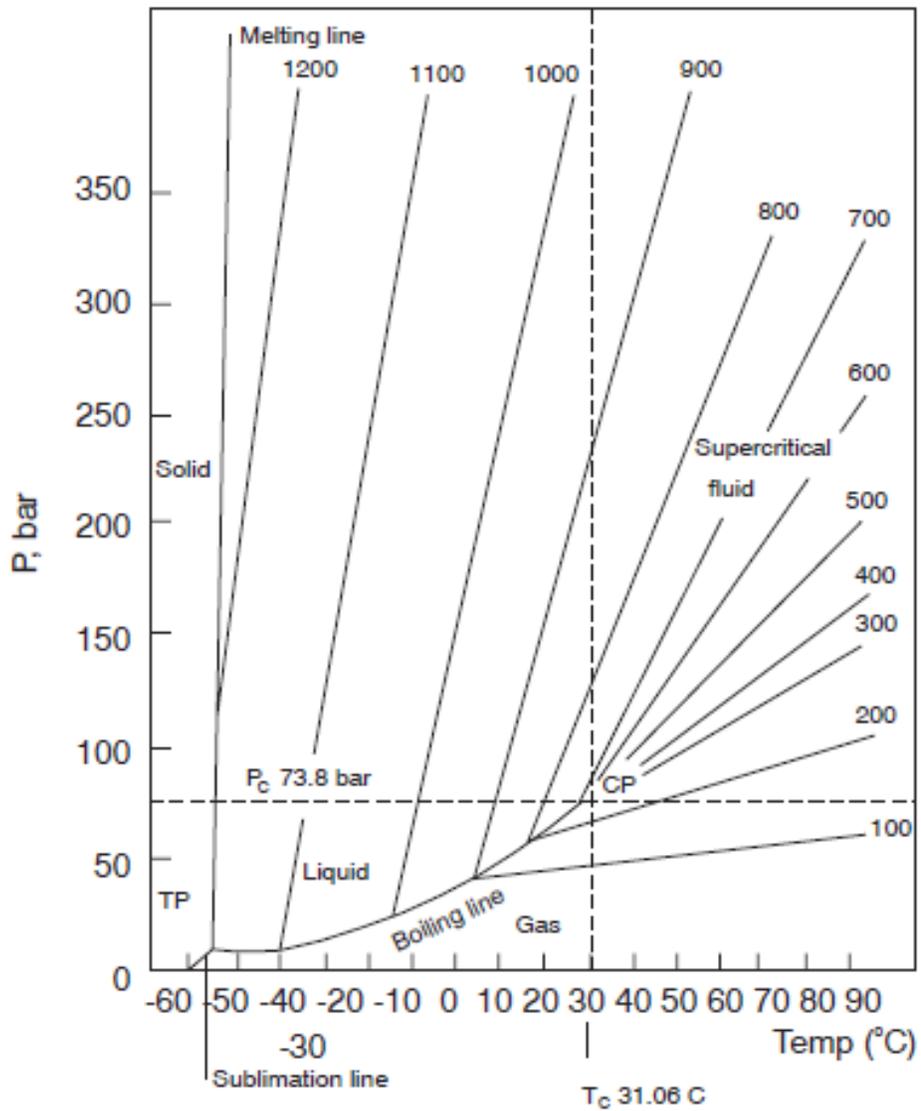
- SMITH, Joseph; VAN NESS, Hendrik. Introducción a la termodinámica en ingeniería química. 5 edición. Mexico: Editorial McGRAW-HILL, 1997, p.60, ISBN 9701013336.
- SOVOVÁ, H. 1994, Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>. 1. Modeling of extraction curves. En: *Chemical Engineering Science*. Febrero, 1994. Vol. 49. No.3. p, 409 - 414.
- STASHENKO, E; MARTINEZ, J; RUIZ, C; ARIAS, G; DURÁN, C; SALGAR, W; CALA, M. Lippia origanoides chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. En: *Journal of Separation Science*. 2010. Vol. 3. No. 1. p, 93-103.
- STASHENKO, E; MARTINEZ, J; CALA, M; DURÁN, C; CABALLERO, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia (Verbenaceae)* aromatic plants. En: *Journal of Separación Science*. Enero, 2011. Vol. 36. No. 1. p, 192 – 202.
- STASHENKO, E; RUIZ, C; MUÑOZ, A; CASTAÑEDA, M; MARTÍNEZ, J. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. En: *Natural Product Communications*. 2008. Vol. 3. No. 4. p, 563-566.
- TOMICK, Jhon. J. On convergence of the Nelder-Mead simplex algorithm for unconstrained stochastic optimización. Trabajo de grado Doctor en Filosofía, Statistics and operations researchs. EEUU: The Pennsylvania State University. Departamento de estadística, 1995. P-8.
- VENEREO, J; Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. En: *Revista Cubana de Medicina Militar*. Junio, 2002. Vol. 31. No. 2. p, 1-7.

- VICUÑA, G; STASHENKO, E; FUENTES, J. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. En: *Fitoterapia*. Octubre, 2009. Vol. 81. p, 343 – 349.
- WALPOLE, R; MYERS, R; MYERS, S. Probabilidad y estadística para ingenieros. Sexta edición. México: PRENTICE HALL. 1999. p-560. ISBN 9701702646.
- ZAPATA, B; DURÁN, C; STASHENKO, E; CORREA, J; BETANCUR, L. Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. En: *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud UIS*, 2009. Vol.41. No. p, 215-222.

## 10. ANEXOS

### ANEXO A. DIAGRAMA DE DENSIDADES PARA EL CO<sub>2</sub>.

Figura A 1. Diagrama de densidades para el CO<sub>2</sub>.



Fuente: *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. Mukhopadhyay. P.14.

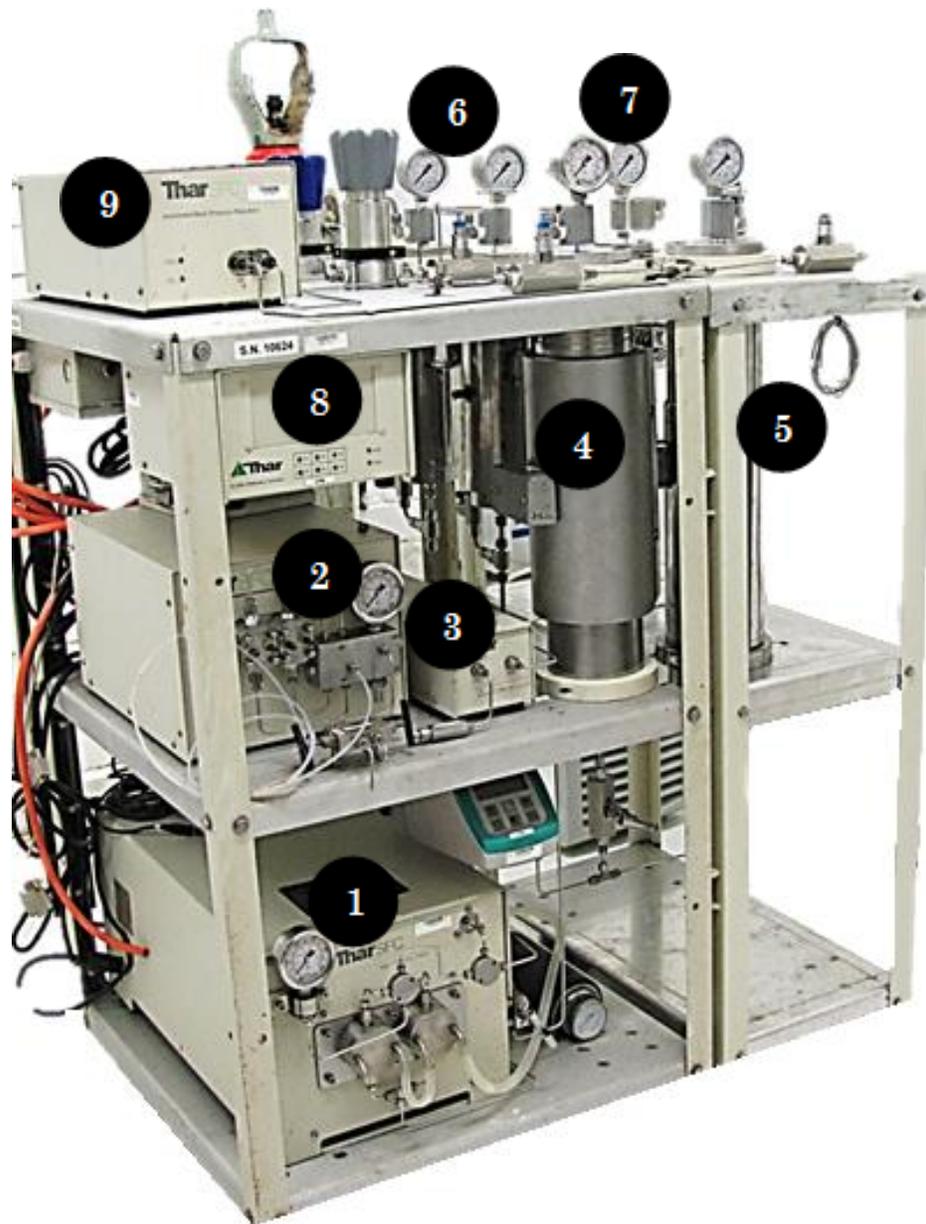
**ANEXO B. MOLINO DE CORTE.**

**Figura B.** Molino de corte SM100 RETSCH.



## ANEXO C. PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO.

**Figura C.** Planta piloto de extracción con fluido supercrítico. 1. Bomba de alta presión. 2. Bomba de cosolvente. 3. Intercambiador de calor. 4. Cámara de extracción 1. 5. Cámara de extracción 2. 6. Cilindros colectores para fraccionamiento. 7. Cilindro colector para descarga. 8. Controlador. 9. Válvula de alta presión ABPR.



**ANEXO D. DATOS COMPLEMENTARIOS.**

**Tabla D 1.** Resultados obtenidos en la primera prueba de reproducibilidad de los ensayos

PUEBRA 1	P, bar	T, °C	F, g/min	Z, mm	t, min	%	Extracto	Resultados estadísticos	
							gramos		
	200	50	40	2	60	0	3,5	Promedio, g	3,2
200	50	40	2	60	0	3,3	Desviación estándar	0,3	
200	50	40	2	60	0	2,9	Coefficiente de Variación %	9,4	

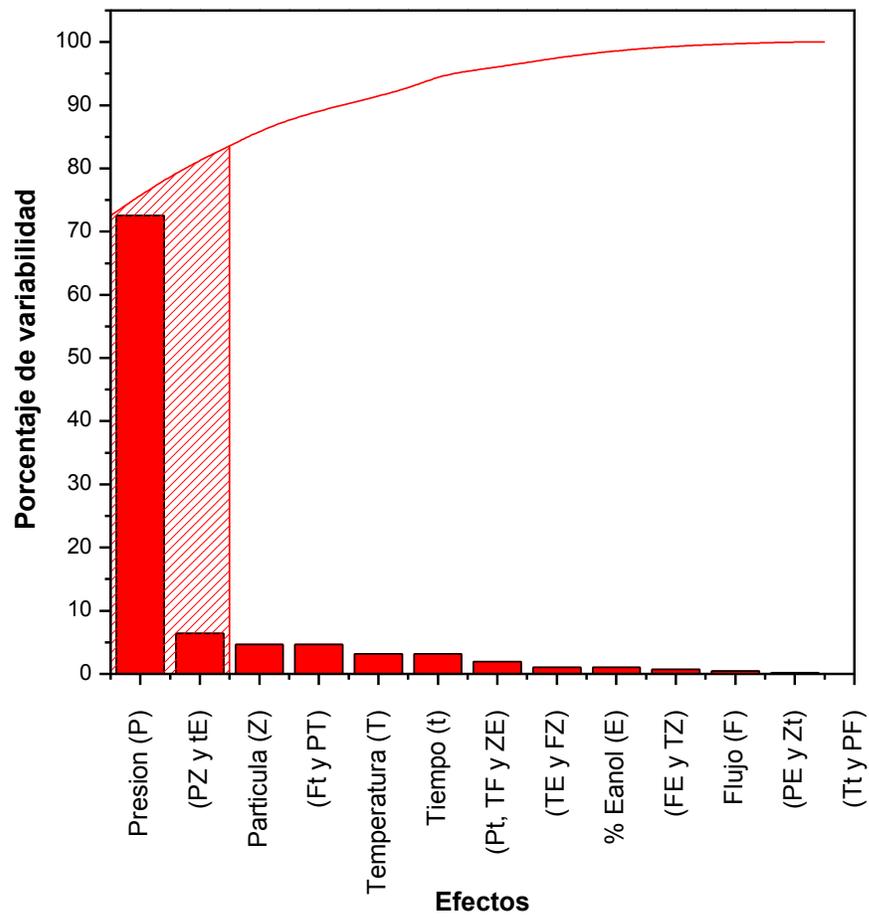
**Tabla D 2.** Resultados obtenidos en la segunda prueba de reproducibilidad de los ensayos.

PUEBRA 2	P, bar	T, °C	F, g/min	Z, mm	t, min	%	Extracto	Resultados estadísticos	
							gramos		
	300	50	30	2	60	0	3	Promedio, g	3
300	50	30	2	60	0	3	Desviación estándar	0,1	
300	50	30	2	60	0	3,1	Coefficiente de Variación %	1,8	

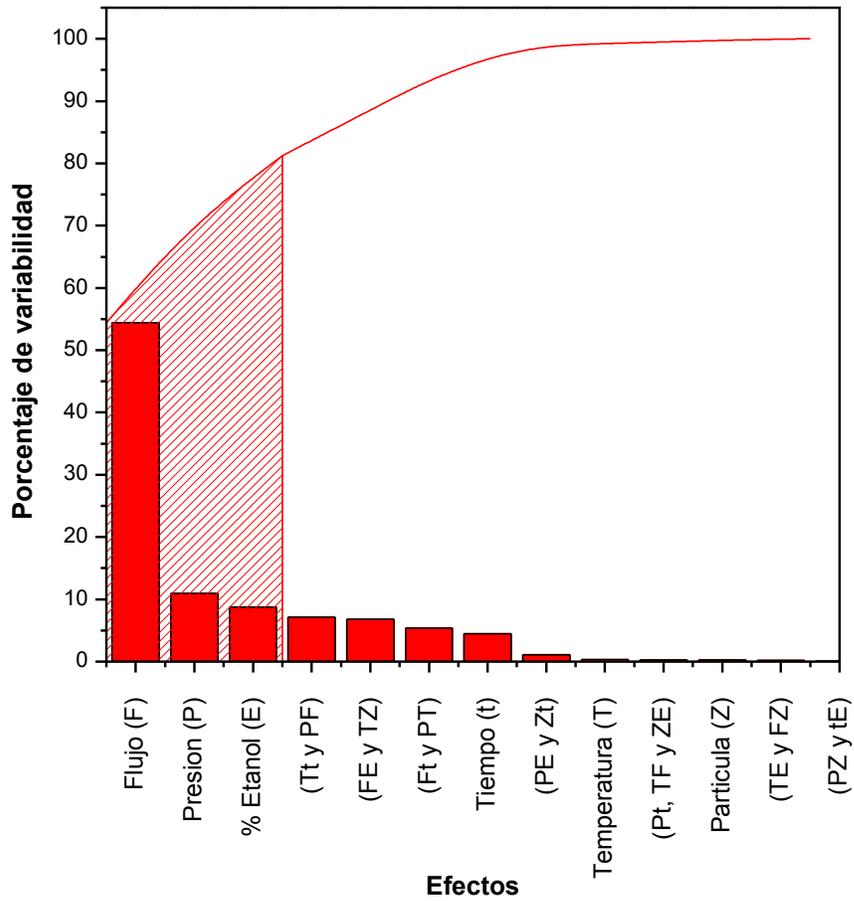
**Tabla D 3.** Total experimentos del diseño factorial fraccionado 2<sup>6-2</sup>.

Prueba Nº	P, bar	T, °C	F, g/min	Z, mm	t, min	E, %	Peso F1, g	Peso F2, g	Masa total, g
1	80	40	10	0,5	60	0	0,1	0,2	0,3
2	400	40	50	2	60	0	1,5	1,9	3,4
3	80	60	10	0,5	120	10	0,2	0,01	0,21
4	80	40	50	0,5	120	10	0,5	3	3,5
5	400	60	10	2	60	0	1,3	0,2	1,5
6	80	60	50	0,5	60	0	0,1	0,3	0,4
7	400	40	10	0,5	120	0	0,9	0,01	0,91
8	400	40	10	2	120	10	1,6	0,5	2,1
9	400	60	50	0,5	120	0	1,5	3,4	4,9
10	80	40	50	2	120	0	0,1	1,7	1,8
11	400	40	50	0,5	60	10	0,3	3,9	4,2
12	80	60	50	2	60	10	0,3	2	2,3
13	80	60	10	2	120	0	0,1	0,1	0,2
14	400	60	10	0,5	60	10	1,4	0,5	1,9
15	400	60	50	2	120	10	2,2	6,3	8,5
16	80	40	10	2	60	10	0,2	0	0,2

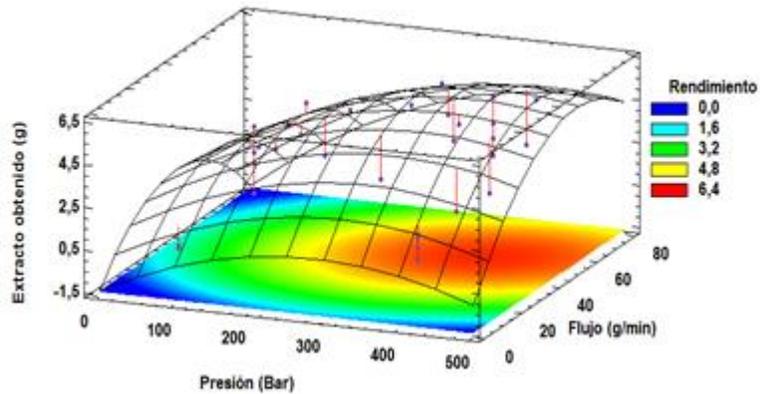
**Figura D 1.** Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de la fracción 1. La región sombreada representa que las variables contenidas explican el 80% de la variabilidad de los datos.



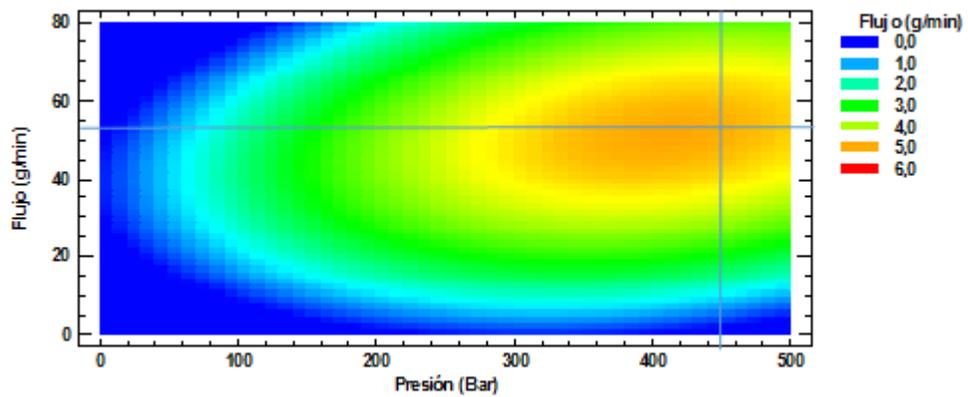
**Figura D 2.** Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de la fracción 2. La región sombreada representa que las variables contenidas explican el 80% de la variabilidad de los datos.



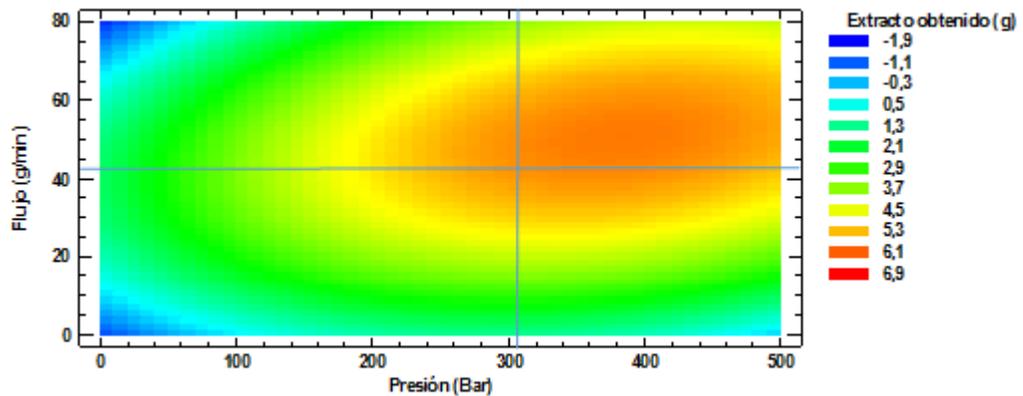
**Figura D 3.** Gráfico de superficie de respuesta usando un porcentaje de etanol del 6.6%, un tiempo de extracción de 94 minutos en el modelo obtenido.



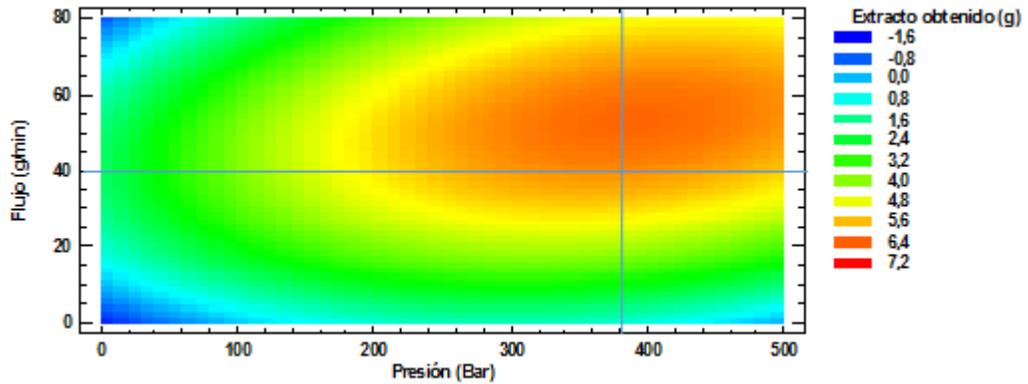
**Figura D 4.** Gráfico de contorno usando un porcentaje de etanol del 11,4% y un tiempo de extracción de 52 minutos en el modelo obtenido.



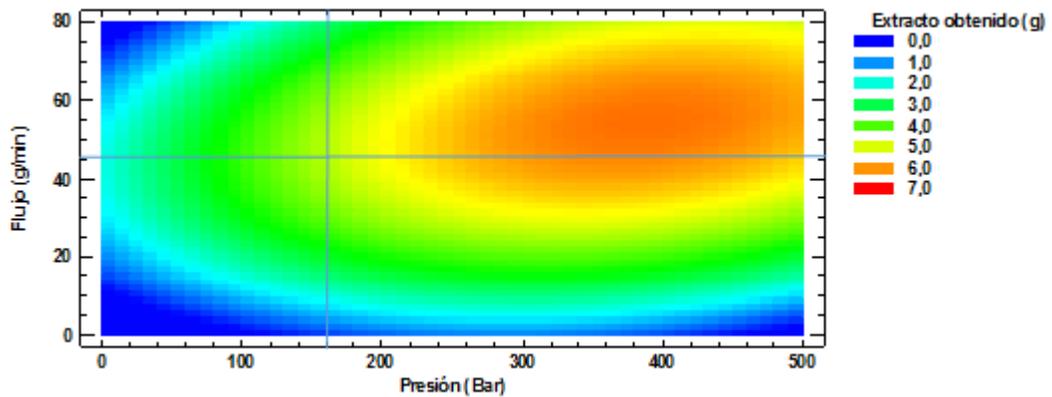
**Figura D 5.** Gráfico de contorno usando un porcentaje de etanol del 4,5% y un tiempo de extracción de 92 minutos en el modelo obtenido.



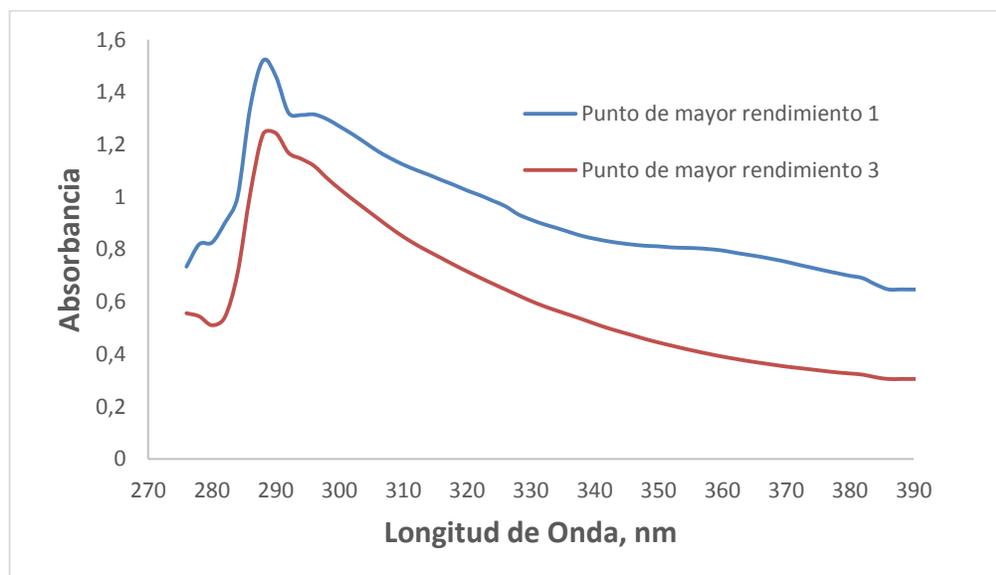
**Figura D 6.** Gráfico de contorno usando un porcentaje de etanol del 8% y un tiempo de extracción de 96 minutos en el modelo obtenido.



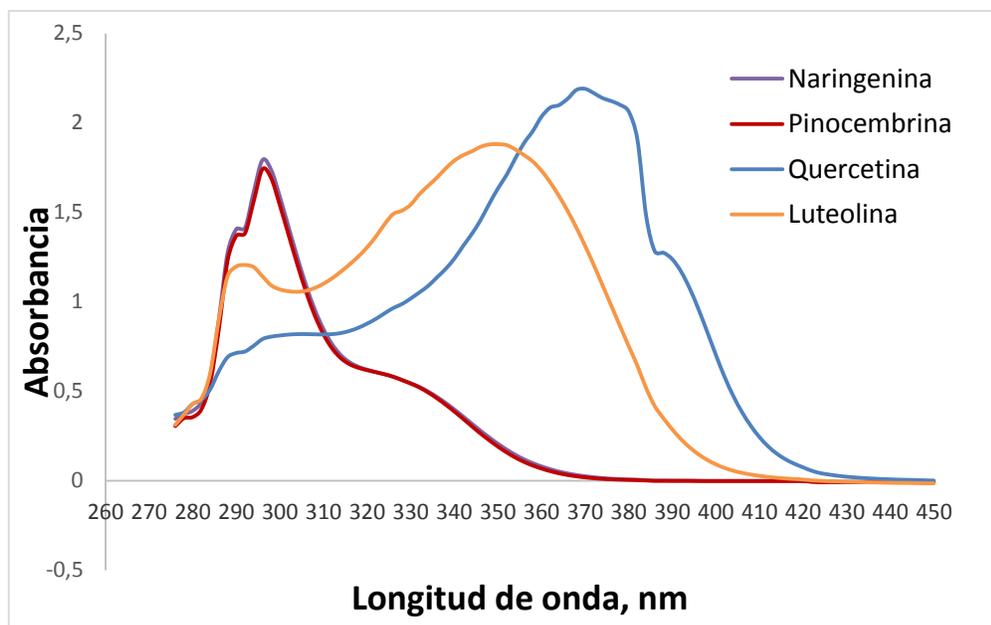
**Figura D 7.** Gráfico de contorno usando un porcentaje de etanol del 8,5% y un tiempo de extracción de 106 minutos en el modelo obtenido.



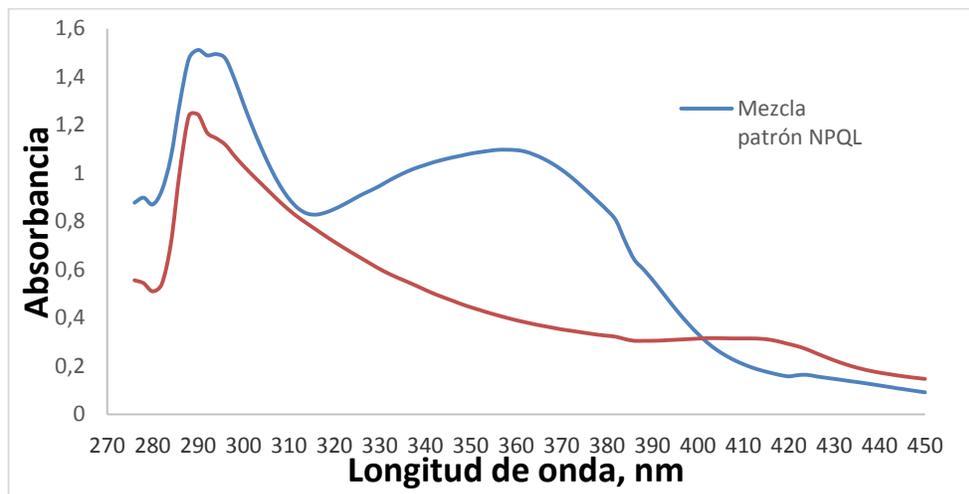
**Figura D 8.** Espectros para los puntos 1 y 3 de mayor rendimiento en la optimización simplex.



**Figura D 9.** Espectro para cada uno de los flavonoides encontrados en la especie *L. organoides* quimiotipo timol.



**Figura D 10.** Espectro para la mezcla patrón de los cuatro flavonoides hallados en *L. organoides* quimiotipo timol y su extracto.



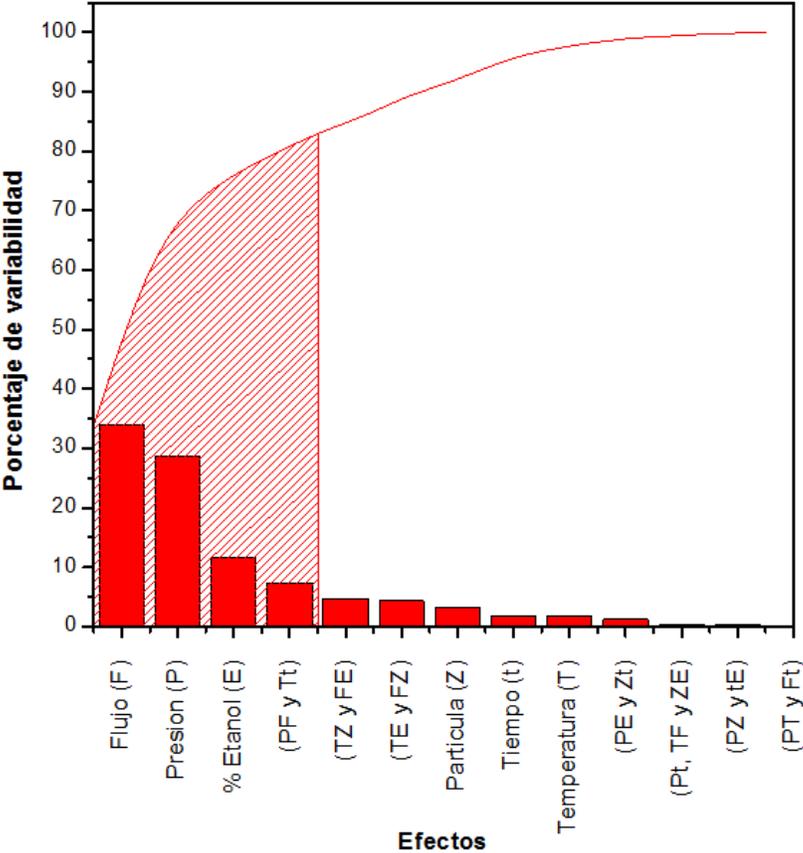
**Tabla D 4.** Comparación entre el rendimiento predicho por el modelo y el rendimiento experimental.

Variables principales				Rto, %	Observado	Ajustado	Residuo	Residuo estudentizado
P, Bar	F, g/min	t, min	E, %					
80	10	60	0	0,06	0,06	-0,096	0,156	1,497
400	50	60	0	0,68	0,68	0,859	-0,179	-1,585
80	10	120	10	0,042	0,042	0,180	-0,138	-1,280
80	50	120	10	0,7	0,7	0,568	0,132	1,171
400	10	60	0	0,3	0,3	0,197	0,103	0,929
80	50	60	0	0,08	0,08	0,291	-0,211	-2,023
400	10	120	0	0,182	0,182	0,279	-0,097	-0,916
400	10	120	10	0,42	0,42	0,474	-0,054	-0,493
400	50	120	0	0,98	0,98	0,941	0,039	0,345
80	50	120	0	0,36	0,36	0,373	-0,013	-0,118
400	50	60	10	0,84	0,84	1,054	-0,214	-1,917
80	50	60	10	0,46	0,46	0,486	-0,026	-0,228
80	10	120	0	0,04	0,04	-0,014	0,054	0,508
400	10	60	10	0,38	0,38	0,392	-0,012	-0,110
400	50	120	10	1,24	1,24	1,136	0,104	0,879
80	10	60	10	0,04	0,04	0,098	-0,058	-0,547
134	31	106	11,4	0,78	0,78	0,802	-0,022	-0,193
417	23,8	46,1	2,93	0,48	0,48	0,380	0,100	0,913
132	47,4	113	9,29	0,8	0,8	0,797	0,003	0,027
359	45,4	66,4	1,98	0,84	0,84	0,949	-0,109	-0,893
438	33,3	45,7	0,97	0,56	0,56	0,484	0,076	0,724
160	46	106	8,51	1,04	1,04	0,902	0,138	1,136
220	45,4	90,1	7,94	1,02	1,02	1,054	-0,034	-0,278
154	32,4	101	2,94	0,76	0,76	0,721	0,039	0,316
449	53,5	51,8	11,4	1,2	1,2	0,952	0,248	2,728
307	43	92	5	1	1,16	1,098	0,062	0,508
111	62,4	130,3	10,5	0,5	0,5	0,495	0,005	0,052
333	53	139	13,3	0,98	0,98	0,953	0,027	0,272
420	60	144	12	0,68	0,68	0,848	-0,168	-1,806
380	40	96	8	1,08	1,08	1,157	-0,077	-0,660
307	60	120	5	1,16	1,16	0,995	0,165	1,679
200	40	60	0	0,64	0,64	0,634	0,006	0,052
300	30	60	0	0,62	0,62	0,665	-0,045	-0,396

**Tabla D 5.** Contenido de flavonoides en el extracto de *L. origanoides* quimiotipo timol.

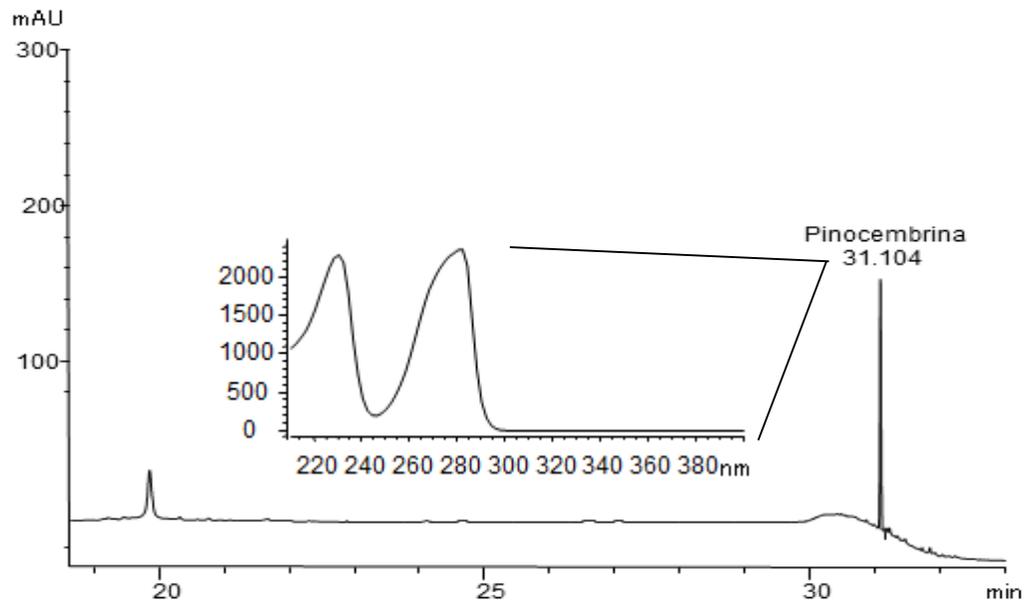
	Peso F1 vial, g	Peso F2 vial, g	Peso total, g	Masa de Pinocembrina y Naringenina, mg/g extracto	Masa de Quercetina, mg/g extracto	Masa de Luteolina, mg/g extracto	Masa de flavonoides, mg/g extracto	Masa total de flavonoides, mg
1	0,1	0,2	0,3	15,51	1,07	4,84	21,43	6,43
2	1,5	1,9	3,4	15,57	2,39	4,57	22,53	76,60
3	0,2	0,01	0,21	54,51	10,64	14,79	79,94	16,79
4	0,5	3	3,5	23,74	3,44	6,61	33,79	118,28
5	1,3	0,2	1,5	12,25	2,35	2,32	16,92	25,37
6	0,1	0,3	0,4	22,66	2,54	2,91	28,11	11,24
7	0,9	0,01	0,91	24,81	7,49	7,56	39,87	36,28
8	1,6	0,5	2,1	23,38	7,38	5,85	36,61	76,87
9	1,5	3,4	4,9	19,60	4,40	6,80	30,81	150,95
10	0,1	1,7	1,8	13,60	2,68	2,85	19,13	34,43
11	0,3	3,9	4,2	22,00	22,56	15,02	59,58	250,22
12	0,3	2	2,3	11,26	5,54	1,22	18,03	41,46
13	0,1	0,1	0,2	21,45	6,71	5,73	33,89	6,78
14	1,4	0,5	1,9	16,40	2,42	3,15	21,96	41,73
15	2,2	6,3	8,5	11,28	5,03	3,33	19,64	166,97
16	0,2	0	0,2	28,92	20,81	0,22	49,95	9,99

**Figura D 11.** Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de la totalidad de la masa de flavonoides en el extracto de *L. origanoides* quimiotipo timol.



**ANEXO E. CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LOS EXTRACTOS DE LA FRACCIÓN 1 Y 2.**

**Figura E 1.** Cromatograma para la fracción 1 de *Lippia origanoides*.



**Figura E 2.** Cromatograma para la fracción 2 de *Lippia origanoides*.

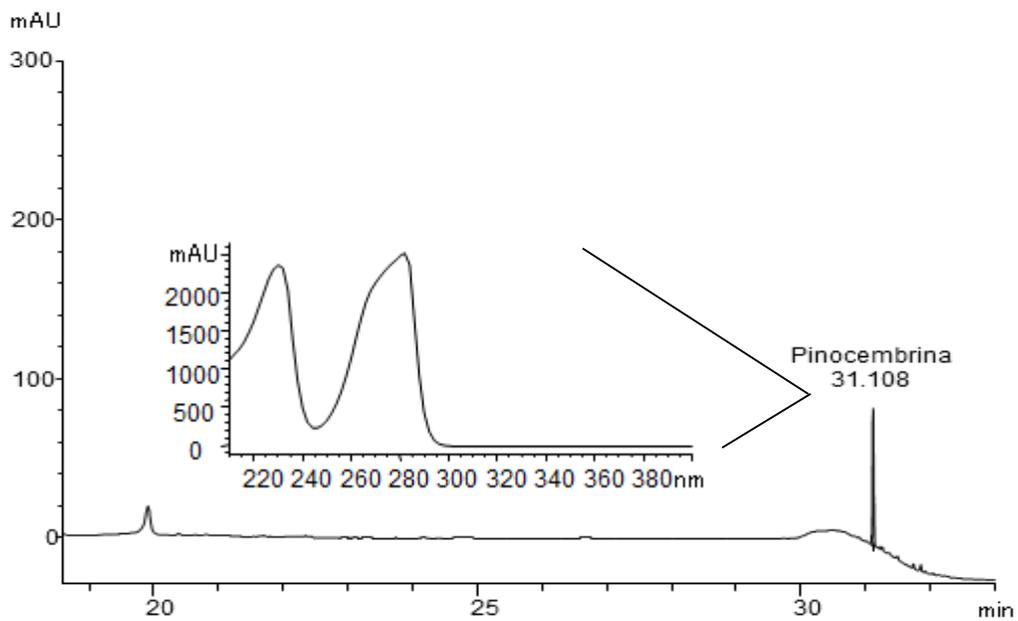


Figura E 3. Patrón específico para la detección de flavonoides.

