

**COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE MANZANILLA (*Matricaria
chamomilla* L.) OBTENIDO MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE FLUIDOS
SUPERCRÍTICOS Y OTRAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN VERDES.**

MARÍA CAMILA MELO GUERRERO

DANIEL ESTEBAN ORTIZ JURADO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

SAN JUAN DE PASTO

2019

**COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE MANZANILLA (*Matricaria
chamomilla* L.) OBTENIDO MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE FLUIDOS
SUPERCRÍTICOS Y OTRAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN VERDES.**

MARÍA CAMILA MELO GUERRERO

DANIEL ESTEBAN ORTIZ JURADO

**Trabajo de grado modalidad investigación presentado como requisito parcial para
optar al título de Ingeniero Agroindustrial**

Asesor:

ANDRÉS MAURICIO HURTADO BENAVIDES Ph.D.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

SAN JUAN DE PASTO

2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1º del Acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN:

Ph.D. Andrés Mauricio Hurtado Benavides
Asesor

Ph.D. Oscar Arango Bedoya
Jurado

M.Sc verónica Jarrín Jarrín
Jurado

Agradecimientos

A Dios.

A nuestras familias.

A la Universidad de Nariño.

A la Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

Al Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria y sus integrantes.

Al Doctor Andrés Mauricio Hurtado Benavides.

Al Doctor Oscar Arango Bedoya.

A la Magister Verónica Jarrín Jarrín.

Al Químico David Arturo Perdomo.

A la Química Jessica Saray Basante Valencia.

Al Ingeniero Esteban Hernán Arteaga Cabrera.

Al personal de Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño.

A todas las personas que con su apoyo desinteresado aportaron sus conocimientos a esta investigación.

Dedicatoria

Este trabajo de investigación lo dedico en primera instancia a Dios, porque sin el nada de esto sería posible, a mi familia especialmente a mi madre y abuelita por su sacrificio, esfuerzo y amor incondicional.

A los profesores de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial por sus enseñanzas durante mi formación profesional; y a todos mis amigos por su apoyo durante este proceso.

Gracias a Todos.

María Camila Melo Guerrero

Dedicatoria

*A Dios por darme la vida,
Por ser siempre la luz que me indica el camino
Y por ser siempre mi fuerza cuando más lo necesito.*

*A mis padres Sonia y Jesús, por todo su amor y confianza,
Por ser mi apoyo en cada paso que doy en la vida.*

*A mis hermanos Juan David y Chucho, por ser mi motor para salir adelante y cada día dar
lo mejor de mí.*

*A todos mis familiares y amigos por haber estado siempre a mi lado motivándome para
alcanzar esta meta.*

*A ti por acompañarme y brindarme tu apoyo durante el largo de este recorrido, te quiero y
te admiro mucho.*

A Cami por su amistad y compañía en todo momento.

*Y a todas las personas que de una u otra manera me brindaron su apoyo en el momento
cuando más lo necesite.*

A todos mil gracias y que Dios los bendiga.

Daniel Esteban Ortiz Jurado

“El tiempo de Dios es perfecto”

Contenido

	Pág.
Introducción.....	21
1. Planteamiento del problema.....	23
2. Justificación.....	28
3. Marco teórico.	31
3.1. Generalidades de la manzanilla (<i>Matricaria chamomilla L.</i>).....	31
3.1.1. Clasificación taxonómica de la Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla L.</i>).	32
3.2. Aceites Esenciales (A.E).....	32
3.2.1. Aceite esencial de manzanilla.....	34
3.3. Métodos de extracción.	37
3.3.1. Métodos de extracción convencionales.....	39
3.3.2. Métodos de extracción verdes.....	39
3.3.2.1. Método de arrastre con vapor de agua (AV).....	41
3.3.2.2. Método destilación extracción simultanea (DES).....	41
3.3.2.3. Método de hidrodestilación o destilación con agua (HD).....	42
3.3.2.4. Método de maceración.	43
3.3.2.5. Tecnología de fluidos supercríticos.....	43
3.4. Actividad antioxidante.	47
3.4.1. Antioxidante.	47
3.4.2. Actividad antioxidante.....	48
3.4.3. Métodos de determinación de actividad antioxidante.	49
3.5. Técnicas de análisis de aceites.....	51

3.5.1.	Cromatografía de gases.	51
3.5.2.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	51
4.	Antecedentes.	53
5.	Objetivos.	61
5.1.	Objetivo general.	61
5.2.	Objetivos específicos.	61
6.	Metodología.	62
6.1.	Localización.	62
6.2.	Obtención y adecuación del material vegetal.	62
6.3.	Caracterización del material vegetal.	63
6.3.1.	Análisis Granulométrico.	63
6.3.2.	Humedad.	65
6.4.	Obtención de los extractos.	66
6.4.1.	Extracción con fluidos supercríticos.	66
6.4.2.	Arrastre con vapor.	71
6.4.3.	Método de maceración.	72
6.4.4.	Hidrodestilación.	73
6.4.5.	Destilación extracción simultánea (DES).	74
6.5.	Medición de la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) Por el método ABTS.	75
6.6.	Análisis por cromatografía de gases.	79
6.7.	Diseño experimental y análisis estadístico.	79
7.	Resultados y análisis.	81
7.1.	Caracterización del materia vegetal.	81

7.1.1.	Humedad.....	81
7.1.2.	Análisis granulométrico.....	81
7.2.	Obtención de los extractos.....	81
7.2.1.	Extracción con fluidos supercríticos.....	81
7.2.1.1.	Rendimiento del aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) extraído con CO ₂ supercrítico.....	83
7.2.1.2.	Composición del aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) obtenido por fluidos supercríticos.....	87
7.2.1.3.	Actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) obtenido por fluidos supercríticos.....	90
7.2.2.	Extracción por arrastre con vapor.....	92
7.3.	Análisis del aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) obtenido por diferentes técnicas de extracción verdes, mediante cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas (GC-MS).....	93
7.3.1.	Análisis de compuestos mayoritarios.....	99
7.3.1.1.	En-in-dicicloeter.....	99
7.3.1.2.	β -farneseno.....	102
7.3.1.3.	Óxido de bisabolol A.....	104
7.4.	Evaluación de la actividad antioxidante.....	106
	Conclusiones.....	111
	Recomendaciones.....	113
	Referencias.....	114

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Diagrama de fases de un compuesto puro.....	44
Figura 2. Reacción antioxidante del radical catión ABTS ensayo TEAC.....	50
Figura 3. Obtención y adecuación de la manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.)	63
Figura 4. Tamizado de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.).....	64
Figura 5. Determinación de humedad de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) en balanza gravimétrica.	66
Figura 6. Diagrama del proceso del equipo de extracción SFE -500	67
Figura 7. Proceso de obtención de aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) mediante tecnología se fluidos supercríticos (SFE).....	68
Figura 8. Proceso de obtención de aceite esencial (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) mediante arrastre con vapor.	71
Figura 9. Extracción de aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) mediante maceración.....	72
Figura 10. Rotaevaporación del extracto de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) obtenido mediante maceración.	73
Figura 11. Extracción de aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) mediante hidrosestilación, con equipo Clevenger.	74

Figura 12. Extracción de aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) mediante destilación extracción simultanea (DES).....	75
Figura 13. Cromatograma muestra de aceite esencial de manzanilla obtenido con fluidos supercríticos a $T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $P = 210\text{ bar}$	95
Figura 14. Cromatograma muestra de aceite esencial de manzanilla obtenido con arrastre con vapor (AV).....	96
Figura 15. Cromatograma muestra de aceite esencial de manzanilla obtenido con maceración (MC).....	97
Figura 16. Cromatograma muestra de aceite esencial de manzanilla obtenido con hidrodestilación (HD).....	98
Figura 17. Cromatograma muestra de aceite esencial de manzanilla obtenido con destilación extracción simultanea (DES).....	99

Lista de gráficos

	Pág.
Gráfico 1. Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante (TEAC).	77
Gráfico 2. Cinética de extracción con CO ₂ supercrítico de aceite de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.). Presión: 150 bar; Temperatura: 50 °C y 5 % de cosolvente (etanol).	82
Gráfico 4. Diagrama de Pareto para el rendimiento de aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) obtenido por fluidos supercríticos.	86
Gráfico 5. Diagrama de efectos principales para rendimiento de aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) obtenido por fluidos supercríticos.	87
Gráfico 6. Composición del aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) obtenido por fluidos supercríticos (SFE).	90
Gráfico 7. Resultados actividad antioxidante de aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) obtenido con fluidos supercríticos.	92
Gráfico 8. Gráfica de medias y 95% de Tukey HSD, para en-in-dicicloeter presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).	101
Gráfico 9. Gráfica de medias y 95% de Tukey HSD, para β -farneseno presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).	103

Gráfico 10. Gráfica de medias y 95% de Tukey HSD, para óxido de bisabolol A presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos). 105

Gráfico 11. Gráfica de medias y 95% de Tukey HSD, para la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos). 108

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Área y producción de plantas aromáticas en Colombia.	25
Tabla 2. Clasificación Taxonómica de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.).....	32
Tabla 3. Principales industrias y sus respectivas ramas donde se utilizan aceites esenciales y productos derivados.....	34
Tabla 4. Principales compuestos del aceite esencial de la manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.)	35
Tabla 5. Usos y aplicaciones del aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.)	36
Tabla 6. Métodos de extracción de aceites esenciales.....	38
Tabla 7. Tecnologías verdes para la extracción de compuestos bioactivos.....	40
Tabla 8. Fluidos supercríticos más utilizados.....	46
Tabla 9. Análisis granulométrico de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.).....	65
Tabla 10. Matriz de diseño experimental para la extracción con fluidos supercríticos (SFE), diseño factorial 32 con cuatro puntos centrales.....	70
Tabla 11. Absorbancias de la prueba de ABTS•+ con distintas concentraciones de Trolox para la elaboración de la curva de calibración.....	77

Tabla 12. Resultados de la prueba ABTS•+ para ácido ascórbico.	78
Tabla 13. Resultados de los rendimientos de las extracciones de aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) mediante técnica de fluidos supercríticos (% p/p). Diseño factorial 32 tipo superficie de respuesta con cuatro puntos centrales. Flujo CO ₂ : 30 g/min; % cosolvente: 0 %; tiempo de extracción: 150 min.	84
Tabla 14. Análisis de varianza para rendimiento de aceite de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) obtenido por fluidos supercríticos.	85
Tabla 15. Composición del aceite esencial de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) obtenido por fluidos supercríticos. Diseño factorial 32 tipo superficie de respuesta con cuatro puntos centrales.	89
Tabla 16. Resultados de actividad antioxidante en TEAC para los aceites esenciales de manzanilla obtenido por fluidos supercríticos (SFE).	91
Tabla 17. Composición del aceite esencial de manzanilla extraído con SFE, AV, HD, MC y DES.	94
Tabla 18. Índice de retención lineal del aceite esencial de manzanilla extraído con SFE, AV, HD, MC y DES.	94
Tabla 19. Valor P en análisis de varianza para en-in-dicicloeter presente en aceite esencial de manzanilla.	100

Tabla 20. Prueba de múltiples rangos para en-in-dicicloeter presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).	101
Tabla 21. Valor P en análisis de varianza para β -farneseno presente en aceite esencial de manzanilla.....	102
Tabla 22. Prueba de múltiples rangos para β -farneseno presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).....	103
Tabla 23. Valor P en análisis de varianza para óxido de bisabolol A presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).....	104
Tabla 24. Prueba de múltiples rangos para óxido de bisabolol A presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).....	105
Tabla 25. Actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla extraído con SFE (fluidos supercríticos), AV (arrastre con vapor), HD (hidrodestilación), MC (maceración) y DES (destilación extracción simultánea), analizados por ABTS•+.....	107
Tabla 26. Valor P en análisis de varianza para la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla.....	108

Tabla 27. Prueba de múltiples rangos para la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).	109
--	-----

Resumen

Se comparó la composición y la actividad antioxidante de aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*) obtenido mediante Fluidos Supercríticos (SFE) y otras técnicas de extracción verdes (Arrastre con vapor (AV), Hidrodestilación (HD), Destilación extracción simultánea (DES) y Maceración (MC)). Se optimizó el proceso de extracción con fluidos supercríticos, donde se evaluó el efecto de la temperatura (35-65°C) y la presión (90-210 bar) sobre el rendimiento de la extracción (%p/p), obteniendo a T=65°C y P= 210 bar el punto óptimo de extracción (0,87 % p/p). La determinación de la composición química de los aceites se realizó utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) presentando una composición de aceite esencial enriquecida en dicicloeteres, sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados, en-in-dicicloeter, β -farneseno, y óxido de bisabolol A respectivamente. Los resultados de los análisis de GC-MS indican que al emplear diferentes métodos de extracción la composición y concentración del aceite esencial cambia, por ejemplo para los aceites extraídos por MC en-in-dicicloeter es su componente mayoritario, por el contrario para HD es β -farneseno y por ultimo para DES es óxido de bisabolol A. En, cuanto a la actividad antioxidante determinada por el método ABTS se evidencio que el aceite obtenido por AV (27,556 μm de trolox/ml de aceite) presenta mayor actividad en comparación con los otros métodos de extracción, incluso al compararla con SFE (15,255 μm de trolox/ml de aceite).

Palabras clave: *Matricaria chamomilla L.*, aceite esencial, actividad antioxidante.

Abstract

The composition and antioxidant activity of chamomile essential oil (*Matricaria chamomilla* L.) obtained by Supercritical Fluids (SFE) and other green extraction techniques (Steam trailing (AV), Hydro distillation (HD), Simultaneous extraction distillation (DES) and Maceration (MC)). The extraction process was optimized with supercritical fluids, where the effect of temperature (35-65 ° C) and pressure (90-210 bar) on the extraction performance (% w / w) was evaluated, obtaining T = 65 ° C and P = 210 bar the optimum extraction point (0.87% w / w). The determination of the chemical composition of the oils was performed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) presenting an essential oil composition enriched in dicycloethers, sesquiterpenes and oxygenated sesquiterpenes, en-in-dicicloeter, β -farneseno, and bisabolol A oxide respectively. The results of the GC-MS analyzes indicate that when using different extraction methods the composition and concentration of the essential oil changes, for example for the oils extracted by MC en-in-dicicloeter is its major component, on the contrary for HD it is β -farnesene and finally for DES is bisabolol oxide A. In regard to the antioxidant activity determined by the ABTS method, it was evidenced that the oil obtained by AV (27,556 μ m trolox / ml of oil) shows higher activity compared to the other extraction methods, even when compared with SFE (15,255 μ m trolox / ml oil).

Keywords: *Matricaria chamomilla* L, essential oil, antioxidant capacity.

Introducción

Colombia es considerada un país privilegiado por ser reconocido como el segundo en el ámbito mundial en diversidad de especies vegetales (Giraldo, Bernal, Morales, Pardo, & Gamba, 2015). En Colombia existen cerca de 120 plantas aromáticas con potencial productivo, las que principalmente se cultivan en el país, son en orden de importancia, la manzanilla, la limonaria, la albahaca, la yerbabuena y el cilantro. La producción de aromáticas y especias en nuestro país se encuentra ubicada en las zonas frías y ligeramente templadas, sobresaliendo los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Cauca y Nariño (Stashenko, 2009). Lastimosamente la oferta colombiana de plantas aromáticas y medicinales ha estado circunscrita durante años al cultivo rústico, su uso se ha perdido con los procesos migratorios, el mal uso del suelo y sobretodo con el remplazo de los productos naturales por los de síntesis química (Castro, Diaz, & Serna, 2013).

La manzanilla (*Matricaria chamomilla L*) es cultivada primeramente como una fuente de aceite, es usada en todas partes como un té y remedio casero. Está entre las primeras cinco hierbas del mercado de los Estados Unidos, con un mercado de aceites mayor que el de las mentas. Las flores secas sirven principalmente como un saborizante para té de hierbas. Los aceites esenciales son usados en cremas, detergentes, lociones, perfumes y jabones (Uden, Abril, & Duarte, 2005).

En la actualidad se utiliza una gran cantidad de extractos de plantas en las diferentes industrias farmacéuticas, alimenticias, cosméticas, entre otros. En años recientes se han estudiado los extractos y aceites esenciales desde un punto de vista funcional. Sin embargo esta funcionalidad está determinada por el método de extracción que se emplee, ya que esto influye en la proporción de los compuestos funcionales presentes (Stashenko, 2009).

Las técnicas de extracción pueden ser clasificadas en convencionales o no convencionales. Las técnicas convencionales requieren el uso de solventes que se ven asociados con el empleo de calor, agitación y altos tiempos de residencia, el Soxhlet es el ejemplo más común de este tipo de técnicas, los solventes pueden contaminar el producto y con su uso se debe recurrir a una segunda operación unitaria de separación para obtener un producto más puro (Velasco, Villada, & Carrera, 2007; Velasquez, 2008).

Las técnicas modernas o no convencionales son técnicas verdes o limpias, las cuales se han ido desarrollando en los últimos años para la extracción de solutos de matrices sólidas con el objeto de disminuir el consumo de solvente, mejorar la calidad del extracto, acortar el tiempo y aumentar el rendimiento. Entre ellas se tienen la extracción asistida con ultrasonido, con microondas, extracción con solvente acelerado y la extracción con fluidos supercríticos (Soquetta, Terra, & Bastos, 2018).

Las tendencias mundiales en cuanto a alimentación en los últimos años, indican un interés acentuado de los consumidores hacia alimentos que contengan además de sus características funcionales y nutrientes esenciales, una función benéfica en la prevención de enfermedades, tales como los antioxidantes naturales que pueden incluso sustituir compuestos sintéticos.

En este trabajo se comparó la composición y la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla L*) obtenido mediante la tecnología de fluidos supercríticos y otras técnicas de extracción verde; concretamente se estudiaron los métodos de: hidrodestilación, arrastre con vapor, destilación-extracción simultánea y maceración. La actividad antioxidante se determinó mediante el método ABTS.

1. Planteamiento del problema

La oferta colombiana de plantas aromáticas y medicinales ha estado circunscrita durante años al cultivo rústico y tímido de sus pocos agricultores que animados por sus costumbres ancestrales, han conservado estos cultivos en sus pequeñas parcelas, establecidas dentro de las huertas familiares y por consiguiente, con baja capacidad de generación de ingresos (Bonilla, Samanca, & Perdómo, 2008), lastimosamente el uso de estas plantas se ha perdido con los procesos migratorios, con el incremento de la población urbana, el mal uso del suelo, la pérdida de la biodiversidad y sobretodo con el remplazo de los productos naturales por los de síntesis química (Castro et al., 2013; Torres, 2010).

Teniendo en cuenta lo anterior, actualmente la sociedad rechaza el uso de sustancias farmacéuticas que proceden de compuestos de síntesis química debido a los efectos secundarios que estos generan, por ejemplo en la elaboración de alimentos, la oxidación de los lípidos no sólo causa una pérdida en la calidad nutricional y gustativa, sino que también genera productos oxidados tales como radicales libres que conducen a diversas reacciones químicas indeseables, por esta razón se buscan alternativas farmacéuticas naturales.

Colombia hace parte de los 17 países megadiversos del mundo sin embargo la oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), lo ha catalogado como uno de los principales países productores de cocaína, su producción actual es 921 toneladas según cifras del Sistema Integrado de Monitoreo de Cultivos Ilícitos (Simci), la ONU afirma que Nariño es el principal cultivador de hoja de coca, con un aumento del 43% entre 2015 y 2016 (ELTIEMPO, 2017). Por esta razón en Colombia y en las regiones afectadas, se debe trabajar para erradicar dichos cultivos, para así hacer un adecuado uso de las tierras.

No obstante Colombia es un país privilegiado por ser reconocido como el segundo en el ámbito mundial en diversidad de especies vegetales, adicionalmente al menos 6.000 de estas especies poseen propiedades medicinales (Giraldo et al., 2015); más de 20.000 especies de plantas en el mundo contienen algún compuesto químico aromático; sin embargo, apenas se comercializan unas 200 a 250 especies entre medicinales, culinarias e industriales. En Colombia se producen y comercializan unas 156 especies de plantas medicinales y aromáticas (Alarcon, 2011).

Existen cerca de 120 plantas aromáticas con potencial productivo en Colombia, las principales son: el poleo, el tomillo, la manzanilla, la albahaca, la mafafa, el orégano, la pimienta y la salvia (Tabla 1). En conjunto, estas 8 especies representaron el 92% de la producción registrada (Bonilla et al., 2008). Su producción se encuentra ubicada en las zonas frías y ligeramente templadas, sobresaliendo los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Cauca y Nariño (Stashenko, 2009).

Tabla 1. Área y producción de plantas aromáticas en Colombia.

CULTIVO	ÁREA COSECHADA	VOLUMEN
	HECTÁREAS	TONELADAS
Poleo	94	567
Tomillo	184	553
Manzanilla	91	341
Albahaca	61	150
Mafafa	12	135
Orégano	94	132
Pimienta Negra	18	130
Salvia	14	61

Fuente: ENA 2006, tomado del plan Hortícola Nacional.

En 2016 según la Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA), las plantas aromáticas, condimentarias y medicinales fue el grupo con menor participación registrada, con 0,1% que representa un área de 5.121 hectáreas; demostrando así una baja participación de estos cultivos en Colombia.

La manzanilla es la planta de mayor consumo en Colombia con 6,728 kilos mensuales, su producción oscila entre 1200 y 2000 kilos de flor y de entre 800 a 1500 kilos de tallos por hectárea; sus precios varían entre \$1.650 el kilo en fresco y \$15.000 el kilo pulverizado (Martinez & Torres, 2011).

Por otra parte, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) asegura que la manzanilla tiene dos usos, uno interno para el tratamiento de trastornos digestivos y uno externo para inflamaciones e irritaciones de la piel y mucosas.

Por otra parte la información sobre los precios de los aceites esenciales, no es fácil de obtener con la exactitud requerida, en parte, porque pueden variar mucho dependiendo de su producción; por ejemplo, el aceite esencial de manzanilla alemana, cultivada en Egipto, tiene un precio de 642 a 700 US por kg, mientras que el aceite de manzanilla destilado de plantas cultivadas en Hungría o en el Reino Unido alcanza un precio de 665 a 1.517 US por kg (Stashenko, 2009).

Para evaluar la dinámica exportaciones e importaciones en Colombia, se observa que mientras las importaciones ascienden a millones de dólares por año, la venta de esencias (exportación) es de orden de miles de dólares. La participación del país en este mercado es <0,1% en exportaciones y alrededor del 0,45% en importaciones. La producción de plantas aromáticas para la exportación, se concentra en los departamentos de Cundinamarca, Tolima, Antioquia, Nariño y Valle del Cauca. Entre los principales destinos de exportaciones de aceites esenciales de Colombia figuran Ecuador (60%), Costa Rica, El Salvador, Perú, Venezuela y los EE.UU (Stashenko, 2009).

Actualmente, debido al incremento en el consumo de alimentos funcionales se han desarrollado muchas investigaciones para obtener las sustancias que los componen de una forma segura, rápida y de bajo costo. En general la extracción de dichos compuestos se realiza a través de métodos de extracción convencionales que requieren altos tiempos de residencia, altas temperaturas que aceleran la degradación de productos de interés y solventes orgánicos, que resultan poco efectivos por ser tóxicos, inflamables, poco

selectivos, muy laboriosos y nocivos tanto para la salud humana como para el medio ambiente (Velasco et al., 2007; Velasquez, 2008).

El método Soxhlet es una técnica anticuada que consume gran cantidad de tiempo y de solvente, este tipo de extracciones siempre deja un residuo inherente en el aceite, particularmente cuando la extracción se realiza con hexano que es el disolvente más comúnmente usado, pero la legislación internacional restringe la cantidad de hexano que deben contener los productos extraídos y cada vez será más restrictiva, previéndose que en un futuro se limite su uso y se sustituya por otros disolventes como el CO₂ supercrítico y el uso de otros métodos de extracción verde (Soquetta et al., 2018).

2. Justificación

La falta de desarrollo y fuente de empleo en el Departamento de Nariño, sumado a la inevitable realidad del cultivo de plantas con fines ilícitos dentro de Colombia, hace necesaria la búsqueda de alternativas que traten de dar solución a ésta problemática. La ONU considera, “aunque los datos indican una situación preocupante, el escenario en Colombia se muestra propicio para una solución sostenible a partir de la transición de una estrategia centrada en los cultivos a una enfocada en la transformación de los territorios y en las comunidades”.

Del mismo modo, Colombia tiene un gran potencial para la producción, debido a su diversidad de microclimas, suelos y pisos térmicos, teniendo en cuenta también la gran necesidad de diversificar los monocultivos tradicionales, se buscan cultivos con crecimiento rápido y productos agrícolas con valor agregado, entre otros, estos son algunos argumentos que nos direccionan hacia la industria de aceites esenciales en Colombia (Stashenko, 2009).

Además, en el país se cultivan una amplia gama de plantas aromáticas y medicinales introducidas, ya adaptadas a diversas condiciones climáticas; también se tiene la experiencia de su producción a pequeña y mediana escala, lastimosamente aún no existe una industria establecida de aceites esenciales, porque no se cuenta con una experiencia positiva sobre la comercialización de los mismos a nivel internacional (Stashenko, 2009).

Entre estos cultivos sobresale la manzanilla la cual es cultivada primeramente como una fuente de aceite, es usada en todas partes como un té y remedio casero. Está entre las primeras cinco hierbas del mercado de los Estados Unidos, sus flores secas sirven

principalmente como un saborizante para té de hierbas y los aceites esenciales son usados en cremas, detergentes, lociones, perfumes y jabones (Uden et al., 2005).

Por otro lado los antioxidantes sintéticos son ampliamente utilizados debido a su estabilidad y su amplia disponibilidad; sin embargo, están relacionados con efectos mutagénicos y carcinogénicos, por esta razón se han estudiado muchas fuentes de origen vegetal (Soquetta et al., 2018), las propiedades antioxidantes de muchas plantas aromáticas y medicinales han demostrado ser eficaces para retrasar el proceso de peroxidación lipídica en aceites y han ganado el interés de muchos grupos de investigación (Roby, Sarhan, Selim, & Khalel, 2013).

La estrecha relación salud - naturaleza se materializa a través de las plantas medicinales que corresponden a especies vegetales que contienen sustancias químicas conocidas como principios activos, los cuales están constituidos , total o parcialmente, por esencias, que tienen propiedades terapéuticas y farmacológicas comprobadas empírica o científicamente (Organización Panamericana de la Salud, 2006), estas producen metabolitos secundarios útiles para la solución de problemas específicos de salud en el hombre (Castro et al., 2013; Garzón, 2016).

Las técnicas de extracción convencionales requieren el uso de disolventes orgánicos, temperatura y agitación, un ejemplo de este tipo de técnica es el método Soxhlet; en los últimos años se ha estimulado el desarrollo de otras tecnologías de extracción, conocidas como tecnologías limpias o verdes (Extracción asistida con ultrasonido, con microondas y la extracción con fluidos supercríticos) (Fornari, Vicente, Vázquez, García-Risco, & Reglero, 2012) que son beneficiosas con el medio ambiente debido al uso reducido de energía, pueden minimizar o eliminar el uso de solventes orgánicos con el objeto de

mejorar la calidad del extracto, acortar el tiempo de extracción y aumentar el rendimiento (C. Rodríguez, Quirantes, Fernández, & Segura, 2015).

De acuerdo con Jacotet-Navarro et al. (2016) el objetivo de estos procesos de extracción verde es lograr una tasa de extracción más rápida, un uso de energía más efectivo, una mayor transferencia de masa y calor, un tamaño de equipo reducido y una reducción en el número de pasos de procesamiento. Por esto se encontró en los fluidos supercríticos (SFE) y en otras técnicas de extracción verde una muy buena alternativa ya que pueden producir extractos con mejor calidad y actividad antioxidante que los obtenidos usando disolventes orgánicos mediante un proceso más eficaz y amigable con el medio ambiente (Conde, Espinosa, Trejo, & Guerrero, 2017).

La extracción con SFE, específicamente con CO₂, resulta una alternativa interesante para la extracción y fraccionamiento de aceites vegetales, algunas ventajas que ofrece el uso del CO₂ supercrítico es ser no tóxico, ni dejar residuo en sus productos, así como su capacidad selectiva para extraer ciertas sustancias al realizar pequeños cambios de presión y temperatura, esta es una tecnología que cumple con las exigencias actuales del mercado en el sentido de promover el uso de procesos con un mínimo o nulo impacto ambiental, que cumplan la normativa en cuanto a las restricciones de utilización de solventes contaminantes y que respondan a la creciente demanda de productos naturales (Velasquez, 2008).

El uso de solventes alternativos tales como: isopropanol, etanol, hidrocarburos, e incluso el agua, se ha incrementado debido a asuntos del medioambiente, la salud, y a preocupaciones de seguridad (Mamidipally & Liu, 2004). Los solventes no tóxicos como el CO₂ supercrítico y el agua están en el orden del día. (Velasco et al., 2007).

3. Marco teórico.

3.1. Generalidades de la manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*)

La manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*) es una especie conocida de plantas medicinales de la familia *Asteraceae* (Singh S et al., 2011), nativa de Irán y Europa que crece como planta silvestre (Solouki, Mehdikhani, Zeinali, & Emamjomeh, 2008). La planta es una hierba anual con ramificaciones erectas y hojas finamente divididas que crece entre 50-90 cm, tiene una amplia variedad de adaptación a suelos con diferentes condiciones, es usada en diferentes formas disponibles comercialmente como té, infusión, líquido y cápsulas en la nutrición humana, y es una de las plantas medicinales más utilizadas en el mundo.

Investigaciones recientes han demostrado que la *M. Chamomilla* posee una amplia gama de acciones farmacológicas, siendo muy efectiva para tratar problemas como la caspa, el eccema, y las hemorroides, incluyendo también propiedades antisépticas y terapéuticas, antiinflamatorias, antioxidantes, antiespasmódicas, antivirales, carminativas, sedantes y antimicrobianas inhibiendo el crecimiento de bacterias conocidas como estafilococos y estreptococos (Tolouee et al., 2010).

Los usos más conocidos de la manzanilla son: el efecto calmante y tranquilizante, ya que alivia los malestares intestinales al reducir la sensación de hinchazón y gases intestinales y al mismo tiempo funciona como un sedante suave, al contener sustancias que actúan sobre el sistema nervioso central calmando los estados de estrés y ansiedad (Galo, 2009).

Por otra parte, se sabe que la manzanilla contiene varias clases de compuestos biológicamente activos incluyendo aceites esenciales, cumarinas y varios polifenoles,

principalmente los flavonoides, que se utilizan tanto interna como externamente para tratar varias condiciones médicas (Avula et al., 2014).

3.1.1. Clasificación taxonómica de la Manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*).

Matricaria chamomilla o *Matricaria recutita* también llamada Manzanilla alemana, manzanilla dulce o cimarrona o manzanilla común, pertenece a la familia de las *Asteraceae* (*Compositae*); una planta anual, nativa de las regiones templadas de Europa.

Tabla 2. Clasificación Taxonómica de Manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*).

Phylum	Euphyta
División	Angiospermae
Clase	Dicotyledones
Orden	Synandreae
Familia	Asteraceae (Compositae)
Género	Matricaria
Especies	Matricaria camomilla o Matricaria recutita

Fuente: (Cosco Robles, 2010).

3.2. Aceites Esenciales (A.E).

En las plantas los metabolitos primarios tales como: las proteínas, los lípidos y los azúcares son vitales para que la planta crezca, se multiplique y viva; mientras que para que ella sobreviva en condiciones de estrés se necesitan los metabolitos secundarios. Estos últimos son moléculas de bajo y mediano peso molecular, generados en la planta por varias rutas biosintéticas; pertenecen a diferentes clases de sustancias químicas, por ejemplo, alcoholes, ácidos, ésteres, fenoles y terpenos, entre muchas otras. A algunos de ellos, les

caracteriza un olor típico y una alta volatilidad, cumplen varias funciones y operan a través de diversos mecanismos.

Entre muchos metabolitos secundarios aislados de las plantas, se destacan algunos, muy especiales, de amplio uso en diversas ramas de la industria, medicina y en muchos productos empleados en la vida cotidiana, en esta clase de sustancias se destacan los aceites esenciales, los cuales son llamados también: aceites volátiles, aceites etéreos o esencias (Stashenko, 2009).

Los aceites esenciales son los aromas que liberan las plantas, estos se encuentran en las hojas, cascaras de las frutas, semillas, cortezas, árboles y flores. Están constituidos en su mayoría por hidrocarburos terpénicos o terpenos (monoterpenos, $C_{10}H_{16}$, y sesquiterpenos $C_{15}H_{24}$) y sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos y cetonas) que juntos se llaman terpenoides (Páez Perilla, 2013; Stashenko, 2009).

De planta a planta el rendimiento de un aceite cambia mucho, puede variar desde 0,01% en flores de jazmín y rosa hasta el 4-6% en semillas de cilantro, anís o coriandro. En promedio las plantas aromáticas herbáceas poseen de 0,5 a 2% del aceite esencial (Stashenko, 2009).

El abanico tan amplio de aplicaciones que encuentran los aceites esenciales en diferentes sectores y ramas de la industria es verdaderamente impresionante. Son tres sectores principales entre ellos, figuran las industrias de alimentos, farmacéutica, productos de aseo y sector cosmético, que utilizan aceites esenciales en grandes cantidades (Tabla 3).

Tabla 3. Principales industrias y sus respectivas ramas donde se utilizan aceites esenciales y productos derivados.

INDUSTRIA	RAMAS	ACEITES ESENCIALES
COSMÉTICA Y DE PRODUCTOS DE ASEO	Higiene personal	Cítricos
	Jabones y detergentes	Eucalipto y derivados
	Productos de belleza	Mentas, lavandas
	Perfumes y afines	Rosa, patchoulí
	Dentífricos	Romero, salvia
ALIMENTICIA	Bebidas, tipo cola	Cítricos
	Dulces, confitería	Anís, hinojo, coriandro
	Salsas, enlatados	Oleorresinas, flavours
	Bebidas alcohólicas	Vainilla, especias
	Tabaco, aromatizantes	Mentas
FARMACÉUTICA	Fitocosméticos	Cítricos
	Cosmecéuticos	Limonaria, citronela, manzanilla
	Homeopatía	Eucalipto y derivados
	Aromaterapia	Lavanda, romero, salvia
	Fitofármacos	Geranio, mentas

Fuente: (Stashenko, 2009).

3.2.1. Aceite esencial de manzanilla.

La mayoría de aceites esenciales son líquidos, fluidos y de color amarillo claro, hay algunas excepciones, por ejemplo, la esencia de manzanilla, que debido a la presencia de hidrocarburos azulénicos, posee un color azul. La calidad de este aceite, se determina por su color. Como su nombre indica, el aceite azul es considerado de mejor calidad, ya que

este color sirve como marcador químico para la presencia de terpenoides, principalmente camazuleno y bisabolol (Stashenko, 2009; Singh et al., 2011).

La esencia de manzanilla se compone de un hidrocarburo y un alcohol sesquiterpénico, un alcohol tricíclico, otros alcoholes terciarios en su mayor parte dicíclicos, así como el llamado camazuleno (Galo, 2009). Los principales compuestos del aceite esencial de manzanilla se observan en la (Tabla 4), adicional a estos, este aceite tiene compuestos biológicamente activos tales como: óxidos de bisabolol, óxido de bisabolona, α -bisabolol, espatulenol, en-in-dicicloéter y camazuleno (Raal, Arak, Orav, & Ivask, 2003).

Tabla 4. Principales compuestos del aceite esencial de la manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*).

COMPONENTE	TIPO
Camazuleno	Alcohol
Bisabolol	Alcohol monocíclico
Ácido salisílico	Ácido
Ácido octílico	Ácido
Éster metílico	Éster
Vitamina C	Vitamina

Fuente: (Galo, 2009).

El componente principal del aceite esencial de manzanilla es el bisabolol, o también llamado α -bisabolol, un alcohol sesquiterpénico monocíclico estable, insoluble en agua y glicerina, muy soluble en etanol, el cual brinda al aceite una vida útil de 6 a 24 meses (Tolouee et al., 2010). El α -bisabolol junto con los espiro-éteres son componentes

antibacterianos y fungicidas; su aceite esencial se utiliza con relativa frecuencia en las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias (Raal et al., 2003), en la tabla 5 se presentan algunos de sus usos.

Tabla 5. Usos y aplicaciones del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*)

USO	APLICACIONES	FUENTE
ANTIFUNGICO	Mostró efectos inhibidores contra la cepa de <i>Cándida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> y algunas especies de <i>Penicillium</i> .	Tolouee et al., (2010); Sharifzadeh, Jebeli, Shokri, Abbaszadeh, & Keykhosravy., (2016); Göger, Demirci, Ilg, & Demirci., (2018)
COSMETICO	Los antioxidantes presentes en los extractos tienen propiedades prometedoras para perfumería, cremas cosméticas, preparaciones para el cabello, lociones para la piel y pastas dentales.	Singh, Khanam, Misra, & Srivastava, (2011); Almeida & Goncalves, (2016).
FARMACEUTICO	Desarrollar medicamentos naturales o suplementos dietéticos, útiles en la prevención y el tratamiento de los trastornos mediados por el estrés oxidativo.	Kolodziejczyk et al., (2015); Sharifzadeh et al., (2016).

Fuete: (Esta investigación).

La actividad farmacológica de la manzanilla está asociada a las fracciones de aceite esencial y flavonoides (Raal et al., 2012). De acuerdo con la Farmacopea Europea (EP), las flores de manzanilla deben contener entre 4 mL/kg (0,4%) y 19 mL/kg (1,9%) de aceite esencial azul y como mínimo 0,25% de apigenina 7-glucósido (Upadhyay, Singh, & Tewari, 2016; Farmacopea Europea, 2010).

3.3. Métodos de extracción.

Según la variedad del material vegetal, la parte de la planta a emplear y la estabilidad del aceite esencial que se pretenda obtener, se emplean diversos procedimientos físicos y químicos de extracción (Sena, 2011).

Dependiendo de las variables, se tienen diversas técnicas de extracción como se muestra en la tabla 6. Los métodos directos se aplican principalmente a los cítricos, porque sus aceites están presentes en la corteza de la fruta, y el calor de los métodos de destilación puede alterar su composición; en la destilación por arrastre de vapor se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por este y otros “no volátiles”; la extracción con solventes donde estos solventes solubilizan la esencia y hacen la extracción mucho más fácil, aunque se obtiene esencias contaminadas (Peredo, Palou, & López, 2009).

Tabla 6. *Métodos de extracción de aceites esenciales.*

TIPO DE METODO	PROCEDIMIENTO	PRODUCTOS OBTENIDOS
Métodos Directos	Extrusión	Aceites esenciales cítricos
	Exudación	Gomas, resinas, bálsamos
Destilación	Directa	Aceites esenciales y aguas aromáticas
	Arrastre con vapor de agua	
	Destilación – maceración (Liberación enzimática de agliconas en agua caliente)	
Extracción con solventes	Solventes volátiles	Infusiones y resinoides alcohólicos
		Concretos y absolutos
	Solventes fijos (grasas y aceites)	Absolutos de pomadas
		Absolutos de enflorados
	Extracción con fluidos en estados supercríticos	Aceites esenciales y oleorresinas.

Fuente: (Sena, 2011).

Las técnicas de extracción se pueden clasificar en convencionales o no convencionales. Las técnicas convencionales requieren el uso de disolventes orgánicos, temperatura y agitación. Las técnicas modernas, o técnicas no convencionales, son técnicas verdes o limpias debido al uso reducido de energía y la implementación de solventes orgánicos, que son beneficiosos en relación con el medio ambiente (C. Rodríguez et al., 2015).

3.3.1. Métodos de extracción convencionales.

Los métodos de extracción convencionales requieren altos tiempos de residencia, altas temperaturas que aceleran la degradación de productos de interés y solventes orgánicos, que resultan poco efectivos por ser tóxicos, inflamables y poco selectivos (Velasco et al., 2007; Velasquez, 2008), el principal exponente de este tipo de métodos es la técnica soxhlet la cual implica una pequeña cantidad de muestra seca, que se coloca en el equipo por donde pasa el solvente. El proceso se realiza de forma repetida hasta que se completa la extracción. Este sistema de extracción está optimizado y la literatura proporciona una gran cantidad de ejemplos prácticos de condiciones favorables (Cravotto et al., 2011; Xhaxhiu, Korpa, Mele, & Kota, 2013). Sin embargo, esta técnica requiere un tiempo de extracción extenso y grandes cantidades de solvente (Heleno et al., 2015).

3.3.2. Métodos de extracción verdes.

Los riesgos de seguridad, como la toxicidad de los solventes y la presencia de residuos de solventes en los extractos, junto con bajo rendimiento, han estimulado el desarrollo de otras tecnologías de extracción, como tecnologías limpias o verdes, que pueden minimizar o eliminar el uso de solventes orgánicos. Estas técnicas también se conocen como técnicas de extracción en frío, donde la estabilidad de los compuestos extraídos no se ve afectada y la energía requerida para la extracción se reduce (Tiwari, 2015).

Hoy en día se han desarrollado nuevas técnicas para la extracción de solutos de matrices sólidas, entre ellas se tiene: la extracción asistida con ultrasonido, la extracción asistida con microondas, la extracción con solvente acelerado y la extracción con fluidos supercríticos, las cuales se describen en la Tabla 7, su implementación cumple con el objeto de acortar el

tiempo de extracción, disminuir el consumo de solvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad del extracto (Velasco et al., 2007).

Tabla 7. *Tecnologías verdes para la extracción de compuestos bioactivos.*

TÉCNICA	CONCEPTO	REFERENCIA
FLUIDOS SUPERCRÍTICO (SFE)	La extracción supercrítica se caracteriza por cambios en la temperatura y la presión que transforman el gas en el fluido supercrítico.	Silva, Rocha, & Duarte, 2016.
LÍQUIDO PRESURIZADO (PLE)	La extracción se produce a presiones elevadas, por lo que el disolvente puede permanecer en estado líquido incluso cuando se emplean temperaturas mucho más altas que sus puntos de ebullición.	Machado, Pasquel, Fernández, & Martínez, 2014.
ULTRASONIDO ASISTIDO (EAU)	El ultrasonido es una onda de sonido de 20 kHz a 100 MHz. Este proceso produce un fenómeno llamado cavitación, lo que significa que la producción, el crecimiento y el colapso de las burbujas forman poros que facilitan la lixiviación de compuestos orgánicos y la matriz de plantas inorgánicas.	Azmir et al., 2013; Rajha, Boussetta, Louka, Maroun, & Vorobiev, 2015.
ASISTIDO POR MICROONDAS (MAE)	Las microondas son campos electromagnéticos en el rango de 300 MHz a 300 GHz. El solvente penetra en la matriz sólida por difusión y el soluto se disuelve para alcanzar una concentración limitada por las características del sólido.	Angiolillo, Nobile, & Conte, 2015; Li, Fabiano, Vian, & Chemat, 2013.

Fuente: (Soquetta et al., 2018).

Algunos autores han tratado de definir los puntos principales o principios elementales de la química verde. Básicamente, los siguientes factores deben ser considerados en la implementación de la química verde: evitar el desperdicio; maximizar la incorporación de todos los materiales de partida en el producto final; obtener productos menos peligrosos con poca o ninguna toxicidad en relación con la salud humana; solventes más seguros; eficiencia energética disminuyendo los impactos medioambientales y económicos; el uso de

materias primas de fuentes renovables; uso de un reactivo tan selectivo como sea posible (Lenardão, Freitag, Dabdoub, Batista, & Silveria, 2003).

3.3.2.1. Método de arrastre con vapor de agua (AV).

Este método de extracción de aceites esenciales es uno de los más sencillos y económicos de realizar, es por esta razón que también se considera uno de los más utilizados a nivel de laboratorios y pequeñas empresas (Sena, 2013), es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles, la proporción de aceite esencial extraído por destilación con vapor es del 93% y el 7% restante puede ser extraído por otros métodos (Asif et al., 2017).

Este proceso se logra por medio de vapor de agua (vapor sobrecalentado), generado usualmente por una caldera que penetra el material vegetal a presión más alta que la atmosférica, la corriente de vapor rompe las células o canales oleíferos en la planta y arrastra la mezcla volátil que se condensa luego de atravesar un refrigerante (Stashenko, 2009). Teniendo en cuenta las diferencias de densidades de los componentes resultantes en la mezcla, estos se pueden separar por medio de decantación o destilación.

La destilación por arrastre de vapor es un método de bajo costo, pero su inconveniente es que requiere largos periodos de tiempo y tiene rendimientos bajos en comparación con otros métodos (Peredo et al., 2009).

3.3.2.2. Método destilación extracción simultanea (DES).

Es un método ampliamente utilizado, consiste en que la muestra diluida en agua y el disolvente destilan de forma separada y condensan en la misma zona produciéndose en ella la extracción, separándose y recirculando posteriormente las dos fases.

El método presenta ventajas como usar pequeñas cantidades de disolvente, introduciéndose por ello pocos contaminantes, poder obtener una concentración alta de volátiles en poco tiempo y poder minimizar la degradación térmica trabajando a presión reducida. También presenta inconvenientes como el de no ser adecuada para volátiles termolábiles (Morales, Aparicio, & Gutiérrez, 1992).

3.3.2.3. Método de hidrodestilación o destilación con agua (HD).

La hidrodestilación es un método convencional utilizado para la extracción de compuestos bioactivos y aceites esenciales de plantas. Existen tres tipos de hidrodestilación: destilación con agua, destilación con agua y vapor y destilación directa de vapor. En el proceso de hidrodestilación, primero, se envasan los materiales vegetales en un compartimento fijo; se agrega agua en cantidad suficiente y luego se lleva a ebullición. Alternativamente, se inyecta vapor directo en la muestra, el agua caliente y el vapor actúan como los principales factores de influencia para liberar compuestos bioactivos del tejido vegetal, posteriormente se hace un enfriamiento indirecto con agua que condensa la mezcla de vapor de agua y aceite; la mezcla condensada fluye desde el condensador a un separador, donde el aceite y los compuestos bioactivos se separan automáticamente del agua (Azmir et al., 2013).

Este método generalmente toma de 6 a 8 horas. Esta técnica implica tres procesos fisicoquímicos principales: hidrodifusión, hidrólisis y descomposición por calor. La hidrodestilación es un proceso muy completo: los compuestos orgánicos volátiles y los compuestos orgánicos no volátiles pueden extraerse y separarse físicamente en un solo paso (Soquetta et al., 2018).

Otro factor que juega un papel importante durante la extracción mediante esta técnica, es el contenido de compuestos grasos (lípidos) en la planta, ya que son poco volátiles y en cierto modo, retienen la fracción de hidrocarburos volátiles, los cuales muestran más afinidad por los compuestos grasos que por los compuestos oxigenados (Fornari et al., 2012; Hurtado, Dorado, & Sánchez, 2016).

3.3.2.4. Método de maceración.

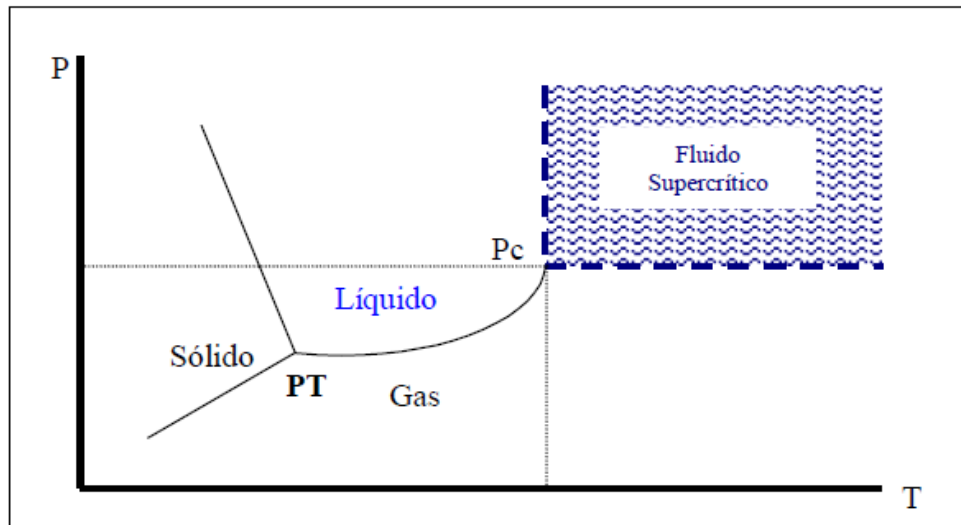
La maceración se usó en la preparación casera de tónicos hace ya mucho tiempo. Se convirtió en una forma popular y económica de obtener aceites esenciales y compuestos bioactivos. El proceso consta en triturar la muestra del material vegetal en partículas más pequeñas para aumentar el área de superficie y obtener una buena mezcla con el solvente, que posteriormente se dispone con la muestra en un recipiente cerrado. Para finalizar el líquido se filtra pero el orujo que es el residuo sólido de este proceso de extracción se presiona para recuperar una gran cantidad de soluciones ocluidas. La agitación en el proceso de maceración facilita la extracción de dos maneras: aumentando la difusión y eliminando la solución concentrada de la superficie de la muestra (Azmir et al., 2013).

3.3.2.5. Tecnología de fluidos supercríticos.

Un fluido supercrítico es aquella sustancia que se encuentra a presiones y temperaturas superiores a las correspondientes al punto crítico. En un diagrama de fases, como el que se muestra en la Figura 1, se observan regiones que corresponden a un solo estado de la materia y líneas a lo largo de las cuales la sustancia se encuentra en equilibrio entre dos fases. De las tres líneas que delimitan las regiones de un solo estado, solamente la línea que representa la curva de vaporización termina en un punto único, el punto crítico (Pc), y es el

inicio de una zona en la que no existe cambio de estado: la región supercrítica (Cavero, 2007).

Figura 1. Diagrama de fases de un compuesto puro.



Fuente: (Cavero, 2007).

Los fluidos supercríticos (SFE) son sustancias que se encuentran por encima de su temperatura crítica y su presión crítica, en estas condiciones no son gases, ni líquidos, pero poseen propiedades de ambos (Hurtado, 2012), es decir pueden difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción (Velasco et al., 2007).

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es una técnica que día a día viene ganando un espacio en las industrias alimentaria y farmacéutica (Velasco & Villada, 2006), es considerada como una técnica verde, que permite una extracción selectiva variando condiciones de presión y temperatura, además, tiene otras ventajas como la ausencia casi completa de residuos, el bajo consumo de energía, la posibilidad de extracción de

compuestos termolábiles, la fácil eliminación del fluido utilizado (Hurtado et al., 2016) y el empleo mínimo o nulo de solventes orgánicos, lo cual es una ventaja en su implementación (Pantoja, Hurtado, & Martínez, 2017).

Existe una gran variedad de compuestos que se pueden utilizar como fluidos supercríticos. En la práctica la elección del fluido supercrítico más apropiado dependerá de algunos factores como: la polaridad del soluto, la selectividad requerida, la estabilidad térmica del compuesto extraído a la temperatura del proceso, las limitaciones instrumentales, la toxicidad del fluido, el costo del fluido y la reactividad de los solutos con el fluido (Cavero, 2007).

Como se puede apreciar, son muchas las condiciones que un buen fluido supercrítico debe cumplir para ser utilizado en un proceso extractivo; en la Tabla 8 se muestran los compuestos más utilizados como fluidos supercríticos con sus valores de presión crítica (P_c), temperatura crítica (T_c) y densidad crítica (ρ_c).

Tabla 8. Fluidos supercríticos más utilizados.

COMPUESTO	TC (° C)	PC (ATM)	PC (G/CM)
CO ₂	31	72,85	0,469
NH ₃	133	111,54	0,236
H ₂ O	374	217,17	0,323
N ₂ O	36	71,5	0,452
Metano	-82	45,41	0,169
Etano	32	8,17	0,203
Propano	97	41,85	0,217
Pentano	197	33,26	0,237
Etileno	9	49,65	0,218
Benceno	289	48,27	0,302
Tolueno	319	40,57	0,292
Metanol	240	79,86	0,272
Etanol	241	60,61	0,276
Acetona	235	46,39	0,279
Éter Etilico	194	35,93	0,265

Fuente: (Cavero, 2007).

El CO₂ es el fluido más usado por varias razones: tiene una presión crítica moderada (72,85 atm) y, una baja temperatura crítica (31° C), que son relativamente fáciles de alcanzar, logrando así obtener un fluido con alto coeficiente de difusión y una viscosidad más baja que los líquidos, permitiendo así una mejor penetración en matrices sólidas y aumento de la solubilidad en componentes químicos durante los procesos de extracción (Morillo et al., 2010)., todo esto lo hace un fluido ideal para la extracción de muchos compuestos termolábiles. Además es fácilmente separable del soluto, posee un alto poder disolvente, no es tóxico, no causa problemas ambientales, no es inflamable y es barato (Hurtado, Señoráns, Ibáñez, & Reglero, 2004). La ventaja principal de utilizar CO₂ supercrítico es la calidad del aceite obtenido por este medio en comparación con los aceites extraídos con solventes orgánicos tradicionales (Velasco et al., 2007).

El mayor inconveniente está asociado a su baja polaridad que, en ocasiones, puede requerir la adición de modificadores polares. Los modificadores son solventes orgánicos que se añaden al fluido supercrítico en pequeñas cantidades (hasta un 10% v/v) con el fin de aumentar la polaridad del mismo y, por tanto, con el objetivo de aproximar su poder de solvatación al del soluto a extraer. Los modificadores más habituales son el etanol, la acetona y el metanol, aunque en la industria alimentaria sólo está permitido el etanol (Cavero, 2007).

3.4. Actividad antioxidante.

3.4.1. Antioxidante.

Los antioxidantes son sustancias que puede inhibir o retardar el proceso oxidativo, interfiriendo con la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de la auto-oxidación. La importancia de un antioxidante depende de su concentración y del medio donde actúa (Nuñez, 2013). Estos interactúan directamente con el radical libre, donde el antioxidante le cede un electrón, debilitando su acción y en algunos casos como sucede con la vitamina E logra regenerarlo a su forma primitiva por la acción de los antioxidantes (Toro & Suárez, 2012).

En la actualidad los antioxidantes sintéticos son ampliamente utilizados debido a su estabilidad y su amplia disponibilidad; sin embargo, están relacionados con efectos mutagénicos y carcinogénicos y esto ha llevado a la búsqueda de antioxidantes extraídos de matrices de plantas (Soquetta et al., 2018).

Los compuestos bioactivos se pueden usar como aditivos alimentarios debido a sus propiedades antioxidantes que pueden ser de diversa naturaleza, como la vitamina C, la vitamina E, carotenoides, fenoles, flavonoides, entre otros. En la actualidad existe evidencia

científica de que estos previenen el daño que la oxidación causa en las células, esto ha recibido gran atención debido a que el aumento del estrés oxidativo se ha identificado como un importante factor causal en el desarrollo y la progresión de varias enfermedades potencialmente mortales, incluidas las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Kasote, Katyare, Hegde, & Bae, 2015).

3.4.2. Actividad antioxidante.

La actividad antioxidante mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa; algunos compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante (Londoño, 2010). La mayoría de las células y organismos de nuestro planeta se enfrentan a ambientes con agresores oxidativos. Todo inicia con el empleo del oxígeno como la molécula oxidante, esta reacción la realizan la mayoría de los organismos del planeta. Todo esto hace que las células mantengan una alta concentración de productos oxidantes del metabolismo, especies reactivas de oxígeno y en muchas ocasiones radicales libres (Winterbourn, 2008).

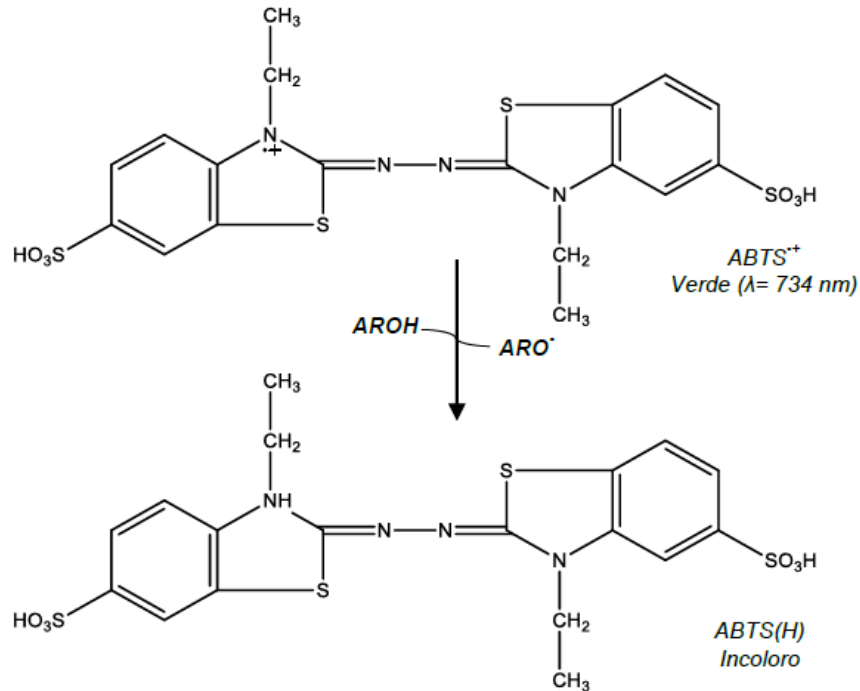
En forma general, un radical libre es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente. Sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear al electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena (Hansberg, 2002).

Los sistemas antioxidantes se pueden medir de diferentes formas específicas y el sistema amortiguador antioxidante global se puede evaluar con las pruebas de capacidad antioxidante total. La mejora tecnológica e interpretativa de estos métodos ha permitido profundizar en el conocimiento básico de las formas de defensa de la célula (Quintanar Escorza & Calderón Salinas, 2009).

3.4.3. Métodos de determinación de actividad antioxidante.

En los últimos años se han desarrollado multitud de métodos para determinar la actividad antioxidante, pero hasta el día de hoy no se conoce ninguno aprobado oficialmente para llevar a cabo esta determinación. La mayoría de los métodos se basan en el uso de sistemas generadores de radicales, los cuales son de inhibición, donde se emplea una especie generadora de radicales libres y una sustancia detectora de estas especies, en estos métodos se han usado diferentes sustratos, diferentes medios de reacción y diferentes técnicas analíticas para evaluar la efectividad de los antioxidantes como la espectroscopia Uv-vis (Cavero, 2007; Pantoja, 2016),

En el análisis de la actividad antioxidante existe una técnica muy utilizada conocida como Método ABTS. Este método se basa en la formación del catión radical libre ABTS•⁺ (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) y su reducción por la acción del extracto antioxidante a analizar (Figura 2). El radical se prepara luego de hacer reaccionar ABTS con persulfato potásico (Kuskoski, Asuero, García, Troncoso, & Fett, 2004). La ventaja del radical es su estabilidad cuando se encuentra en refrigeración y lejos de la luz. Estos factores permiten almacenar una solución de trabajo por aproximadamente seis meses. Además ese absorbe en la región cercana al infrarrojo (645, 734 y 815 nm), evitando interferencias con las antocianinas (Aruoma, 2003; Kuskoski et al., 2004).

Figura 2. Reacción antioxidante del radical catión ABTS ensayo TEAC.

Fuente: (Craft, Kerrihard, Amarowicz, & Pegg, 2012)

El método permite expresar los resultados de acuerdo a la capacidad del antioxidante para donar un hidrogeno y estabilizar al radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. La decoloración que la solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ experimenta en la reacción se compara con la decoloración hecha por un antioxidante patrón derivado de la vitamina E conocido como Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), mediante una curva de calibración. Por esta razón el resultado se expresa como capacidad antioxidante en equivalentes trolox o TEAC (Jiménez & Villarreal, 2008).

3.5. Técnicas de análisis de aceites.

3.5.1. Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es una técnica utilizada para separar diferentes compuestos volátiles de una muestra. La fase móvil es un gas inerte, (nitrógeno o helio) conocido como gas portador, que transporta la muestra volatilizada en el inyector a través de la columna cromatográfica. La fase estacionaria generalmente está constituida por una columna de metil polisiloxano, o derivados de éste. Los diferentes compuestos se separan en función de su grado de volatilidad (punto de ebullición, peso molecular) y su afinidad por la fase estacionaria. Entre los detectores más utilizados caben mencionar el detector FID (ionización de llama) que por su alta versatilidad, hace posible la detección de un elevado tipo de compuestos. También provee información cualitativa y cuantitativa de los componentes presentes en una mezcla (Pantoja, 2016).

3.5.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Técnica utilizada para la separación e identificación de compuestos volátiles, donde la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, donde la elución se produce por el flujo de una fase móvil del gas portador, la cual no interacciona con las moléculas del analito. Los diversos componentes son retenidos por la fase estacionaria con mayor o menor fuerza y alcanzan correspondientemente el final de la columna donde se encuentra el detector (Skoog, Holler y Crouch, 2008); en este caso el espectrómetro de masas es un detector universal para cromatografía de gases. La Espectrometría de Masas es una técnica analítica instrumental de alta sensibilidad capaz de identificar cualitativa y cuantitativamente cualquier tipo de sustancia orgánica. Asimismo esta técnica permite también determinar la masa molecular de un compuesto, así como de

los diversos fragmentos que resultan de la rotura controlada del mismo, dando estos una información muy valiosa sobre la estructura de la molécula. Cuando una molécula se somete a ionización por impacto electrónico en un espectrómetro de masas, el proceso primario consiste en la abstracción de un electrón para dar un catión-radical. Este catión-radical se trata del ión molecular y tendrá mayor o menor tendencia a fragmentar en función de su estabilidad. Los iones moleculares muy estables tendrán poca tendencia a fragmentar y serán muy abundantes. Al ión más abundante del espectro se le denomina pico base. Los fragmentos más abundantes de un espectro de masas nos dan una información valiosa sobre la estructura de una molécula (Robinson y Robinson, 2001).

4. Antecedentes.

Se han realizado diferentes investigaciones para la obtención no solamente de aceites esenciales a partir de manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*) sino también de oleorresinas.

Mahecha (2010), extrajo aceite esencial de las hojas y frutos de un ejemplar de la especie *Siparuna sessiliflora*, empleando como métodos de extracción hidrodestilación (HD) y destilación extracción simultanea (DES), verificaron la actividad antioxidante frente al catión radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS•+), los constituyentes de cada uno de los aceites se analizaron mediante la técnica GC-MS. El rendimiento de los aceites de la planta expresado en porcentaje (gramos de aceite obtenido por cada 100 gr de muestra) se encontró entre 0,12% y 0,17% para hojas y 0,11% y 0,14% para frutos, comparando el rendimiento del aceite obtenido con otros aceites esenciales obtenidos y comercializados en Colombia a nivel industrial, resulto bueno, ya que es mayor que el de especies como el albacón, la manzanilla, el poleo, la hierbabuena, el laurel, la albahaca y el ajo, se detectaron e identificaron 40 compuestos en el aceite extraído por DES y 42 en el aceite extraído por HD, los componentes principales fueron el Beta- eudesmol, Tau- muurolol, Germacreno-D, Delta- elemeno y Tau-cardinol, la capacidad antioxidante de los aceites extraídos de las hojas de *Siparuna sessiliflora* por las técnicas HD y DES, estadísticamente no presentaron diferencias significativas.

Cujic et al. (2016), estudiaron el método de maceración para la extracción de Polifenoles de Chokeberry (*Aronia melanocarpa*), se trabajaron los efectos de varios parámetros en la extracción (efecto de diferentes solventes, el tamaño de partícula, la relación sólido-solvente y el tiempo de extracción) sobre los contenidos totales de fenoles (TP) y antocianinas (TA), la eficiencia de extracción de ambos parámetros, mejoro a medida que

aumentaba la duración de la extracción, los rendimientos máximos de TP y TA se lograron a los 90 minutos (13,3 mg GAE/ g DW y 0,15% respectivamente), para ambos parámetros la relación solido-solvente de 1:10 mostro rendimientos significativamente más bajos que los alcanzados a razón de 1:30 y 1:20, estos resultados concuerdan con la literatura es decir a mayor relación solido-solvente mayor rendimiento de polifenoles, usaron diferentes solventes como etanol a concentraciones de 50%, 70% y 96% y agua para determinar la eficiencia de extracción, los resultados revelaron que el rendimiento de TP y TA es mayor al 50% de etanol y significativamente más bajo con los otros dos disolventes y agua, los rendimientos obtenidos con tamaños de partícula 1 y 0,5 mm fueron significativamente mayores (14,9 y 15,4 mg GAE / g DW, respectivamente) que los obtenidos con tamaños de partículas mayores de 2,3 y 6 mm (11,8 y 10,5 mg GAE / g DW, respectivamente), esto debido a que el tamaño de partícula más pequeño tenía una superficie de contacto más alta que permite el aumento de transferencia de masa tanto para TP como TA. El estudio mencionado anteriormente indicó que la maceración fue una técnica simple para la extracción de compuestos bioactivos de chokeberry fruit.

Cano (2002), obtuvo aceite esencial con el método de arrastre con vapor a partir de cuatro plantas medicinales (manzanilla, hinojo, pericón y ajeno) cultivadas a diferentes altitudes. En la investigación, sobre la manzanilla se puede concluir, que debido a que no se observó el color azul, este no poseía en su composición química el componente camazuleno, también se obtuvo una mayor densidad (entre 1 y 1,75 g/mL) comparándola con otros valores ya reportados (entre 0,896 y 0,9459 g/mL), esto se debe a que la consistencia del aceite no era muy fluida, se considera que además del aceite esencial el vapor arrastro otros componentes como por ejemplo ceras. En los resultados de

cromatografía de gases se observa que el aceite esencial es más rico en bisabolol cuando la manzanilla es cultivada a mayor altitud.

González (2004), obtuvo aceite esencial de las hojas de Manzanilla mediante la técnica de arrastre con vapor, utilizó 700gr de muestra durante 90 minutos, el rendimiento de este aceite fue de 0,34%, este autor señala que transcurridos los 90 minutos el volumen del aceite no tuvo variación por lo cual se dio por finalizada la extracción para evitar la degradación del aceite por exposición prolongada de material vegetal.

Vieira, Reis, Garbuio, & Pedro de Freitas (2017), optimizaron el proceso de maceración dinámica de inflorescencias de *Matricaria chamomilla*, para obtener extractos con un contenido óptimo de flavonoides y actividad antioxidante, la condición óptima de maceración fue usando 1h de extracción a una velocidad de agitación de 900rpm, etanol 74,7%, temperatura de 69°C y usando 36,8% de planta en disolvente (p / v). Bajo este conjunto de condiciones, el extracto tenía un contenido total de flavonoides de $4,11 \pm 0,07\%$, actividad antioxidante in vitro con IC 50 de 18,19 $\mu\text{g/mL}$ y contenido de apigenina y apigenina-7-glucósido de $2,0 \pm 0,1 \text{ mg/g}$ y $20,1 \pm 0,9 \text{ mg/g}$, respectivamente.

Reverchon y Senatore (1994), utilizaron CO₂ supercrítico para obtener extractos de manzanilla. Las extracciones se realizaron a presiones de 15 y 20 MPa y temperaturas de 308 a 323 K. Estos autores verificaron que la extracción con fluidos supercríticos produjo extractos de manzanilla que contenían tanto aceite esencial como cera cuticular. El aceite esencial de manzanilla estaba compuesto en un 75% por óxido de bisabolol, α -bisabolol, y óxido de bisabolona; los dicloéteres aportaban aproximadamente un 13% a su composición. Además Pekic et al. (1997) observaron un aumento en la cantidad de extracto de manzanilla

a medida que aumentaba la presión de 8 a 24 MPa a la temperatura de 313 K. El rendimiento máximo fue 0,44% (m/m).

Povh, Marques, & Meireles (2001), estudiaron los efectos de la presión, la temperatura y el caudal másico sobre el rendimiento de extractos de manzanilla utilizando CO₂ supercrítico. Sus resultados experimentales mostraron que el rendimiento de extracción (4,33%) fue el mejor a una temperatura de 40°C, presión 200 bares y caudal de disolvente $6,67 \times 10^{-5}$ kg/s. Los principales compuestos del aceite esencial y de la oleorresina fueron: β -farneseno, α -farneseno, γ -cadineno, α -bisabolol óxido B, α -bisabolol, chamazuleno, α -bisabolol óxido A, cis y *trans*-dicicloéter.

Rahimi, Prado, Zahedi, & Meireles (2011), en su trabajo estudiaron la extracción con fluidos supercríticos de manzanilla, la extracción la realizaron a 40°C y 250 bar. Además, investigaron el efecto del diámetro de partícula sobre el rendimiento de extracción en diferentes tiempos de extracción. Los resultados mostraron que el rendimiento de extracción es una función del diámetro de partícula (0,3 mm).

Kotnik, Skerget, & Knez (2007), realizaron extracción con fluidos supercríticos de cabezas de flores de manzanilla, semicontinua en la escala de laboratorio utilizando dióxido de carbono como disolvente. Compararon los resultados de los experimentos de alta presión con los obtenidos con extracción Soxhlet, destilación con vapor y maceración. Encontraron que los rendimientos de extracción obtenidos convencionalmente por maceración con etanol y extracción Soxhlet con etanol fueron altos (hasta 10%), sin embargo los extractos contenían sólo hasta 35% de aceite esencial. En contraposición, el rendimiento obtenido con el proceso de destilación fue muy bajo (0,60%), sin embargo el extracto contenía 94%

de aceite esencial. El mayor rendimiento de extracción lo obtuvieron utilizando extracción con fluidos supercríticos (3,81%) a 250 bar y 40°C.

Scalia, Giuffreda, & Pallado (1999), compararon la extracción con fluidos supercríticos con la extracción Soxhlet, la destilación con vapor y la maceración para el aislamiento de los componentes activos presentes en las cabezas de las flores de manzanilla. El rendimiento de aceite esencial obtenido por una extracción con fluidos supercríticos de 30 minutos con CO₂ puro a 90 atm y 40°C fue 4,4 veces mayor que el producido por la destilación de vapor realizada durante 4 h. Usando CO₂ supercrítico, las extracciones se pueden realizar en un tiempo más corto y bajo condiciones suaves, minimizando así la degradación de componentes termolábiles (Ejemplo: Matricina).

Roby et al. (2013), examinaron aceites esenciales de hinojo y manzanilla para determinar actividad antioxidante y antimicrobiana. Primero obtuvieron rendimientos en aceite esencial de 1,95% para el hinojo y 0,73% para la manzanilla. El análisis por cromatografía de gases, espectrometría de masas de los aceites esenciales, reveló la presencia de 15 monoterpenoides principales en los dos, pero sus porcentajes en cada planta eran muy diferentes. Las actividades antioxidantes de los extractos se evaluó utilizando la capacidad del radical DPPH[•]. El análisis estadístico mostró mayor potencia antiradical para la manzanilla. Los resultados de la presente investigación demostraron variaciones significativas en las actividades antioxidantes.

Sharifzadeh et al. (2016), determinaron las actividades antioxidantes y antifúngicas de los aceites esenciales de cinco hierbas aromáticas, incluyendo *Thymus vulgaris*, *Chamaemelum nobile*, *Ziziphora clinopodioides*, *Zingiber officinale* y *Cuminum cyminum*, contra diferentes especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Los aceites se sometieron a un

cribado de su posible actividad antioxidante usando el ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), sobre la base de estos resultados, las potencias reductoras de todos los aceites esenciales fueron menores que *T. vulgaris* y *Ch. nobile* ya que presentan un alto porcentaje de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides. En cuanto a las considerables actividades antifúngicas su estudio mostro que el aceite esencial de *Ch. Nobile* mostró un patrón débil de inhibición (rango de 3000 a 5000 mg/mL, valor medio: 3750 mg/mL) contra patógenos fúngicos transmitidos por alimentos.

Kolodziejczyk et al. (2015), evaluaron la actividad antioxidante de *Matricaria chamomilla* y su capacidad para proteger los componentes del plasma sanguíneo contra las alteraciones inducidas por el estrés oxidativo; la eliminación de radicales libres se realizó por los métodos DPPH• Y ABTS•+ ; la eliminación de radicales indicaron considerable acción anti-radicales libres de la MC examinada, sin embargo, la actividad observada fue menor que las propiedades de radicales libres de Trolox (utilizado como compuesto de referencia). Los valores de EC50 para MC fueron $\approx 100 \mu\text{g/mL}$ y $8,45 \mu\text{g/mL}$, para los radicales DPPH • y ABTS•+, respectivamente. El CE50 $3,22$ y $2,24 \mu\text{g/mL}$ se obtuvieron para Trolox y para los radicales DPPH • y ABTS•+, respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio indican que los conjugados polifenólicos-polisacáridos aislados de sustancias de *M. chamomilla* poseen propiedades antioxidantes.

Gawde, Cantrell, Zheljazkov, Astatkie, & Schlegel (2014), estudiaron el efecto del tiempo de destilación (DT) en relación al rendimiento, la composición y la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.). El aceite esencial obtenido a 30, 60, 90, 120,180, 240, 360, 480, 600 y 720 min mostró un aumento significativo en el rendimiento de aceite con DT creciente, alcanzando un máximo de 3,1 g

de aceite por 1000 g de flores a los 720 min. Los principales compuestos que se identificaron y cuantificaron fueron anethole, β -farnesene, spathulenol, α -bisabolol oxide B, α -bisabolone oxide A, chamazuleno, α -bisabolol oxide A, and spiroether, los diagramas de rendimientos de los componentes esenciales del aceite expresados como g/100 g de flores secas frente a DT mostraron un aumento constante en los rendimientos de spathulenol, α -bisabolol oxide B α -bisabolol oxide A, α -bisabolone oxide A, chamazuleno, y spiroether que fue adecuadamente modelado por el modelo Michaelis-Menton. La capacidad antioxidante del aceite de manzanilla en este estudio no se vio significativamente afectada por el DT. Se observó una actividad promedio de 905 μ Mol de equivalentes Trolox / g de extracto de aceite esencial de manzanilla, respecto a la actividad antimicrobiana fue probada contra diez microorganismos, donde exhibió baja inhibición contra *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* y *Mycobacterium intracellulare* con porcentajes de inhibición de 38, 39 y 35, respectivamente. El aceite de manzanilla mostró cierta actividad contra *Candida glabrata* y *Pseudomonas aeruginosa* con una inhibición del 14% y 10%, respectivamente. El aceite de manzanilla tuvo una actividad insignificante contra *E. coli* y *Candida albicans*, con 3% y 5% de inhibición, respectivamente. La actividad antimicrobiana del aceite de manzanilla contra *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus* y *S. aureus* resistente a la meticilina fue cero. La actividad del aceite esencial probado a una concentración de 15867 ng / mL no mostró actividad antimalárica.

Raal et al. (2012), analizaron muestras comerciales de manzanilla alemana (*Matricaria recutita* L.) por GC-MS para determinar el contenido de aceite esencial y terpenoides. Los aceites se obtuvieron de las flores de manzanilla con rendimientos de 0,10 – 0,61%, establecieron la existencia de dos tipos de té de manzanilla, uno rico en óxidos de bisabolol

y el otro en α -bisabolol, los principales compuestos fenólicos de las infusiones de manzanilla fueron los ácidos clorogénicos, los glucósidos de ácido ferúlico, los ácidos dicafeoil quínicos y los glicósidos de apigenina. En base a las cantidades de aceite esencial, terpenoides, flavonoles totales y compuestos fenólicos principales, la calidad de los tés de manzanilla comerciales fue muy variable.

Todos los anteriores aspectos condujeron a la siguiente pregunta de investigación:

¿Existen diferencias en la composición y en la actividad antioxidante, del aceite esencial de manzanilla obtenido por diferentes técnicas de extracción verde?

5. Objetivos.

5.1. Objetivo general.

Comparar la composición y actividad antioxidante de aceite esencial de manzanilla (*Matricaria Chamomilla* L.) obtenido con fluidos supercríticos y otras técnicas de extracción verdes.

5.2. Objetivos específicos.

1. Determinar las condiciones óptimas para la extracción de aceite esencial de manzanilla utilizando la tecnología de fluidos supercríticos
2. Comparar la composición del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria Chamomilla* L.) obtenido mediante: fluidos supercríticos, arrastre con vapor, hidrodestilación, destilación extracción simultanea (DES) y maceración.
3. Determinar y comparar la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria Chamomilla* L.) obtenido por varios métodos de extracción.

6. Metodología.

6.1. Localización.

La presente investigación se desarrolló con el apoyo del grupo de investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) en el laboratorio de Fluidos Supercríticos e Ingredientes Naturales y la Planta Piloto de la Universidad de Nariño, adscritos a la Facultad de Ingeniería Agroindustrial. También se contó con el apoyo de los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño, todas estas instalaciones ubicadas en la Sede Torobajo de Pasto, Nariño.

6.2. Obtención y adecuación del material vegetal.

La manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) se obtuvo como muestra seca de la empresa Agrocomercial del Sur S.A.S. de la ciudad de Ipiales. Fue empacada en bolsas herméticas y se trasladó hacia las instalaciones de la Universidad de Nariño sede Torobajo donde primeramente se le hizo un proceso de homogenización para obtener una muestra más uniforme.

Figura 3. Obtención y adecuación de la manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.).



Fuente: (Esta investigación)

6.3. Caracterización del material vegetal.

Se hizo un análisis granulométrico con el fin de caracterizar el tamaño del material vegetal, también se midió el % de humedad para determinar cuáles eran las condiciones iniciales de la manzanilla.

6.3.1. Análisis Granulométrico.

Dentro del estudio se determinó el tamaño promedio de partícula del material vegetal; durante 15 minutos se tamizaron 350 g de manzanilla en una tamizadora (modelo PS-35 serie 1182) empleando un juego de tamices de mallas (10-100) ordenados de mayor a menor.

Para determinar el tamaño promedio de partícula, se colocaron un conjunto de tamices estandarizados, acoplados en serie (10-100), con el tamiz más pequeño en el fondo y el más grande en la parte superior, se colocaron 350 g de manzanilla en el tamiz superior y el

conjunto se sometió a sacudidas mecánicas durante 15 minutos. Las partículas retenidas sobre cada tamiz se retiraron y se pesaron. Las partículas que pasaron a través del tamiz más fino se recogieron en un contenedor situado en el fondo de la columna de tamices.

Figura 4. Tamizado de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.).



Fuente: (Esta investigación).

En la tabla 9 se presenta el análisis por tamizado, donde: x_i es la fracción de masa de la muestra total que es retenida sobre el tamiz designado, D_{pi} es el diámetro promedio de partícula y D_w es el diámetro medio másico.

Tabla 9. Análisis granulométrico de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.).

No. de malla	Apertura (μ)	Apertura (mm)	Peso retenido (g)	Xi	Dpi (mm)	Dw (mm)
10	2000	2	60,228	0,17	0	0
20	850	0,841	74,448	0,21	1,420	0,302
40	425	0,420	76,400	0,22	0,630	0,138
80	180	0,177	109,725	0,31	0,298	0,094
100	150	0,149	14,125	0,04	0,163	0,006
Colector	0	0	14,981	0,04	0,074	0,003
TOTAL			349,907	1,00		0,543

Fuente: (Esta Investigación).

6.3.2. Humedad.

Se determinó el porcentaje de humedad de 2 g de manzanilla seca por triplicado según la Norma Internacional AOAC: Official Methods of Analysis en una balanza gravimétrica RADWAG PMR-50/NH a una temperatura de 103°C, con el fin de determinar si la humedad era menor al 10%, condición favorable para un proceso de extracción óptimo.

Figura 5. Determinación de humedad de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) en balanza gravimétrica.

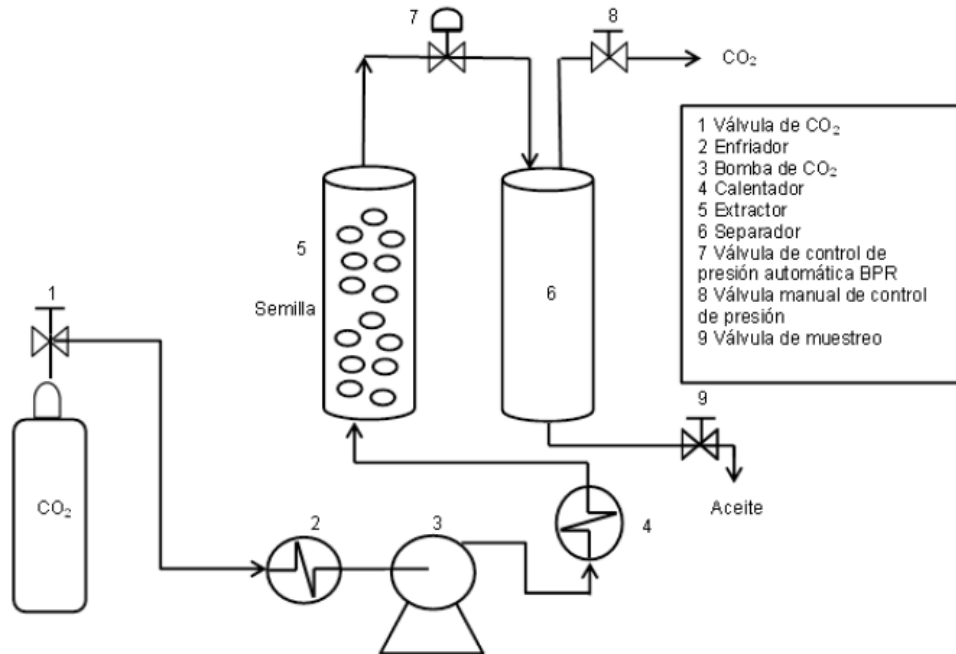


Fuente: (Esta investigación).

6.4. Obtención de los extractos.

6.4.1. Extracción con fluidos supercríticos.

La extracción del aceite de manzanilla (*Matricaria Chamomilla* L.) se realizó utilizando la tecnología de fluidos supercríticos bajo diferentes condiciones de presión y temperatura. Para lograrlo, se utilizó un equipo Waters modelo SFE-500 (USA), como se muestra en el diagrama de proceso (Figura 6), y se utilizó CO₂ al 99,9 % de pureza (Cryogas, Colombia) como solvente, equipo con celda de extracción 500 mL, una bomba de alta presión y un separador.

Figura 6. Diagrama del proceso del equipo de extracción SFE -500

Fuente: (Pantoja, 2016).

El proceso extractivo se llevó a cabo utilizando una carga de 140 g de manzanilla molida, dispuestos en la columna de extracción. Seguidamente se hizo pasar el CO₂ a través de un serpentín sumergido en líquido refrigerante (etilenglicol) mantenido a una temperatura de 2 °C con el objetivo de evitar su gasificación y mantenerlo líquido. Empleando una bomba de alta presión se bombeó el CO₂ en intervalos de 90 a 210 bares, la temperatura dentro del recipiente extractor fue elevada entre 35 y 65 °C. Una vez alcanzadas las condiciones de operación (presión y temperatura) en la columna de extracción, se inicia el proceso ajustando el flujo de CO₂ a 30 g CO₂/min por un tiempo de 150 minutos. El CO₂ pasa por la columna y extrae el aceite presente en las flores secas de manzanilla. Finalmente se despresuriza el equipo, el CO₂ en estado gaseoso circuló hasta el

escape, el aceite extraído se recogió en el separador y se almacenó en un vial de vidrio ámbar en refrigeración (4°C), hasta su posterior análisis.

Figura 7. *Proceso de obtención de aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla L.) mediante tecnología de fluidos supercríticos (SFE).*



Fuente: *(Esta investigación).*

- Diseño de Experimentos.

Se aplicó un diseño factorial 3^2 con 4 puntos centrales, de manera aleatoria, donde se evaluó el efecto de la temperatura (35-65 °C) y la presión (90-210 bar) sobre el rendimiento de la extracción (% p/p), la actividad antioxidante (μM de trolox/ mL de aceite de manzanilla) y la composición del aceite esencial de manzanilla (en-in-dicicloeter, β -farneseno, óxido de bisabolol A como % relativo de área). Se llevaron a cabo un total de 13 experimentos (Tabla 9).

El rendimiento fue calculado mediante la ecuación 1 y se expresó como porcentaje de aceite extraído.

$$\text{Rendimiento (\% p/p)} = \left(\frac{\text{Peso del aceite extraído}}{\text{peso de la muestra seca y molida}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Tabla 10. Matriz de diseño experimental para la extracción con fluidos supercríticos (SFE), diseño factorial 3² con cuatro puntos centrales.

Ensayo	Temperatura (°C)	Presión (Bar)	Rendimiento (%)	Actividad antioxidante (mMol de Trolox/100 mL de aceite)	Composición		
					En-in-dicicloeter (%)	β-farneseno (%)	Óxido de bisabolol a (%)
1	50	150					
2	50	150					
3	35	90					
4	35	210					
5	50	90					
6	50	150					
7	50	210					
8	50	150					
9	65	210					
10	65	90					
11	65	150					
12	35	150					
13	50	150					

Fuente: (Esta investigación)

Con el fin de determinar el efecto de la presión y la temperatura sobre el rendimiento del aceite, la actividad antioxidante y la composición del mismo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.

6.4.2. Arrastre con vapor.

El aceite esencial de *Matricaria chamomilla* L. logrado por el método de arrastre con vapor se obtuvo desarrollando la metodología descrita por Arango, Pantoja, Santacruz, & Hurtado (2012); este proceso se llevó a cabo en la Planta Piloto de Universidad de Nariño; las condiciones utilizadas en este estudio fueron: vapor saturado a presión atmosférica de 1 psig y densidad del lecho de $95,4 \text{ g.L}^{-1}$, la extracción se realizó con 7,25 kg de manzanilla seca bajo un tiempo de extracción aproximado de 4 horas, este proceso se realizó por triplicado. El equipo utilizado fue la unidad de extracción por arrastre con vapor de Marca DINOX con capacidad de 80 L.

Figura 8. *Proceso de obtención de aceite esencial (Matricaria chamomilla L.) mediante arrastre con vapor.*



Fuente: (Esta investigación).

Se determinó la cantidad de aceite obtenida y se almaceno en refrigeración para su posterior análisis.

El rendimiento se calculó a partir de la cantidad de aceite esencial obtenido por unidad másica de materia prima en términos porcentuales según la ecuación 1.

6.4.3. Método de maceración.

La maceración se realizó en un balón de vidrio de 2000 mL, donde se dispusieron 500 g de manzanilla seca y 1000 mL de Etanol puro, el tiempo de la extracción fue de 16 días y el montaje se realizó por triplicado, se mantuvo hermético, cubierto de la luz, a temperatura ambiente y sin ningún tipo de agitación.

Figura 9. Extracción de aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla L.) mediante maceración.



Fuente: (Esta investigación)

Los extractos se concentraron en un rotaevaporador EYELA N-1100, con una base de agua a 60°C con el fin de concentrarlos y obtener unos extractos más puros, posteriormente se almacenaron en refrigeración y protegidos de la luz, con estos se hicieron los análisis de actividad antioxidante y de composición.

Figura 10. Rotaevaporación del extracto de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido mediante maceración.



Fuente: (Esta investigación)

6.4.4. Hidrodestilación.

El procedimiento se realizó con un equipo Clevenger mostrado en la figura 11. Se tomaron 100 g de manzanilla seca y se depositaron en un balón de vidrio de 2000 mL junto con 1500 mL de agua, se calentó hasta el punto de ebullición usando una malla térmica durante 3 horas, con el fin de que el aceite en el interior de las glándulas del vegetal alcance su punto de ebullición al igual que el agua y ambos se evaporen. Luego los gases viajarán a través de los conductos del equipo Clevenger hasta llegar al condensador, como producto del proceso de condensación se obtuvieron dos fases una de aceite esencial y otra de agua; posteriormente al extracto obtenido se realizó una extracción líquido-líquido con

diclorometano obteniéndose finalmente una mezcla de aceite esencial-diclorometano, la cual se almacenó en refrigeración y protegida de la luz, para su concentración y posterior análisis. El ensayo se realizó por triplicado.

Figura 11. *Extracción de aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla L.) mediante hidrosestilación, con equipo Clevenger.*



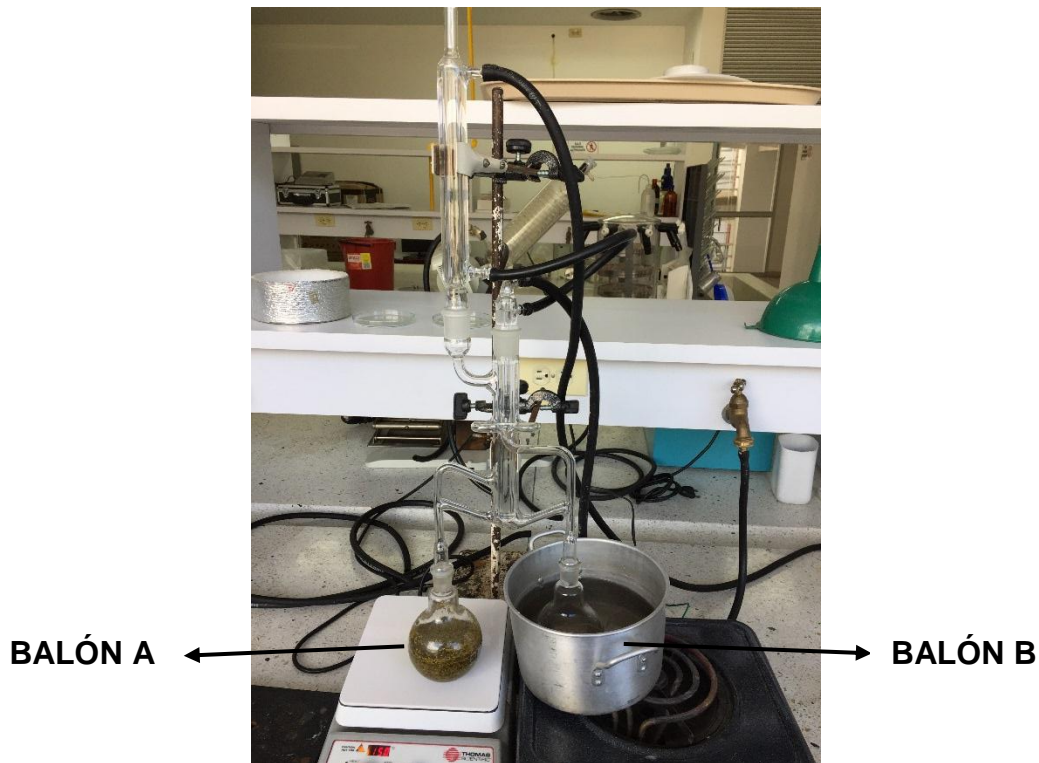
Fuente: (Esta investigación)

6.4.5. Destilación extracción simultánea (DES).

Para realizar el proceso de destilación extracción simultánea se pesaron aproximadamente 20 g de manzanilla seca y se agregaron al balón A (Ver figura 12) junto con agua suficiente para tapan la muestra de material vegetal (140 mL), se agregó 50 mL de diclorometano al balón B; se inició el calentamiento en ambos balones, hasta la temperatura de ebullición de cada solvente durante 2 horas, como producto del proceso de condensación se obtuvo una mezcla de aceite esencial y diclorometano. El proceso se realizó por

triplicado. La mezcla se separó, se concentró en un rotaevaporador EYELA N-1100 (Ver Figura 10) y se envaso en un recipiente ámbar protegido de la incidencia de la luz, en refrigeración.

Figura 12. Extracción de aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) mediante destilación extracción simultanea (DES).



Fuente: (Esta investigación).

6.5. Medición de la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) Por el método ABTS.

Para la determinación de la actividad antioxidante de los aceites extraídos de manzanilla se realizó el siguiente proceso:

La metodología aplicada fue la descrita por Re et al. (1999), citado por Jiménez & Villarreal (2008). El radical ABTS•+ se generó tras la reacción de ABTS (7 mM) con

persulfato potásico (2,45 mM). La mezcla reaccionante permaneció a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 24 horas. El ABTS^{•+} preparado se diluyó con metanol hasta obtener un valor de absorbancia de $0,8 \pm 0,2$ a una longitud de onda de 734 nm, y utilizando un espectrofotómetro Genesys UV-VIS 10S (Thermo Scientific, USA).

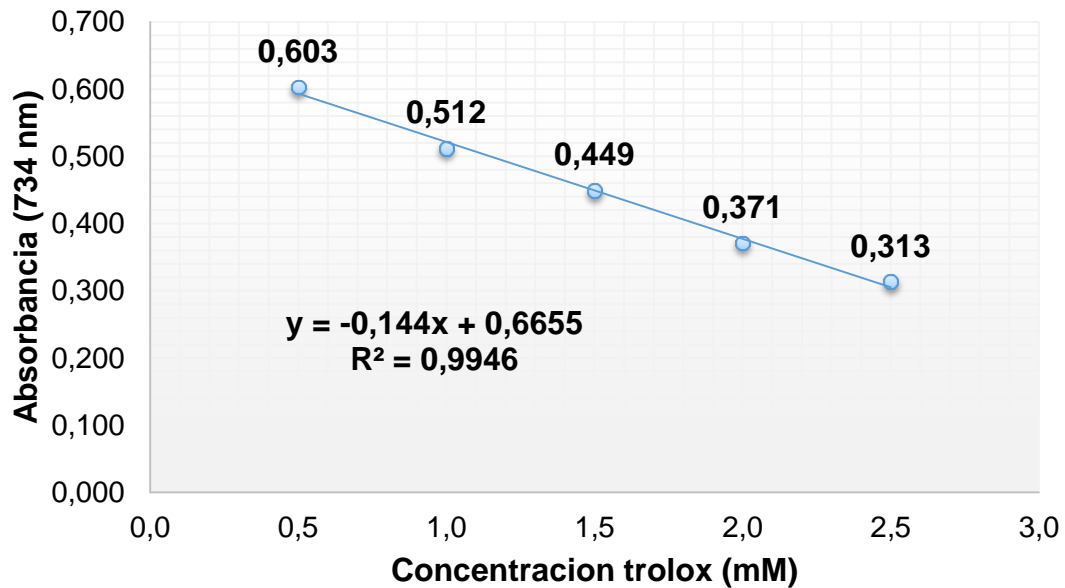
Se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones de trolox (0,5 – 2,5 mM). Para esto se tomaron 2 mL de la solución ABTS^{•+} y se añadió 20 μ L de las distintas concentraciones de trolox, agitándose durante un minuto, y midiendo la absorbancia transcurridos 6 minutos más a 734 nm. Cada muestra fue medida por triplicado y se encontró la siguiente ecuación (Gráfico 1): $Y = -0,144X + 0,6655$ ($R^2 = 0,9946$). La pendiente negativa indica la pérdida de color que sufre el catión ABTS^{•+} al reaccionar con el antioxidante. Los resultados fueron expresados como actividad antioxidante equivalente en trolox con sus siglas en inglés (TEAC) en unidades de μ Mol de Trolox/ mL de aceite de manzanilla.

Tabla 11. Absorbancias de la prueba de ABTS•+ con distintas concentraciones de Trolox

Trolox (mM)	Absorbancia			Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)
2,5	0,313	0,314	0,312	0,313	0,001000	0,3195
2,0	0,371	0,371	0,371	0,371	0,000000	0,0000
1,5	0,450	0,449	0,448	0,449	0,001000	0,2227
1,0	0,513	0,512	0,510	0,512	0,001528	0,2985
0,5	0,603	0,603	0,602	0,603	0,000577	0,0958

para la elaboración de la curva de calibración.

Fuente: (Esta investigación).

Gráfico 1. Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante (TEAC).

Fuente: (Esta investigación).

El potencial antioxidante de la muestra se probó por la adición de 2 mL de la solución del radical ABTS•+ a 20 µL del aceite diluido en una mezcla isopropanol: etanol (80:20) y se leyó la absorbancia a 734 nm; la lectura se interpoló en la ecuación de la recta obtenida a partir de trolox.

La funcionalidad del método se verificó con un patrón de ácido ascórbico 1,5 mM al cual se le realizó el mismo procedimiento que a las muestras de aceite. Los resultados obtenidos se expresaron en mM de trolox (Tabla 12), en donde se puede observar que los valores encontrados son similares a los reportados por los autores, con lo cual se puede concluir que el método aplicado es válido.

Tabla 12. Resultados de la prueba ABTS•+ para ácido ascórbico.

ANTIOXIDANTE	REPLICA	mM TROLOX	mM DE TROLOX Jiménez & villarreal (2008).
ÁCIDO ASCÓRBICO	1	0,928	1,05 ± 0,02
	2	1,022	
	3	0,914	
	Promedio	0,955	
	DE	0,007	
	CV	1,624	

Fuente: (Esta investigación).

6.6. Análisis por cromatografía de gases.

El análisis cromatográfico del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* se realizó en los Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, mediante cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas (GC-MS), utilizando un equipo Shimadzu QP2010S GC-MS, siguiendo la metodología descrita por Arango et al. (2012).

Para la separación e identificación de los componentes químicos se utilizó una columna DB-5 de J y W Scientific con 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro, espesor película de 0,25 μm , y un flujo de helio de 1 mL / min UAP como gas portador, temperatura del detector o la interfaz (GC-MS) de 300°C. La temperatura inicial de la columna fue de 40°C, seguido de un incremento de 5°C/min hasta 250°C, y una isoterma de separación durante 15 min. La energía de ionización 70 eV.

Se inyectó en el GC-MS 1,0 μL del aceite esencial a una concentración del 10% disuelto en diclorometano. La identificación de los componentes se realizó por comparación de sus espectros de masas con los referenciados en las bases de datos Nist y Adams. La cuantificación de los componentes se llevó a cabo mediante el cálculo de las cantidades relativas de áreas.

6.7. Diseño experimental y análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de la composición y de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de manzanilla se usó un diseño experimental completamente al azar con 5 tratamientos correspondientes a las técnicas de extracción y tres repeticiones por cada método: Fluidos supercríticos (SFE), arrastre con vapor (AV), hidrodestilación (HD), destilación extracción simultanea (DES) y maceración (MC) y 4 variables de respuesta que corresponden a: tres componentes mayoritarios encontrados en los perfiles

cromatográficos: en-in-dicicloeter, β -farmseseno y oxido de bisaolol A y el ultimo al % de actividad antioxidante (μ Mol de trolox / mL de aceite).

Para la tecnología de fluidos supercríticos se emplearon como referencia los valores del punto óptimo (T=65 °C y P=210 bar).

Se utilizó la técnica de análisis de varianza para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, a un nivel de significancia de 5%. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.

7. Resultados y análisis.

7.1. Caracterización del materia vegetal.

7.1.1. Humedad.

La manzanilla seca y pulverizada presentó un porcentaje de humedad promedio de 4,83 %, valor favorable para obtener un mayor rendimiento durante la extracción con fluidos supercríticos, ya que es inferior al límite recomendado del 10% de humedad (E. Rodríguez et al., 2012). En semejanza Rahimi et al. (2011), midieron el contenido de humedad a flores de manzanilla donde el resultado obtenido fue de $(9,3 \pm 0,7) \%$.

7.1.2. Análisis granulométrico.

Tras el análisis granulométrico, el tamaño promedio de partícula obtenido fue de 0,54 mm, este valor se encuentra dentro del promedio que han utilizado otras investigaciones, Povh et al. (2001) y Rahimi et al. (2011), midieron el tamaño de partícula a flores de manzanilla para extracción con fluidos supercríticos, donde los resultados obtenidos fueron 0,33 y 0,54 mm respectivamente. La razón por la que el material debe ser molido o triturado es facilitar la extracción, ya que permite obtener mayor área de contacto entre el material y el solvente (Pantoja , 2016).

7.2. Obtención de los extractos.

7.2.1. Extracción con fluidos supercríticos.

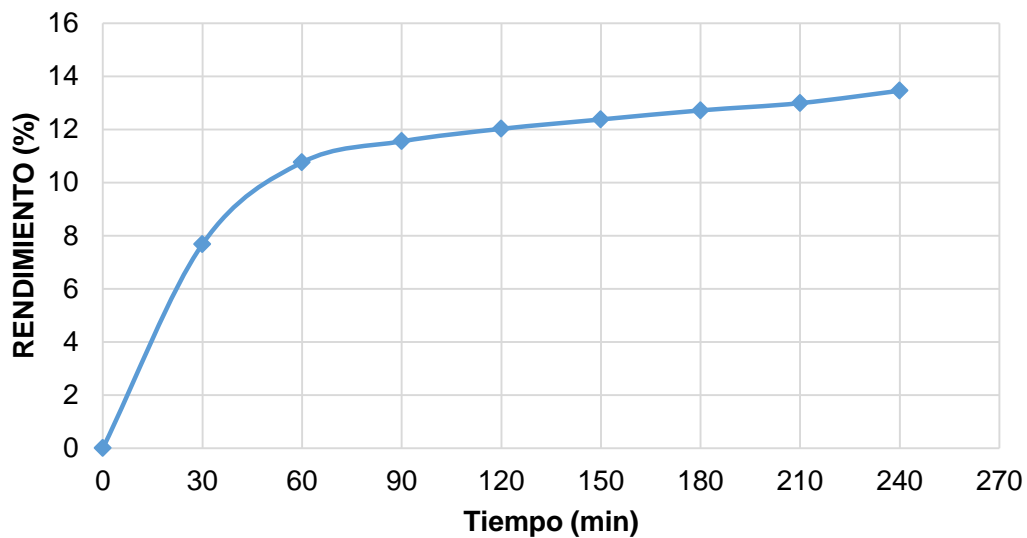
La extracción con fluidos supercríticos se realizó teniendo en cuenta la metodología presentada en el numeral 6.4.1., con un diseño factorial 3^2 , cuatro puntos centrales y de manera aleatoria.

En el gráfico 2 se presenta la cinética de la extracción de aceite esencial de manzanilla obtenida a una presión de 150 bar, una temperatura de 50°C y 5 % de cosolvente (etanol),

donde se estudió el comportamiento del rendimiento de aceite en función del tiempo de extracción. El porcentaje de aceite extraído fue de 13,46%, transcurridos 240 minutos de extracción y considerando el peso del cosolvente.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente se fijó el tiempo de extracción en 150 minutos para todo el diseño experimental, tiempo en el cual se recuperó la mayor cantidad de aceite contenido en la manzanilla, aproximadamente un 70% del total, debido a que es un criterio de trabajo, puesto que en la práctica industrial no se llega a agotar totalmente la materia prima dado a largos tiempos de extracción y los costos asociados a ello.

Gráfico 2. *Cinética de extracción con CO₂ supercrítico de aceite de manzanilla (Matricaria chamomilla L.). Presión: 150 bar; Temperatura: 50 °C y 5 % de cosolvente (etanol).*



Fuente: (Esta investigación).

7.2.1.1. Rendimiento del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) extraído con CO₂ supercrítico.

En la tabla 13 se puede observar el rendimiento del aceite esencial de manzanilla obtenido mediante fluidos supercríticos en cada una de las condiciones de presión (90-210 bar) y temperatura (35-65°C); las condiciones óptimas encontradas fueron 210 bar y 65°C, donde se obtuvo un rendimiento de aceite de 0,87 % (p/p) en un tiempo de extracción de 150 minutos.

Rahimi et al. (2011), obtuvo un rendimiento de 0,6% de aceite esencial de manzanilla empleando la tecnología de fluidos supercríticos, a una temperatura de 40°C y una presión de 250 bar, valor inferior al obtenido en la presente investigación a condiciones de extracción similares.

Tabla 13. Resultados de los rendimientos de las extracciones de aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) mediante técnica de fluidos supercríticos (% p/p). Diseño factorial 3^2 tipo superficie de respuesta con cuatro puntos centrales. Flujo CO_2 : 30 g/min; % cosolvente: 0 %; tiempo de extracción: 150 min.

ENSAYO	CONDICIONES DE LA EXTRACCIÓN		RENDIMIENTO (%)
	Temperatura (°C)	Presión (bar)	
1	50	150	0,031
2	50	150	0,500
3	35	90	0,154
4	35	210	0,021
5	50	90	0,060
6	50	150	0,133
7	50	210	0,036
8	50	150	0,319
9	65	210	0,871
10	65	90	0,228
11	65	150	0,512
12	35	150	0,047
13	50	150	0,299

Fuente: (Esta investigación).

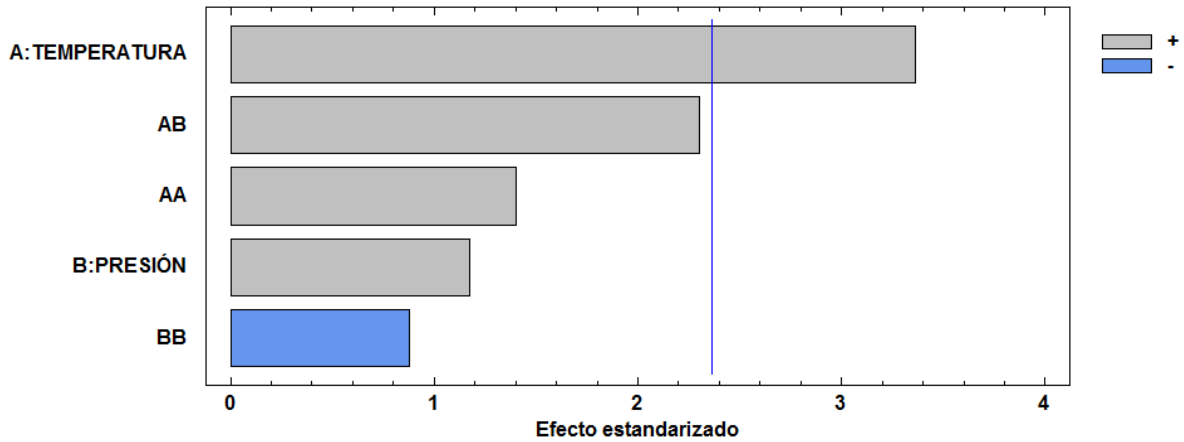
En la tabla 14 se muestran los resultados del análisis de varianza. Se puede observar que únicamente la temperatura influye significativamente sobre el rendimiento de aceite extraído de manzanilla ($p < 0,05$). Mientras que los factores presión y demás interacciones no presentaron efecto significativo dentro del intervalo de las condiciones estudiadas (Gráfico 4). La investigación realizada por Kotnik *et al.* (2007), demuestra que efectivamente el rendimiento de la extracción es directamente proporcional a la temperatura.

Tabla 14. Análisis de varianza para rendimiento de aceite de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por fluidos supercríticos.

Fuente	Suma De Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	0,321554	1	0,321554	11,3	0,0121
B:Presión	0,039366	1	0,039366	1,38	0,2781
AA	0,0561111	1	0,0561111	1,97	0,2031
AB	0,150544	1	0,150544	5,29	0,055
BB	0,0218601	1	0,0218601	0,77	0,4099
Error Total	0,199269	7	0,028467		
Total (Corr.)	0,770726	12			

Fuente: (Esta investigación).

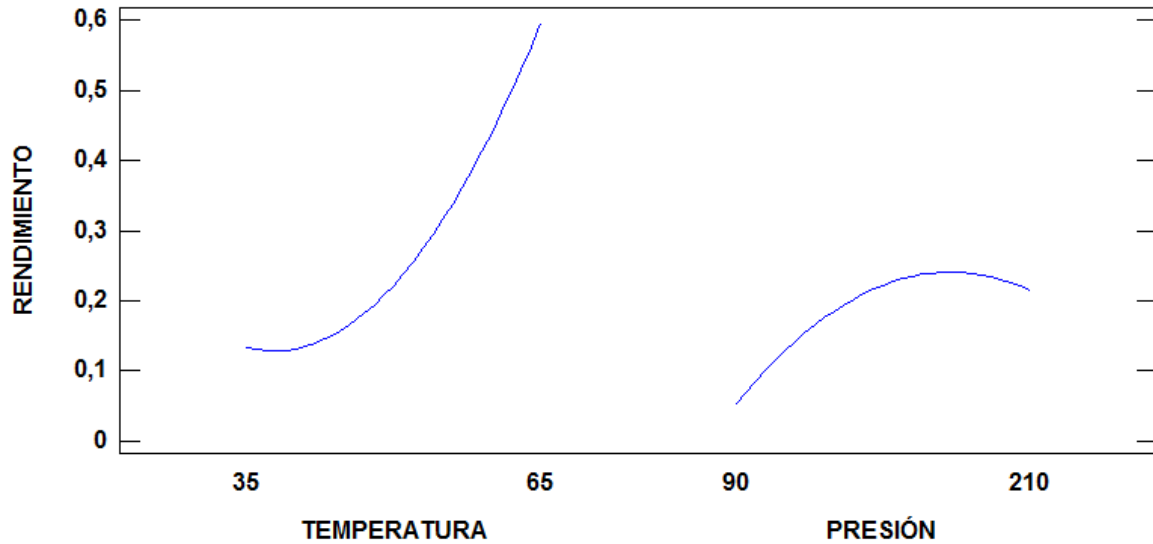
Gráfico 3. Diagrama de Pareto para el rendimiento de aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por fluidos supercríticos.



Fuente: (Esta investigación).

El gráfico 5 muestra el efecto particular de cada factor sobre la variable de respuesta, por lo tanto se evidencia que la temperatura presenta una pendiente con mayor inclinación lo cual hace referencia a su significancia frente al rendimiento y la sensibilidad de la variable de respuesta a los cambios de este factor. El efecto de la presión frente al rendimiento es directamente proporcional en los rangos evaluados en la presente investigación pero no presenta ningún efecto significativo. La investigación realizada por Kotnik *et al.* (2007), demuestra que efectivamente el rendimiento de la extracción es directamente proporcional únicamente a la temperatura.

Gráfico 4. Diagrama de efectos principales para rendimiento de aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por fluidos supercríticos.



Fuente: (Esta investigación).

7.2.1.2. Composición del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por fluidos supercríticos.

En el análisis composicional del aceite esencial de manzanilla, obtenido por fluidos supercríticos, se identificaron los siguientes componentes mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas: en-in-dicicloeter, β -farneseno, óxido de bisabolol A, óxido de bisabolona, óxido de bisabolol, en-in-dicicloeter isómero, docosano, octacosano y p-cimeno. Los de mayor importancia para esta investigación son en-in-dicicloeter, β -farneseno y óxido de bisabolol A, ya que se encontraron en todas las muestras y presentaron el mayor porcentaje relativo de área en cada una de ellas, los valores porcentuales para cada uno se observa en la Tabla 15.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que en-in-dicicloeter es el principal componente obtenido empleando este método de extracción (Gráfico 5), seguido por óxido de bisabolol A y β -farneseno.

Povh *et al.* (2001), Rahimi *et al.* (2011) y Scalia *et al.* (1999) reportaron la composición de aceite esencial de manzanilla obtenido mediante fluidos supercríticos, donde los componentes activos con mayor porcentaje relativo de área en orden de importancia son: en-in-dicicloeter, β -farneseno, óxido de bisabolol A, óxido de bisabolol B y α bisabolol, El perfil cromatográfico encontrado en esta investigación arrojó un reporte similar sobre la composición del aceite.

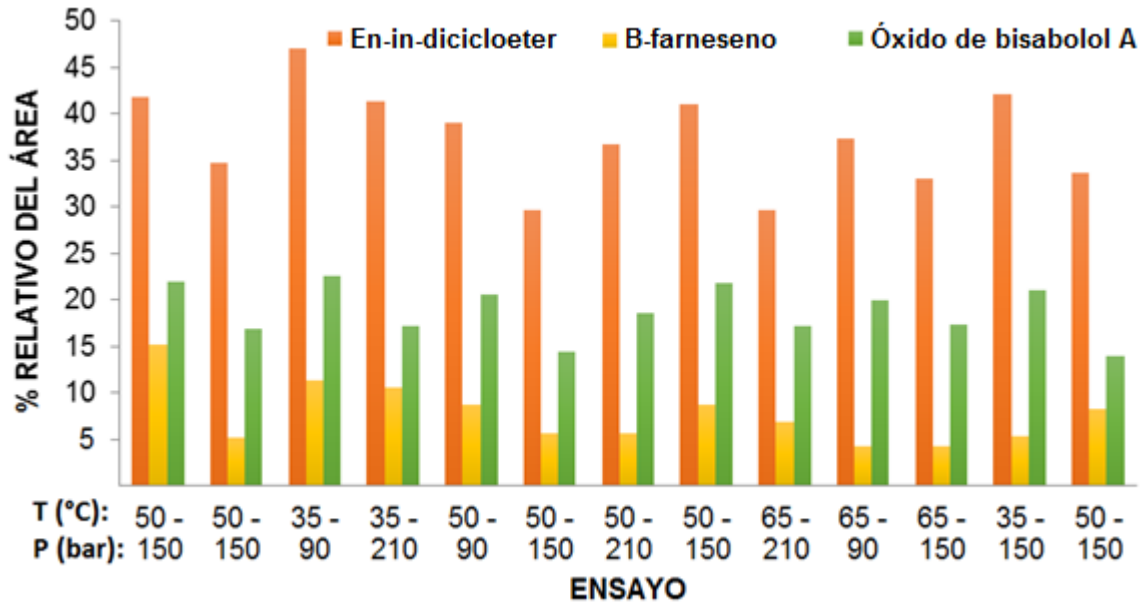
Por otra parte Kotnik *et al.* (2007), realizaron una investigación donde los extractos de manzanilla obtenidos por fluidos supercríticos, contenían principalmente matricina, un compuesto sesquiterpenico no identificado en los perfiles cromatográficos de esta investigación; esto se debe a que la especie utilizada por Kotnik es diferente (*Matricaria recutita*).

Tabla 15. Composición del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por fluidos supercríticos. Diseño factorial 3^2 tipo superficie de respuesta con cuatro puntos centrales.

Ensayo	Temperatura (°C)	Presión (Bar)	% Relativo del área		
			En-in- dicicloeter (%)	β -farneseno (%)	Óxido de bisabolol a (%)
1	50	150	41,8	15,15	21,9
2	50	150	34,7	5,1	16,8
3	35	90	47	11,4	22,63
4	35	210	41,4	10,6	17,1
5	50	90	39,1	8,7	20,5
6	50	150	29,6	5,6	14,4
7	50	210	36,8	5,7	18,5
8	50	150	41	8,65	21,8
9	65	210	29,6	6,9	17,1
10	65	90	37,3	4,2	19,9
11	65	150	33	4,3	17,3
12	35	150	42,18	5,3	21,1
13	50	150	33,6	8,3	13,95

Fuente: (Esta investigación).

Gráfico 5. Composición del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por fluidos supercríticos (SFE).



Fuente: (Esta investigación).

7.2.1.3. Actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por fluidos supercríticos.

En la tabla 16 se presentan los resultados de actividad antioxidante para los aceites esenciales de manzanilla obtenidos con fluidos supercríticos. La mayor actividad antioxidante obtenida por el método ABTS se observó a una temperatura de 50 °C y una presión de 150 bar (Grafica 7), 33,188 $\mu\text{Mol Trolox} / \text{mL}$ de aceite de manzanilla.

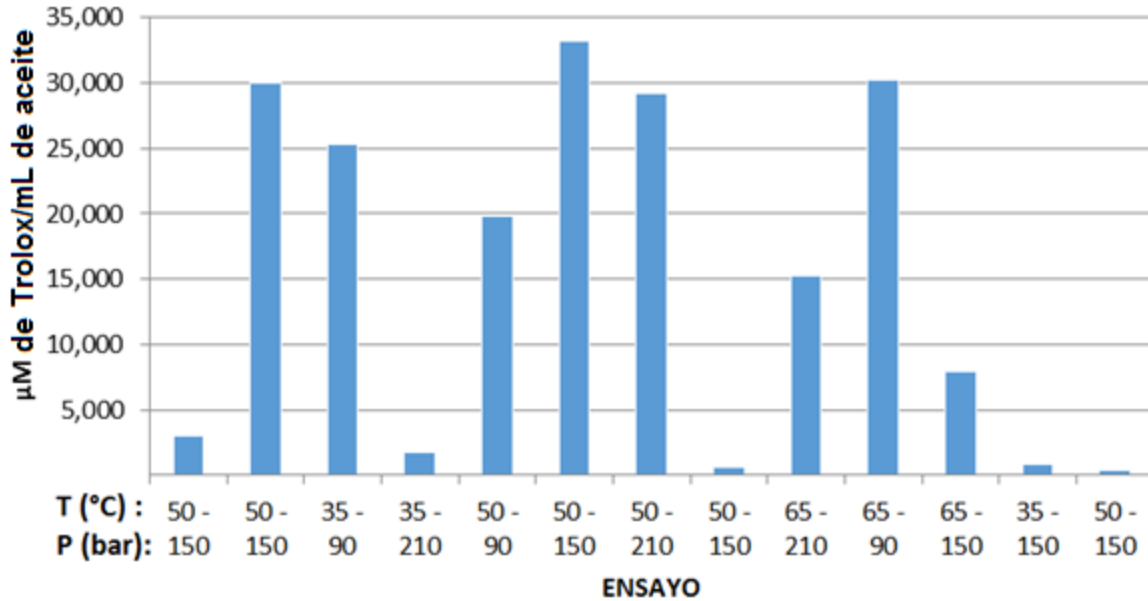
En este estudio se comprueba que el aceite esencial de manzanilla obtenido por fluidos supercríticos tiene buena actividad antioxidante.

Tabla 16. Resultados de actividad antioxidante en TEAC para los aceites esenciales de manzanilla obtenido por fluidos supercríticos (SFE).

Ensayo	Condiciones		Promedio	μM de Trolox/ mL de aceite
	T ($^{\circ}\text{C}$)	P (bar)		
1	50	150	0,626	2,999
2	50	150	0,273	29,953
3	35	90	0,334	25,313
4	35	210	0,642	1,793
5	50	90	0,407	19,757
6	50	150	0,231	33,188
7	50	210	0,283	29,174
8	50	150	0,657	0,618
9	65	210	0,466	15,255
10	65	90	0,270	30,197
11	65	150	0,562	7,898
12	35	150	0,654	0,862
13	50	150	0,661	0,359

Fuente: (Esta investigación).

Gráfico 6. Resultados actividad antioxidante de aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido con fluidos supercríticos.



Fuente: (Esta investigación).

7.2.2. Extracción por arrastre con vapor.

La extracción por arrastre con vapor se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Arango et al. (2012). El rendimiento del aceite esencial de manzanilla extraído por arrastre con vapor fue de 0,046 % p/p, un valor bajo comparado con el obtenido por Gawde et al., (2014) & González, (2004) que utilizaron la misma técnica y obtuvieron rendimientos de 0,31% y 0,34% respetivamente.

7.3. Análisis del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por diferentes técnicas de extracción verdes, mediante cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas (GC-MS).

Entre los compuestos identificados GC/MS se encontraron: limoneno, eucaliptol, anetol, p-cimeno, tetradecano, β -farneseno, 1,2 epóxido de limoneno, germacreno-D, α -farneseno, espatulenol, óxido de bisabolol, α -bisabolol, óxido de bisabolona, 7-metoxi-coumarina, óxido de bisabolol A, en-in-dicicloeter, en-in-dicicloeter isómero, ácido palmítico metil ester, ácido linoleico metil ester, fitol, pentatriacontano, linoleato de etilo, docosano, octasano y nonacosano. Estos compuestos presentaron diferentes porcentajes dependiendo del método de extracción. En general las fracciones más representativas están constituidas por dicicloeteres, sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados, que incluyen los compuestos de aceite esencial de manzanilla más característicos como el en-in-dicicloeter, β -farneseno y óxido de bisabolol A; el % relativo de área de estos se presentan en la tabla 17.

En la tabla 18 se encuentra el índice de retención lineal o índice de Kovast del aceite esencial de manzanilla extraído con SFE, AV, HD, MC y DES, este índice confirma la identidad del compuesto, es decir cuantifica los tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos en cromatografía de gases; con esto se identifican positivamente los componentes del aceite esencial de manzanilla.

Tabla 17. Composición del aceite esencial de manzanilla extraído con SFE, AV, HD, MC y DES.

MÉTODO	% RELATIVO DEL ÁREA		
	En-in-dicicloeter	β -farneseno	Óxido de bisabolol A
SFE	29,6	6,9	17,1
AV	15,93	30,2	22
HD	12,3	37,8	21,21
MC	47,6	6,1	24,15
DES	9,7	1,52	47,1

Fuente: (Esta investigación).

Tabla 18. Índice de retención lineal del aceite esencial de manzanilla extraído con SFE, AV, HD, MC y DES.

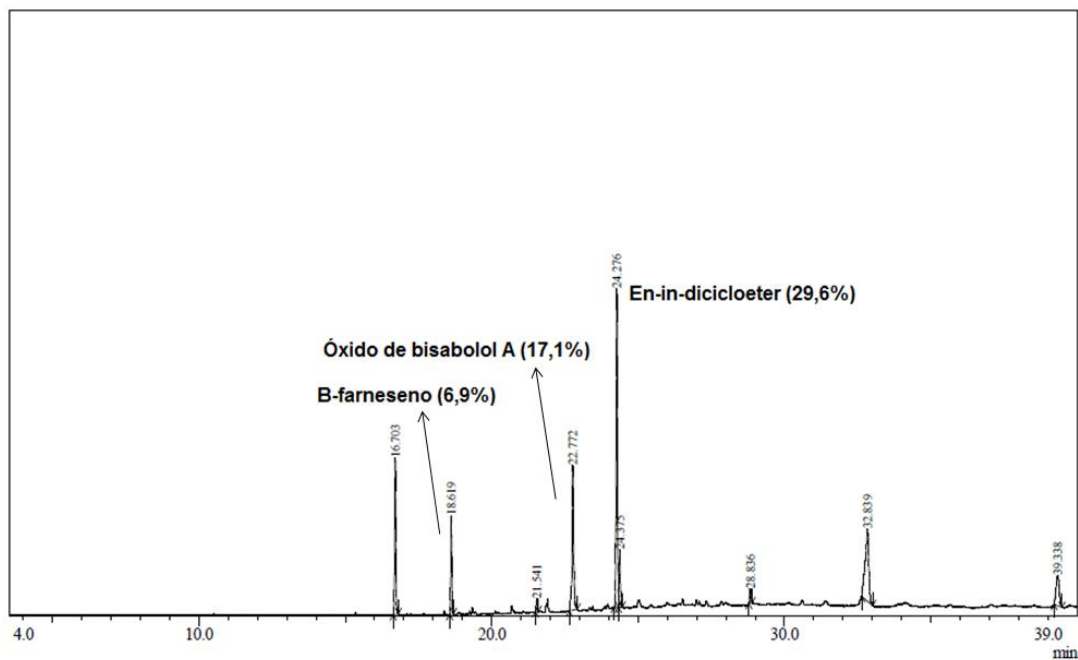
MÉTODO	INDICE DE RETENCIÓN LINEAL		
	En-in-dicicloeter	β -farneseno	Óxido de bisabolol A
SFE	1933,960	1465,468	1797,436
AV	1937,736	1468,345	1800,000
HD	1930,189	1464,748	1794,872
MC	1931,132	1463,309	1794,872
DES	1932,075	1464,029	1798,291

Fuente: (Esta investigación).

En la tabla 17 se puede ver claramente que los aceites caracterizados con una mayor cantidad de en-in-dicicloeter como los obtenidos por fluidos supercríticos y maceración, poseen una menor cantidad de óxido de bisabolol A; de lo cual podemos afirmar que estos compuestos tienen una relación inversamente proporcional.

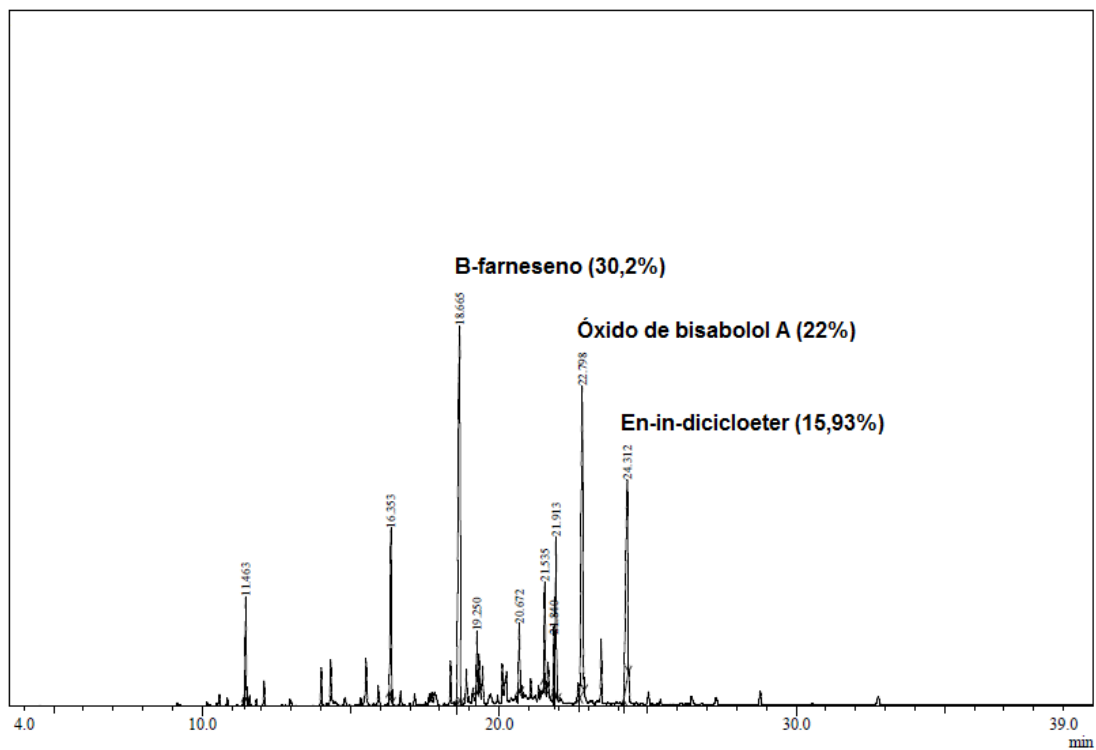
Los diferentes perfiles cromatográficos obtenidos de las muestras de aceite esencial de manzanilla extraído por diferentes métodos se muestran a continuación (Figura 13 – Figura 17).

Figura 13. Cromatograma muestra de aceite esencial de manzanilla obtenido con fluidos supercríticos a $T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $P = 210\text{ bar}$.



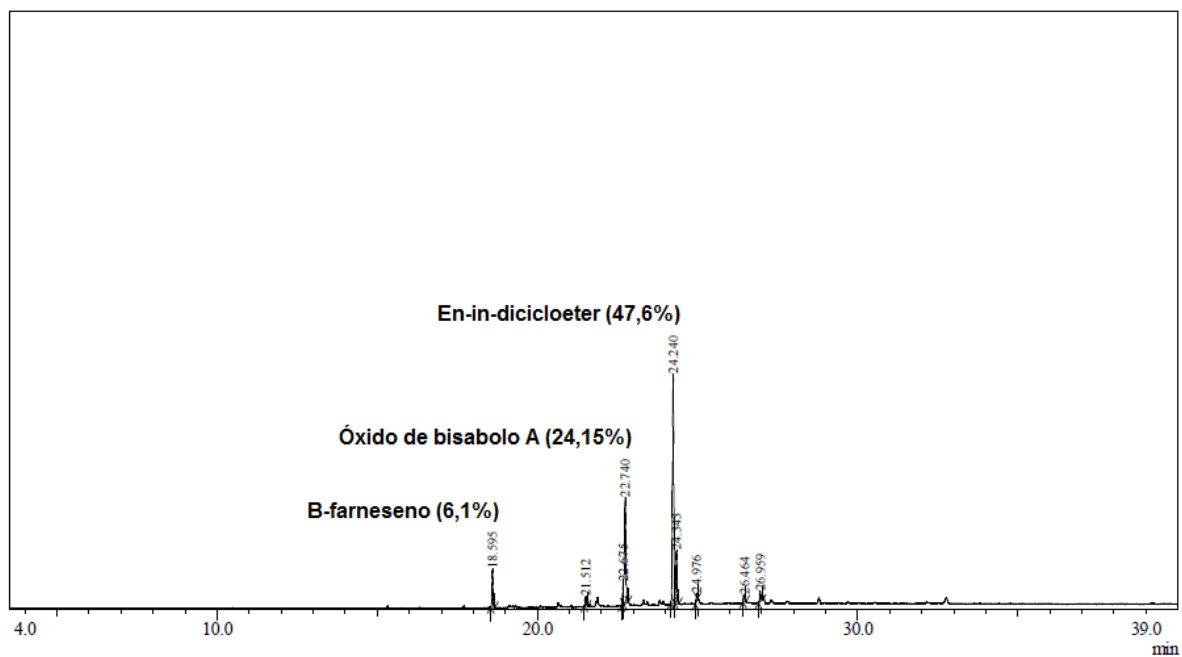
Fuente: (Esta investigación).

Figura 14. Cromatograma muestra de aceite esencial de manzanilla obtenido con arrastre con vapor (AV).



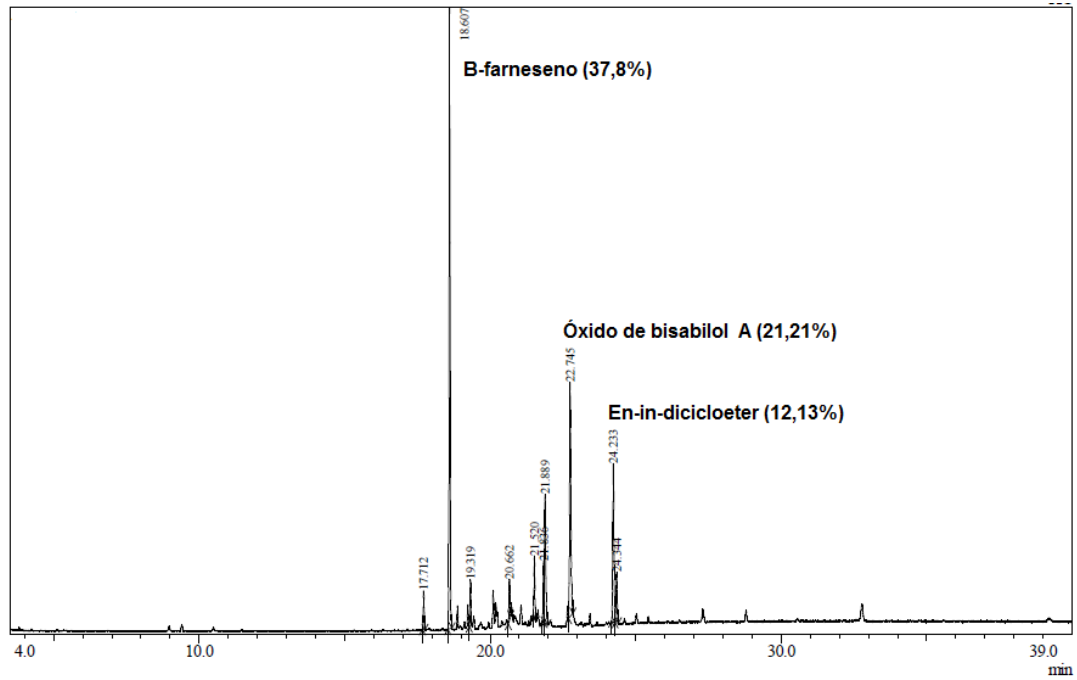
Fuente: (Esta investigación).

Figura 15. Cromatograma muestra de aceite esencial de manzanilla obtenido con maceración (MC).



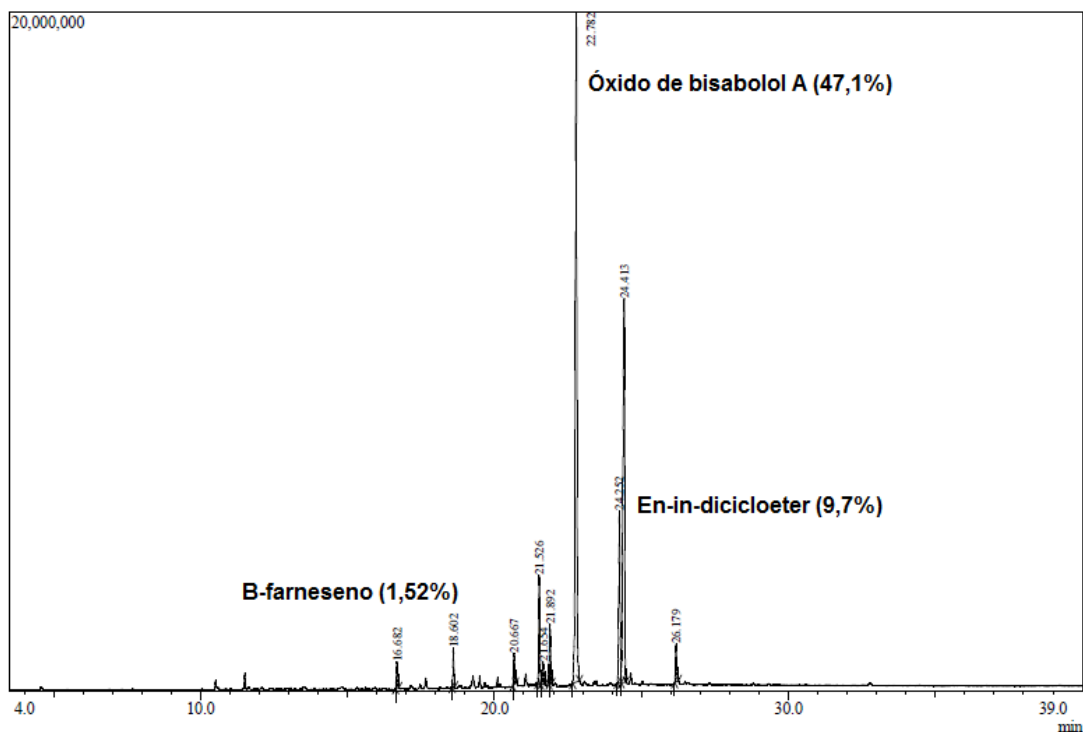
Fuente: (Esta investigación).

Figura 16. Cromatograma muestra de aceite esencial de manzanilla obtenido con hidrodestilación (HD).



Fuente: (Esta investigación).

Figura 17. Cromatograma muestra de aceite esencial de manzanilla obtenido con destilación extracción simultanea (DES).



Fuente: (Esta investigación).

Los resultados de los análisis de GC-MS indican que el porcentaje relativo de área de los componentes mayoritarios del aceite de manzanilla varía dependiendo del método de extracción.

7.3.1. Análisis de compuestos mayoritarios.

A continuación se muestra el análisis de los tres compuestos mayoritarios para esta investigación con relación a los cinco métodos de extracción estudiados:

7.3.1.1. En-in-dicicloeter.

En la tabla 19 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para en-in-dicicloeter, en la cual se observa que si hay diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) para este compuesto, entre los métodos de extracción evaluados.

El aceite extraído por maceración tiene la mayor cantidad de en-in-dicicloeter sobre los otros métodos, como se puede observar en el gráfico de medias (Gráfico 8). Esto coincide con el estudio realizado por Formisano *et al.* (2015), quienes extrajeron aceite esencial de manzanilla empleando el método de maceración y obtuvieron como componente mayoritario en-in-dicicloeter.

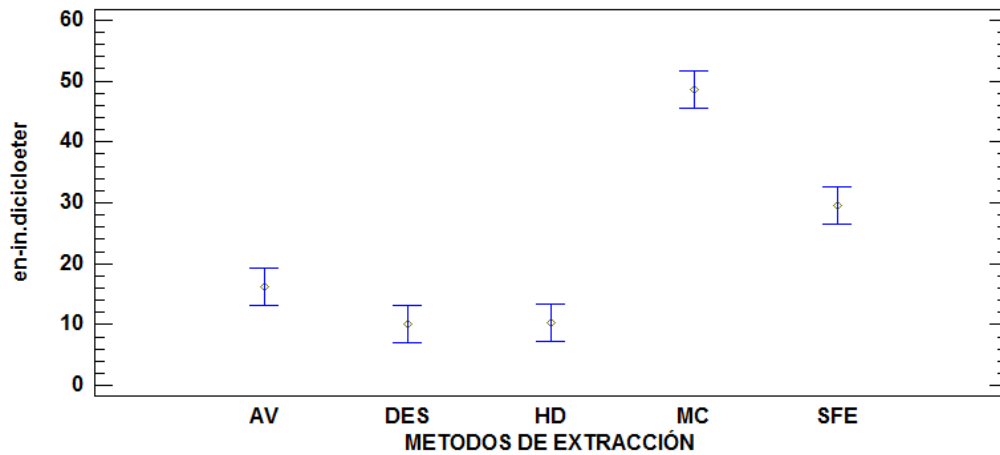
La extracción con SFE tiene un valor significativo para este compuesto (Gráfico 8) en comparación a HD, AV Y DES, esto concuerda con la investigación realizada por Rahimi *et al.* (2011), donde obtuvieron como compuesto mayoritario en-in-dicicloeter al extraer aceite esencial de manzanilla por SFE.

Tabla 19. Valor P en análisis de varianza para en-in-dicicloeter presente en aceite esencial de manzanilla.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3200,93	4	800,231	156,85	0,000
Intra grupos	51,0191	10	5,10191		
Total (corr.)	3251,94	14			

Fuente: (Esta investigación).

Gráfico 7. Gráfica de medias y 95% de Tukey HSD, para en-in-dicicloeter presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).



Fuente: (Esta investigación).

Tabla 20. Prueba de múltiples rangos para en-in-dicicloeter presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).

Nivel	Casos	Media	Grupos homogéneos
DES	3	10,0333	X
HD	3	10,4	X
AV	3	16,1967	X
SFE	3	29,6	X
MC	3	48,5	X

Fuente: (Esta investigación).

7.3.1.2. β -farneseno

En la tabla 21 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para la composición en β -farneseno; se observa que hay diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) para este compuesto, entre los métodos de extracción estudiados.

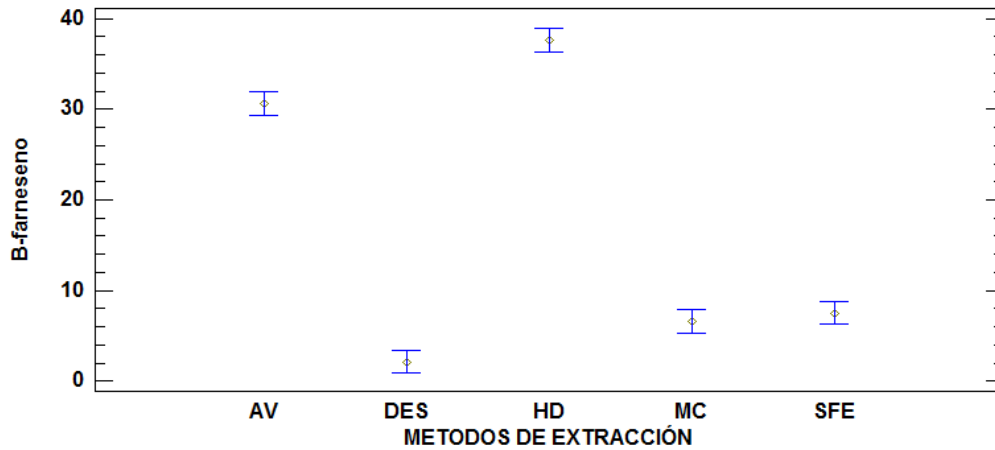
β -farneseno aparece con mayor porcentaje relativo de área en los métodos hidrodestilación y arrastre con vapor; también es el componente mayoritario para ambos métodos (Gráfico 9), debido a que ambos métodos emplean principios muy similares. Scalia *et al.* (1999) & Tolouee *et al.* (2010), extrajeron aceite esencial de manzanilla por arrastre con vapor e hidrodestilación respectivamente, donde β -farneseno es uno de sus compuestos mayoritarios; por otra parte Rahimi *et al.* (2011), reportaron un contenido mínimo de β -farneseno para la extracción con fluidos supercríticos; todos estos valores son similares a los obtenidos en la presente investigación.

Tabla 21. Valor P en análisis de varianza para β -farneseno presente en aceite esencial de manzanilla.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3089,25	4	772,312	380,11	0,000
Intra grupos	20,3182	10	2,03182		
Total (corr.)	3109,57	14			

Fuente: (Esta investigación).

Gráfico 8. Gráfica de medias y 95% de Tukey HSD, para β -farneseno presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).



Fuente: (Esta investigación).

Tabla 22. Prueba de múltiples rangos para β -farneseno presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).

Nivel	Casos	Media	Grupos homogéneos
DES	3	2,13667	X
MC	3	6,6	X
SFE	3	7,53333	X
AV	3	30,63	X
HD	3	37,6233	X

Fuente: (Esta investigación).

7.3.1.3. Óxido de bisabolol A.

En la tabla 23 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para la composición en óxido de bisabolol A, donde se observa que hay diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) para este compuesto, entre los métodos de extracción estudiados.

En el gráfico de medias (Gráfico 10) y en la prueba de múltiples rangos (Tabla 24), se evidencian tres grupos diferentes entre sí: DES, SFE y el último conformado por AV, HD y MC, donde DES y SFE son los métodos con mayor y menor porcentaje relativo de área respectivamente para óxido de bisabolol A.

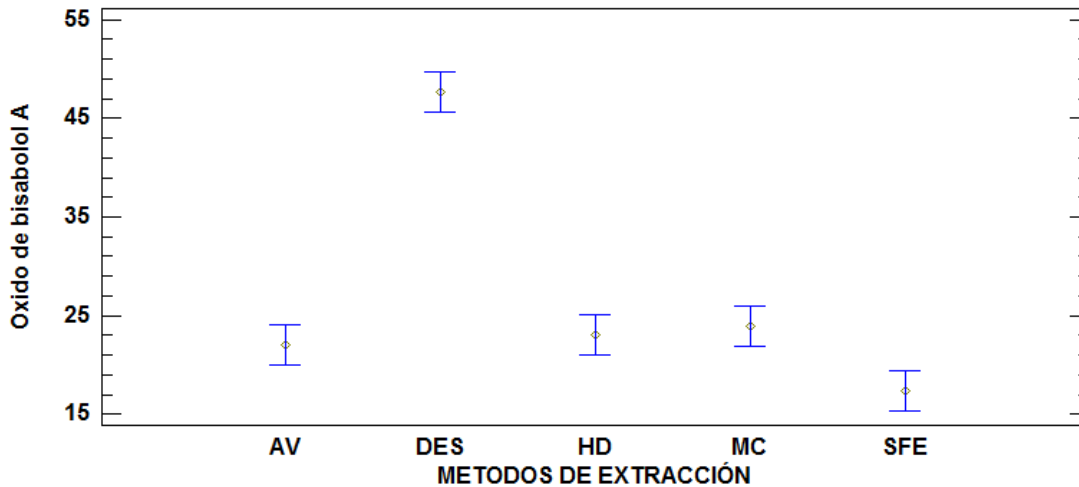
Investigaciones como Cano, (2002); Gawde *et al.* (2014) & Scalia *et al.* (1999), reportan altos contenidos de óxido de bisabolol A para aceite esencial de manzanilla obtenido por arrastre con vapor, valores diferentes a los obtenidos en la presente investigación.

Tabla 23. Valor P en análisis de varianza para óxido de bisabolol A presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1711,84	4	427,959	83,6	0,000
Intra grupos	51,1906	10	5,11906		
Total (corr.)	1763,03	14			

Fuente: (Esta investigación).

Gráfico 9. Gráfica de medias y 95% de Tukey HSD, para óxido de bisabolol A presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).



Fuente: (Esta investigación).

Tabla 24. Prueba de múltiples rangos para óxido de bisabolol A presente en aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).

Nivel	Casos	Media	Grupos homogéneos
SFE	3	17,3667	X
AV	3	22,0333	X
HD	3	23,0467	X
MC	3	23,97	X
DES	3	47,7	X

Fuente: (Esta investigación).

7.4. Evaluación de la actividad antioxidante.

A continuación se presentan los resultados de actividad antioxidante para el aceite esencial de manzanilla obtenido por diferentes métodos (Tabla 25). La mayor actividad antioxidante obtenida por el método ABTS se observa en el aceite de manzanilla extraído por arrastre con vapor 27,556 μM de trolox / mL de aceite; este aceite era de color azul; Formisano et al. (2015) aseguran que el color azul en el aceite se debe a la presencia de chamazuleno, un compuesto que brinda una alta actividad antioxidante ya que inhibe la peroxidación de lípidos. Este compuesto no apareció en el cromatograma pero puede estar presente en mayor concentración en el aceite esencial obtenido por arrastre con vapor, que en el aceite extraído por los otros métodos.

La formación de chamazuleno se puede minimizar con el uso de CO_2 supercrítico, por esta razón el aceite obtenido por este método presenta una actividad antioxidante más baja que la de arrastre con vapor. También los extractos obtenidos por hidrodestilación y destilación extracción simultánea presentan una actividad antioxidante baja, esto puede deberse a que ambos fueron recuperados con diclorometano debido a su bajo rendimiento.

Tabla 25. Actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla extraído con SFE (fluidos supercríticos), AV (arrastre con vapor), HD (hidrodestilación), MC (maceración) y DES (destilación extracción simultánea), analizados por ABTS•+.

MÉTODOS	PROMEDIO	TEAC
		μM de Trolox/mL de aceite
SFE	0,466	15,255
MC	0,356	23,619
HD	0,485	13,805
DES	0,413	19,238
AV	0,304	27,556

Fuente: (Esta investigación).

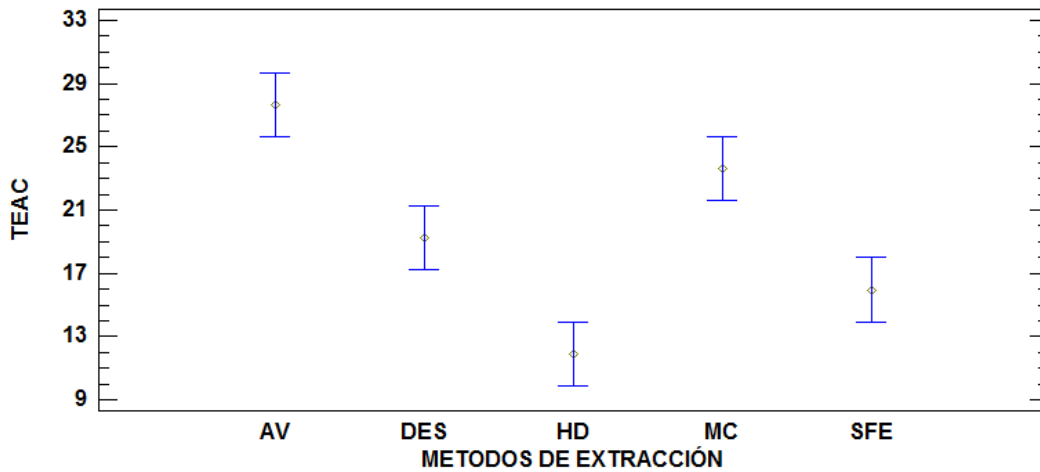
Existen diferencias estadísticamente significativas para la actividad antioxidante entre los diferentes métodos de extracción utilizados. Esto se puede observar en el análisis de varianza (ANOVA) donde el $P - \text{Valor} \leq 0,05$ (Tabla 26), simultáneamente se analizaron la gráfica de medias y 95% de Tukey HSD (Gráfico 11) y la prueba de múltiples rangos (Tabla 27), donde se verifica que todos los métodos son diferentes entre sí, y que arrastre con vapor es el método con mayor actividad antioxidante.

Tabla 26. Valor P en análisis de varianza para la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	457,172	4	114,293	50,76	0,0000
Intra grupos	22,516	10	2,2516		
Total (corr.)	479,688	14			

Fuente: (Esta investigación).

Gráfico 10. Gráfica de medias y 95% de Tukey HSD, para la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).



Fuente: (Esta investigación).

Tabla 27. Prueba de múltiples rangos para la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla extraído por AV (arrastre con vapor), DES (destilación extracción simultánea), HD (hidrodestilación), MC (maceración), SFE (fluidos supercríticos).

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
HD	3	11,943	X
SFE	3	15,969	X
DES	3	19,238	X
MC	3	23,585	X
AV	3	27,637	X

Fuente: (Esta investigación).

Los resultados de actividad antioxidante para el aceite esencial de manzanilla obtenido en esta investigación son: 27,556 μM de Trolox/mL para arrastre con vapor, 23,619 para maceración, 19,238 para destilación extracción simultánea, 15,255 para fluidos supercríticos y 13,805 para hidrodestilación; son mayores a los reportados por Formisano et al. (2015) & Kolodziejczyk et al. (2015), de 8,45 y 12,003 μM de Trolox/mL de aceite esencial de manzanilla respectivamente.

Sin embargo, la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla obtenido por SFE a condiciones de $T=50^{\circ}\text{C}$ y $P=150$ bar presenta la actividad antioxidante más alta de esta investigación (Tabla 16) con un valor de 33,188 μM de Trolox/mL de aceite esencial de manzanilla, este valor no es comparado con los otros métodos debido a que no es el punto óptimo encontrado para la extracción con fluidos supercríticos.

Comparando la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla con otros aceites esenciales, resulto bueno, ya que es mayor que el de especies como estragón morado (3,68 μMol de Trolox/g de extracto) , anís (5,6 μMol de Trolox/g de extracto), albahaca (5,1 μMol de Trolox/g de extracto), estragón (0,00023 μMol de Trolox/g de extracto), hinojo (0,00015 μMol de Trolox/g de extracto) (Muñoz, Kouznetsov, & Stashenko, 2009) y cilantro (0,6585 μMol de Trolox/g de extracto) (Ceballos & Giraldo, 2011). Sin embargo Muñoz et al. (2007), encontraron que la actividad antioxidante del orégano (2040 μmol de Trolox/ g de extracto) y del tomillo (890 μmol de Trolox/ g de extracto) son superiores a las obtenidas en la presente investigación, de igual manera Granados, Santafé, & Acevedo (2015) & Granados, Yáñez, & Santafé (2012) reportaron valores superiores para eucalipto (38,96 μmol de Trolox/ g de extracto) y muña (631,72 μmol de Trolox/ g de extracto).

Conclusiones

- Las condiciones óptimas para la extracción de aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) empleando la tecnología de fluidos supercríticos son: 65 °C y 210 bar de presión, con las cuales se obtuvo un rendimiento de (0,871%) en un tiempo de extracción de 150 minutos.
- Los resultados experimentales muestran que para el aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por SFE la temperatura es la única variable que incide en el rendimiento, es decir que el rendimiento de la extracción es directamente proporcional a la temperatura.
- Teniendo en cuenta los porcentajes relativos de área y la presencia de en-in-dicicloeter, β -farneseno y óxido de bisabolol A en todas las muestras de esta investigación, se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en la composición del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) dependiendo del método de extracción.
- El aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor, fue el que mayor actividad antioxidante presentó (27,556 μ Mol de Trolox/mL de aceite), superior a los valores obtenidos en fluidos supercríticos (15,225 μ Mol de Trolox/mL de aceite), maceración (23,619 μ Mol de Trolox/mL de aceite), hidrodestilación (13,805 μ Mol de Trolox/mL de aceite) y destilación extracción simultánea (19,238 μ Mol de Trolox/mL de aceite).
- La actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) obtenido a 65°C y 210 bar (punto óptimo de extracción con fluidos supercríticos (SFE)) no fue el valor esperado ya que es inferior al obtenido por AV (arrastre con

vapor), MC (maceración) e HD (hidrodestilación). Sin embargo a 50°C y 150 bar la actividad antioxidante (33,188 μ M de Trolox/mL de aceite esencial de manzanilla) es superior a la obtenida por los otros métodos.

- El aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) posee actividad antioxidante, incluso superior a otras especies aromáticas como el estragón, el estragón morado, el anís, la albahaca, el hinojo y el cilantro.

Recomendaciones

- Los resultados de la investigación muestran que el aceite esencial de manzanilla representa un gran interés para la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. Por lo tanto es necesario seguir realizando estudios relacionados con las actividades biológicas de este aceite en diferentes formulaciones.
- Realizar una mayor investigación en base a la actividad antioxidante de la *Matricaria chamomilla* L. sobre las técnicas de extracción verdes no contempladas en esta investigación como: extracción asistida por microondas (MAE), ultrasonido (EAU) y líquido presurizado (PLE), con el fin de ampliar la información sobre el tema.
- Para la extracción con fluidos supercríticos, podrían ser estudiados otros niveles de presión y temperatura, para analizar el nivel de incidencia de la presión sobre el rendimiento y las diferentes propiedades del aceite.
- En la literatura se reporta que el aceite esencial de manzanilla cuenta con un alto poder antimicrobiano, se recomienda realizar investigaciones sobre la especie *Matricaria chamomilla* L. con el fin de buscar aplicaciones que sean efectivas sobre algunos microorganismos, una buena alternativa, principalmente para la industria alimentaria.

Referencias

- Alarcon, J. jairo. (2011). Plantas aromáticas y medicinales Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos. *Instituto Colombiano de Agricultura (ICA)*, 48, 15-18.
- Almeida, W., & Goncalves, P. (2016). Euterpe oleracea , Matricaria chamomilla , and Camellia sinensis as promising ingredients for development of skin care formulations. *Industrial Crops and Products*, 83, 1–10.
- Angiolillo, L., Nobile, M. A. Del, & Conte, A. (2015). The extraction of bioactive compounds from food residues using microwaves. *Current Opinion in Food Science*, 5, 93–98.
- Arango, O., Pantoja, D., Santacruz, L., & Hurtado, A. (2012). Actividad Antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H . B . K) del Alto Patia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 79–86.
- Aruoma, O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods, 524, 9–20.
- Asif, M., Nawaz, H., Naz, S., Mukhtar, R., Rashid, N., Ahmad, I., & Saleem, M. (2017). Raman spectroscopy for the characterization of different fractions of hemp essential oil extracted at 130 °C using steam distillation method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 182, 168–174.
- Avula, B., Wang, Y. H., Wang, M., Avonto, C., Zhao, J., Smillie, T. J., ... Khan, I. A. (2014). Quantitative determination of phenolic compounds by UHPLC-UV-MS and

- use of partial least-square discriminant analysis to differentiate chemo-types of Chamomile/Chrysanthemum flower heads. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88, 278–288.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
- Bonilla, R., Samanca, H., & Perdómo, J. (2008). Caracterización y evaluación de la cadena de plantas aromáticas, medicinales, condimentarias, aceites esenciales y afines en Colombia. *Universidad Nacional de Colombia*, 83, 13-18.
- Cano, T. M. (2002). Obtención y caracterización de aceite esencial de 4 plantas medicinales cultivadas a diferentes niveles altitudinales de Guatemala.
- Castro, D., Diaz, J., & Serna, R. (2013). Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales. *Universidad Católica de Oriente, Antioquia, Colombia*, 94, 18-19.
- Cavero, S. (2007). Obtención de extractos de plantas aromáticas mediante fluidos subcríticos y supercríticos. Caracterización Química y Funcional. *Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias*. 269.
- Ceballos, A., & Giraldo, G. (2011). El cilantro (*Coriandrum sativum* L.) como fuente potencial de antioxidantes naturales. *Vector*, 6, 85–93.
- Conde, L. A., Espinosa, J. R., Trejo, A., & Guerrero, J. (2017). CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Food Engineering*, 200, 81–86.

- Cosco Robles, D. A. (2010). Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* manzanilla.
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Food Science and Food Safety, 11*, 148–173.
- Cravotto, G., Bicchi, C., Mantegna, S., Binello, A., Tomao, V., & Chemat, F. (2011). Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters Extraction of kiwi seed oil : Soxhlet versus four different non-conventional techniques. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 25*, 974–981.
- Cujic, N., Šavikin, K., Jankovic, T., Pljevljakušić, D., Zdunic, G., & Ibric, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry, 194*, 135–142.
- El Tiempo. (14 de Junio 2017). El 63% de la coca está solo en tres departamentos del país. p-1.
- Formisano, C., Delfino, S., Oliviero, F., Tenore, G. C., Rigano, D., & Senatore, F. (2015). Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy). *Industrial Crops and Products, 63*, 256–263.
- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., & Reglero, G. (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction.

Journal of Chromatography A, 1250, 34–48.

- Galo, C. (2009). Optimización del proceso de secado de la Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y del Toronjil (*Melissa officinalis*) con la union de comunidades indígenas y campesinas de Juan Montalvo (UCICJUM). *Escuela Politecnica Nacional. Facultad de ingeniería Química y Agroindustrial*. 201.
- Garzón, L. P. (2016). Conocimiento tradicional sobre las plantas medicinales de yarumo (*Cecropia sciadophylla*), carambolo (*Averrhoa carambola*) y uña de gato (*Uncaria tomentosa*) en el resguardo indígena de Macedonia, Amazonas. *Luna Azul*, 43(43), 386–414.
- Gawde, A., Cantrell, C. L., Zheljazkov, V. D., Astatkie, T., & Schlegel, V. (2014). Steam distillation extraction kinetics regression models to predict essential oil yield, composition, and bioactivity of chamomile oil. *Industrial Crops & Products*, 58, 61–67.
- Giraldo, S., Bernal, M., Morales, A., Pardo, A., & Gamba, L. (2015). Descripción del uso tradicional de plantas medicinales en mercados populares de Bogotá, D.C. *Traditional Nova*, 13(23), 73–80.
- Göger, G., Demirci, B., Ilg, S., & Demirci, F. (2018). Antimicrobial and toxicity profiles evaluation of the Chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil combination with standard antimicrobial agents. *Industrial Crops & Products*, 120, 279–285.
- González, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del

amazonas. *Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales*, 100, 33-55

Granados, C., Santafé, G., & Acevedo, D. (2015). Chemical composition and evaluation of antioxidant activity of leaf essential oil *Eucalyptus camaldulensis* from Norte de Santander (Colombia). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 235–240.

Granados, C., Yáñez, X., & Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 12–23.

Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*, 16, 19–54.

Heleno, S. A., Diz, P., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A., Filomena, M., & Ferreira, I., (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L . by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, 197, 1054–1063.

Hurtado, A. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales de frutas para la obtención de aceites con potencialidad en la industria cosmética, utilizando la tecnología de extracción con fluidos supercríticos.

Hurtado, A., Dorado, D., & Sánchez, A. D. P. (2016). Study of the fatty acid profile and the aroma composition of oil obtained from roasted Colombian coffee beans by supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 113, 44–52.

Hurtado, A., Señoráns, F., Ibáñez, E., & Reglero, G. (2004). Countercurrent packed column

supercritical CO₂ extraction of olive oil. Mass transfer evaluation. *Journal of Supercritical Fluids*, 28(1), 29–35.

Jacotet-Navarro, M., Rombaut, N., Deslis, S., Fabiano-Tixier, A.-S., Pierre, F.-X., Bily, A., & Chemat, F. (2016). Towards a “dry” bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. *Green Chemistry*, 18(10), 3106–3115.

Jiménez, J., & Villarreal, J. (2008). *Estudio Químico de Pigmentos Tipo Antocianina Presentes en el Fruto del Motilon (Hyeronima macrocarpa)*. Universidad de Nariño, Colombia, 104, 26-48.

Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015). Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*, 11(8), 982–991.

Kolodziejczyk, J., Bijak, M., Saluk, J., Ponczek, M. B., Zbikowska, H. M., Nowak, P., ... Pawlaczyk, I. (2015). Radical scavenging and antioxidant effects of *Matricaria chamomilla* polyphenolic-polysaccharide conjugates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1152–1158.

Kotnik, P., Skerget, M., & Knez, Z. (2007). Supercritical fluid extraction of chamomile flower heads: Comparison with conventional extraction, kinetics and scale-up. *Journal of Supercritical Fluids*, 43(2), 192–198.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos 1. *Ciencia y Tecnología*

Alimentaria, 24(4), 691–693.

Lenardão, E. J., Freitag, R. A., Dabdoub, M. J., Batista, C. F., & Silveria, C. da cruz.

(2003). “Green Chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quima Nova*, 26(1), 123–129.

Li, Y., Fabiano, A. S., Vian, M. A., & Chemat, F. (2013). Solvent-free microwave

extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical. *Trends In Analytical Chemistry*, 47, 1–11.

Londoño, J. A. (2010). Aprovechamiento de residuos de la agroindustria de cítricos :

extracción y caracterización de flavonoides. *Corporación Universitaria Lasallista*, 21, 395–416.

Machado, A., Pasquel, J. L., Fernández, G., & Martínez, J. (2014). Pressurized liquid

extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues : a comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675–683.

Mahecha, C. (2010). Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales extraídos

de hojas y frutos de *Siparuna sessiliflora*. *Pontifica Universidad Javeriana*.

Mamidipally, P. K., & Liu, S. X. (2004). First approach on rice bran oil extraction using

limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 122–125.

Martinez, A., & Torres, L. (2011). Produccion y comercializacion de hierbas aromaticas y

especies en el municipio de santa rosa de viterbo. 23.

Morales, M. T., Aparicio, R., & Gutiérrez, F. (1992). Técnicas de aislamiento y

concentración de volátiles de aceites vegetales. *Grasas y Aceites*, 43(3), 164-173.

Morillo, Osmar, Fernández, Solymar, Hernández, Helis, Castillo, Gilda, & Marquina, Germania. (2010). Optimización de los parámetros de extracción de aceite de palma africana utilizando CO₂ supercrítico. *Bioagro*; 22(2): 89-94.

Muñoz, A., Castañeda, M., Blanco, K., Cardenas, C., Reyes, J., Kouznetsov, V., & Stashenko, E. (2007). Composición y actividad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*, 8(33), 125–128.

Muñoz, A., Kouznetsov, V., & Stashenko, E. (2009). Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol. *Salud UIS: Revista de La Universidad Industrial de Santafe*, 41, 287–294.

Núñez, H. (2013). Estudio del potencial bioactivo en partes no comestibles de planta de chile (*Capicum chinense*) asperjadas con peróxido de hidrógeno. *Universidad Autonoma de Queretaro, Mexico*, 20-48.

Páez Perilla, Á. V. (2013). Unidad 1. Generalidades de los aceites esenciales, *SENA, Colombia*, 12, 1–12.

Pantoja, A. L., Hurtado, A. M., & Martínez, H. A. (2017). Evaluación del Rendimiento, Composición y Actividad Antioxidante de Aceite de Semillas de Mora (*Rubus glaucus*) Extraído con CO₂ Supercrítico. *Informacion Tecnologica*, 28(1), 35–46.

Pantoja Chamorro, A. L. (2016). Extracción de aceites con fluidos supercríticos a partir de semillas de frutas con potencialidad en la industria cosmética Extracción de aceites

con fluidos supercríticos a partir de semillas de frutas con potencialidad en la industria cosmética. *Universidad Nacional de Colombia*.

Peredo, H., Palou, E., & López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 48, 12-18.

Povh, N. P., Marques, M. O., & Meireles, A. A. (2001). Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita*). *The Journal of Supercritical Fluids*, 21, 245–256.

Quintanar Escorza, M. A., & Calderón Salinas, V. J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28, 89–101.

Raal, A., Arak, E., Orav, A., & Ivask, K. (2003). Comparison of essential oil content of *Matricaria recutita* L. from different origins. *Ars Pharmaceutica*, 44(2), 159–165.

Raal, A., Orav, A., Püssa, T., Valner, C., Malmiste, B., & Arak, E. (2012). Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. *Food Chemistry*, 131(2), 632–638.

Rahimi, E., Prado, J. M., Zahedi, G., & Meireles, M. a. a. (2011). Chamomile extraction with supercritical carbon dioxide: Mathematical modeling and optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 56(1), 80–88.

Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2015). Effect of alternative physical pretreatments (pulsed electric field , high voltage electrical discharges and ultrasound) on the dead-end ultrafiltration of vine-shoot extracts. *Separation And Purification Technology*, 146, 243–251.

- Reverchon, E., Senatore, F. (1994). Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile edessential oil and its analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *Agricultural and Food Chemistry*, 42, 154–158.
- Robinson, K., y Robinson, J. (2001). Análisis instrumental. Madrid: Pearson Educación.
- Roby, M. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A., & Khalel, K. I. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, 44, 437–445.
- Rodríguez, C., Quirantes, R., Fernández, A., & Segura, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, 246–254.
- Rodríguez, E., Árias, A., Vásquez, E., Martínez, J., & Stashenko, E. (2012). Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava* obtenidos con CO₂ supercrítico. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 36(140), 305–316.
- Scalia, S., Giuffreda, L., & Pallado, P. (1999). Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21(3), 549–558.
- Skoog, D., Holler, F., y Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. (Sexta ed.). Cengage learning editores.
- Sena. (2011). Introduccion a La Industria De Los Aceites Esenciales De Plantas

Medicinales Y Aromaticas. *Sistema de Bibliotecas SENA*, 33.

Sena. (2013). Unidad 2. Métodos de extracción, análisis y control de calidad. *Sistema de Bibliotecas SENA*, 15.

Sharifzadeh, A., Jebeli, A., Shokri, H., Abbaszadeh, S., & Keykhosravy, K. (2016). Evaluation of antioxidant and antifungal properties of the traditional plants against foodborne fungal pathogens. *Journal de Mycologie Medicale*, 26(1), e11–e17.

Silva, R., Rocha, T., & Duarte, A. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40–51.

Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., & Srivastava, M. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 82.

Solouki, M., Mehdikhani, H., Zeinali, H., & Emamjomeh, A. A. (2008). Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 117(3), 281–287.

Soquetta, M. B., Terra, L. de M., & Bastos, C. P. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CYTA - Journal of Food*, 16(1), 400–412.

Stashenko, E. E. (2009). *Aceites Esenciales. División de Publicaciones UIS*.

Tiwari, B. K. (2015). Trends in Analytical Chemistry Ultrasound: A clean , green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109.

Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S. J., Jaimand, K., ... Razzaghi-

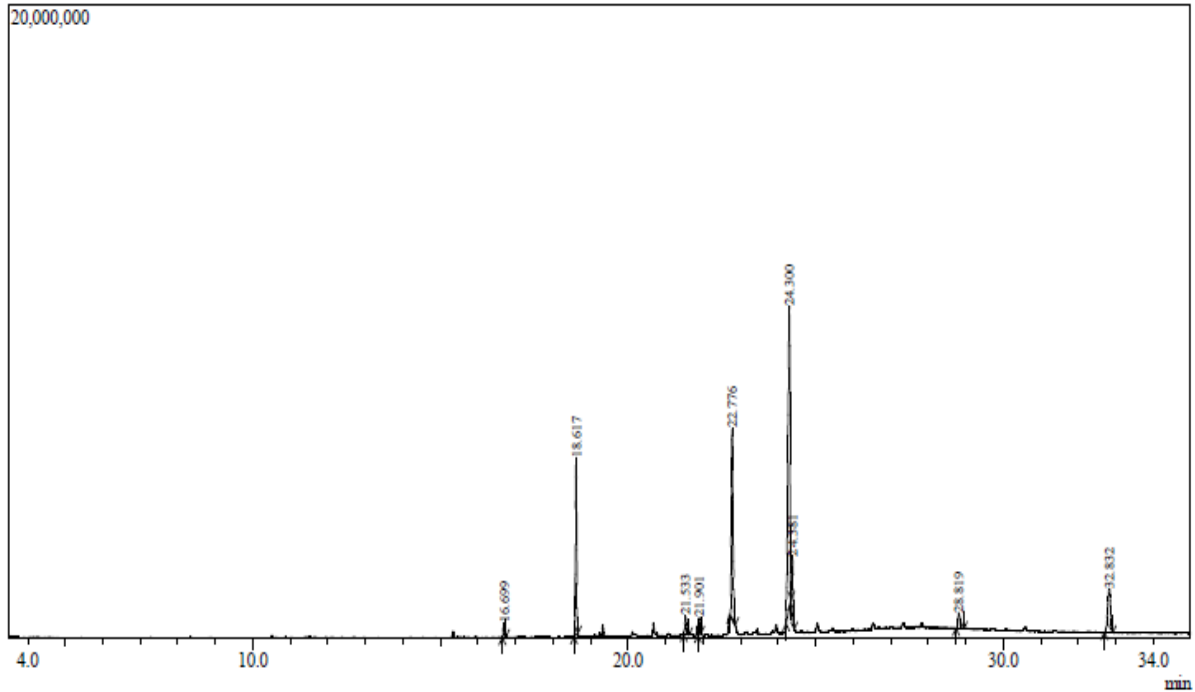
- Abyaneh, M. (2010). Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 127–133.
- Toro, N., & Suárez, L. (2012). Obtención y caracterización del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva isabella) y evaluación de su actividad antioxidante. *Universidad Tecnológica de Pereira*.
- Torres, J. (2010). Evaluación Del Uso De Plantas Aromáticas Y Medicinales, Y Sus Aplicaciones En Tradiciones Culinarias En La Localidad 20 Del Sumapaz. *Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D. C., Colombia*, 63, 16-24.
- Uden, A. Van, Abril, M., & Duarte, E. (2005). Curso Teórico-Práctico del Cultivo de la Sábila (*Aloe barbadensis* Miller) y Plantaciones alternativas (Lombricultura y Plantas aromáticas y medicinales). *Biologicos Brabante, Tolima, Colombia*, 125, 87.
- Upadhyay, R. K., Singh, V. R., & Tewari, S. K. (2016). New agro-technology to increase productivity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, 89, 10–13.
- Velasco, R., Villada, H., & Carrera, J. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Informacion Tecnologica*, 18(1), 53–66.
- Velasco, R., & Villada, Y. H. S. (2006). Modeling of Supercritical Fluids. *Biotecnología en el sector agropecuario y agrindustrial. Universidad Del Cauca*, (4), 9.
- Velasquez, A. M. (2008). La tecnología de fluidos supercríticos , un proceso limpio para el sector industrial. *Producción + Limpia*, 3(2), 98–104.

- Vieira, S., Reis, R. A. S., Garbuio, D. C., & Pedro de Freitas, L. A. (2017). Dynamic maceration of *Chamomilla recutita* (L.) Rauscher inflorescences: optimal conditions for flavonoids and antioxidant activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(1), 111–117.
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*, 4(5), 278–286.
- Xhaxhiu, K., Korpa, A., Mele, A., & Kota, T. (2013). Ultrasonic and Soxhlet Extraction Characteristics of the Orange Peel from “ Moro ” Cultivars Grown in Albania. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16, 421–428.

ANEXOS

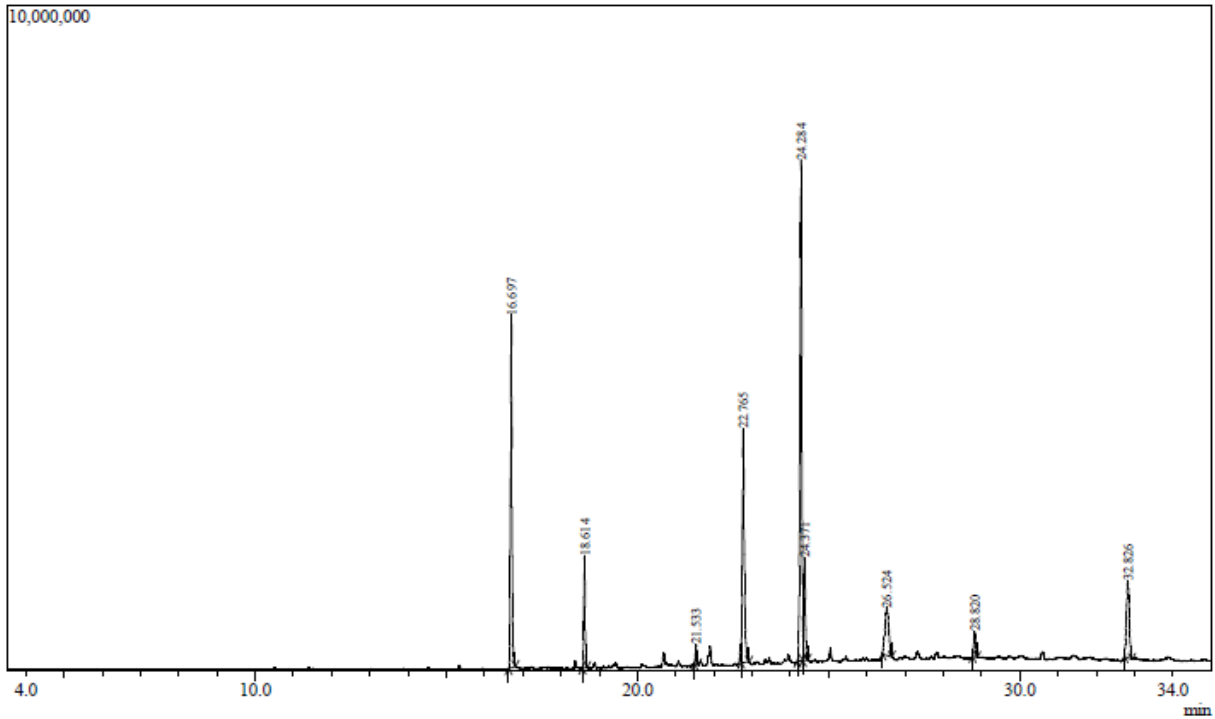
Anexo A: Cromatogramas de aceite esencial de manzanilla, extraídos con Fluidos Supercríticos.

Ensayo 1 (T= 50°C; P= 150 bar).



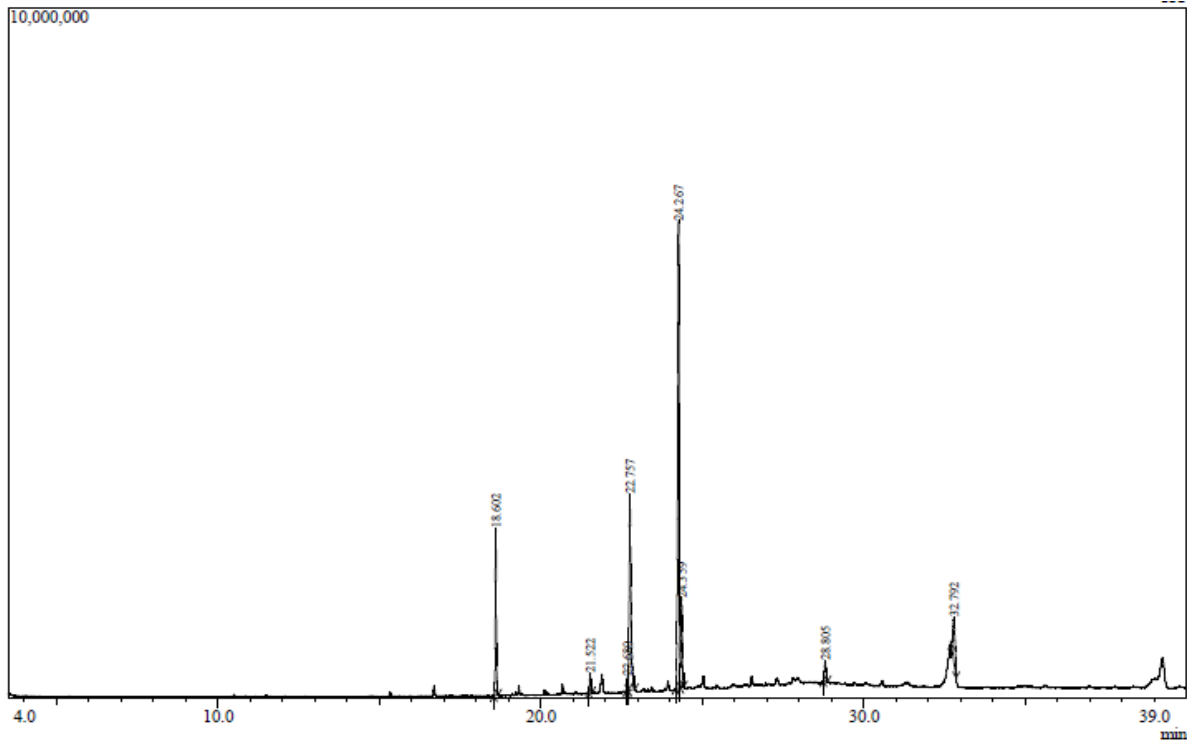
Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
16,7	1,4	p-cimeno	1329,63
18,62	15,15	β -farneseno	1465,468
21,53	1,7	Óxido de bisabolol	1691,87
21,9	1,75	Óxido de bisabolona	1715,385
22,77	21,9	Óxido de bisabolol A	1797,436
24,3	41,8	En-in-dicicloeter	1936,792
24,38	5,2	En-in-dicicloeter isómero	1944,34
28,82	2,2	Docosano	2307,558
32,83	8,9	Octacosano	2509,926

*IRL: Índice de retención lineal.

Ensayo 2 (T= 50°C; P= 150 bar).

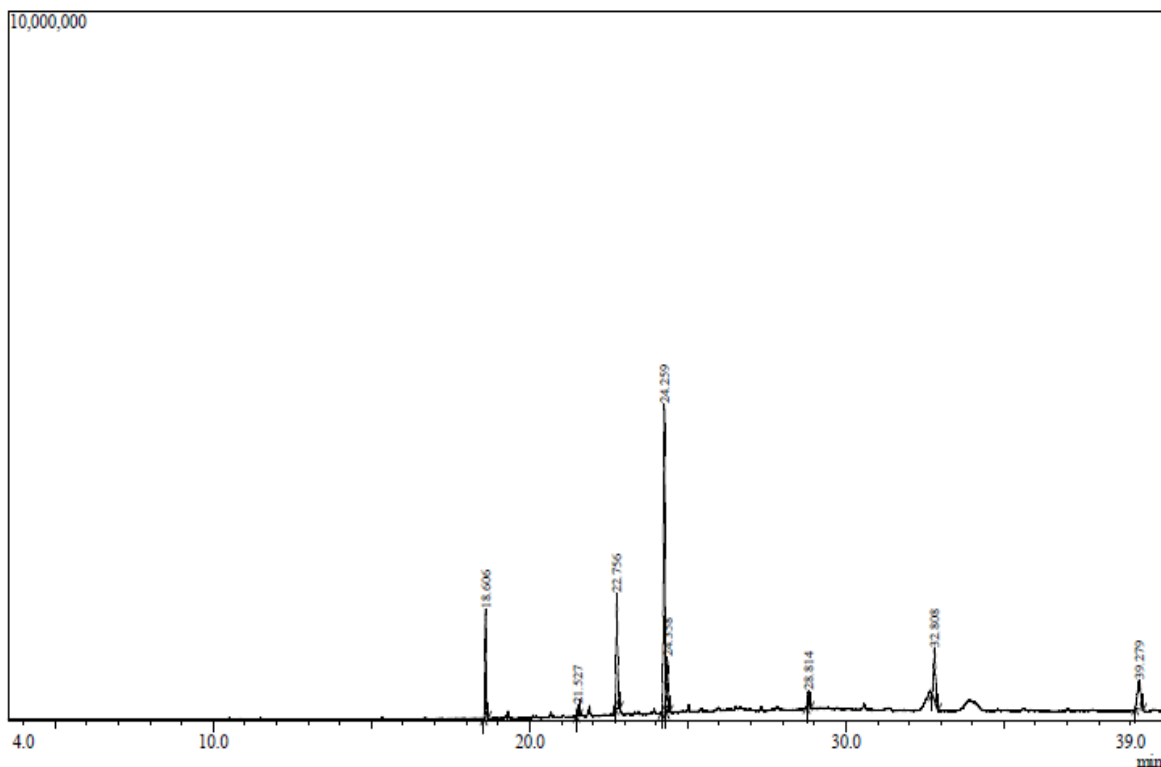
Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
16,7	20	p-cimeno	1329,63
18,61	5,1	β -farneseno	1464,748
21,53	1	Óxido de bisabolol	1691,87
22,76	16,8	Óxido de bisabolol A	1796,581
24,28	34,7	En-in-dicicloeter	1934,906
24,37	5,95	En-in-dicicloeter isómero	1943,396
26,52	6,8	Pentatriacontano	2138,525
28,82	1,7	Docosano	2307,558
32,82	8,1	Octacosano	2509,559

*IRL: Índice de retención lineal.

Ensayo 3 (T= 35°C; P= 90 bar).

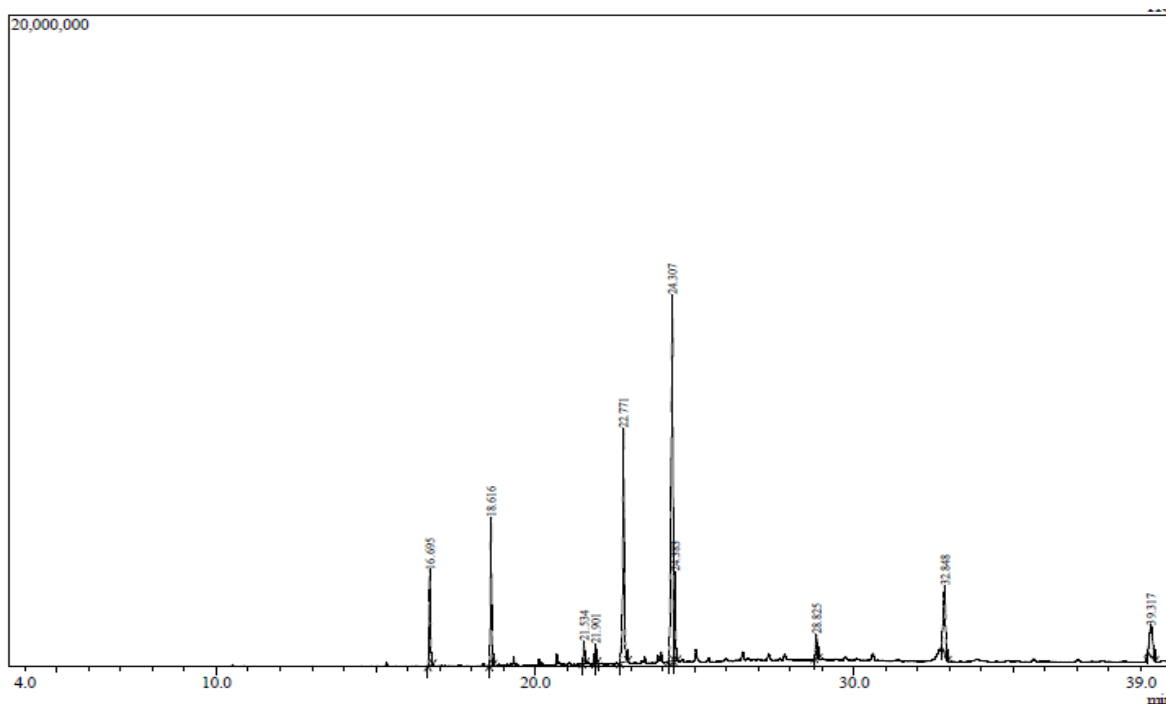
Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
18,6	11,4	β -farneseno	1464,029
21,52	1,5	Óxido de bisabolol	1691,057
22,68	1,4	7-metoxi-coumarina	1789,744
22,76	22,63	Óxido de bisabolol A	1796,581
24,27	47	En-in-dicicloeter	1933,962
24,35	7,9	En-in-dicicloeter isómero	1941,509
28,8	2,1	Docosano	2306,395
32,79	6,1	Octacosano	2508,456

*IRL: Índice de retención lineal.

Ensayo 4 (T= 35°C; P= 210 bar).

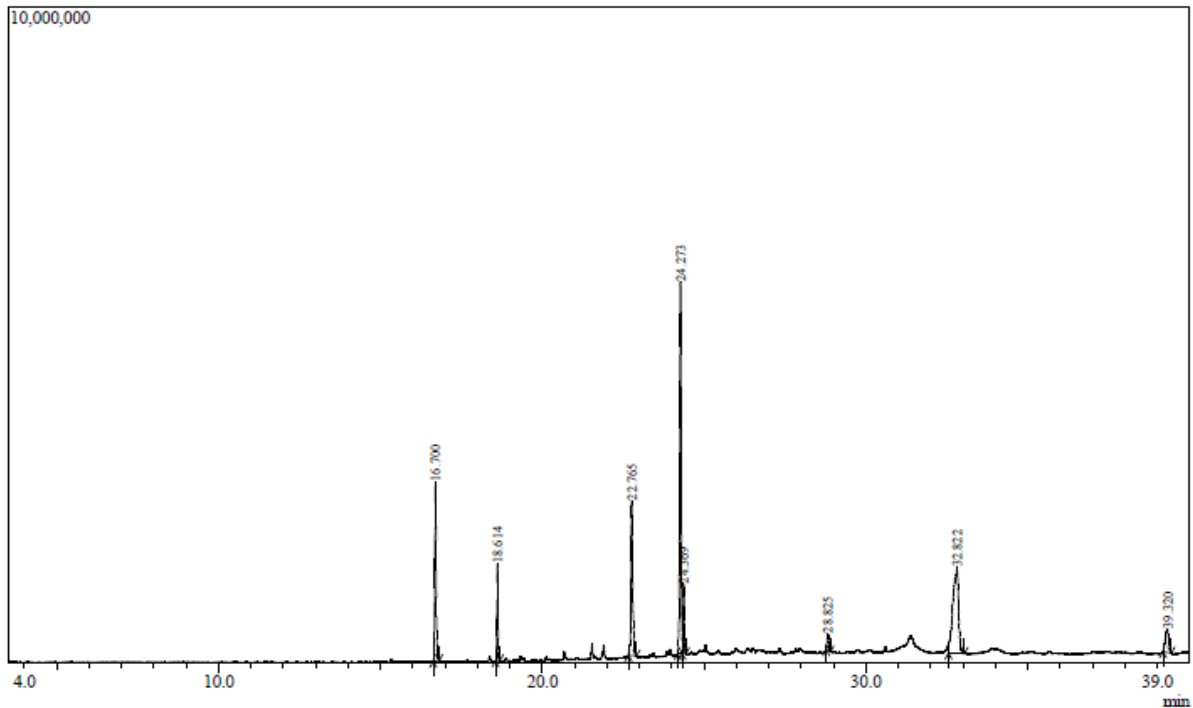
Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
18,61	10,6	β -farneseno	1464,748
21,52	1,2	Óxido de bisabolol	1691,057
22,75	17,1	Óxido de bisabolol A	1795,726
24,25	41,4	En-in-dicicloeter	1932,075
24,36	7,2	En-in-dicicloeter isómero	1942,453
28,81	2,5	Docosano	2306,977
32,81	10,85	Octacosano	2509,191
39,27	9,3	Nonacosano	2710,889

*IRL: Índice de retención lineal.

Ensayo 5 (T= 50°C; P= 90 bar).

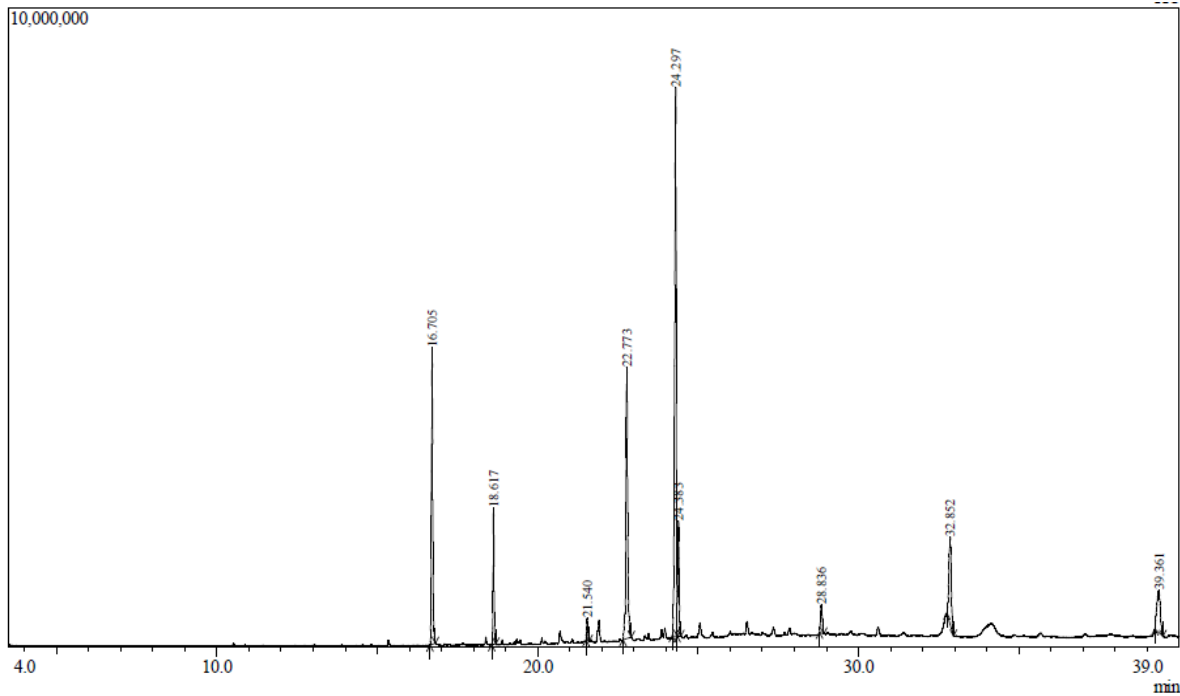
Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
16,7	6,75	p-cimeno	1329,63
18,62	8,7	β -farneseno	1465,468
21,53	1,4	Óxido de bisabolol	1691,87
21,9	1,2	Óxido de bisabolona	1723,077
22,7	20,5	Óxido de bisabolol A	1791,453
24,31	39,1	En-in-dicicloeter	1937,736
24,38	6,4	En-in-dicicloeter isómero	1944,34
28,82	2,1	Docosano	2307,558
32,85	8,6	Octacosano	2510,662
39,32	5,4	Nonacosano	2712

*IRL: Índice de retención lineal.

Ensayo 6 (T= 50°C; P= 150 bar).

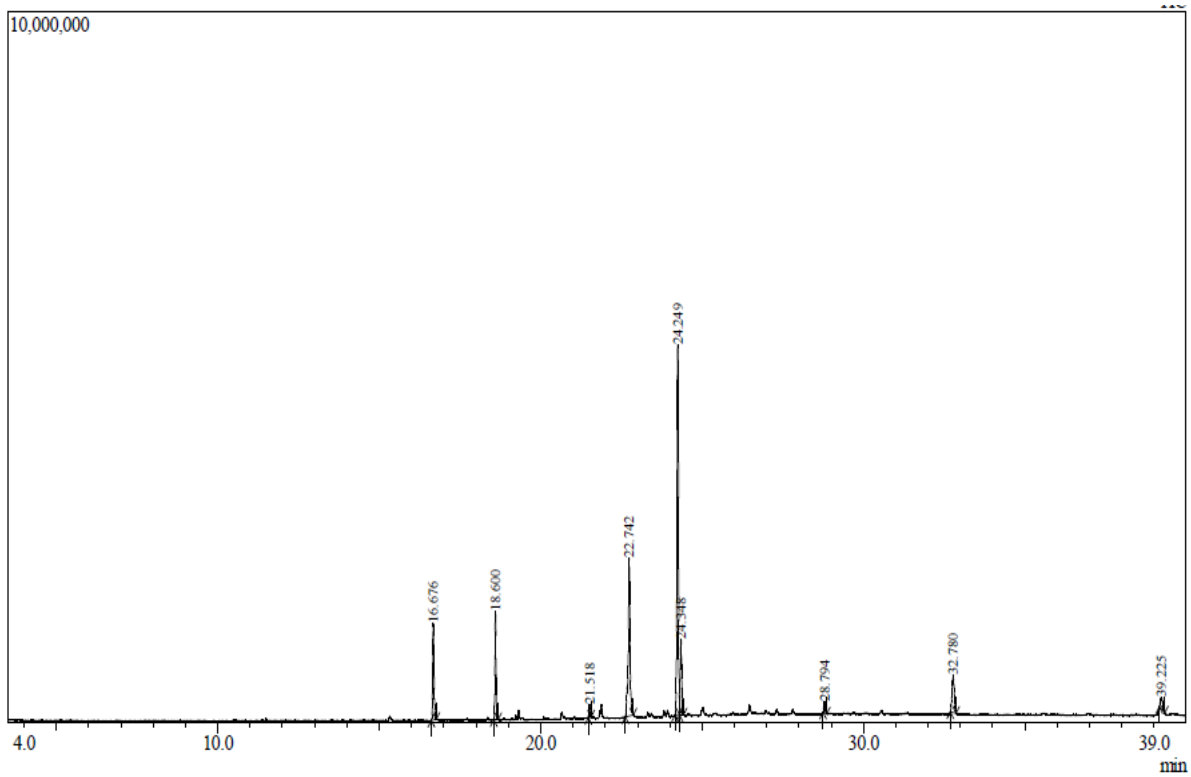
Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
16,7	12,8	p-cimeno	1329,63
18,61	5,6	β-farneseno	1464,748
22,76	14,4	Óxido de bisabolol A	1796,581
24,27	29,6	En-in-dicicloeter	1933,962
24,37	5,1	En-in-dicicloeter isómero	1943,396
28,82	1,5	Docosano	2307,558
32,82	26,3	Octacosano	2509,559
39,32	4,5	Nonacosano	2712

*IRL: Índice de retención lineal.

Ensayo 7 (T= 50°C; P= 210 bar).

Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL *
16,7	15,4	p-cimeno	1329,63
18,62	5,7	β -farneseno	1465,468
21,54	1	Óxido de bisabolol	1692,683
22,77	18,5	Óxido de bisabolol A	1797,436
24,3	36,8	En-in-dicicloeter	1936,792
24,38	6,35	En-in-dicicloeter isómero	1944,34
28,84	1,9	Docosano	2308,721
32,85	8,3	Octacosano	2510,662
39,36	6	Nonacosano	2709,057

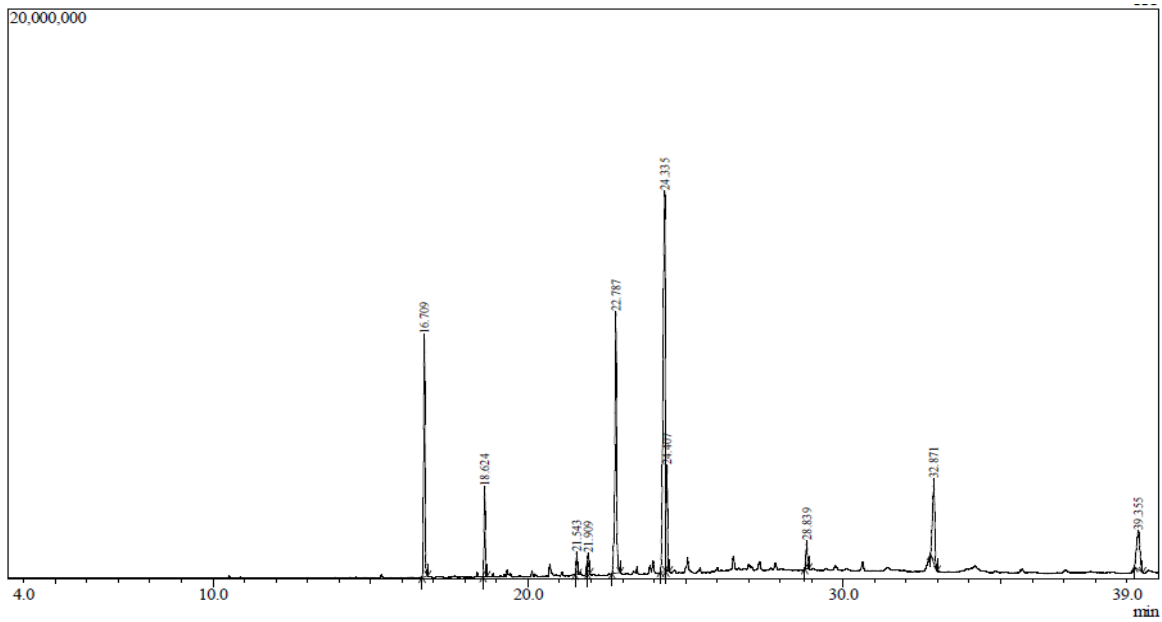
*IRL: Índice de retención lineal.

Ensayo 8 (T= 50°C; P= 150 bar), Curva de extracción.

Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
16,67	9,7	p-cimeno	1330,201
18,6	8,65	β -farneseno	1464,029
21,52	1,2	Óxido de bisabolol	1691,057
22,74	21,8	Óxido de bisabolol A	1794,872
24,25	41	En-in-dicicloeter	1932,075
24,35	7,6	En-in-dicicloeter isómero	1941,509
28,79	1,3	Docosano	2305,814
32,78	6,3	Octacosano	2508,088
39,22	2,3	Nonacosano	2809,381

*IRL: Índice de retención lineal.

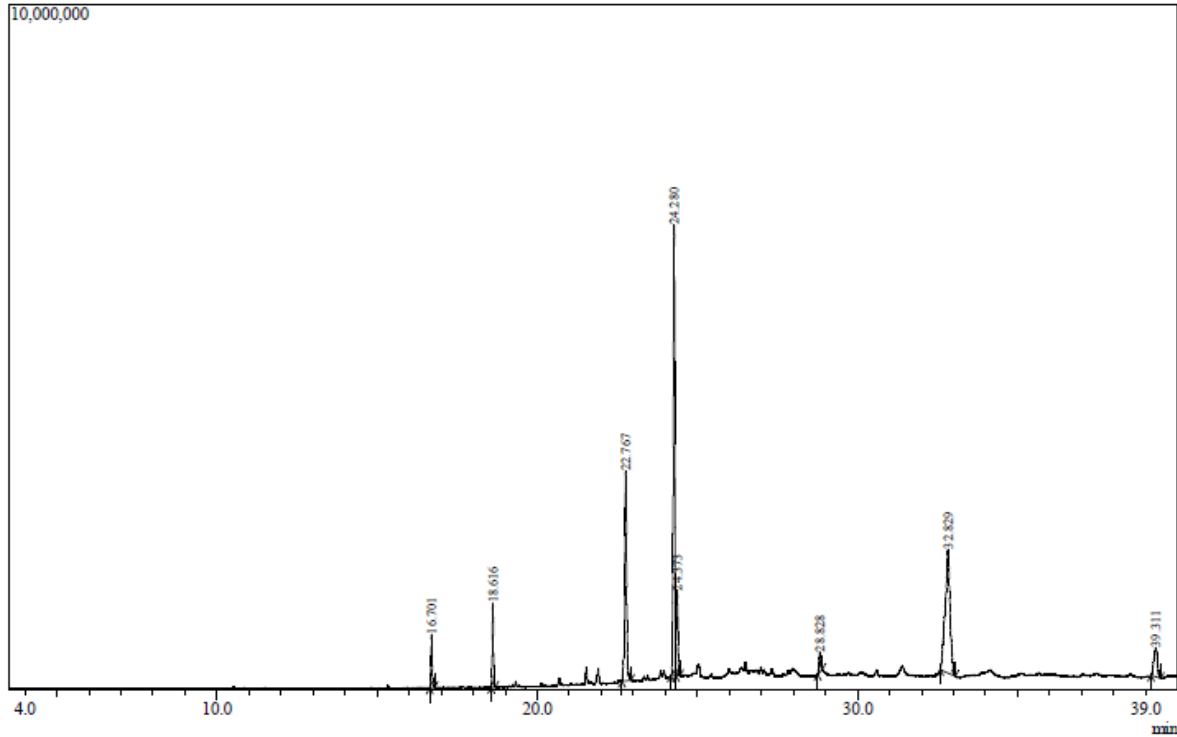
Ensayo 10 (T= 65°C; P= 90 bar).



Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
16,71	13,91	p-cimeno	1332,886
18,62	4,2	β-farneseno	1465,468
21,54	1,2	Óxido de bisabolol	1692,683
21,91	1	Óxido de bisabolona	1723,932
22,79	19,9	Óxido de bisabolol A	1799,145
24,33	37,3	En-in-dicicloeter	1939,623
24,41	6	En-in-dicicloeter isómero	1947,17
28,84	2	Docosano	2308,721
32,87	8,45	Octacosano	2511,397
39,35	6	Nonacosano	2712,667

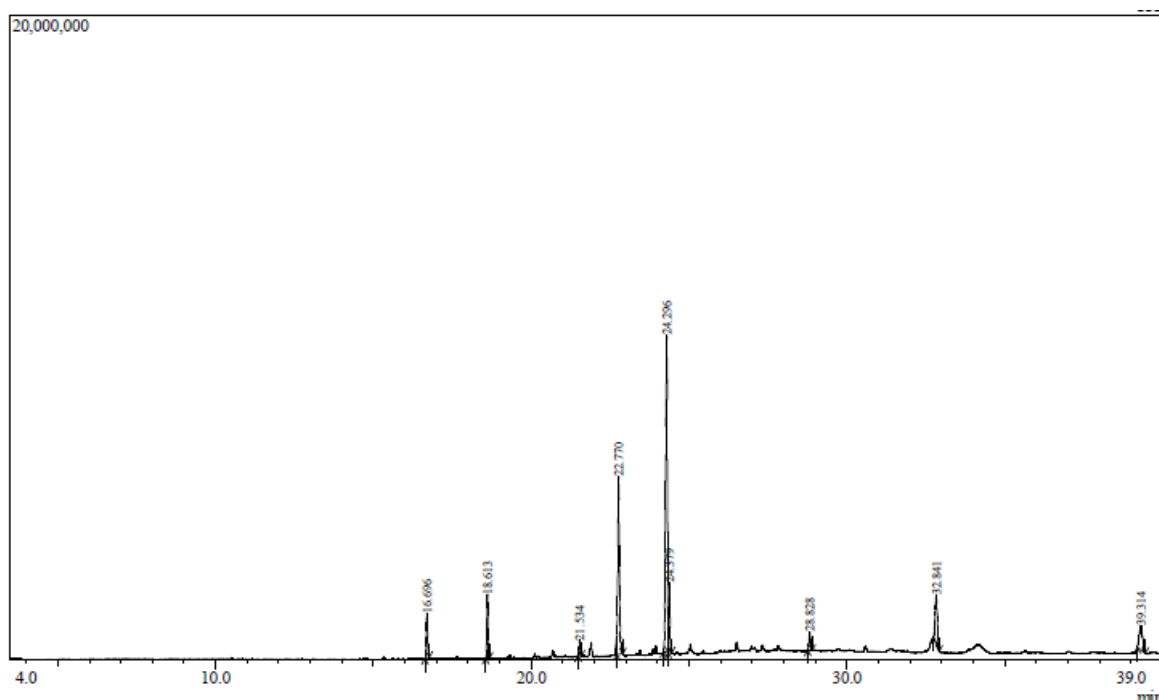
*IRL: Índice de retención lineal.

Ensayo 11 (T= 65°C; P= 150 bar).



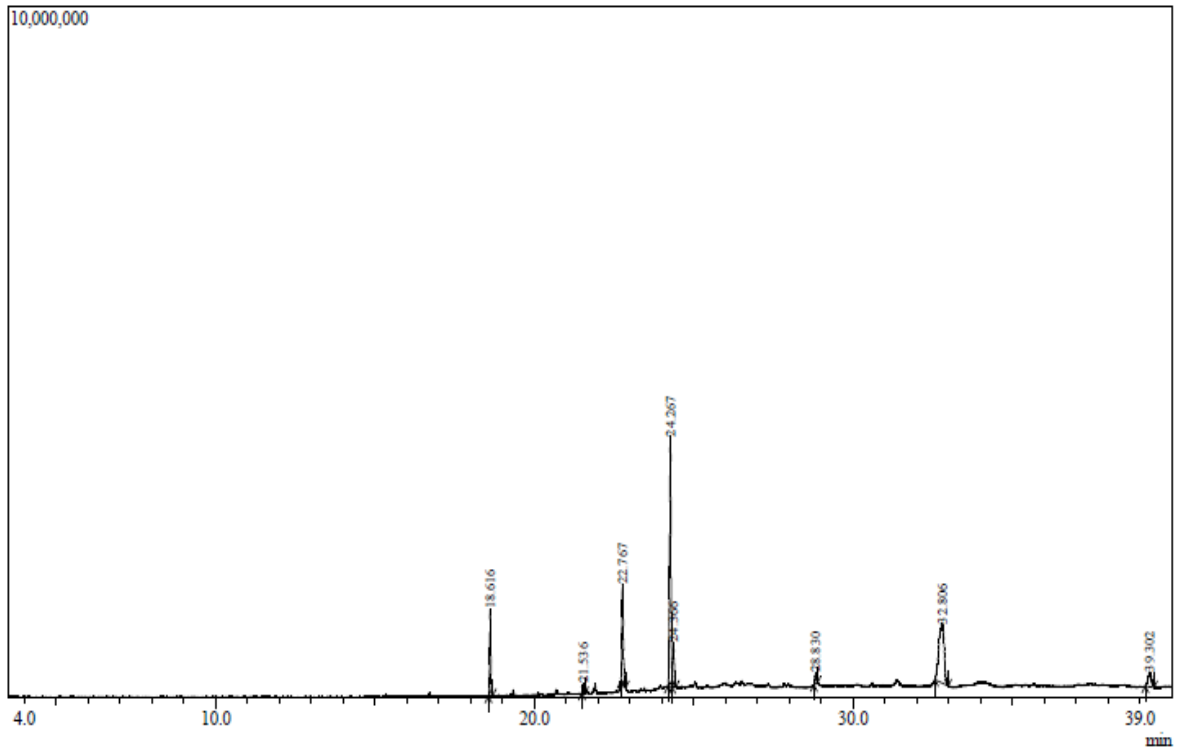
Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
16,7	3,2	p-cimeno	1329,63
18,62	4,3	β-farneseno	1465,468
22,77	17,3	Óxido de bisabolol A	1797,436
24,28	33	En-in-dicicloeter	1934,906
24,37	5,74	En-in-dicicloeter isómero	1943,396
28,83	1,7	Docosano	2308,14
32,83	29,1	Octacosano	2509,926
39,31	5	Nonacosano	2809,173

*IRL: Índice de retención lineal.

Ensayo 12 (T= 35°C; P= 150 bar).

Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
16,7	4,4	p-cimeno	1329,63
18,61	5,3	β-farneseno	1464,748
21,53	1,3	Óxido de bisabolol	1691,87
22,77	21,1	Óxido de bisabolol A	1797,436
24,3	42,18	En-in-dicicloeter	1936,792
24,38	7,1	En-in-dicicloeter isómero	1944,34
28,83	2,2	Docosano	2308,14
32,84	8,5	Octacosano	2510,294
39,31	6,2	Nonacosano	2711,778

*IRL: Índice de retención lineal.

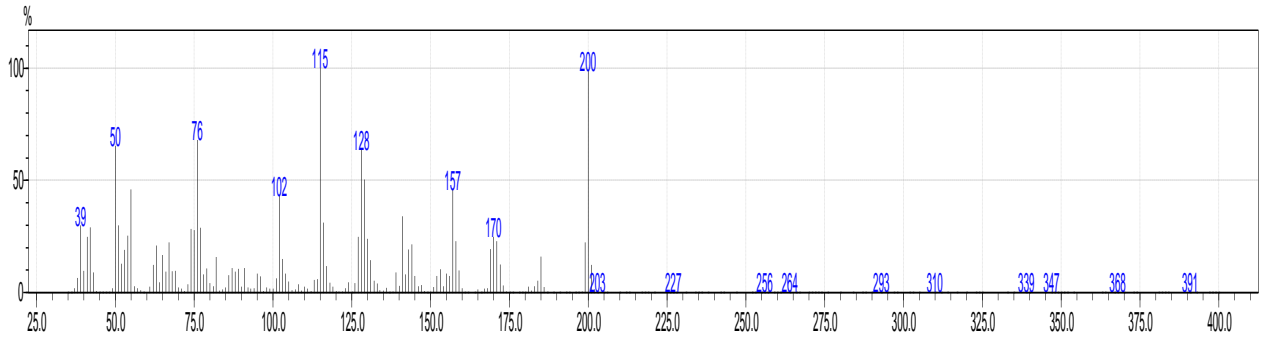
Ensayo 13 (T= 50°C; P= 150 bar).

Tiempo de Retención (Tr)	Porcentaje relativo de área (%A)	Compuesto identificado	IRL*
18,62	8,3	β -farneseno	1465,468
21,53	1,1	Óxido de bisabolol	1691,87
22,77	13,95	Óxido de bisabolol A	1797,436
24,27	33,6	En-in-dicicloeter	1933,962
24,37	5,75	En-in-dicicloeter isómero	1943,396
28,83	1,6	Docosano	2308,14
32,81	30,6	Octacosano	2511,628
39,3	5	Nonacosano	2711,556

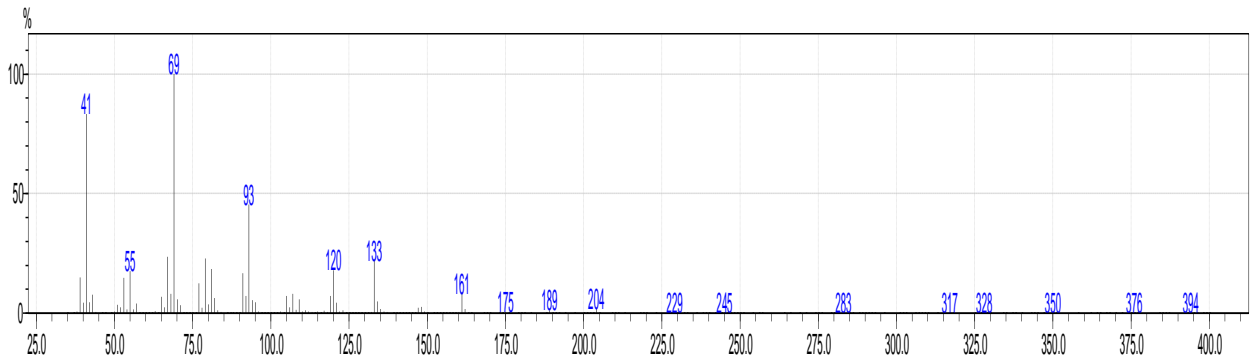
*IRL: Índice de retención lineal.

Anexo B: Espectros de masas de los compuestos mayoritarios (en-in-dicicloeter, β -farneseno, óxido de bisabolol A).

Espectro de masas en-in-dicicloeter.



Espectro de masas β -farneseno.



Espectro de masas óxido de bisabolol A.

