



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

**“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS DE PALO
NEGRO (*LEPTOCARPHA RIVULARIS*) OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN
SUPERCRÍTICA”**

**TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN
ALIMENTOS**

Profesor guía: Dr. Edgar Luciano Uquiche Carrasco

CLAUDIA FRANCISCA CAMPOS SANHUEZA

2017

**“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS DE PALO
NEGRO (*LEPTOCARPHA RIVULARIS*) OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN
SUPERCRÍTICA”**

CLAUDIA FRANCISCA CAMPOS SANHUEZA

2016

COMISIÓN EXAMINADORA

DR. EDGAR UQUICHE CARRASCO

Profesor Guía

DR. JORGE FARÍAS AVENDAÑO

Profesor examinador

MG. VALERIO BIFANI COSENTINI

Profesor examinador

Nota trabajo escrito :

Nota examen :

Nota final :

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron en este largo camino, en especial a mi familia que me apoyó siempre, en todas las decisiones que tomé. También quiero agradecerles a ellos el haberme enseñado que sin esfuerzo no se logra nada, y que todo logrado con esfuerzo tiene más valor.

“En el camino a la verdad solo hay dos errores que uno puede cometer, no seguir hasta el final o no haber comenzado”. Buda

RESUMEN

Leptocarpha rivularis, es el nombre científico de una planta medicinal endémica de Chile, llamada comúnmente palo negro. Ha sido utilizada para tratar diferentes afecciones. Dentro de sus propiedades medicinales, están sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios, por lo que es una planta de gran interés. Para extraer sus compuestos se ha considerado utilizar fluidos supercríticos. Dentro de éstos está el CO₂ el cual es ampliamente utilizado ya que no es tóxico, es estable químicamente y ambientalmente aceptable. Por otra parte, ya que el CO₂ supercrítico se considera un disolvente no polar, es posible mejorar su poder solvente con la adición de un co-solvente polar, como el etanol, el cual ayuda a extraer compuestos polares de interés desde la matriz vegetal.

El objetivo de este trabajo fue determinar condiciones de extracción supercrítica con CO₂ modificado con etanol, para mejorar la obtención de extracto total de tallos *L. rivularis*, actividad antioxidante y la actividad antiinflamatoria. Se trabajó a 60 °C, evaluando el efecto de la presión (20 y 40 MPa) y de la concentración de co-solvente (0,5 y 1,5 %p/p) en el rendimiento de extracción (g extracto/ kg SS); extracción de compuestos antioxidantes (mmol de TE/ kg SS) y actividad antiinflamatoria (IC₅₀ mg/ mL). Cada experimento de extracción se realizó en base a un diseño factorial 2² y mediciones en el punto central, empleando el software Design Expert.

De acuerdo con los resultados experimentales, no se observó una condición óptima para la extracción supercrítica, por lo que la condición seleccionada fue a una presión de 40 MPa y usando 1 %p/p de co-solvente, a 60 °C, donde se obtuvo el mayor rendimiento de extracto total y de extracción de compuestos antioxidantes, medidos por el método de inhibición del radical DPPH. Estos valores correspondieron a 30,3 g/kg SS y 0,71 mmol de TE/ kg SS respectivamente. Sin embargo, bajo esta condición la actividad antiinflamatoria fue la más baja (IC₅₀=4,46 mg/mL). La actividad antiinflamatoria tuvo su mayor valor a 20 MPa y usando 1,5 %p/p de cosolvente, siendo su valor IC₅₀ 2,37 mg/mL; pero con rendimientos de extracción de 5,69 g/kg SS y actividad antioxidante de 0,0130 mmol TE/ kg SS.

El rendimiento de extracto total y la extracción de compuestos antioxidantes, se comportaron de la misma manera en relación al efecto de la presión y del efecto del co-solvente. Un aumento de la presión resulta en una mayor densidad y un mayor poder disolvente de la mezcla etanol-CO₂,

lo que explica el efecto positivo de la presión sobre ambas respuestas. También se observó un aumento del rendimiento de extracto total y la extracción de compuestos antioxidantes con el aumento de la concentración del co-solvente de 0,5 a 1,0 %p/p, debido a la mayor polaridad de la mezcla etanol-CO₂ y característica polar de los compuestos activos Sin embargo, al seguir aumentando la concentración de co-solvente hasta 1,5 %p/p, los resultados de las respuestas disminuyeron. Este último comportamiento podría explicarse por una saturación del CO₂ debido al aumento en la concentración de etanol provocando la formación de dos fases, lo que genera además una disminución en la densidad del disolvente. Además se promovería la formación de enlaces de hidrógeno en el etanol y en los componentes polares del soluto, todo lo cual provoca una disminución del poder disolvente de la mezcla etanol-CO₂.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES GENERALES	4
2.1 <i>LEPTOCARPHA RIVULARIS</i>	4
2.2 EXTRACCIÓN CON CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	5
2.3 ETANOL COMO CO-SOLVENTE DE EXTRACCIÓN	8
2.4 ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS NATURALES	9
2.5 INHIBICIÓN DE LA LIPOXIGENASA	10
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 MATERIALES.....	12
3.1.1 Materia prima	12
3.1.2 Equipos e instrumentos.....	12
3.1.3 Reactivos	12
3.1.4 Material de vidrio y otros	13
3.2 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS	13
3.2.1 Distribución del tamaño de partícula.....	14
3.2.2 Humedad.....	14
3.2.3 Densidad verdadera	14
3.2.4 Densidad aparente.....	15
3.2.5 Porosidad	16
3.2.6 Extracción supercrítica	16
3.2.7 Extracción de antioxidantes por el método del radical DPPH	16

3.2.8 Actividad antiinflamatoria por el método de la inhibición de la lipoxigenasa	17
3.2.9 Análisis estadístico	18
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATO	20
4.2 RENDIMIENTO	22
4.2.1 Análisis de varianza.....	23
4.2.2 Superficie de respuesta	24
4.3 EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES.....	27
4.3.1 Análisis de varianza.....	27
4.3.2 Superficie de respuesta	29
4.4 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.....	31
4.4.1 Análisis de varianza.....	31
4.4.2 Superficie de respuesta	33
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS	44
ANEXO A. CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULA.....	44
ANEXO B. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ENSAYO DPPH.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1 Características del sustrato para la extracción con CO ₂ supercrítico.....	21
Tabla 4.2 Rendimiento de extracción (Y_1 , g extracto/ kg SS), en función de las condiciones de co-solvente (%p/p) y presión (MPa).....	22
Tabla 4.3 Análisis de varianza del modelo cuadrático para el rendimiento de extracción.....	23
Tabla 4.4 Extracción de antioxidantes (Y_2 , mmol de TE/ kg SS) en función de las condiciones de co- solvente (%p/p) y presión (MPa)	27
Tabla 4.5 Análisis de varianza del modelo cuadrático para la extraccion de antioxidantes.....	28
Tabla 4.6 Actividad antiinflamatoria (Y_3 , IC ₅₀ mg/ mL) en función de las condiciones de co-solvente (%p/p) y presión (MPa).....	31
Tabla 4.7 Análisis de varianza del modelo cuadrático para la actividad antiinflamatoria....	32
Tabla A-1 Datos para la determinación de humedad inicial de la muestra de tallos de <i>L. rivularis</i>	44
Tabla A-2 Determinación del tamaño promedio de partícula por el método ASAE de la muestra de tallos de <i>L. rivularis</i>	45
Tabla A-3 Datos para la determinación de la densidad aparente (ρ_{ap}) de tallos de <i>L. rivularis</i>	46
Tabla A-4 Datos para la determinación de la densidad verdadera (ρ_v) de tallos de <i>L. rivularis</i>	46
Tabla A-5 Datos para la determinación de porosidad (ϵ) de tallos de <i>L. rivularis</i>	46
Tabla B-1 Datos para confeccionar la curva de calibración para el ensayo del radical DPPH.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Diagrama de fases para el dióxido de carbono, que ilustra regiones útiles para las aplicaciones en el procesamiento de alimentos (McCabe <i>et al.</i> , 2007).....	7
Figura 4.1 Superficie de respuesta para rendimiento de extracción (Y_1 , g extracto/ kg SS), en función de la presión (P , MPa) y uso de co-solvente (C , %p/p).....	25
Figura 4.2 Superficie de respuesta para la extracción de antioxidantes (Y_2 mmol de TE/ kg SS), en función de la presión (P , MPa) y uso de co-solvente (C , %p/p).....	29
Figura 4.3 Superficie de respuesta para actividad antiinflamatoria (Y_3 , IC50 mg/ mL), en función de la presión (P , MPa) y uso de co-solvente (C , %p/p).....	33
Figura B-1 Curva de calibración para el ensayo del radical DPPH.....	47

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Palo negro de nombre científico *Leptocarpha rivularis*, perteneciente a la familia *Asteraceae* es una planta medicinal endémica del sur de Chile, es un arbusto de hoja perenne que tiene, ramas leñosas poco delgadas, con corteza oscura y finamente estriada. Crece en lugares húmedos, con exposición al sol y puede alcanzar una altura de 2 m. Florece en primavera y verano y fructifica en otoño. Su aplicación forma parte de la medicina ancestral del pueblo mapuche (habitantes prehispánicos del sur y centro de Chile). De la cual es posible obtener un extracto compuesto por diversos metabolitos secundarios, tales como sesquiterpenos y lactonas sesquiterpénicas, que se caracterizan por tener efectos anticancerígenos y antiinflamatorios. Así mismo del extracto de *L. rivularis* se puede obtener flavonoides y triterpenos (Martínez *et al.*, 2006).

Los métodos comúnmente usados para la extracción de compuestos bioactivos en plantas involucran la aplicación de solventes de distinta polaridad, con el inconveniente de manejar grandes volúmenes de solvente, acompañada de largos periodos de extracción, la dificultad en la recuperación de todo el disolvente orgánico del producto final, y en el caso de la extracción con disolvente, las altas temperaturas involucradas que pueden causar la degradación térmica y la hidrólisis parcial de algunos constituyentes. Ha habido un interés creciente en el uso de la extracción con fluidos supercrítico con dióxido de carbono como solvente (del Valle y Aguilera, 1999).

La extracción con CO₂ supercrítico produce extractos libres de disolvente a temperaturas bajas, evitando así la degradación de los compuestos activos, lo que permite una extracción más selectiva y eficiente mediante el control de la temperatura de extracción y de la presión, los que regulan la densidad del CO₂ y determinan su poder disolvente. El CO₂ es ampliamente utilizado debido a que no es tóxico, es estable químicamente y ambientalmente aceptable. Por otra parte, ya que el CO₂ supercrítico se considera un disolvente no polar, no puede solubilizar compuestos polares, por lo que su poder solvente puede ser mejorado mediante la adición de un co-solvente polar, el cual modifica la polaridad de la mezcla y logra aumentar el rendimiento de extracción (Danh *et al.*, 2010). Los co-solventes generan fuerzas intermoleculares preferenciales, tales como enlaces de hidrógeno, y aumentan la selectividad del fluido supercrítico (del Valle y Aguilera, 1999).

La eficiencia de la extracción supercrítica se ve afectada por varios factores tales como temperatura, presión, tiempo de extracción, la velocidad de flujo y tamaño de partícula. La temperatura y la presión son los principales factores que afectan el comportamiento de extracción supercrítica, ya que estos factores determinan el poder disolvente del fluido supercrítico (del Valle y Aguilera, 1999).

Entre las muchas enfermedades que aquejan a la población mundial, las que involucran procesos inflamatorios representan un importante grupo; enfermedades como artritis reumatoidea, gota, asma o trastornos neurodegenerativos implican reacciones inflamatorias que en algunos casos puede producir inmovilidad del área afectada para quienes las padecen. Además, muchas otras dolencias menores que se presentan diariamente involucran procesos inflamatorios como respuesta natural del organismo ante traumas físicos y alergias. Como consecuencia, existe una gran necesidad de descubrir y desarrollar nuevos agentes antiinflamatorios más seguros y eficaces. El uso de las plantas medicinales o de sus componentes activos representa una alternativa cada vez más explorada y promisoría para el tratamiento de numerosos desórdenes inflamatorios (Franco *et al.*, 2007).

Según García *et al.* (2002), los extractos de plantas que presentan sustancias como flavonoides y polifenoles que tienen capacidad antioxidante, en muchas ocasiones a su vez presentan efecto antiinflamatorio. Como por ejemplo, son bien conocidas las propiedades antiinflamatorias de la sábila (*Aloe vera*), así como sus propiedades cicatrizantes y en su composición presenta taninos y otras sustancias antioxidantes. También se reporta que la presencia de flavonoides y los componentes fenólicos le confieren a los extractos de tomillo (*Thymus vulgaris*) su acción antiinflamatoria entre otras.

De acuerdo con los antecedentes anteriores, se propone estudiar la extracción con dióxido de carbono supercrítico modificado con etanol, en tallos de *L. rivularis*, evaluando las condiciones de extracción para rendimiento, actividad antioxidante y actividad antiinflamatoria.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

- Determinar condiciones de extracción supercrítica con CO₂ modificado con etanol para mejorar la obtención de extracto total, compuestos antioxidantes y la actividad antiinflamatoria.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la presión y co-solvente en el rendimiento de extracción total.
- Evaluar el efecto de la presión y co-solvente sobre la extracción de antioxidantes.
- Evaluar el efecto de la presión y co-solvente sobre la actividad antiinflamatoria.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 LEPTOCARPHA RIVULARIS

"Palo negro" es un arbusto nativo del sur de Chile, originalmente llamado CUDU-mamëll (en mapudungun) por los mapuches de Chile. Su nombre científico es *Leptocarpha rivularis* y pertenece a la familia de las compuestas, de la tribu *Heliantheae*, actualmente clasificado como *Asteraceae*. Este vegetal crece entre el Maule y Valdivia (Hoffmann, 2005), específicamente en los suelos húmedos y asoleados o a orillas de cursos de agua. Se encuentra en los faldeos de ambas cordilleras (Riedemann *et al.*, 2014). Constituye un arbusto ramoso de 1 a 2 metros de altura, con ramas delgadas, peludas cuando nuevas, poco leñosas, de corteza casi negra y finamente estriadas. Sus hojas son de color verde oscuro, con flores amarillentas y posee un olor penetrante parecido al de la manzanilla (Hoffmann, 2005). Sus hojas son usadas en medicina popular para curar afecciones estomacales y también casos de menstruaciones difíciles (Doroso y Ramírez, 1994). También ha sido usado desde tiempos inmemoriales en la medicina nativa como agente estimulante, carminativo y para el tratamiento de desórdenes gástricos (Martínez *et al.*, 1995).

Los extractos de plantas pertenecientes a la familia *Asteraceae* contienen metabolitos secundarios, como acetilénicos, sesquiterpeno y lactonas sesquiterpénicas, que poseen efectos anticancerígenos y antiinflamatorios (Martínez *et al.*, 2006). También contienen flavonoides y triterpenos (Carcamos *et al.*, 2006) y en menor cantidad lo componen compuestos alifáticos de baja masa molecular, algunos alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos y ciertas aminas (Bruzual *et al.*, 2015). Las lactonas sesquiterpénicas obtenidas de vegetales pueden tener alto valor farmacológico para el tratamiento de tumores malignos, debido a su preferencia hacia las células tumorales y las células madre del cáncer, excluyendo células normales y además efectos antiinflamatorios (Gertsh *et al.*, 2003; Ghantous *et al.*, 2010).

2.2 EXTRACCIÓN CON CO₂ SUPERCRÍTICO

Las plantas poseen una variedad de mezclas de compuestos bio-activos tales como lípidos, grasas, fotoquímicos, fragancias, pigmentos y sabores que son ampliamente utilizados en la agroindustria, en la industria farmacéutica y en la industria cosmética. Para separar estos compuestos (solutos) de la fase sólida esta se pone en contacto con una fase líquida, ambas fases entran en contacto íntimo y el (los) soluto(s) se difunde(n) desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes de su estructura natural original. Este proceso se conoce como lixiviación y para realizarlo existen varios métodos. Un proceso importante es la lixiviación de azúcar de las remolachas con agua caliente. Otros procesos muy utilizados consisten en la extracción de aceites vegetales, en los cuales se emplean disolventes orgánicos como hexano, acetona y éter, para extraer aceites de maní, soja, semillas de lino, ricino, girasol, algodón, entre otros (Geankoplis, 1999).

De un tiempo a esta parte se han desarrollado varias técnicas nuevas 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. La extracción Soxhlet es una técnica bien establecida, entre sus ventajas, por encima de otros nuevos métodos como la extracción ayudada con ultrasonido, la ayudada con microondas y la extracción con fluidos supercríticos, está la de tener bastantes aplicaciones industriales, buena reproducibilidad, eficacia y menor manipulación del extracto. Sin embargo, comparada con la extracción con CO₂ supercrítico, el método Soxhlet es una técnica anticuada y consumidora de tiempo y de solvente (Velasco, 2007).

Las técnicas de extracción se han desarrollado para aumentar la efectividad de los procesos de extracción, especialmente en la recuperación de productos biológicos sensibles. Éstas incluyen la extracción que solo utiliza fases acuosas y la extracción con fluidos supercríticos mediante solventes que tienen una presión y temperatura por arriba del punto crítico del solvente (McCabe *et al.*, 2007).

Ciertos compuestos se separan a partir de sólidos o líquidos por extracción con un solvente supercrítico. Además de su poder disolvente selectivo, un fluido supercrítico posee varias ventajas sobre los solventes líquidos convencionales. Su densidad y viscosidad son bajas, las

difusividades de los solutos en estos fluidos son elevadas (aproximadamente 100 veces más grandes que las de los líquidos ordinarios). En consecuencia, los fluidos supercríticos penetran con facilidad los sólidos porosos o fibrosos. Los solutos se recuperan a partir de los fluidos supercríticos con solo variar la temperatura o la presión. La desventaja principal de la extracción con fluidos supercríticos es que se requiere una presión elevada (del Valle y Aguilera, 1999).

La extracción con CO₂ supercrítico es una técnica que se puede utilizar para obtener extractos volátiles de matrices vegetales sin ningún rastro de disolvente. El CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado, en particular para la extracción de compuestos farmacéuticos y alimentarios debido a sus propiedades químicas y físicas y a sus valores relativamente bajos de temperatura y presión críticas (31,06 °C y 73,8 bars). El diagrama de fases para el CO₂ puro (Figura 2.1) muestra las regiones de equilibrio del sólido, líquido y gas, así como las condiciones en las cuales existe el fluido supercrítico. En la región supercrítica no hay distinción entre el líquido y el gas, ni tampoco existe fase de transición de uno a otro; los fluidos supercríticos actúan como un gas muy denso o un líquido móvil y ligero. La solubilidad y selectividad en un fluido supercrítico son funciones fuertemente dependientes de la temperatura y la presión. Para la extracción prácticamente total de solutos mediante CO₂ supercrítico, como se indica en la Figura 2.1, se utiliza presión muy elevada, debido a que las solubilidades son las más altas (McCabe *et al.*, 2007).

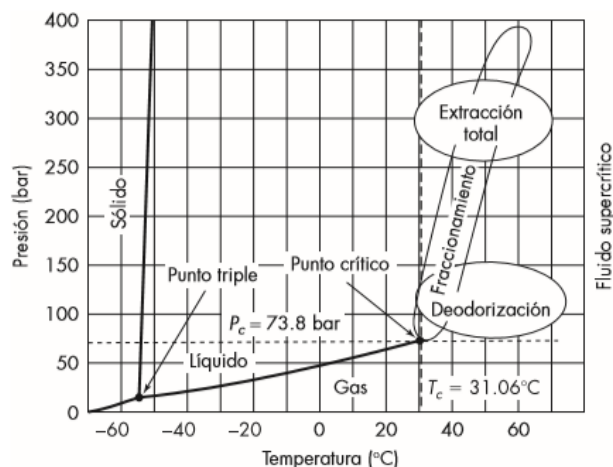


Figura 2.1 Diagrama de fases para el dióxido de carbono, que ilustra regiones útiles para las aplicaciones en el procesamiento de alimentos (McCabe *et al.*, 2007).

El aumento de la presión aumenta la densidad, lo que disminuye la distancia media entre las moléculas y acelera la transferencia de masa de analitos por lo tanto, aumenta las interacciones soluto-solvente (Reverchon y de Marco, 2006; Bimakr *et al.*, 2011).

La densidad determina las interacciones entre moléculas de CO₂ y de los compuestos orgánicos, y como al aumentar la presión, la densidad del fluido aumenta, se logra que con suficientes interacciones, las fuerzas de cohesión entre las moléculas individuales del compuesto orgánico se rompan, generando un aumento de la solubilidad y produciendo un incremento en la eficiencia de la extracción de compuestos bioactivos (Safaralie *et al.*, 2010; Yamini *et al.*, 2008). De hecho, los fluidos supercríticos de densidades más altas tienen mayor potencia de solvatación y por tanto, permiten mayor extracción (Norulaini *et al.*, 2009).

Los extractos obtenidos por medio de extracción con fluidos supercríticos son de una calidad mucho mejor que los obtenidos por extracción con disolventes orgánicos o por vapor e hidrodestilación. También estas técnicas clásicas tienen algunas desventajas claras como la dificultad en la recuperación de todo el disolvente orgánico del producto final y en el caso de la extracción con disolvente, las altas temperaturas involucradas que pueden causar la degradación térmica y la hidrólisis parcial de algunos constituyentes en el caso de vapor e hidrodestilación (del Valle y Aguilera, 1999).

La extracción con fluido supercrítico es una importante tecnología limpia donde el alto poder disolvente de los fluidos supercríticos se debe a la influencia de la presión y la temperatura en sus propiedades, principalmente su densidad. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de esta técnica es el coste del equipo que limita su uso en los campos industriales altamente sensibles en las que se requieren altas cualidades y purezas de los productos finales (Badens *et al.* 2016).

Una efectiva extracción supercrítica se puede ver afectada con las condiciones en que se presente la materia prima (Pourmortazavi y Hajimirsadegui, 2007). La humedad del sustrato debe estar en el intervalo de 3-12% ya que el contenido de agua presente en un sustrato vegetal, superior al 12%, puede interferir en la interacción soluto-CO₂, actuando como anti-solvente, generando una obstaculización en la difusión de lípidos desde el interior de la muestra y provocar efectos negativos en el rendimiento de extracción (Sun y Temelli, 2006; Sahena *et al.*, 2009). Además, se puede formar hielo en las tuberías e hidrólisis de algunos compuestos, afectando directamente el contenido de compuestos volátiles (Fornari *et al.*, 2012). Se recomienda también disminuir el tamaño de partícula, con el fin de aumentar la superficie de contacto con el solvente, favoreciendo la eficiencia de extracción (Vasapollo *et al.*, 2004). Al igual que el tamaño de partícula, la densidad y porosidad también influyen en la resistencia del flujo del CO₂. Es por esto que los sustratos vegetales son comúnmente sometidos a pretratamientos mecánicos para reducir el tamaño de partícula, y así promover la liberación de los componentes desde las células del sustrato, y también facilitar el flujo de solvente durante la extracción (del Valle *et al.*, 2006; Pourmortazavi y Hajimirsadegui, 2007).

2.3 ETANOL COMO CO-SOLVENTE DE EXTRACCIÓN

Uno de los inconvenientes que tiene la extracción con CO₂ supercrítico, es la falta de polaridad para extraer analitos polares (Pourmortazavi y Hajimirsadegui, 2007). Sin embargo, existe una alternativa la cual consiste en adicionar pequeñas cantidades de modificadores o co-solventes, que son sustancias polares que varían enormemente la polaridad del fluido si son añadidas en conjunto durante la extracción (Vásquez, 2008). El co-solvente puede ser seleccionado para interactuar fuertemente con los solutos de interés para facilitar su extracción. El metanol y el

etanol son capaces de formar interacciones de puentes de hidrógeno y dipolo-dipolo con los fenoles, lo que indica que podrían ser buenos co-solventes del dióxido de carbono (Murga, 2000). Los disolventes más utilizados como modificadores en tecnología de alimentos son etanol, metanol y acetona. Los inconvenientes del uso de ellos son de partida el ser orgánicos y potencialmente tóxicos. No obstante aquello, la baja cantidad con que intervienen y la solubilidad que tienen en el fluido supercrítico hacen que sus residuos en el extracto sean prácticamente despreciables. Aun así, en tecnología de alimentos se tiende a evitar su uso o restringirlo al etanol que tiene la toxicidad más baja (Vásquez, 2008).

El etanol ha resultado muy eficaz como co-solvente, en la extracción supercrítica de distintos compuestos de diferentes matrices, no comprometiendo el uso de los extractos en productos farmacéuticos o nutraceuticos (Macías *et al.*, 2009).

2.4 ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS NATURALES

Los Antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Los antioxidantes se dividen en dos categorías principalmente que son: sintéticos y naturales. En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminos) o carotenoides así como el ácido ascórbico (Belitz y Grosch, 1999). Los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Butil – hidroxianisol y Butil - hidroxitolueno) han sido utilizados como antioxidantes desde principios del siglo pasado. Sin embargo, se han impuesto medidas de precaución y se ha restringido su uso debido a su carcinogenicidad (Sikwese y Duodu, 2007). Debido a esto, el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado considerablemente ya que la capacidad de actuar como antioxidante se ha demostrado en el laboratorio y mencionado en la literatura. Muchos antioxidantes naturales, en especial los flavonoides, muestran un amplio rango de efectos biológicos incluyendo funciones antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadores. Una terapia antioxidante provee una alternativa barata para el tratamiento de

enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo ya que se ha demostrado el efecto antioxidante de productos naturales provenientes de las plantas (Pokorny *et al.*, 2001; Zheng y Wang, 2001). La actividad antioxidante y su relación con la propiedad curativa de una gran cantidad de plantas medicinales ha sido reportada en diversas investigaciones (Malecka, 2002). Existe muchos métodos para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, un método muy usado se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia.

2.5 INHIBICIÓN DE LA LIPOXIGENASA

Cuando hay un daño producido por agentes endógenos o exógenos, ya sea químico, mecánico o biológico el cuerpo actúa como una barrera defensiva del organismo por medio de la inflamación, la cual se produce y causa varias enfermedades que van desde alergias a la insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, cáncer, carcinoma de colon, asma, artritis reumatoide y muchos de los problemas relacionados con la edad (Chua, 2013; Torres *et al.*, 2015).

Cuando ocurre una agresión en la membrana celular, el ácido araquidónico que se encuentra normalmente esterificado en forma de fosfolípido, se libera por acción de las fosfolipasas, y es metabolizado por dos enzimas, la cicloxigenasa y la lipoxigenasa. Ambas producen eicosanoides, los cuales son mediadores en la inflamación (Akula y Odhav, 2008). La cicloxigenasa metaboliza al ácido araquidónico produciendo prostaglandinas y tromboxanos, que son mediadores en la vasodilatación que potencian el edema. Esta enzima se puede inhibir con antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. Los glucocorticoides son potentes antiinflamatorios esteroideos que controlan muy bien los síntomas de la artritis, sin embargo su toxicidad en el uso crónico los limitan solo al uso en las recaídas de la enfermedad. Por otro lado un antiinflamatorio no esteroideo es la aspirina la cual alivia el dolor y la inflamación por periodos significativos de tiempo (Pérez *et al.*, 1998).

La lipoxigenasa es estimulada al aumentar las concentraciones de Ca^{++} , la cual se une con la proteína que la activa, catalizan la oxigenación de ácidos poliédricos hasta originar los hidroxiperóxidos lípidos. El ácido araquidónico, que contiene varias dobles ligaduras en su configuración, es metabolizado hasta obtener hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE), que se reduce espontáneamente a hidroxeieicosatetraenoico (HETE). Este sufre sucesivas transformaciones para dar lugar a diferentes leucotrienos, los que son constrictores de la musculatura lisa, como la de la periferia de los pulmones (broncoconstricción), aumentan la permeabilidad vascular en la zona afectada y contribuyen a la obstrucción bronquial en asmáticos. Un único inhibidor de la lipoxigenasa producido comercialmente para el tratamiento del asma humano es el Zileutón, éste inhibe la actividad catalizadora de la lipoxigenasa por unión al hierro en el sitio activo de la enzima; esta inhibición es reversible. Este medicamento puede producir dolor de cabeza, vómitos, estreñimiento y acidez (Pérez *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2002). La lipoxigenasa es capaz de oxidar el sistema de dobles enlaces del ácido graso poliinsaturado linoleico para formar hidroperóxidos los cuales se miden espectrofotométricamente a 234 nm (Akula y Odhav, 2008).

Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios que confieren propiedades antiinflamatorias potentes a diversas plantas que se encuentran, casi exclusivamente, en especies de la familia *Asteraceae* (Velásquez *et al.*, 2013). Se han investigado plantas del género *Vernonia*, dando como resultado el aislamiento de triterpenoides, glucósidos esteroides y flavonoides y numerosas clases de lactonas sesquiterpénicas con actividades biológicas incluyendo las antiinflamatorias (Babando *et al.*, 2015). Los compuestos fenólicos, también son ampliamente considerados debido a que poseen propiedades antiinflamatorias y, por lo tanto, se han propuesto como una aproximación alternativa natural para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias crónicas (Torres *et al.*, 2015). Estos componentes naturales interfieren con las actividades de la lipoxigenasa, debido a sus capacidades antioxidantes, es decir, por desacoplamiento del ciclo redox de la lipoxigenasa en el sitio activo del hierro presente en la enzima. Esto se ha demostrado con varios productos naturales de plantas, que utilizadas como remedios antiinflamatorios podían suprimir la formación de leucotrienos, mediadores cruciales de reacciones inflamatorias, y la mayoría de ellos mediante la inhibición de la actividad de la lipoxigenasa (Napagoda *et al.*, 2014).

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Materia prima

Tallos de *L. rivularis* (Palo negro), serán la materia prima a utilizar, provenientes de Valdivia, Región de los Ríos, Chile. Éstos fueron sometidos a una molienda con el fin de reducir su tamaño, y guardados en bolsas herméticas para la extracción.

3.1.2 Equipos e instrumentos

- Agitador de tubos Vortex (VELP SCIENTÍFICA, Europa).
- Balanza analítica, sensibilidad $\pm 0,0001\text{g}$, (Precisa gravimetrics AG XB-220A, Estados Unidos).
- Baño ultrasónico 2,75 L (Elma, modelo E 30 H, Alemania)
- Cronómetro (Stopwatch, China).
- Estufa (ElectroThermostatic Oven, modelo DHG-9037 A, China).
- Espectrofotómetro (ThermoScientific, Genesys 10S UV-Vis, Estados Unidos).
- Extractor supercrítico (Applied Separation Speed 2, INC Allentown, Estados Unidos).
- Molino de cuchillos.
- Tamices de la serie ASTM.
- Tamiz vibratorio Ro-Tap (Gilson Company, INC, Estados Unidos).

3.1.3 Reactivos

- Ácido linoleico.
- CO₂ 99% de pureza, Linde Gas, Chile.
- DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil), Aldrich, Alemania.
- Etanol 98 % pureza p.a Baker.
- Lipoxidasa soybean (L6632-1MU).
- Nitrógeno (DIN 477#10; CONCO A, USA).
- Solución dimethyl sulfoxydo (DMSO).

- Solución de ácido nordihidroguaiarético (NDGA).
- Tolueno p.a, (Merck, Darmstadt, Alemania).
- TROLOX (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

3.1.4 Material de vidrio y otros

- Cubetas de vidrio.
- Desecador con sílica gel.
- Matraces aforados (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL).
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Micropipetas (10 μ L, 100 μ L).
- Picnómetro de 25 mL.
- Pipetas.
- Probetas (50 mL, 100 mL).
- Tubos de ensayo.
- Viales de vidrio de 60 mL.
- Vidrio reloj.
- Vasos precipitados.

3.2 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

Los tallos de *L. rivularis* se sometieron a una molienda en un molino de cuchillos y posteriormente se procedió a tamizar para determinar la distribución del tamaño de partículas. Adicionalmente se determinó la densidad aparente, densidad verdadera y porosidad.

3.2.1 Distribución del tamaño de partícula

Los tallos se tamizaron a través de una serie de tamices ASTM E11: 8, 14, 18, 20, 30, 40, 50, 60, 80, utilizando un agitador de tamices Ro- Tap. El diámetro de partícula promedio (d_p) se calculó utilizando la ecuación 3.1 según el método estándar (ASAE, 2000):

$$d_p = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n w_i} \right] \quad (3.1)$$

Donde:

d_p : Diámetro de partícula (mm).

w_i : Masa de partícula con diámetro medio (g).

$\bar{d}_i$: Diámetro medio geométrico o mediana de tamaño partículas retenidas entre los tamices superior e inferior (mm), calculado por la ecuación 3.2.

$$\bar{d}_i = \sqrt{d_i \times d_{i+1}} \quad (3.2)$$

Donde:

d_i : Tamaño de apertura del tamiz inferior (mm).

d_{i+1} : Tamaño de apertura del tamiz superior (mm).

3.2.2 Humedad

Antes de la extracción se determinó la humedad del sustrato mediante la norma AOAC (1990), basada en la diferencia de pesada mediante el secado en estufa a 105°C, hasta que la muestra alcance un peso constante.

3.2.3 Densidad verdadera

La densidad verdadera se obtuvo utilizando un picnómetro (botella de Gay- Lussac) de 25 mL. El sustrato se introdujo primeramente en el picnómetro hasta llenarlo y se pesó en una balanza analítica; luego se agregó tolueno al picnómetro hasta el nivel máximo y nuevamente se pesó. El

volumen total del material se calculó con la ecuación 3.3 y la densidad verdadera se obtuvo dividiendo el peso de la materia seca y el volumen total del material (ecuación 3.4). Esta metodología fue descrita por Roca *et al.* (2006).

$$V = V_p - \frac{(W_{total} - W_p - W)}{\rho_{tolueno}} \quad (3.3)$$

Donde:

V : Volumen de la muestra (m^3).

V_p : Volumen del picnómetro (m^3).

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

W_p : Masa seca del picnómetro (kg).

W : Masa de la muestra (kg).

$\rho_{tolueno}$: Densidad del tolueno 866 (kg/m^3) a 20°C.

La densidad verdadera se calcula con la ecuación:

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

Donde:

ρ_v : Densidad verdadera (kg/m^3).

W : Masa muestra seca (kg).

V : Volumen de la muestra (m^3).

3.2.4 Densidad aparente

La densidad aparente se determinó mediante una operación matemática, donde se dividió la masa de los tallos secos y molidos (kg), cargados en una probeta, *versus* el volumen de la masa medido en la probeta, en este caso se utilizó una probeta de 50 mL, todo esto sin aplicar presión mecánica, la densidad aparente se expresó en kg/m^3 .

3.2.5 Porosidad

La porosidad se determinó con la relación entre la densidad aparente y la densidad verdadera, cómo se muestra en la ecuación 3.5 (Börjesson *et al.*, 2014).

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

Donde:

ε_b : Porosidad (-).

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

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

3.2.6 Extracción supercrítica

En la extracción supercrítica, se cargaron 12 g de muestra a un recipiente de extracción de 50 mL, llevando a cabo los experimentos en una unidad supercrítica Applied Separation Speed 2. Se utilizó CO₂ como solvente a una velocidad superficial de 1 mm/s. Como co-solvente se empleó etanol. Las extracciones se realizaron a 60 °C bajo condiciones que combinan 2 niveles de presión (20 y 40 MPa) y consumo de co-solvente (0,5 y 1,5 %p/p) en un diseño 2² con cuatro replicas en el punto central. El tiempo de extracción varió en cada experimento de tal forma que el consumo específico de CO₂ se mantuvo constante a 30 kg CO₂/kg SS. Los extractos con co-solvente fueron recolectados en viales de 60 mL, y sometidos a corriente de nitrógeno para evaporar el etanol. La diferencia de peso entre viales con y sin extracto se utilizó para determinar el rendimiento de extracción (g extracto/ kg SS). Cada ensayo de extracción se realizó en duplicado. Los extractos obtenidos se utilizaron para determinar su actividad antioxidante y actividad antiinflamatoria.

3.2.7 Extracción de antioxidantes por el método del radical DPPH

Este método consiste en la neutralización de radicales libres de 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) (García *et al.*, 2011).

Primero se preparó una solución de TROLOX disolviendo 0,0025 mL en 10 mL de etanol p.a. También se disolvió el reactivo DPPH usando 0,0039 g de éste en 25 mL de etanol en un vaso precipitado cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz, el cual se llevó a agitación durante 30 min. Posteriormente se obtuvo una curva de calibración. Para esto, se depositó en un tubo de 0 a 0,1 mL de solución TROLOX completando con etanol hasta obtener 3,2 mL de volumen total, donde el blanco correspondió al valor 0. Seguido a esto se agregó a cada tubo 0,8 mL de reactivo DPPH (Hatano *et al.*, 1998).

Para preparar las muestras se adicionó 2,2 mL de etanol, 1 mL de muestra en etanol (10 mg/mL) y 0,8 mL de DPPH, además se realizó un blanco con 3,2 mL de etanol y con 0,8 mL de DPPH. Los tubos con mezclas se agitaron y se dejaron en reposo por 15 min en la oscuridad, luego se midió su absorbancia a 520 nm en cubetas de vidrio. Finalmente a partir de la curva patrón TROLOX generada, se calculó la extracción de antioxidante de las muestras, expresada en mmol TROLOX eq/ kg SS a partir de la ecuación 3.6.

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

Dónde:

C: Concentración de Trolox equivalente (TE) (mmol de TE/ kg SS).

m: Pendiente de la curva patrón de Trolox.

A: Absorbancia a una longitud de onda de 520 nm.

FD: Factor de dilución.

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

M: Masa de extracto (kg).

3.2.8 Actividad antiinflamatoria por el método de la inhibición de la lipoxigenasa

La actividad antiinflamatoria se midió con el método de la inhibición de la lipoxigenasa descrito por Jazet *et al.* (2010) y Kamatou *et al.* (2010), con algunas modificaciones. Primero se prepararon soluciones a distintas concentraciones diluidas con solución dimethyl sulfoxido (DMSO), de las muestras extraídas por extracción supercrítica. También se preparó una solución control diluyendo solución de ácido nordihidroguaiarético (NDGA) en solución DMSO, obteniendo distintas concentraciones. Además se realizó una solución de lipoxidasa a una

concentración de 10000U/mL. Finalmente se preparó una solución de ácido linoleico a una concentración de 50 mM. Para determinar la inhibición de la enzima se mezcló 40 µL de solución de extracto (diluido en DMSO), 20 µL de lipoxidasa (200 U) y 1,94 mL de solución buffer fosfato, luego la muestra se incubó en estufa a 25°C por 5 minutos, posteriormente se le incorporó 10 µL de ácido linoleico e inmediatamente se midió la actividad de la lipoxidasa en un espectrofotómetro a 234 nm, midiendo la absorbancia.

Con las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de inhibición de la enzima, construyendo una curva, con la cual se obtuvo el valor IC₅₀ (Concentración requerida para obtener una inhibición de 50% de la enzima), expresado en mg/ mL. Esto para cada muestra extraída.

3.2.9 Análisis estadístico

Cada experimento de extracción se realizó en base a un diseño factorial 2², con dos variables independientes, concentración de co-solvente (%p/p) (codificada X₁) y presión (codificada X₂), obteniendo las ecuaciones ajustadas 3.7 (donde C corresponde al %p/p de co-solvente) y 3.8 (donde P corresponde a la presión, MPa) respectivamente.

$$X_1 = \frac{C - 1}{0,5} \quad (3.7)$$

$$X_2 = \frac{P - 30}{10} \quad (3.8)$$

Se totalizaron 8 ensayos que incluían 4 repeticiones en el punto central. Como variable de respuesta se midió el rendimiento de extracción (Y₁, g extracto/kg SS), extracción de antioxidantes (Y₂, mmol TE/ kg SS) y la actividad antiinflamatoria (Y₃, IC₅₀ mg/ mL). Para expresar las variables dependientes en función de las variables independientes (X₁, X₂), los resultados se ajustaron a la ecuación 3.9 de segundo orden que se muestra a continuación:

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_{12}X_1X_2 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 \quad (3.9)$$

Donde A_0 es una constante; A_1 y A_2 son coeficientes lineales; A_{12} es el coeficiente de interacción y A_{11} y A_{22} son los coeficientes cuadráticos. Se construyeron superficies de respuesta variando el valor de las dos variables dentro del rango experimental. Las variables independientes con y sin codificación, se muestran en la Tabla 4.2. Mediante un análisis de varianza (ANOVA), se determinó la significancia ($p < 0,05$) de los coeficientes de la ecuación, empleando el software Design Expert Versión 6.0.1 (Stat-Easy, Inc. Minneapolis, MN).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATO

La efectiva extracción de componentes se ve afectada con las condiciones en que se presente la materia prima. La humedad, tamaño de partícula, densidad y porosidad afectarán los resultados de la extracción (Pourmortazavi y Hajimirsadegui, 2007). Es por esto que los sustratos vegetales son comúnmente sometidos a pretratamientos mecánicos para reducir el tamaño de partícula, con el fin de mejorar la velocidad y/o el rendimiento de extracción. Con estos pretratamientos, es posible promover la liberación de los componentes desde las células del sustrato y también facilitar el flujo de solvente durante la extracción (del Valle *et al.*, 2006).

La molienda del sustrato fue necesaria como pretratamiento, ya que al disminuir el tamaño de partículas, se aumenta la superficie de contacto con el solvente, favoreciendo la eficiencia de extracción (Vasapollo *et al.*, 2004). Posterior a la molienda de los tallos de *L. rivularis*, se realizó un tamizado, donde resultó un tamaño de partícula promedio de 1,070 mm, donde el mayor porcentaje de partículas (31 %) de la muestra total, quedaron retenidas en el tamiz n°14 de la serie ASTM, correspondiente a partículas con diámetro <2,36 y >1,4 mm, seguido por un 30 % de masa retenida en el tamiz n°18 de la serie ASTM, teniendo ésta un diámetro de partículas correspondiente <1,4 y >1,0 mm. El porcentaje de masa restante se retuvo en seis tamices más, de distintos diámetros de apertura, en forma decreciente (Anexo A, Tabla A-2). Luego del tamizado se determinaron las características que se deben considerar del sustrato previo a la extracción, la Tabla 4.1 muestra la caracterización del sustrato de tallos de *L. rivularis* para la extracción con CO₂ supercrítico y uso de co-solvente.

Tabla 4.1 Características del sustrato para la extracción con CO₂ supercrítico.

Características	
Contenido de humedad b.h (%)	6,624±0,149
Tamaño promedio de partícula (d _p , mm)	1,070
Densidad verdadera (ρ _v , kg/m ³)	761,91±14,60
Densidad aparente (ρ _{ap} , kg/m ³)	258,76±8,62
Porosidad (%)	66,03±1,26

El contenido de agua presente en un sustrato vegetal, superior al 12 %, puede interferir en la interacción soluto-CO₂, actuando como anti-solvente (Sun y Temelli, 2006), generando una obstaculización en la difusión de lípidos desde el interior de la muestra y provocar efectos negativos en el rendimiento de extracción (Sahena *et al.*, 2009). Además, se puede formar hielo en las tuberías e hidrólisis de algunos compuestos, afectando directamente el contenido de compuestos volátiles (Fornari *et al.*, 2012). A partir de esto, se recomienda realizar un secado previo a la extracción, sin embargo, si la humedad está en el intervalo de 3-12 %, es insignificante su influencia en la transferencia de masa y la solubilidad de compuestos (Ivanovic *et al.*, 2011).

En consecuencia con lo anterior, el valor de humedad determinado del sustrato de *L. rivularis* utilizado para este estudio, es igual a 6,624±0,149 % (Anexo A, Tabla A-1), por lo que no influiría mayormente en la eficacia de las extracciones, ya que se encuentra dentro del rango descrito por literatura.

El sustrato tuvo una densidad aparente de 258,76±8,62 (kg/m³) (Anexo A, Tabla A-3), ésta entrega información entre la capacidad de carga y el grado de empaque en el extractor (Fornari *et al.*, 2012).

La densidad verdadera en este estudio presentó un valor igual a 761,91±14,60 (kg/m³) (Anexo A, Tabla A-4), correspondiente a la razón del peso de la muestra seca *versus* el volumen total, excluyendo el aire (Roca *et al.*, 2006).

La resistencia al flujo de CO₂ depende de las características físicas de la muestra, como es la porosidad y el tamaño de partículas. Los valores de porosidad en un lecho empacado representan el espacio vacío que se genera dentro del extractor y por donde debiera circular el CO₂ (Fornari *et al.*, 2012), la porosidad del lecho resultó tener un valor igual a 66,03±1,26 % (Anexo A, Tabla A-5).

4.2 RENDIMIENTO

Para el estudio de las condiciones que aumentan el rendimiento, los ensayos de extracción se llevaron a cabo usando un diseño factorial que se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Rendimiento de extracción (Y_1 g extracto/ kg SS), en función de las condiciones de co-solvente (%p/p) y presión (MPa).

Set	C	P	X_1	X_2	Y_1
	%p/p	MPa	(-)	(-)	g/kg SS
1	0,5	20	-1	-1	6,29±1,33
2	1,5	20	1	-1	5,69±0,42
3	0,5	40	-1	1	21,86±1,80
4	1,5	40	1	1	19,11±1,73
5	1,0	30	0	0	22,70±0,95
6	1,0	30	0	0	24,46±1,13
7	1,0	30	0	0	22,61±1,04
8	1,0	30	0	0	22,35±0,71

C : co-solvente; P : presión.

La Tabla 4.2 muestra el promedio del rendimiento de extracción (Y_1 g extracto/ kg SS) de las 8 experiencias realizadas en duplicado, como una función de porcentaje de co-solvente (X_1 , %p/p) y de la presión de extracción (X_2 , MPa). El rendimiento de extracción experimental de extracto de *L. rivularis*, con CO₂ supercrítico se encuentra en un rango entre 5,69 y 24,46 g extracto/ kg SS, diferencia de 4,3 veces entre el valor más alto y más bajo.

4.2.1 Análisis de varianza

Con los resultados de rendimiento de extracción y empleando el software Design Expert, se realizó un análisis de varianza para el modelo cuadrático. En la Tabla 4.3 se observa que el valor de p definido en el análisis de varianza demuestra que el modelo cuadrático es adecuado para describir la respuesta rendimiento de extracción, ya que es significativo ($p=0,0002$), al tener un valor pequeño indica que existe poca probabilidad de error experimental.

Tabla 4.3 Análisis de varianza del modelo cuadrático para el rendimiento de extracción.

Variables respuesta	Y_1	
Coefficientes de regresión	Estimado	p
X_1	-0,8375	0,1671
X_2	+7,2475	0,0001
X_1^2	-9,7925	0,0002
Indicadores estadísticos		
Modelo (valor- F)	136,67	0,0002
R^2	0,990	
Relación señal/ruido	25,45	
C.V.	5,48	

La Tabla 4.3 muestra los indicadores estadísticos, que entregan información de la idoneidad del modelo cuadrático. El valor de $F=136,67$, indica que la respuesta resultó ser significativa, con una probabilidad $p=0,0002$ de que el modelo presentara fallas debido a perturbaciones experimentales. El coeficiente de correlación R^2 tiene un valor de 0,990, lo que indica la relación que existe entre los valores experimentales y los valores predichos, por lo que siendo este valor cercano a 1, el comportamiento del rendimiento de extracción respecto a las variables, es adecuado y un modelo significativo (esto significa que el modelo explica en un 99% la variabilidad observada en la respuesta Y_1). Por otro lado la relación señal/ ruido resultó ser 25,45, un valor superior a 4, lo que revela que el modelo explica de una manera adecuada el comportamiento de la respuesta y que su calidad no se vio afectada por errores no controlables.

Finalmente el coeficiente de variación (C.V.= 5,48) indica que existe poca dispersión entre los datos y la media.

En la Tabla 4.3 se muestran sólo los coeficientes de regresión significativos ($p < 0,01$), los que fueron utilizados para obtener la ecuación 4.1 donde se describe el comportamiento de la respuesta en función de las variables X_1 (porcentaje de co-solvente %p/p) y X_2 (presión de extracción MPa).

$$Y_1 = 23,03 - 0,8375X_1 + 7,2475X_2 - 9,7925X_1^2 \quad (4.1)$$

Para la respuesta Y_1 , se observa que el mayor efecto fue del término cuadrático de co-solvente ($X_1^2 = -9,7925$), seguido por el término lineal de presión ($X_2 = +7,2475$). Se mantuvo el término lineal de co-solvente ($X_1 = -0,8375$) que no fue significativo ($p = 0.1671$) para mantener la jerarquía del modelo (Tabla 4.3).

4.2.2 Superficie de respuesta

La Figura 4.1 muestra la superficie respuesta para el rendimiento de extracción, donde es posible observar con mayor claridad el efecto de las variables co-solvente y presión sobre la respuesta Y_1 en el extracto de tallo de *L. rivularis*.

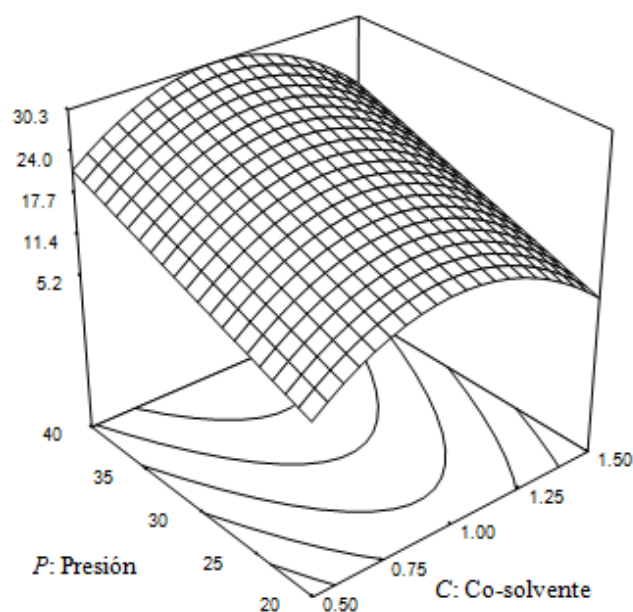


Figura 4.1 Superficie de respuesta para rendimiento de extracción (Y_1 , g/ kg SS), en función de la presión (P , MPa) y uso de co-solvente (C , %p/p).

En la Figura 4.1 se muestra el efecto que tienen las dos variables en el rendimiento. El efecto lineal de la presión fue significativo ($p=0,0001$), así el rendimiento (Y_1) aumentó de 15,8 a 30,3 g/ kg SS cuando la presión cambió de 20 a 40 MPa, con un uso de co-solvente de 1 %p/p. Respecto a esto, se puede observar que a medida que la presión aumenta el rendimiento también lo hace, lo cual se debe a que el aumento de la presión genera un aumento de la solubilidad, generando incremento en la eficiencia de la extracción (Reverchon y de Marco, 2006). Además, el aumento de la presión disminuye la distancia media entre las moléculas y acelera la transferencia de masa de analitos, por lo tanto, aumenta las interacciones soluto-solvente (Bimakr *et al.*, 2011). La densidad determina las interacciones entre moléculas de CO_2 y de los compuestos orgánicos, por lo que con suficientes interacciones, las fuerzas de cohesión entre las moléculas individuales del compuesto orgánico se rompen, dando lugar a la solubilización y una mejora en la extracción (Yamini *et al.*, 2008).

En relación al uso de co-solvente, se observa que el rendimiento de extracción disminuye al aumentar el porcentaje de co-solvente utilizado. A partir de la ecuación 4.1, el efecto cuadrático de co-solvente (X_1^2) sobre la respuesta de rendimiento Y_1 fue significativo ($p=0,0002$), siendo éste el coeficiente de mayor magnitud. Esto se observa por ejemplo a 40 MPa, donde Y_1 aumenta de 21,3 a 30,3 g/ kg SS cuando el co-solvente aumenta de 0,5 a 1 %p/p, y luego Y_1 disminuye hasta

Actividad antioxidante y anti-inflamatoria de extractos de palo negro (*Leptocarpha rivularis*) obtenidos por extracción supercrítica

19,6 g/ kg SS cuando el co-solvente aumenta hasta 1,5 %p/p. Este comportamiento se observa para todo el rango de presión (Figura 4.1).

Sodeifian *et al.* (2016) realizaron un estudio para optimizar la extracción de aceite de *Launaea acanthodes*, utilizando CO₂ supercrítico y etanol como co-solvente, donde la temperatura y presión utilizadas fueron 55 °C y 24 MPa respectivamente, se observó que el rendimiento mejoraba al aumentar el co-solvente de 0 a 650 µL, pero disminuyó al aumentar a 720 µL. Baysal *et al.* (2000), también informan un comportamiento similar en la extracción supercrítica de pasta de tomate utilizando etanol como co-solvente. Cuando se fijó la temperatura y presión a 40 °C y 25 MPa respectivamente, el mayor rendimiento de extracción lo obtuvo con 5 %p/p de etanol (rendimiento = 2,30 g/ 100g) y al aumentar el etanol a 10 %p/p el rendimiento disminuyó a 1,69 g/ 100g. Estos autores indicaron que el comportamiento observado al aumentar la concentración de etanol en la extracción produjo una disminución en la densidad molar del disolvente, lo que disminuyó su capacidad disolvente. También Castro *et al.* (2013) y Babovic *et al.* (2010), observaron en sus estudios este efecto e indicaron que esto puede ser debido a dos factores. El primer factor señala que el aumento en la concentración de etanol puede inducir la formación de dos fases como resultado de la saturación de CO₂, disminuyendo el poder disolvente de la mezcla, el segundo factor que mencionan es que en el aumento de la concentración del co-solvente se forman más enlaces de hidrógeno entre moléculas de etanol que enlaces etanol-soluto; y al reducir la interacción con las moléculas polares del soluto, el efecto del co-solvente se ve reducido en la extracción con fluido supercrítico.

En relación a las investigaciones antes mencionadas, el efecto del co-solvente en el rendimiento de extracción aumenta a medida que la concentración de etanol también lo hace ya que esto estimula la extracción de solutos polares y por lo tanto el aumento en el rendimiento, sin embargo llega a un punto máximo que al continuar aumentando el co-solvente el rendimiento de extracción disminuye. Este comportamiento se pudo observar en el presente estudio, y puede ser explicado a través de la disminución de la densidad del disolvente, también por la saturación del CO₂, o bien por la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de etanol.

4.3 EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES

Para evaluar el efecto de la concentración de co-solvente y de la presión en la actividad antioxidante de tallos de *L. rivularis*, los ensayos de extracción se realizaron bajo un diseño experimental que se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Extracción de antioxidantes (Y_2 mmol de TE/ kg SS) en función de las condiciones de co-solvente (%p/p) y presión (MPa).

Set	C	P	X_1	X_2	Y_2
	%p/p	MPa	(–)	(–)	mmol de TE/kg SS
1	0,5	20	-1	-1	0,0224±0,003
2	1,5	20	1	-1	0,0130±0,001
3	0,5	40	-1	1	0,0576±0,001
4	1,5	40	1	1	0,0450±0,009
5	1,0	30	0	0	0,0500±0,004
6	1,0	30	0	0	0,0573±0,008
7	1,0	30	0	0	0,0536±0,002
8	1,0	30	0	0	0,0569±0,011

C : co-solvente; P : presión.

La Tabla 4.4 muestra el promedio de la extracción de antioxidantes (Y_2 , mmol de TE/ kg SS). Las 8 experiencias realizadas en duplicado, como una función de porcentaje de co-solvente (X_1 , %p/p) y de la presión de extracción (X_2 , MPa). La extracción de antioxidante experimental de extracto de *L. rivularis*, con CO₂ supercrítico se encuentra en un rango entre 0,0130 y 0,0576 mmol de TE/ kg SS, diferencia de 0,0576/0,0130= 4,4 veces entre el valor más alto y más bajo.

4.3.1 Análisis de varianza

Con los resultados de extracción de antioxidantes y empleando el software Design Expert, se realizó un análisis de varianza para el modelo cuadrático. En la Tabla 4.5 se observa que el valor de p definido en el análisis de varianza demuestra que el modelo cuadrático es adecuado para describir la respuesta de extracción de antioxidantes, ya que es significativo ($p<0,05$), como se

dijo anteriormente, al tener un valor pequeño indica que existe poca probabilidad de error experimental.

Tabla 4.5 Análisis de varianza del modelo cuadrático para la extracción de antioxidantes.

Variables respuesta	Y_2	
Coeficientes de regresión	Estimado	p
X_1	-0,00549	0,0516
X_2	+0,01682	0,0011
X_1^2	-0,01923	0,0024
Indicadores estadísticos		
Modelo (valor- F)	41,49	0,0018
R^2	0,969	
Relación señal/ ruido	15,78	
C.V.	9,07	

La Tabla 4.5 muestra los indicadores estadísticos, que entregan información de la idoneidad del modelo cuadrático. El valor de $F=41,49$, nos indica que la respuesta resultó ser significativa, con una probabilidad $p=0,0018$ de que el modelo presentara fallas debido a perturbaciones experimentales. El coeficiente de correlación R^2 tiene un valor de 0,969, lo que indica la proporción de variación que existe entre los valores experimentales y los valores predichos, por lo que siendo este valor cercano a 1, refleja que el comportamiento de la extracción de antioxidantes respecto a las variables, es adecuado y un modelo significativo. Por otro lado la relación señal/ ruido resultó ser 15,78, un valor superior a 4, lo que revela que el modelo explica de una manera adecuada el comportamiento de la respuesta y que su calidad no se vio afectada por errores no controlables. Finalmente el coeficiente de variación ($C.V.= 9,07$) indica que existe poca dispersión entre los datos y la media.

En la Tabla 4.5 se muestran sólo los coeficientes de regresión significativos ($p<0,05$), los que fueron utilizados para obtener la ecuación 4.2 donde se describe el comportamiento de la

respuesta de actividad antioxidante (Y_2), en función de las variables X_1 (porcentaje de co-solvente %p/p) y X_2 (presión de extracción MPa).

$$Y_2 = 5,37 \times 10^{-2} - 5,49 \times 10^{-3}X_1 + 1,68 \times 10^{-2}X_2 - 1,92 \times 10^{-2}X_1^2 \quad (4.2)$$

Para la respuesta Y_2 , se observa que el mayor efecto fue del término cuadrático de co-solvente ($X_1^2 = -1,92 \times 10^{-2}$), seguido por el término lineal de presión ($X_2 = +1,68 \times 10^{-2}$). Se mantuvo el término lineal de co-solvente ($X_1 = -5,49 \times 10^{-3}$) que no fue significativo ($p=0,0516$) para mantener la jerarquía del modelo (Tabla 4.5).

4.3.2 Superficie de respuesta

La Figura 4.2 muestra la superficie de respuesta para la extracción de antioxidantes, donde es posible observar el efecto de las variables co-solvente y presión sobre la respuesta la actividad antioxidante Y_2 del extracto de tallo de *L. rivularis*.

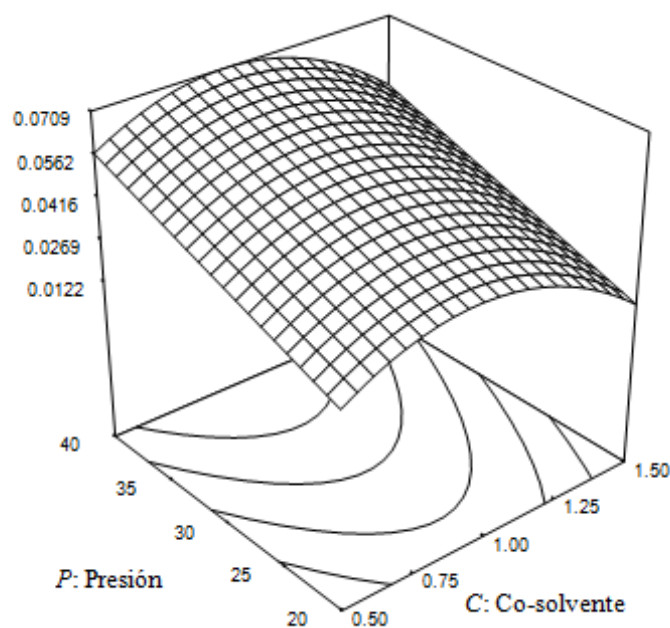


Figura 4.2 Superficie de respuesta para la extracción de antioxidantes (Y_2 , mmol TE/ kg SS), en función de la presión (P , MPa) y uso de co-solvente (C , %p/p).

En la Figura 4.2 se muestra el efecto que tienen las dos variables en la actividad antioxidante. El efecto lineal de la presión fue significativo ($p=0,0011$) (Tabla 4.5). A partir de la ecuación 4.2, la respuesta (Y_2) aumentó de 0,037 a 0,071 mmol TE/ kg SS, (aumentó 1,9 veces) cuando la presión cambió de 20 a 40 MPa, utilizando co-solvente 1 %p/p. Respecto a esto, se puede observar que a medida que la presión aumenta la actividad antioxidante también lo hace. Con el aumento de la presión, la densidad del fluido supercrítico también aumenta, y con ello el poder solvente, permitiendo la extracción de compuestos antioxidantes. De hecho, los fluidos supercríticos de densidades más altas tienen mayor potencia de solvatación y por tanto, permiten mayor extracción de compuestos bioactivos (Norulaini *et al.*, 2009).

En la ecuación 4.2, se puede ver que el efecto cuadrático del co-solvente (X_1^2) sobre la actividad antioxidante (Y_2) fue significativo ($p=0,0024$) (Tabla 4.5). Esto se observa por ejemplo a 40 MPa, donde Y_2 aumenta de 0,057 a 0,071 mmol TE/kg SS, cuando el co-solvente aumenta de 0,5 a 1 %p/p, y luego disminuye hasta 0,046 mmol TE/kg SS cuando el co-solvente aumenta hasta 1,5 %p/p. Este comportamiento se observa para todo el rango de presión (Figura 4.2).

Un efecto similar se observó en un estudio realizado por Souza *et al.* (2015), donde se realizó una extracción con CO₂ supercrítico y etanol como co-solvente, de compuestos antioxidantes de propóleo verde brasileño; a 35 MPa de presión y 50 °C de temperatura, la actividad antioxidante aumentó con el uso de co-solvente, donde la mayor cantidad de antioxidantes se obtuvo utilizando 1 %p/p de etanol ($145,25 \pm 3,62$ IC₅₀ (µg/mL)), pero cuando se aumentó a 2 %p/p la actividad antioxidante disminuyó a $193,75 \pm 4,27$ IC₅₀ (µg/ml). Estos autores explicaron que este comportamiento se debía a que el etanol presenta en sus moléculas el grupo OH, los cuales son capaces de formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por otro lado los componentes polares del soluto también los forman, por lo tanto, con el fin de que se formen enlaces de hidrógeno esta vez entre el soluto y el etanol, es necesaria energía para la ruptura de los enlaces entre las moléculas de etanol y los enlaces entre las moléculas polares del soluto. Sin embargo cuando la cantidad de co-solvente (% etanol) es demasiado alta, la energía no será suficiente para romper los enlaces de etanol, por lo que solo los compuestos menos polares se solubilizan por el disolvente y se reduce la extracción de los compuestos de interés, causando una disminución en el rendimiento de extracción y en la actividad antioxidante.

Junto con la explicación anterior, el efecto observado en este estudio, también se puede manifestar por la disminución de la densidad del disolvente al aumentar la concentración de etanol y también por la formación de dos fases como resultado de la saturación de CO₂ (Baysal *et al.*, 2000; Babovic *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2013).

4.4 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

La Tabla 4.6 muestra resultados de la medición de la actividad antiinflamatoria (Y_3 , IC₅₀ mg/mL). Las 8 experiencias realizadas en duplicado, como una función de concentración de co-solvente (X_1 , %p/p) y de la presión de extracción (X_2 , MPa). La actividad antiinflamatoria experimental de extracto de *L. rivularis*, con CO₂ supercrítico se encuentra en un rango entre 2,37 y 4,33 mg/mL, diferencia de 1,8 veces entre el valor más alto y más bajo.

Tabla 4.6 Actividad antiinflamatoria (Y_3 , IC₅₀ mg/mL) en función de las condiciones de co-solvente (%p/p) y presión (MPa).

Set	C	P	X_1	X_2	Y_3
	%p/p	MPa	(-)	(-)	IC ₅₀ g/mL
1	0,5	20	-1	-1	3,22
2	1,5	20	1	-1	2,37
3	0,5	40	-1	1	4,33
4	1,5	40	1	1	3,27
5	1,0	30	0	0	3,88
6	1,0	30	0	0	4,16
7	1,0	30	0	0	4,03
8	1,0	30	0	0	3,76

C : co-solvente; P : presión.

4.4.1 Análisis de varianza

Con los resultados de actividad antiinflamatoria y empleando el software Design Expert, se realizó un análisis de varianza para el modelo cuadrático. En la Tabla 4.7 se observa que el valor de p definido en el análisis de varianza demuestra que el modelo cuadrático es adecuado para

describir la respuesta actividad antiinflamatoria, ya que es significativo ($p < 0,05$), como se dijo anteriormente, al tener un valor pequeño indica que existe poca probabilidad de error experimental.

Tabla 4.7 Análisis de varianza del modelo cuadrático para la actividad antiinflamatoria.

Variables respuesta	Y_3	
Coeficientes de regresión	Estimado	p
X_1	-0,478	0,0037
X_2	+0,503	0,0031
X_1^2	-0,659	0,0041
Indicadores estadísticos		
Modelo (valor- F)	37,45	0,0022
R^2	0,966	
Relación señal/ ruido	17,59	
C.V.	4,35	

La Tabla 4.7 muestra los indicadores estadísticos, que entregan información de la idoneidad del modelo cuadrático. El valor de $F=37,45$, nos indica que la respuesta resultó ser significativa, con una probabilidad $p=0,0022$ de que el modelo presentara fallas debido a perturbaciones experimentales. El coeficiente de correlación R^2 tiene un valor de 0,966, lo que indica la relación que existe entre los valores experimentales y los valores predichos, por lo que siendo este valor cercano a 1, el comportamiento de la actividad antiinflamatoria respecto a las variables, es adecuado y un modelo significativo. Por otro lado la relación señal/ ruido resultó ser 17,59, un valor superior a 4, lo que revela que el modelo explica de una manera adecuada el comportamiento de la respuesta y que su calidad no se vio afectada por errores no controlables. Finalmente el coeficiente de variación ($C.V.= 4,35$) indica que existe poca dispersión entre los datos y la media.

En la Tabla 4.7 se muestran sólo los coeficientes de regresión significativos ($p < 0,05$), los que fueron utilizados para obtener la ecuación 4.3 donde se describe el comportamiento de la

respuesta de actividad antiinflamatoria (Y_3), en función de las variables X_1 (porcentaje de co-solvente %p/p) y X_2 (presión de extracción MPa).

$$Y_3 = 3,9537 - 0,4775X_1 + 0,5025X_2 - 0,6587X_1^2 \quad (4.3)$$

Para la respuesta Y_3 , se observa que el mayor efecto fue del término cuadrático de co-solvente ($X_1^2 = -0,6587$), seguido por el término lineal de presión ($X_2 = +0,5025$) y el término lineal de co-solvente ($X_1 = -0,4775$) (Tabla 4.7).

4.4.2 Superficie de respuesta

La Figura 4.3 muestra la superficie de respuesta para la actividad antiinflamatoria, donde es posible observar efecto de las variables co-solvente y presión sobre la respuesta actividad antiinflamatoria Y_3 en el extracto de tallo de *L. rivularis*.

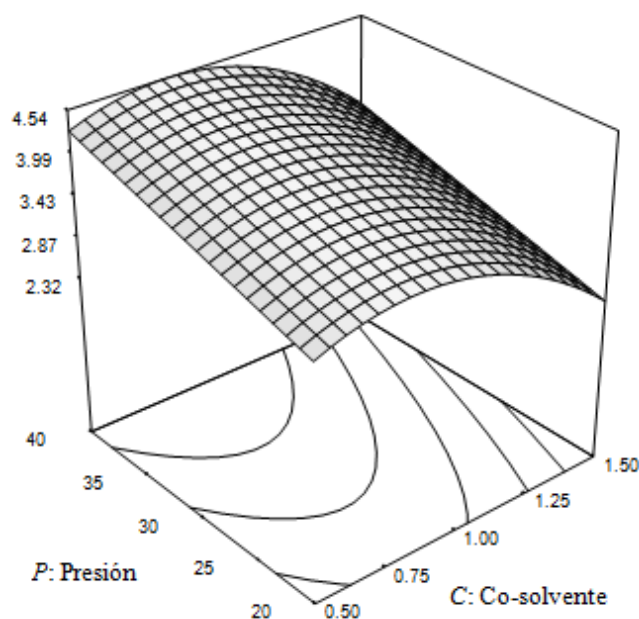


Figura 4.3 Superficie de respuesta para actividad antiinflamatoria (Y_3 , IC_{50} mg/ mL), en función de la presión (P , MPa) y uso de co-solvente (C , %p/p).

En la Figura 4.3 se muestra el efecto que tienen las dos variables en la actividad antiinflamatoria. El efecto lineal de la presión fue significativo ($p=0,0031$) (Tabla 4.7). A partir de la ecuación 4.3,

la respuesta (Y_3) aumentó de 3,45 a 4,46 IC_{50} mg/ mL, (aumentó 1.3 veces) cuando la presión cambió de 20 a 40 MPa, utilizando co-solvente 1 %p/p. El valor IC_{50} representa la concentración de extracto (mg/mL) necesaria para inhibir en un 50% la actividad de la lipoxigenasa. Por tanto, cuanto menor sea el valor IC_{50} , mayor será su capacidad anti-inflamatoria. Por tanto, se puede observar que a medida que la presión aumenta la actividad antiinflamatoria disminuye.

En la ecuación 4.3, se observa que el efecto lineal (X_1) ($p=0,0037$) y cuadrático (X_1^2) ($p=0,0041$) del co-solvente sobre la actividad antiinflamatoria (Y_3) fueron significativos (Tabla 4.7). Esto se observa por ejemplo a 40 MPa, donde Y_3 aumenta de 4,28 a 4,46 IC_{50} mg/ mL cuando el co-solvente aumenta de 0,5 a 1 %p/p, y luego disminuye a 3,32 IC_{50} mg/ mL cuando el co-solvente aumenta hasta 1,5 %p/p. Este comportamiento se observa para todo el rango de presión (Figura 4.3). Por lo que se puede decir que la actividad antiinflamatoria disminuyó (rango 0,5–1,0 %p/p) y aumentó (rango 1,0–1,5 %p/p) con la concentración creciente de co-solvente.

El comportamiento de la actividad antiinflamatoria frente a la presión puede estar relacionado a que en condiciones cercanas a 22 MPa y 60°C se extraen en mayor cantidad triterpenos y esteroides (Castola *et al.*, 2005), los cuales tienen capacidad antiinflamatoria y antioxidante (Martínez *et al.*, 2006) y además en esta condición de presión el uso de etanol como co-solvente aumentó la extracción de compuestos polares con actividad antiinflamatoria y antioxidante, como compuestos fenólicos (Bitencourt *et al.*, 2014). Ramírez *et al.* (2004) extrajeron compuestos con actividad antioxidante a 60°C usando presiones que iban desde los 10 a 40 MPa. Por lo que al seguir aumentando la presión de 20 a 40 MPa se extrajeron menos componentes con actividad antiinflamatoria.

En la cascada inflamatoria se libera el ácido araquidónico el cual es el responsable de dar la señal de inflamación al ser liberado con ayuda de la fosfolipasa A_2 luego de la agresión celular. Seguido, éste es metabolizado por las lipoxigenasas o por las ciclooxigenasas. Las lipoxigenasas generan leucotrienos por acción oxidativa lo cual puede ser detenido por los compuestos fenólicos que pueden inhibir la actividad de la lipoxigenasa, por desacoplamiento del ciclo redox de la lipoxigenasa en el sitio activo del hierro presente en la enzima (Napagoda *et al.*, 2014), y puede servir como un eliminador de la reacción de radicales libres, que se producen durante el metabolismo de este ácido (Chua, 2013; Akula y Odhav, 2008). Kumaraswamy y Satish (2008), trabajaron con el extracto acuoso de raíces de *Thespesia lampas*, señalando la posible relación del

efecto de eliminación de radicales, con la inhibición de la lipoxigenasa, ya que la mayor parte de su acción es catalizar la oxidación del ácido araquidónico produciendo leucotrieno, el cual participa en los procesos de inflamación crónica, aumentando la permeabilidad vascular y favoreciendo, por tanto, el edema en la zona afectada. Los antioxidantes pueden limitar la disponibilidad de hidroperóxidos necesarios para el ciclo catalítico de la lipoxigenasa. Los resultados reportados del extracto de *Thespesia lampas* mostraron la capacidad de reducir la iniciación de radicales libres o retardar la reacción en cadena de radicales libres en la propagación del mecanismo de oxidación, reduciendo la actividad antiinflamatoria. La mayoría de los inhibidores de lipoxigenasa son antioxidantes eliminadores de radicales libres, ya que la lipoxigenación se produce a través de un radical libre (Demerci *et al.*, 2011), dejando ver que la presencia de antioxidantes en las plantas tiene directa relación con la actividad antiinflamatoria (Leelaprakash *et al.*, 2012; Akula y Odhav, 2008). Es por esto que se puede inferir que el comportamiento de la actividad antiinflamatoria respecto a la concentración del co-solvente observado en este estudio, está directamente relacionado al comportamiento de la actividad antioxidante del extracto, la cual aumenta a medida que la concentración de etanol también lo hace, ya que esto estimula la extracción de solutos polares (Castro *et al.*, 2013; Babovic *et al.*, 2010; Baysal *et al.*, 2000).

Aunque los fármacos esteroides y no esteroides se utilizan actualmente para tratar la inflamación aguda, de manera eficaz, tienen un gran número de efectos secundarios inesperados. Por lo tanto, los productos naturales y sus derivados semisintéticos pueden proporcionar alternativas adecuadas (Singh *et al.*, 2014).

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

La mejor condición de extracción con CO₂ supercrítico de *L. rivularis*, a 60 °C determinada en este estudio, fue a la presión más alta que se utilizó que fue 40 MPa y usando la concentración intermedia de etanol como co-solvente, que fue 1 %p/p. En estas condiciones el rendimiento y la extracción de compuestos antioxidantes obtuvieron los mejores resultados, siendo estos 30,3 g/kg SS y 0,071 mmol de TE/ kg SS respectivamente. En ésta condición la actividad antiinflamatoria tuvo un valor de 4,46 IC₅₀ g/mL siendo éste el más bajo. El mejor resultado para la actividad antiinflamatoria fue 2,37 IC₅₀ g/mL que se obtuvo a la presión más baja (20 MPa) y usando una concentración de 1,5 %p/p de etanol como co-solvente. El modelo estadístico obtenido en las tres respuestas, muestra que la variable cuadrática de co-solvente generó un mayor efecto, seguido de la variable lineal de presión.

En el rendimiento y en la extracción de compuestos antioxidantes se observó un efecto positivo a medida que la presión crecía, debido a que aumentaba la densidad del fluido supercrítico y por ende el poder solvente de éste. En cambio en la actividad antiinflamatoria el efecto fue negativo.

En este estudio, se identificó que la adición de etanol como co-solvente en el sistema, es una ventaja para mejorar el proceso de extracción de los compuestos biológicamente activos presentes en *L. rivularis*, debido a la característica polar de los compuestos activos. Todas las respuestas tuvieron el mismo comportamiento creciente ante el aumento de la concentración del co-solvente de 0,5 a 1,0 %p/p, pero, al seguir aumentando la concentración de éste, desde 1,0 a 1,5 %p/p, los resultados de rendimiento y de compuestos antioxidantes disminuyeron.

La extracción por CO₂ supercrítico con adición de etanol como co-solvente, constituye un proceso moderno, limpio y seguro para extraer componentes con actividad antioxidante y antiinflamatoria desde tallos de *L. rivularis*, siendo ésta matriz vegetal de gran interés por su actividad biológica y por su potencial aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.

BIBLIOGRAFÍA

Akula, U., Odhav, B. (2008). "In vitro 5-Lipoxygenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plants of South Africa". *Journal of Medicinal Plants*, **2** (9): 207 - 212.

AOAC (1990). "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists". 15th edition. Washington DC, USA.

ASAE (2000). ASAE S319.3 Method of determining and expressing fineness of feed materials by sieving. In ASAE Standards. *American Society of Agricultural Engineers*, St. Joseph, MI, USA, pp. 563 - 566.

Babando, A., Moodley, B., Chenia, H., Koorbanally, N. (2015). "Sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Vernonia blumeoides* growing in Nigeria". *Phytochemistry*, **111**: 163 - 168.

Babovic, N., Djilas, S., Jadranim, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S., Zizovic, I. (2010). "Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected *Lamiaceae* herbs and their antioxidant capacity". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**: 98 - 107.

Badens, E., Crampón, C., Larkeche, O., Meniai, A., Zermane, A. (2016). "Optimization of Algerian rosemary essential oil extraction yield by supercritical CO₂ using response surface methodology". *Comptes Rendus Chimie*, **19**: 538 - 543.

Baysal, T., Ersus, S., Starmans, D. (2000). "Supercritical CO₂ extraction of β -carotene and lycopene from tomato paste waste". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** (11): 5507 - 5511.

Belitz, H., Grosch, W. (1999). "Food Chemistry". Springer Editorial. Berlín.

Bimakr, M., Rahman, R., Traip, F., Ganjloo, A., Salleh, L., Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I. (2011). "Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves". *Food and Bioproducts Processing*, **89**: 67 - 72.

- Bitencourt, R., Queiroga, C., Duarte, G., Eberlin, M., Kohn, L., Arns, C., Cabral, F. (2014). "Sequential extraction of bioactive compounds from *Melia azedarach* L. in fixed bed extractor using CO₂, ethanol and water". *The Journal of the Supercritical Fluids*, **95**: 355 - 363.
- Börjesson, E., Innings, F., Tragardh, C., Bergenstahl, B., Paulsson, M. (2014). "Evaluation of particle measures relevant for powder bed porosity. A study of spray dried dairy powders". *Powder Technology*, **253**: 453 - 463.
- Bruzual, H., Henríquez, W., Crescente, O., Lanza, J. (2015). "Aceite esencial de *Wedelia calycina* (asteraceae): composición química, actividad antibacteriana y antifúngica". *Saber, Universidad de Oriente*, **27** (1): 87 – 93.
- Carcamos, J., Carraso, H., Contreras, C., García, C., Gutiérrez, E., Késternich, V., Martínez, R., Montenegro, C., Moreno, J., Ugarte, R., Werner, E. (2006). "Synthesis and conformational analysis of leptocarpin derivatives". *Journal of the Chilean Chemical Society*, **51**: 1010 - 1014.
- Castola, V., Marongiu, B., Bighelli, A., Floris, C., Casanova, J. (2005). "Extractives of cork (*Quercus suber* L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical CO₂ extracts". *Industrial Crops and Products*, **21**: 65 - 69.
- Castro, H., Benelli, P., Ferreira, S., Parada, F. (2013). "Supercritical fluid extracts from tamarillo (*Solanum bataveum* Sendtn) epicarp and its application as protectors against lipid oxidation of cooked beef meat". *The Journal of Supercritical Fluids*, **76**: 17 - 23.
- Chua, L. (2013). "A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities". *Journal of Ethnopharmacology*, **150** (3): 805 - 817.
- Danh, T., Truong, P., Mammucari, R., Foster, N. (2010). "Extraction of vetiver essential oil by ethanol-modified supercritical carbon dioxide". *Chemical Engineering Journal*, **165**: 26 - 34.
- del Valle, J., Aguilera, M. (1999). "Extracción con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos". *Food Science and Technology International*, **5**: 1 - 24.
- del Valle, J., Germain, J., Uquiche, E., Ztzi, C., Brunner, G. (2006). "Microstructural effects on internal mass transfer of lipids in prepressed and flaked vegetable substrates". *The Journal of Supercritical Fluids*, **37**: 178 - 190.

- Demerci, B., Edip, H., Portakal, T., Kirmizibekmez, H., Demirci, F., Husnu, K. (2011). "Inhibitory effect of *Calamintha nepeta* subsp glandulosa essential oil on lipoxygenase". *Turkish Journal of Biochemistry*, **36** (4): 290 - 295.
- Doroso, C., Ramírez, C. (1994). "Arbustos nativos de Chile". Guía de reconocimiento, Marisa Cureo Ediciones. 2° Edición. Valdivia.
- Fornari, T., Vicente, G., Vásquez, E., García, M., Reglero, G. (2012). "Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction". *Journal of Chromatography A*, **1250**: 34 - 48.
- Franco, L., Matiz, G., Calle, J., Pinzón, R., Ospina, L. (2007). "Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana*". Universidad de Cartagena, Colombia.
- García, L., Rojo, D., García, L., Hernández, A. (2002). "Plantas con propiedades antiinflamatorias". *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, **21**: 45 - 49.
- García, M., Hernández, E., Vicente, G., Fornari, T., Señoráns, J., Reglero, G. (2011). "Kinetic study of pilot-scale supercritical CO₂ extraction of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves". *The Journal of Supercritical Fluids*, **55**: 971 - 976.
- Geankoplis, J. (1999). "Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias". Editorial Continental S. A. Tercera edición. México. D. F.
- Gertsh, J., Sticher, O., Shmidt, T., Heilmann, J. (2003). "Influence of helenanolide-type sesquiterpene lactones on gene transcription profiles in Jurkat T cells and human peripheral blood cells: anti-inflammatory and cytotoxic effects". *Biochemical Pharmacology*, **66** (11): 2141 - 2153.
- Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N., Darwiche, N. (2010). "What made sesquiterpene lactones reach cáncer clinical trials?". *Drug Discovery Today*, **15**: 668 - 678.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasura, T., Okuda, T. (1998). "Two new flavonoid and other constituent in licore rot: their relative astringency and radical scavenging effects". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **36**: 2090 - 2097.

Hernández, J., Padilla, C., Angeli, M., Hernández, R., Pacheco, B., Sosa, B. (2002). “Efecto del Zileuton, un inhibidor de la 5-lipoxigenasa en pacientes con asma moderada”. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, **21** (1): 28 - 38.

Hoffmann, A. (2005). “Flora silvestre de Chile, zona Araucanía”. Ediciones Fundación Claudio Gay. Quinta edición. Santiago de Chile.

Ivanovic, J., Ristic, M., Skala, D. (2011). “Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO₂ density and moisture content of plant material”. *The Journal of Supercritical Fluids*, **57** (2): 129 - 136.

Jazet, P., Tchoumboungang, F., Ndongson, B., Agwanande, W., Sandjon, B., Amvam, P., Menut, C. (2010). “Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon”. *Agriculture and Biology Journal of North America*, **1**: 606 - 607.

Kamatou, G., Viljoen, A., Steenkamp, P. (2010). “Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African salvia species”. *Food Chemistry*, **119** (2): 684 - 688.

Kumaraswamy, M., Satish, S. (2008). “Antioxidant and Anti-Lipoxygenase Activity of *Thespesia lampas* Dalz & Gibs”. *Advances in Biological Research*, **2** (3 - 4): 56 - 59.

Leelaprakash, G., Caroline, J., Mohan, S. (2012). “In vitro anti-inflammatory activity of *Momordica charantia* by inhibition of lipoxygenase enzyme”. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**: 148 - 152.

Macías, M., Mantell, C., Rodríguez, M., de la Ossa, E. (2009). “Kinetics of the supercritical fluid extraction of carotenoids from microalgae with CO₂ and ethanol as cosolvent”. *Chemical Engineering Journal*, **150**: 104 - 113.

Malecka, M. (2002). “Antioxidant properties of the unsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil”. *Food Chemistry*, **79**: 327 - 330.

Martínez, R., Kesternich, V., Carrasco, H., Álvarez, C., Montenegro, C., Ugarte, R., Gutiérrez, E., Moreno, J., García, C., Werner, E., Cárcamos, J. (2006). “Synthesis and conformational

analysis of *leptocarpin* derivatives: influence of modification of the oxirane ring on leptocarpin's cytotoxic activity". *Journal of the Chilean Chemical Society*, **51**: 1010 - 1014.

Martínez, R., Kesternich, V., Gutierrez, E., Dolz, H., Mansanilla, H. (1995). "Conformational analysis and biological activity of *Leptocarpin* and *leptocarpin acetate*". *Planta Medica*, **61**: 188 - 189.

McCabe, W., Smith, J., Harriot, P. (2007). "Operaciones unitarias en ingeniería química". Editorial Mc Graw Hill interamericana. México. D. F.

Murga, R. (2000). "Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **48**: 3408 - 412.

Napagoda, M., Gerstmeier, J., Wesely, S., Popella, S., Lorenz, S., Scheubert, K., Svatos, A., Werz, O. (2014). "Inhibition of 5-lipoxygenase as anti-inflammatory mode of action of *Plectranthus zeylanicus Benth* and chemical characterization of ingredients by a mass spectrometric approach". *Journal of Ethnopharmacology*, **151**: 800 - 809.

Norulaini, N., Anuar, O., Omar, A., Alkarkhi, A., Setianto, W., Fatehah, M. (2009). "Optimitizacion of SC-CO₂ extraction of zerumbone from *Zingiber zerumbet (L)* Smith". *Food Chemistry*, **114**: 702 - 705.

Pérez, A., Cartaya, L., Valencia, V., Sanjurjo, V., Ilisástigui, T. (1998). "Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación" *Revista Cubana Estomatol*, **35** (2): 56 - 61.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). "Antioxidantes en los Alimentos: Aplicaciones prácticas". Editorial Acribia S.A. Zaragoza.

Pourmortazavi, S., Hajimirsadeghi, S. (2007). "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis". *Journal of Chromatography A*, **1163**: 2 - 24.

Ramírez, P., Senoráns, F., Ibañez, E., Reglero, G. (2004). "Separation of rosemary antioxidant compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns". *Journal of Chromatography A*, **1057**: 241 - 245.

- Reverchon, E., de Marco, I. (2006). "Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter". *The Journal of Supercritical Fluids*, **38** (2): 146 - 166.
- Riedemann, P., Aldunate, G., Teillier, S. (2014). "Arbustos nativos de la zona centro-sur de Chile. Guía de Campo". Ed. Corporación Chilena de la Madera. Concepción.
- Roca, E., Guillard, V., Guilbert, S., Gontard, N. (2006). "Moisture migration in a cereal composite food at high water activity: Effects of initial porosity and fat content". *Journal of Cereal Science*, **43** (2): 144 - 151.
- Safaralie, A., Fatemi, S., Salimi, A. (2010). "Experimental design on supercritical extraction of essential oil from valerian roots and study of optimal conditions". *Food and Bioproducts Processing*, **88** (2 - 3): 312 - 318.
- Sahena, F., Zaidul, I., Jinap, S., Karim, A., Abbas, K., Norulaini, N., Omar, A. (2009). "Application of supercritical CO₂ in lipid extraction. A review". *Journal of Food Engineering*, **95**: 240 - 243.
- Sikwese, F., Duodu, K. (2007). "Antioxidant effect of a crude phenolic extract from sorghum bran in sunflower oil in the presence of ferric ions". *Food Chemistry*, **104**: 324 - 331.
- Singh, M., Kaur, M., Silakari, O. (2014). "Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry". *European Journal of Medicinal Chemistry*, **84**: 206 - 239.
- Sodeifian, G., Sajadian, S., Saadati, N. (2016). "Optimization of essential oil extraction from *Launaea acanthodes* Boiss: Utilization of supercritical carbon dioxide and cosolvent". *The Journal of Supercritical Fluids*, **116**: 46 - 56.
- Souza, B., de Abreu, G., Silva, A., Serra, S., Pina, R., Silva, D., Figuerêdo, D., Neves, H., Carneiro, J., Nunes, S., Umsza, M., Ferreira, F. (2015). "Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent". *Journal Plos One*, **10** (8): e0134489.
- Sun, M., Temelli, F. (2006). "Supercritical carbón dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as continous co-solvent". *The Journal of Supercritical Fluids*, **37**: 397 - 408.

- Torres, R., Isla, M., Giner, J., Alberto, M. (2015). "Anti-inflammatory properties of hydroalcoholic extracts of *Argentine Puna* plants". *Food Research International*, **67**: 230 - 237.
- Vasapollo, G., Longo, L., Rescio, L., Cirliu, L. (2004). "Innovative supercritical CO₂ extracción of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent". *The Journal of Supercritical Fluids*, **29**: 87 - 92.
- Vásquez, L. (2008). "Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales". Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Velasco, R., Villada, H., Carrera, J. (2007). "Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria". *Información Tecnológica*, **18**: 53 - 66.
- Velásquez, J., Marchant, L., López, C., Mendoza, G., Sánchez, E., Calzada, F., Ortega, A., Sánchez, V., Ramírez, E. (2013). "Effect of the sesquiterpene lactone incompitine A in the energy metabolism of *Entamoeba histolytica*". *Experimental Parasitology*, **135** (3): 503 - 510.
- Yamini, Y., Khajeh, M., Ghasemi, E., Javidnia, K. (2008). "Comparison of essential oil compositions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbón dioxide extraction and hydrodistillation methods". *Food Chemistry*, **108**: 341 - 346.
- Zheng, W., Wang, S. (2001). "Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **49** (11): 5165 - 170.

ANEXOS**ANEXO A. CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULA****Tabla A-1.** Datos para la determinación de humedad inicial de la muestra de tallos de *L. rivularis*.

Peso Placa (g)	Peso Inicial Muestra (g)	Peso Placa + Muestra Inicial (g)	Peso Placa + Muestra Seca (g)	Peso Muestra Seca (g)	Humedad b.h (%)	Humedad promedio b.h (%)	desviación estándar -
27,5043	1,0079	28,5122	28,4460	0,9417	6,568		
28,1031	1,0034	29,1065	29,0411	0,938	6,518	6,624	0,149
28,2198	1,0031	29,2229	29,1574	0,9376	6,530		
28,2669	1,0043	29,2712	29,2021	0,9352	6,880		

Tabla A-2. Determinación del tamaño promedio de partícula por el método ASAE de la muestra de tallos de *L. rivularis*.

Abertura	Diámetro promedio de malla ($\bar{d}_i$)	Masa retenida (w_i)	$w_i \log(\bar{d}_i)$
(mm)	(mm)	(g)	
2,360	2,360	3,29	1,23
1,400	1,818	72,89	18,92
1,000	1,183	70,02	5,12
0,850	0,922	37,50	-1,32
0,600	0,714	18,45	-2,70
0,425	0,505	14,45	-4,29
0,300	0,357	12,97	-5,80
0,250	0,274	2,84	-1,60
0,180	0,212	3,71	-2,50
<u>0</u>	<u>0</u>	<u>2,87</u>	-
		Σ 238,99	Σ 7,05
		Diámetro promedio (d_p , mm)	1,070

Tabla A-3. Datos para la determinación de la densidad aparente (ρ_{ap}) de tallos de *L. rivularis*.

Peso probeta 50 mL (g)	Probeta + muestra (g)	Peso muestra (g)	m/v (g/mL)	ρ_{ap} (kg/m ³)	ρ_{ap} promedio (kg/m ³)	Desviación estándar -
80,8325	93,3024	12,4699	0,2494	249,398		
80,8325	94,1511	13,3186	0,2664	266,372	258,76	8,62
80,8325	93,8581	13,0256	0,2605	260,512		

Tabla A-4. Datos para la determinación de la densidad verdadera (ρ_v) de tallos de *L. rivularis*.

Volumen picnómetro (m ³)	W _p (kg)	W _{total} (kg)	W (kg)	V (m ³)	ρ_v (kg/m ³)	ρ_v promedio (kg/m ³)	Desviación estándar -
0,0000250	0,02051	0,04112	0,00705	9,3410E-06	754,67		
0,0000250	0,02052	0,04117	0,00662	8,7991E-06	752,35	761,91	14,60
0,0000250	0,01994	0,04082	0,00687	8,8222E-06	778,72		

Tabla A-5. Datos para la determinación de porosidad (ϵ) de tallos de *L. rivularis*.

ρ_{ap} (kg/m ³)	ρ_v (kg/m ³)	Porosidad (ϵ)	Porosidad promedio (ϵ)	Desviación estándar -
249,398	754,67	66,95		
266,372	752,35	64,59	66,03	1,26
260,512	778,72	66,55		

ANEXO B. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ENSAYO DPPH

Tabla B-1. Datos para confeccionar la curva de calibración para el ensayo del radical DPPH.

Tubo	Etanol (mL)	Trolox (mL)	DPPH (mL)	Abs	Abs ₀ - Abs	Trolox (mmol Trolox)	ppm Trolox (mg/L)	Trolox (mmol/L)
0	3,20	0	0,80	0,913	0	0	0	0
0	3,20	0	0,80	0,932	0	0	0	0
1	3,18	0,02	0,80	0,796	0,1265	0,005	1,25	0,00499
2	3,16	0,04	0,80	0,678	0,2445	0,010	2,50	0,00998
3	3,14	0,06	0,80	0,558	0,3645	0,015	3,75	0,01498
4	3,12	0,08	0,80	0,412	0,5015	0,020	5,00	0,01997
5	3,10	0,10	0,80	0,295	0,6275	0,025	6,25	0,02497

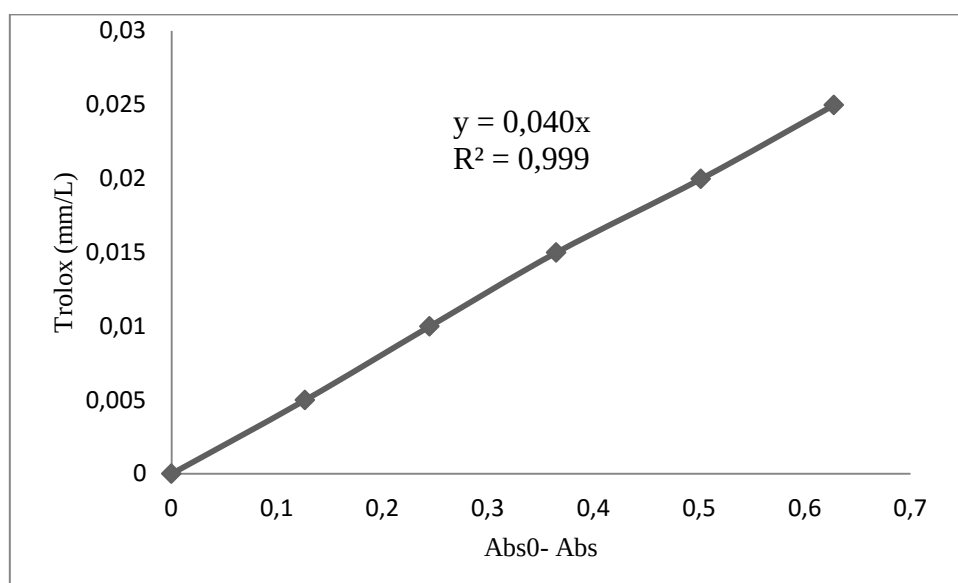


Figura B-1. Curva de calibración para el ensayo del radical DPPH.