

Extracción de aceites esenciales a partir de las plantas Chisacá (*Spilanthes americana*)

Extraction of essential oils from Chisacá plants (*Spilanthes americana*)

Hernan Felipe Pita Benavides ¹, Javier Andrés Dávila Rincón ¹
hernanf.pitab@utadeo.edu.co, javier.a.davilar@utadeo.edu.co

⁽¹⁾ Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Maestría en Ingeniería de Procesos y Sistemas Industriales

Resumen

Se empleó la planta Chisacá (*Spilanthes americana*) para caracterizar el aceite esencial que contienen enfocándose solo en las flores de la planta. Inicialmente, se caracterizó la flor de la planta determinando un porcentaje alto de humedad para la flor de 78.5%. Posteriormente, se utilizó la metodología de extracción Soxhlet para cuantificar la cantidad total de aceite en peso seco obteniendo un 10.56% de aceite en las flores. A continuación, se evaluó el rendimiento de la extracción supercrítica usando etanol como cosolvente logrando así, un 26.7% de rendimiento global para la flor. Posteriormente, se analizaron las muestras por FTIR encontrando picos en 1490 y 1740 cm^{-1} para enlaces dobles $C = O$, $C = N$ y $C = C$, picos en 2854 y 2923 cm^{-1} para los CH_2 del citrato y pico en 3457 cm^{-1} correspondiente al agua. Se analizó compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante del extracto. Se obtuvo 39.1668 mg GAE/g peso seco para compuestos fenólicos totales y 14.28% de captación de DPPH, correspondiente en IC_{50} para DPPH de 0.058 ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Finalmente, se proponen trabajos de investigación futuros con base a los resultados preliminares obtenidos.

Palabras Clave: Extracción Soxhlet, FTIR, Compuestos Fenólicos Totales, Actividad Antioxidante, Chisacá, Extracción Supercrítica.

Abstract

The Chisacá plant (*Spilanthes americana*) was used to characterize the essential oil it contains, focusing only on the flowers of the plant. Initially, the flower of the plant was characterized by determining a high percentage of humidity for the flower of 78.5%. Subsequently, the Soxhlet extraction methodology was used to quantify the total amount of oil in dry weight, obtaining 10.56% oil in the flowers. Next, the performance of the supercritical extraction using ethanol as cosolvent was evaluated, thus achieving a 26.7% overall yield for the flower. Subsequently, the samples were analyzed by FTIR, finding peaks at 1490 and 1740 cm^{-1} for $C = O$, $C = N$ and $C = C$ double bonds, peaks at 2854 and 2923 cm^{-1} for Citrate CH_2 and peak at 3457 cm^{-1} corresponding to water. Total Phenolic compounds and Antioxidant Activity of the extract were analyzed. 39.1668 mg GAE/g dry weight for total phenolic compounds and 14.28% uptake of DPPH, corresponding in IC_{50} for DPPH of 0.058 ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Finally, future research work is proposed based on the preliminary results obtained.

Keywords: Soxhlet Extraction, FTIR, Total Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, Chisacá, Supercritical Extraction.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la revisión bibliográfica para la planta Chisacá (*Spilanthes americana*), no se encuentra información relevante de rendimientos y metodologías de extracción donde se caracterice al detalle el aceite esencial que contiene. Sin embargo, (Zuluaga Lopez, 2017) analiza la composición química de la planta de estudio, únicamente caracterizando químicamente dicho aceite esencial, en especial su principio activo Espilantol o más conocido con su nombre en inglés, “Spilanthol”. En la actualidad, su proceso de extracción es rudimentario (Sharapin, 2000), donde se utiliza toda la planta en el proceso de extracción, a pesar de saber, que el principio activo se encuentra en mayor medida en la flor. Hoy en día, se conocen como principales propiedades, la actividad cicatrizante y disminución de la incidencia de fenómenos inflamatorios, así mismo del tratamiento de aftas y Herpes simplex, al administrar el extracto de la planta (Calle & Caballero, 1977). Lo anterior descrito, permite evidenciar la necesidad de explorar otras técnicas de extracción de aceite de esta flor y la importancia de emplear extracción supercrítica con CO₂.

La extracción de aceites esenciales y en especial los de carácter medicinal, se ha convertido en prioridad debido al incremento en el uso de medicamentos naturales con baja residualidad, además de manejar las mismas eficiencias, con la misma o mejor efectividad, respecto a sus pares sintéticos. Muchos de estos aceites tienen propiedades medicinales más destacables, como lo son el poder antiséptico (*Spilanthes acmella*) (Mithilesh & Rakhi, 2012), frente a un gran número de bacterias patógenas y hongos “Estudio del vapor de 133 aceites esenciales”; propiedades irritantes que provocan el aumento de la microcirculación, sensación de calor y en ciertos casos, ligera acción anestésica local; acción espasmódica sedante donde son capaces de disminuir o suprimir las espasmos gastrointestinales y finalmente, ciertos aceites presentan efectos colerético, donde se facilita la expulsión de la bilis retenida en la vesícula biliar (Muntyan & Likyer, 2022). Este tipo de propiedades finalmente convierte a los aceites esenciales en un producto valioso para el sector farmacéutico.

Otro aspecto importante para analizar es la metodología de extracción de estos aceites esenciales, esto con la finalidad de escoger el mas apropiado. Uno de los de mayor relevancia y mayor rendimiento, es la extracción con fluidos supercríticos (Seied Mahdi & Seiedeh Somayyeh , 2007), donde la técnica utiliza dióxido de carbono líquido, que se calienta y se presuriza hasta pasar la fase de transición donde se torna como un fluido supercrítico. En este estado se mantiene en una sola fase por encima de su temperatura crítica 31.1°C y presión crítica 7.4×10^3 kPA (73.8 bar) (Xiaoxue, Saara , & Erkki , 2014), es decir, para que adquiera propiedades de los gases y los líquidos. En su estado supercrítico, el CO₂ actúa como disolvente, pudiendo disolver o extraer materiales de una matriz vegetal. Es por lo que en este trabajo de investigación se realizó la extracción supercrítica del aceite esencial de la planta Chisacá (*Spilanthes americana*) con cosolvente etanol para así obtener un rendimiento experimental de esta planta. Para ello se evaluó condiciones de presión entre 24.1×10^3 - 27.6×10^3 kPA y Temperaturas entre 35 - 40°C. Se empleo la metodología de FTIR, compuestos Fenólicos Totales y Actividad Antioxidante para caracterizar el aceite extraído.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestra de Chisacá

La muestra de la planta Chisacá fue tomada de la región conocida de Cundinamarca, Colombia como Guayabetal, ubicada en las coordenadas 4°12'55"N 73°48'52"O, aproximadamente. Se determinó retirar las hojas y tallos de la planta y se procedió sólo a utilizar la flor para su posterior secado.

2.2. Determinación inicial de aceite esencial

Para poder determinar el contenido máximo de aceite que puede llegar a contener las muestras, se empleó la metodología de extracción Soxhlet para un material vegetal macerado en peso seco.

2.2.1. Contenido de Humedad, Proceso de Secado y Maceración

Posteriormente al retiro del material orgánico no deseado, se calculó el contenido de humedad de las muestras de acuerdo con el Informe Técnico NREL/TP 510-42620 (Hames, Ruiz, & Scarlata, 2008). Este método es un método convencional de secado que permite conocer el contenido de humedad en una muestra. Es necesaria una muestra representativa homogeneizada según el procedimiento descrito por (Hames, Ruiz, & Scarlata, 2008). Para la medición de la humedad se utilizó un horno convencional (Thermolab, Maharashtra, India) manteniendo la temperatura a 105 °C, la muestra se secó en un plato de pesaje de aluminio durante 4 horas. Pasado este tiempo, la muestra en el plato se retiró del horno y se enfrió en un desecador (Todoquímica, profinas, Bogotá Colombia) durante 30 minutos. Una vez que la muestra alcanzó la temperatura ambiente, se pesó en una balanza analítica (Precisa XR 205SM-DR, Moosmattstrasse Suiza) y se devolvió la muestra a la estufa para que se secase por 1 hora más. La muestra se enfrió nuevamente y se volvió a pesar. Este procedimiento se realizó hasta alcanzar un peso constante de la muestra. Cuando el peso fue constante entonces, se hizo la prueba. Las mediciones se realizaron por triplicado y la humedad se calculó según la ecuación 1.

$$Humedad (\%) = 1 - \left(\frac{Peso_{plato+muestra} - Peso_{plato}}{Peso_{muestra\ inicial}} \right) \quad (1)$$

El proceso de secado se realizó en un horno de convección marca ESCO a 40°C durante 7 horas hasta lograr la estabilización del peso de la muestra. Posteriormente, se deja enfriar y se macera manualmente debido a la naturaleza frágil de la muestra. Es importante mencionar que se va a realizó un ensayo con dos réplicas. Esto con el fin de disminuir errores experimentales y sistemáticos (UDLA).

2.2.2. Extracción Soxhlet

Posteriormente al proceso de secado, la muestra se encapsuló en una malla fina para permitir el contacto solvente-muestra sin que ésta se pierda en el proceso. Se adicionó 50 g de hexano Sigma en concentración 96% v/v a una temperatura entre 70 y 75°C durante seis horas. Se realizó una extracción (Ex)¹ con dos reextracciones a las mismas condiciones iniciales de la primera anteriormente descrita, esto con la finalidad de maximizar la cantidad de aceite que se puede llegar a obtener de una matriz vegetal.

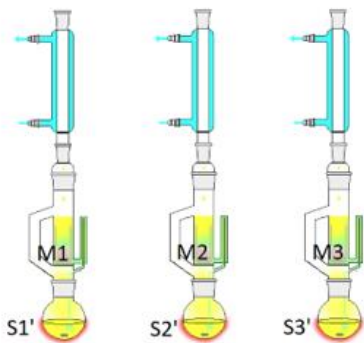


Imagen 1. (Gráfico de Ilustración) “Soxhlet” EX 1 (Realizado por el Autor)

	EX 1	EX 2	EX 3
M1	S1'	S1''	S1'''
M2	S2'	S2''	S2'''
M3	S3'	S3''	S3'''

Imagen 2. Matriz metodología de extracción (Realizado por el Autor)

¹ EX1: Primera extracción EX2: Primera reextracción EX3: Segunda reextracción

En la

Imagen 1 e Imagen 2, describen como se empleó la extracción máxima del aceite para la misma muestra (M) durante tres extracciones de seis horas, empleando nuevamente hexano entre experimentación, llegando a obtener tres (3) muestras (S', S'', S''') con la mezcla solvente-aceite para dicha muestra (M). Se realizó un ensayo (M1) con dos replicas (M2) y (M3).

2.2.3. Roto evaporación

Posteriormente, se plantea la roto evaporación del solvente, como describe la metodología de (James , Malcolm, & Dariel, 2014), para cuantificar la cantidad de aceite extraído de las muestras “S” y así lograr identificar la máxima cantidad de aceite presente en las tres matrices vegetales. La roto evaporación se realizó para el hexano como solvente por 40 min a 40°C a una presión de vacío de 335 mbar y para etanol como solvente por 40 min a 40°C a una presión de vacío de 175 mbar.

2.3. Extracción supercrítica

Como se desea extraer el aceite esencial sin alterar y mantener sus propiedades físicas y químicas de gran valor, se empleó la extracción supercrítica con CO₂ y etanol como cosolvente para aumentar el rendimiento, así como lo plantea (Santos, Froh, & Hoscheid, 2017). Se manejó una nueva muestra de las flores de la planta Chisacá y posterior uso de la metodología descrita en 2.2.1 con un único ensayo. Con la muestra seca, se empleó condiciones de 35 - 40°C y $24.1 \times 10^3 - 27.6 \times 10^3 \text{ kPA}$ similares a las que plantea, (Stashenko, Puertas, & Combariza, 1996), de 40-45°C y $7.24 \times 10^3 - 7.58 \times 10^3 \text{ kPA}$. Se manejó tiempos de extracción de una (1) hora, con etanol en relación 3.5 a 1 en peso con respecto a la muestra, con concentración al 96% en un sistema cerrado. Montaje ubicado el Centro de Investigación en Procesos de Ingeniería “CIPI” de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. La Imagen 3 enuncia el diagrama de flujo del proceso. Se empleó nuevamente la metodología 2.2.3 descrita previamente para retirar el cosolvente y así calcular el rendimiento.

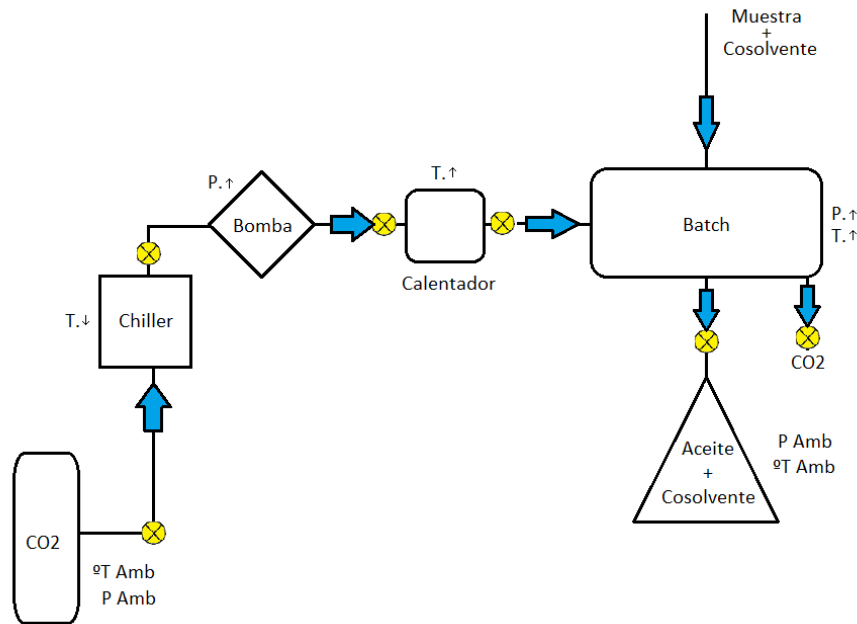


Imagen 3. Diagrama de flujo del proceso de la extracción supercrítica (Realizado por el Autor)

2.4. Caracterización Físico - Química

2.4.1. FTIR

Se plantea el uso de FTIR para determinar la pureza y principales grupos químicos que contienen los aceites esenciales (Agatonovic-Kustrin, Ristivojevic, & Gegechkori, 20220), esto permitirá comparar con resultados en flores con características y familias similares. Se utilizó el instrumento Agilent Technologies Ref. Cary 630 FTIR Spectrometer. La cantidad de muestra analizada de 30 microlitros. Se manejó 32 escaneos a la muestra en un rango del espectro de 400 a 4000 cm^{-1} .

2.4.2. Compuestos Fenólicos Totales

El contenido fenólico total de la muestra se calculó utilizando un método colorimétrico modificado de Folin-Ciocalteu (V. L. Singleton & Joseph A. Rossi, 1965). El método de Folin-Ciocalteu se utiliza habitualmente para determinar el contenido fenólico total de los alimentos y es un método muy complejo (Cicco, Paraggio, & Lattanzio, 2009) . Implica la oxidación en solución alcalina de fenoles mediante el reactivo del amarillo heteropolianión molibdotungstosfosfórico y la medición colorimétrica del azul de molibdotungstosfosfato resultante. Estos pigmentos azules tienen un máximo de absorción dependiendo de la composición de las mezclas fenólicas además del pH de las soluciones, que normalmente se obtiene añadiendo carbonato de sodio (20% p/v) (Cicco, Paraggio, & Lattanzio, 2009).

Así, según (Cicco, Paraggio, & Lattanzio, 2009), para el método de Folin-Ciocalteu se tomaron 100 μl de muestras debidamente diluidas, se pipetearon soluciones de calibración o blanco en tubos de ensayo separados y 1600 μl de agua destilada y 100 μl de Folin-Ciocalteu. Se añadió a cada uno reactivo Ciocalteu 1 N (2 N, suministrado por Sigma Aldrich). La mezcla se mezcló bien y se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante 8 min. Luego, se agregaron 200 μl de una solución de carbonato de sodio (20% p/v, Sigma Aldrich). La mezcla se agitó y se dejó reposar durante 60 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se utilizó ácido gálico (GA) (99% suministrado por Sigma Aldrich) como solución estándar en una curva de calibración (0 – 500 mg GA/l) para determinar el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) y se preparó el blanco con agua destilada. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro JENWAY 6405 UV-Vis (Keyson products, Reino Unido). El TPC se expresó como miligramos de ácido gálico equivalente (GAE) por unidad de masa de peso seco de muestra (mg GAE/g peso seco).

2.4.3. Actividad Antioxidante

Se utilizó el método DPPH (di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazano). La actividad antioxidante total (AA) se midió como captación de radicales libres de DPPH utilizando el reactivo 1,1 difenil 2-picrilhidrazilo (DPPH), que es un radical libre estable. La medida se basa en el reactivo DPPH que se convierte en 1,1 difenil 2-picril hidracina cuando reacciona con antioxidantes cambiando el color de violeta a amarillo pálido. Por lo tanto, se utilizaron ensayos de eliminación de DPPH para estudiar la actividad antioxidante (Gawron, 2012) . Las muestras se prepararon con 2850 μl de solución de DPPH (suministrada por Sigma Aldrich) a 100 ppm y 150 μl de muestra mientras que la solución de referencia se preparó en etanol (2850 μl de solución de DPPH + 150 μl de etanol) y se midió la absorbancia a 515 nm (espectrofotómetro JENWAY 6405 UV-Vis. Keyson products, Reino Unido) después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad (Thaipong & Boonprakob, 2006). El porcentaje de actividad depuradora se calculó según la ecuación (2).

$$\% \text{ Act. Antioxidante} = \left(1 - \frac{ABS_{\text{extracto}}}{ABS_{\text{referencia}}} \right) 100 \quad (2)$$

La IC50 se define como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50%, este término se utiliza para expresar la Actividad Antioxidante de una muestra. Se calculó el coeficiente 1/IC50 y se utilizó para determinar la correlación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total de una muestra que contiene compuestos fenólicos con actividad antioxidante (como los obtenidos a partir de SBP mediante cualquier técnica) (Gawron, 2012). Las actividades antioxidantes se estimaron a partir de la disminución de la absorbancia de tres réplicas para cada muestra. Los resultados se expresan como valor IC50.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Contenido inicial de aceite

Según la clasificación taxonómica de Jacobson, se han encontrado diferentes especies de (*Spilanthès*) en Sur América, incluyendo (*Spilanthès americana*), actual planta de estudio (Zuluaga Lopez, 2017). Para evaluar el contenido de aceite esencial de la flor de la planta Chisacá, a diferencia de (Stashenko, Puertas, & Combariza, 1996), el cual utiliza tallos, hojas y flores de la planta, en este estudio se empleó solo las flores. Inicialmente, se determinó el peso húmedo y seco de las tres muestras descritas en la Tabla 1. A partir de los anteriores resultados, se calculó la pérdida de peso y se determinó que el porcentaje de humedad de la planta Chisacá de 78.5% con σ : 0.0103

Tabla 1. Proceso de Secado

Muestra	Peso Húmedo (g)	Peso Seco (g)	(%) de Humedad	Desviación Estándar (σ)
1	16.5234	3.3873	79.5	
2	18.4452	3.8735	79	
3	13.0974	2.9993	77.1	
		Promedio	78.5%	0.0103

Al comparar los resultados obtenidos con (da Silva, Botelho, & Dias, 2017), ellos reportan porcentajes de humedad de ~20% para la flor de (*Spilanthès acmella*) para la región de Belén, Brasil, flor de similar familia a la del estudio actual (*Spilanthès americana*). Se observa una notoria diferencia de humedad a pesar de estar en regiones con alto porcentaje de humedad y precipitaciones. Esto se pudo dar, debido al periodo de lluvias intensas durante el corte de la flor en los meses de agosto – septiembre como reporta (IDEAM, 2022) con precipitación muy por encima de lo normal en regiones del Meta y Cundinamarca. La planta estuvo en contacto y pudo absorber grandes cantidades de agua al momento de su cosecha.

Posterior al proceso de secado y maceración de la planta, se requirió emplear un solvente orgánico ideal para la extracción Soxhlet. (Bereket & Tilahu, 2017) enuncia utiliza hexano, etanol y una mezcla de ambos solventes para maximizar rendimiento. En el caso de este estudio se optó por hexano como único solvente orgánico. A continuación, se enuncian los resultados de la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados “Extracción Soxhlet” con Solvente “Hexano”

Muestra	Extracción 1 Aceite Extraído	Extracción 2 Aceite Extraído	Extracción 3 Aceite Extraído	(%) Acumulado Aceite Extraído
1	3.57 %	2.83 %	1.59 %	8 %
2	6.76 %	2.84 %	0.57 %	10.17 %
3	11.10 %	2.93 %	0.03 %	14.04 %
Promedio por (Ex)	7.15 %	2.87 %	0.73 %	10.75 %
Desv. Estándar (σ)	0.0309	0.0005	0.0065	0.0251

Los resultados, son consistentes con los que plantea (Luque Garcia & Luque de Castro, 2004), la reextracciones Soxhlet permite cuantificar la cantidad total de aceite presente en una matriz vegetal. Ahora, (Luque Garcia & Luque de Castro, 2004) propone el uso de la metodología con ultrasonido para reducir tiempos y ciclos de reextracciones. En nuestro caso, se cuantifico el porcentaje de pérdida de peso entre extracción y se determinó si es suficiente o, por el contrario, era

necesaria una nueva extracción. Se evidenció que tres extracciones a la misma muestra son suficientes. Se obtiene así en la última extracción “EX3”, un 10% de masa con respecto a la cantidad promedio obtenida en la primera extracción “EX1”. Esto permite dar por culminado la cantidad de extracciones. Por último, se determinó que en promedio la planta Chisacá contiene 10.75% en peso de aceite acumulado en sus flores con una desviación estándar de σ : 0.0251. Este valor nos permitirá calcular el porcentaje de rendimiento que tendrá la extracción supercrítica.

Por otra parte, al analizar y comparar la cantidad de aceite experimental que llegan a contener las flores de la planta Chisacá con respecto a la reportada en la literatura para flores comúnmente utilizadas en la industria, resulta en que esta cantidad es representativa. Al comparar los valores reportados por (Renaud & Charles, 2001), donde se tienen cantidades de aceites para Lavanda (*Lavandula Angustifolia*) de 5% y 3.5 %. Así mismo, flores de la planta Olivillo (*Elaeagnus Angustifolia* L) reportan contenidos de aceite del 0.05% (Bucur & Gabriela, 2006) y, por último, se obtiene un rendimiento del 0.12% para el aceite esencial “Neroli” (Haj Ammar, Ahlem and Bouajila, & Jalloul and Lebrihi, 2012) de las flores de la planta Naranja agrio (*Citrus Aurantium* L), este último es uno de los aceites florales más utilizados en perfumería. Como lo reporta la literatura previamente expuesta, la flor analizada en este estudio contienen un porcentaje mayor en cantidad de aceite. Esto representa menores costos operativos y de capital al extraer un porcentaje mayor con la misma cantidad de materia prima. Esto representa en un aumento proporcional del bioactivo que este aceite esencial llegase a tener, aumentando la rentabilidad del proceso a nivel industrial.

3.2. Extracción supercrítica -Cosolvente “Etanol”

Se ajustó el montaje y condiciones planteadas en la metodología 2.3 e Imagen 3 y se obtuvo una cantidad en peso de 0.37 g de aceite para 13.15 g de muestra. Esto representa el 2.82% de contenido en aceite respecto a la muestra inicial y finalmente, alcanzar un rendimiento del 26.2% para condiciones de presión entre $24.1 \times 10^3 - 27.6 \times 10^3$ kPA y temperaturas entre 35 - 40°C. Este porcentaje representa la cantidad extraída máxima en un ensayo por la metodología supercrítica con respecto a la máxima experimental obtenida por la extracción Soxhlet. Se logró un rendimiento superior al de la flor (*Spilanthes acmella*) (da Silva, Botelho, & Dias, 2017) de (~9%) global a $22 \times 10^3 - 49 \times 10^3$ kPA y 70°C y para (Dias, Santos, Seabra, & Junior, 2012) de (~4.82%) global a 70°C para extracción supercrítica con CO₂. Estos valores de rendimiento de la literatura son para flores de una familia similar, primer factor relevante a evaluar. Siendo plantas de familias similares, sus contenidos de agua y aceite esencial son distintos y ocasionan variaciones en los resultados reportados.

Es importante mencionar que en la industria se requiere producir mayor cantidad de aceite esencial a un menor costo operativo. Un rendimiento del 26.2% para una única extracción supercrítica con respecto a la cantidad máxima experimental obtenida representa un punto de partida a evaluar. Para comparar el potencial que se obtuvo inicialmente, (Palazzolo, Laudicina, & Germanà, 2013) reporta rendimientos globales de aceite esencial para las flores con la técnica de extracción supercrítica con CO₂ para mandarina de (2.59%), pomelo (2.22%), limón (1,79 %), naranja dulce (1,77 %) y naranja agria de (1,04 %). Todos estos importantes para la industria alimenticia y farmacológica manejando rendimientos relativamente bajos.

En este orden de ideas, el rendimiento obtenido en este ensayo es mayor en un orden de magnitud, esto se traduce en menores costos operativos para extraer la misma cantidad. Cabe aclarar que, solo se evaluó una única condición de presión y temperatura obteniendo dicho rendimiento. Al analizar plantas mas cercanas a la familia de este estudio, (da Silva, Botelho, & Dias, 2017) y (Dias, Santos, Seabra, & Junior, 2012), evaluaron temperaturas mucho mayores cercanas a 70°C. Un punto importante para enfocar trabajos futuros. El aumento de la temperatura puede maximizar el rendimiento de este estudio. Esto lo demuestra (Motonobu, Smith, & McCoy, 1990) donde los rendimientos aumentan entre mayor temperatura y presión. Ensayos futuros, permitirían utilizar la metodología de superficie de respuesta (RSM) para obtener las condiciones de temperatura, presión y tiempos de extracción para obtener un rendimiento optimo.

3.3. Caracterización Físicoquímica

La Caracterización físicoquímica se realizó solamente para la única muestra obtenida de la Extracción supercrítica - Cosolvente “Etanol”. Estos análisis tienen como objetivo lograr caracterizar de manera básica el potencial que tienen este aceite esencial y sus posibles usos.

3.3.1. Análisis de FTIR

A partir del aceite extraído se realiza la técnica de análisis instrumental FTIR para evaluar los posibles grupos de compuestos presentes en la muestra en un rango de escaneo entre 400 y 3800 cm^{-1} dando el resultado de la Imagen 4.

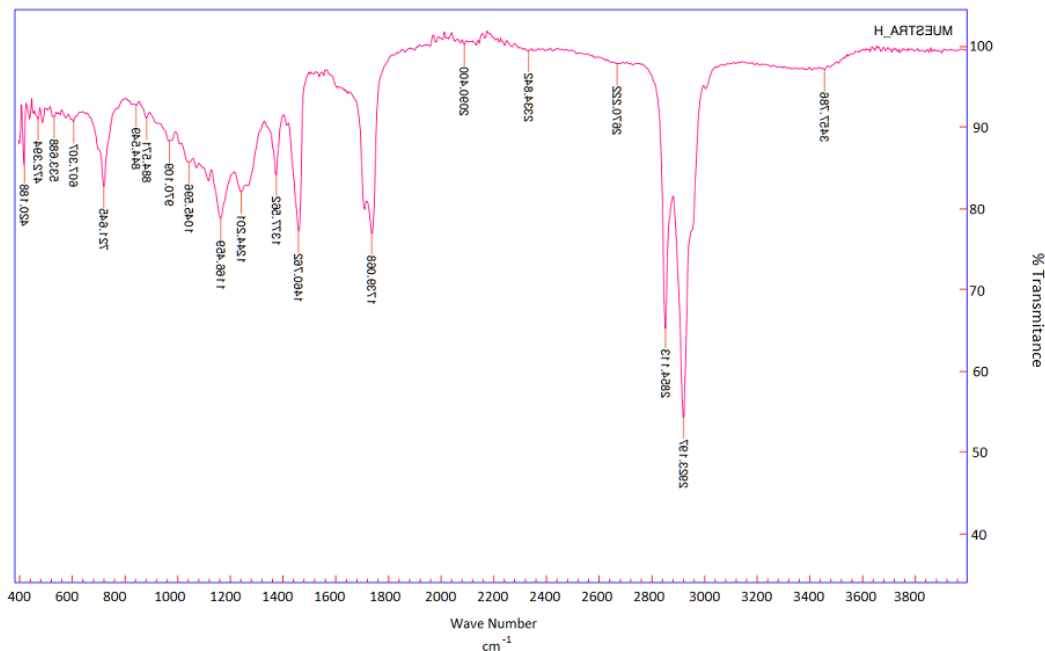


Imagen 4. Caracterización FTIR muestra Chisacá
(Realizado por el Autor)

Al analizar la muestra obtenida observamos un rango entre 400 y 1700 cm^{-1} donde se obtienen varios picos correspondientes a la zona denominada “huella digital” asignada a los carbohidratos. Analizamos los picos en 1490 y 1740 cm^{-1} correspondientes a la vibración de enlaces dobles $C = O$, $C = N$ y $C = C$. Así mismo, los picos entre 2854 y 2923 cm^{-1} , banda característica de vibraciones de tensión de enlaces $C - H$ en alcanos, puede deberse a las vibraciones de los CH_2 del citrato presente en la muestra y un breve pico en 3457 cm^{-1} correspondiente a la vibración del rango de banda entre 3500 y 3200 cm^{-1} para el enlace O-H del agua. En nuestro caso, la muestra no presenta un pico agudo a 3650-3600 cm^{-1} , característica de alcoholes y fenoles y, por tanto, se concluye no encontrar hidroxilos.

Para analizar y comparar los resultados del estudio, (Zuluaga Lopez, 2017) realiza el mismo procedimiento para la misma familia y especie de flor de nuestro estudio obteniendo picos para tensión $C - O$. Dos bandas a 1300 y 1000 cm^{-1} , siendo más ancha e intensa observando un pico a 1300 cm^{-1} . Así mismo otra tensión $C = O$ a 1735 cm^{-1} , estos picos son válidos para grupo ésteres presentes en la muestra. Si continuemos con la banda subrayada en torno a 2900 -3000 cm^{-1} se obtiene un pequeño pico característico de vibraciones de tensión de enlaces $C - H$ en alcanos, puede deberse a las vibraciones de los CH_2 del citrato. Por último, Tensión $O - H$: Banda ancha desde 3500 a 3200 cm^{-1} para el enlace O-H del agua. En

ausencia de puentes de hidrógeno aparece como un pico agudo a 3650-3600 cm^{-1} , es debida a vibraciones de alcoholes y fenoles. Finalmente, permite encontrar grandes cantidades de compuestos con radicales hidroxilos donde es posible deducir que la muestra analizada por (Zuluaga López, 2016) contiene los principales grupos del Espilantol.

3.3.2. Compuestos Fenólicos Totales

Con base a la curva de calibración (Imagen 5) con índice de correlación de R^2 0.9953 y la metodología 2.4.2, se obtiene la ecuación 3 que depende de la absorbancia para obtener los miligramos de ácido gálico equivalente (GAE).

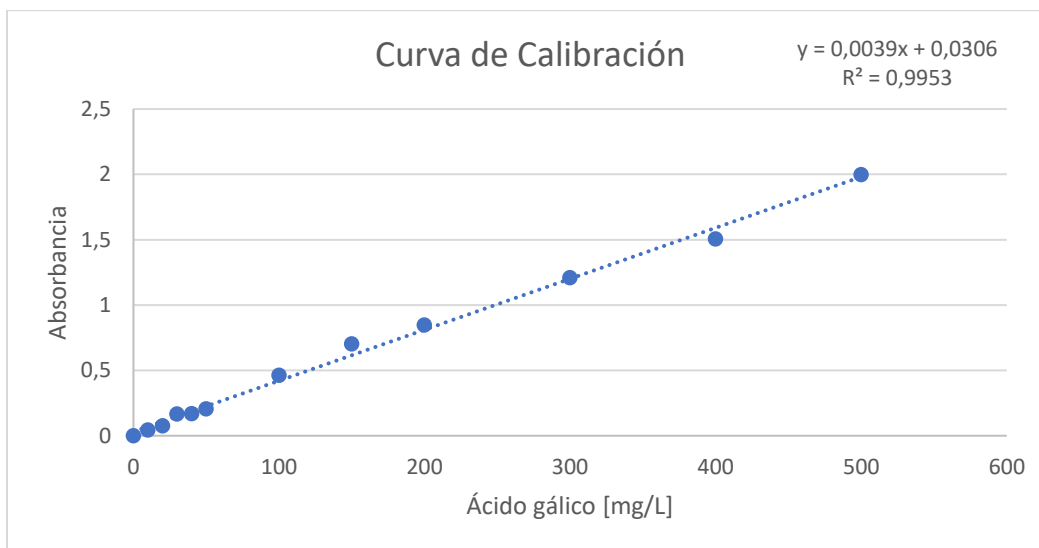


Imagen 5. Curva de Calibración

$$GAE \left(\frac{mg}{g \text{ peso seco}} \right) = \left(\frac{Absorv - 0.0306}{0.0039} \right) \quad (3)$$

Los resultados de absorbancia fueron 0.1833. Por tanto, la muestra de la planta chisacá contiene 39.1668 (mg GAE/g peso seco) para una única muestra obtenida de la Extracción supercrítica. Al comparar los resultados con los obtenidos por (Ghulam & Shrivastava, 2016) el cual obtiene 84.52 (mg GAE/g peso seco) para las hojas de (*Spilanthes acmella*) dichos, difieren en más del doble debido a la diferencia de familia y de que estos fueron obtenidos a partir las hojas de la planta con respecto a las flores realizadas en este estudio. Por otra parte, (Thanaphon, Thatcha, & Supavadee, 2020) obtiene 62.8 (mg GAE/g peso seco) para la planta de (*Spilanthes acmella*) pero macerada en su totalidad con 95% de etanol. Este resultado sería para tanto hojas, tallos y flores de la planta (*Spilanthes acmella*). Nos permite evidenciar que, la flor del estudio contiene una parte importante compuestos fenólicos, casi la mitad, un 50% si lo analizamos respecto a (Ghulam & Shrivastava, 2016), pero evidencia que los tallos y hojas pueden contener compuestos fenólicos de relevancia no estudiados en este ensayo, aportando para aumentar dicho contenido fenólico total de la planta.

3.3.3. Actividad Antioxidante

Se parte del uso de la ecuación 1, para obtener el porcentaje de la actividad antioxidante, ecuación 4.

$$\% \text{ Act. Antioxidante} = \left(1 - \frac{0.5111}{0.5963} \right) 100 \quad (4)$$

La medida de absorbancia obtenida fue de 0.5111 con una referencia de 0.5963. Por tanto, la muestra de Chisacá contiene

un porcentaje de captación del radical DPPH de 14.28%, como actividad antioxidante. Así mismo, para un porcentaje de actividad antioxidante de 50% o IC_{50} para DPPH, la absorbancia correspondiente es de 0,2981, equivalente a 0.058 ($\mu g/ml$) para una única muestra obtenida de la Extracción supercrítica. El resultado evidencia una actividad antioxidante dos órdenes de magnitud por debajo de la analizada por (Thanaphon, Thatcha, & Supavadee, 2020) donde obtiene IC_{50} de 1.2 ($\mu g/ml$) similar a nuestro ensayo y cuatro ordenes de magnitud por debajo de la analizada por (Ghulam & Shrivastava, 2016) donde obtienen IC_{50} para DPPH de 134.11 ($\mu g/ml$) para para las hojas de (*Spilanthes acmella*). Esto se confirma con el análisis realizado en el FTIR donde hay una baja presencia de compuestos fenólicos. Esto evidencia baja capacidad antioxidante en las flores en comparación al de las hojas presente en la familia de la (*Spilanthes acmella*). Nuevamente se sugiere el uso de otras partes de la planta “hojas y tallos” no analizadas en el ensayo, los cuales pueden llegar a aportar en el aumento de la actividad antioxidante.

4. CONCLUSIONES

Este estudio determino que la planta Chisacá contine un porcentaje característico de aceite en sus flores de 10.16%. Este porcentaje comparado con algunos reportados en la literatura es superior. Esto representa una buena base en trabajos futuros para estudiar a fondo las propiedades farmacéuticas que se conocen solo de manera empírica de la medicina herbaria. El estudio se centró en solo el contenido de aceite esencial que llega a tener la flor de la planta y, por tanto, hay un potencial estudio en cuantificar y caracterizar el contenido de aceite que contienen otras partes de la planta “tallos y hojas”.

La metodología de extracción Soxhlet múltiple cumplió con el objetivo de cuantificar la cantidad de aceite esencial máxima experimental que contienen las flores de la planta Chisacá. Con este valor fue posible evaluar otras metodologías a nivel de rendimiento. La extracción supercrítica con CO_2 obtuvo un rendimiento del 26.2% con respecto a contenido experimental obtenido. El ensayo a escala de laboratorio permitió dar un punto de partida favorable al originar nuevas investigaciones como lo son el uso de herramientas estadísticas y metodologías de optimización para maximizar el rendimiento ya obtenido. Ya evaluado este campo, se debe realizar una evaluación más precisa de los costos de producción, incluidos el capital invertido y costos operativos, para poder explorar la extracción supercrítica a nivel industrial.

La caracterización fisicoquímica preliminar del aceite obtenido a nivel del laboratorio, estableció un punto de referencia para identificar familias de elementos químicos y posibles compuestos activos requeridos por su gran valor económico y productivo. Se sugieren en trabajos futuros, el uso de técnicas analíticas más específicas para aceites esenciales. Una posibilidad es el uso de la cromatografía GC-MS para caracterizar en mayor detalle el aceite obtenido. Hoy en día, la extracción con fluido supercrítico es el proceso más preferible para la extracción del producto químico bioactivo de las plantas medicinales y aromáticas por la industria. Esto se fundamenta en el uso de las bajas temperaturas directamente afectando costos operativos y en la preservación de las propiedades activas del aceite aumentando las ganancias finales del proceso productivo.

Otro enfoque por desarrollar se centra en utilizar la totalidad de la planta Chisacá. Como se evidencio en la literatura, cada parte de la planta contiene una mayor o menor cantidad de aceites esenciales. Maximizar el rendimiento implicaría utilizar toda la planta para no incurrir en costos elevados de materia prima para su extracción. Así mismo, la caracterización fisicoquímica de cada parte de la planta permitiría centralizar esfuerzos en obtener un bioactivo de interés. La finalidad sería entonces en optimizar recursos en solo extraer el aceite esencial específicamente de esa parte de la planta.

5. REFERENCIAS

- Agatonovic-Kustrin, S., Ristivojevic, P., & Gegechkori, V. (20220). Essential Oil Quality and Purity Evaluation via FT-IR Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques. *Applied Sciences*, 1-12.
- Bereket , T., & Tilahu , T. (2017). Extraction of Essential Oil from Neem Seed by Using Soxhlet Extraction Methods. *International Journal of Advanced Engineering, Management and Science*, 646-650.
- Bucur, L., & Gabriela, S. (2006). The GC-MS Analysis of *Elaeagnus Angustifolia* L. Flowers Essential Oil. *Revista de Chimie -Bucharest*, 58.
- Calle, M., & Caballero, J. (1977). Anti-herpes and anti-aphtha effects of *Spilanthes americana* (Chisacá). *Rev Fed Odontol Colomb.*, 59-66.
- Cicco, N. L., Paraggio, M. V., & Lattanzio, L. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical journal* 91(1), 107-110.
- da Silva, A., Botelho, J., & Dias, A. (2017). Temperature and density effects of the scCO₂ extraction of spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers. *The Journal of Supercritical Fluids*, 32-40.
- Dias, A., Santos, P., Seabra, I., & Junior, R. (2012). Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 62-70.
- Eleonora, S., Roman, P., Giulia , B., & Diego, R. (2021). Spilanthol-rich essential oil obtained by microwave-assisted extraction from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen and its nanoemulsion: Insecticidal, cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Industrial Crops and Products*, 1-17.
- Gawron, A. G. (2012). DPPH Radical Scavenging Activity And Phenolic Compound Content In Different Leaf Extracts From Selected Blackberry Species. *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIS Series Botanica*, 32-38.
- Ghulam , N. N., & Shrivastava, M. (2016). Estimation of Total Flavonoids and Antioxidant Activity of *Spilanthes acmella* Leaves. *Pharmaceutical and Biosciences Journal*, 29-34.
- Haj Ammar, Ahlem and Bouajila, & Jalloul and Lebrihi. (2012). Chemical Composition and in vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Citrus aurantium* L. Flowers Essential Oil (Neroli Oil). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 1034-1040.
- Hames, B., Ruiz, R., & Scarlata, C. (2008). *Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. Colorado, USA: National Renewable Energy Laboratory.
- IDEAM. (2022, Septiembre 22). Retrieved from Boletín Climatológico: http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/climatologico-mensual?p_p_id=110_INSTANCE_xYvIPc4uxk1Y&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=2&_110_INSTANCE_xYvIPc4uxk1Y_redirect=http%3A%2F%2Fwww.ideam.gov.co%2Fweb%2F
- James , R., Malcolm, K., & Dariel, B. (2014). Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant Material (Essential Oils) for Their Antimicrobial Properties. *Journal of Microbiology and Biology Education*, 15, 656.
- Luque Garcia, J., & Luque de Castro, M. (2004). Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, 237-242.
- Mithilesh, S., & Rakhi, C. (2012). Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from in vitro cell and tissue cultures of *Spilanthes acmella* Murr. *Industrial Crops and Products*, 321-328.

- Motonobu, G., Smith, J., & McCoy, B. (1990). Kinetics and mass transfer for supercritical fluid extraction of wood. *American Chemical Society*, 282-289.
- Muntyan, I., & Likyer, L. (2022). *Essential Oils: Smooth Bowel Functioning*. Research Gate.
- Palazzolo, E., Laudicina, V. A., & Germanà, M. A. (2013). Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. *Current Organic Chemistry*, 3042-3049.
- Rai, A., Mohanty, B., & Bhargava, R. (2016). Supercritical extraction of sunflower oil: A central composite design for extraction variables. *Food Chemistry*, 647-659.
- Renaud, E. N., & Charles, D. J. (2001). Essential Oil Quantity and Composition from 10 Cultivars of Organically Grown Lavender and Lavandin. *Essent Oil Res*, 269-273.
- Santos, K. A., Froh, P. C., & Hoscheid, J. (2017). Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil extraction using supercritical CO₂ with ethanol and ethyl acetate cosolvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 323-330.
- Seied Mahdi, P., & Seiedeh Somayyeh, H. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography*, 2-24.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogota, Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Stashenko, E. E., Puertas, M. A., & Combariza, M. Y. (1996). Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 223-232.
- Thaipong, K., & Boonprakob, U. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 669-675.
- Thanaphon, S., Thatcha, T., & Supavadee, B. (2020). Cytotoxic, colony formation and anti-migratory effects of *Spilanthes acmella* (Asteraceae) aerial extract on MCF-7 cells and its cream formulation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17-24.
- UDLA. (n.d.). *Universidad de las Americas Puebla*. Retrieved from TEORIA DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lem/florian_m_a/capitulo4.pdf
- V. L. Singleton, & Joseph A. Rossi. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 144-158.
- Xiaoxue, Z., Saara, H., & Erkki, L. (2014). Applications of supercritical carbon dioxide in materials processing and synthesis. *RSC Advances*, 61137-61152.
- Zuluaga López, O. H. (2016). Chemical Composition of *Spilanthes americana* Extract. *Rev Nac Odontol*, 7-16.
- Zuluaga Lopez, O. H. (2017). Chemical Composition of *Spilanthes americana* Extract. *Rev Nac Odontol*, 7-16.