

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES DE FLOR DE MANZANILLA (*Matricaria recutita* L.)

OPTIMIZATION OF THE PROCESS OF FLAVONOID EXTRACTION FROM CHAMOMILE (*Matricaria recutita* L.)

José C. Meneses-Reyes¹, Ramón M. Soto-Hernández^{1*}, Teodoro Espinosa-Solares³ y Martha E. Ramírez-Guzmán²

¹Botánica, ²Estadística. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. km 36.5 Carretera México-Texcoco. Estado de México (jcmeneses@colpos.mx) (msoto@colpos.mx). ³Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. km 38.5 Carretera México-Texcoco. Estado de México (espinosa@correo.chapingo.mx)

RESUMEN

Matricaria recutita L. tiene varios usos medicinales, alimenticios y cosméticos. Su flor contiene altas cantidades de flavonoides, principalmente apigenina; su acción farmacológica y la calidad del extracto hidro-alcohólico varían según el contenido de este compuesto. Para optimizar el proceso de extracción de flavonoides y obtener un mayor rendimiento se usó el método de Taguchi. Los factores analizados fueron tiempo-temperatura (1-4 h a 70 ± 0.5 °C y 12-48 h a 20 ± 2 °C), proporción del disolvente metanol:agua (50:50 a 80:20) y tamaño de partícula de la flor (< 0.42 y > 2.00 mm). Para cuantificar flavonoides se usó el método colorimétrico cloruro de aluminio. La combinación óptima de niveles que maximiza ($p \leq 0.05$) el rendimiento de flavonoides es el proceso realizado en 1 h a 70 ± 0.5 °C, con una proporción del disolvente metanol:agua de 80:20 y un tamaño de partícula grande (> 2.00 mm).

Key words: *Matricaria recutita* L., cloruro de aluminio, flores liguladas, metanol:agua, modelo Taguchi.

INTRODUCCIÓN

La manzanilla (*Matricaria recutita* L.), una planta herbácea de la familia Asteraceae, se cultiva principalmente en Argentina, Egipto, Bulgaria, Hungría, España, República Checa, Alemania e Italia (Meireles, 2001; Tavares y Fonseca, 2004; Franke y Schilcher, 2005). Hay dos derivados principales de la flor de manzanilla: el aceite esencial y el extracto hidroalcohólico, que tienen usos medicinales, alimenticios y cosméticos. El extracto hidro-alcohólico se usa como antiinflamatorio y antipirético, musculotrópico espasmolítico, ansiolítico, vulnerario, desodorante, antibacteriano y estimulante del metabolismo de la piel (Svehlíková y Repčák, 2000; Franke y Schilcher, 2005; Svehlíková

ABSTRACT

Matricaria recutita L. has several uses in medicine, food and cosmetics. Its flower has high contents of flavonoids, mainly apigenine, whose pharmacological action and quality of its water-alcohol extract vary depending on its concentration. To optimize the process of flavonoid extraction and obtain higher yield, the Taguchi method was used. The factors analyzed were time-temperature (1-4 h at 70 ± 0.5 °C), proportion of methanol: water (50:50 to 80:20) as solvent, and flower particle size (< 0.42 and > 2.00 mm). To quantify flavonoids the aluminum chloride colorimetric method was used. The optimum combination of levels that maximizes ($p \leq 0.05$) flavonoid yield is the process conducted with large flower particles (> 2.00 mm) at 70 ± 0.5 °C for 1 h in a solvent with 80:20 methanol:water.

Key words: *Matricaria recutita* L., aluminum chloride, ligulate flowers, methanol:water, Taguchi model.

INTRODUCTION

Chamomile (*Matricaria recutita* L.), a herbaceous plant of the Asteraceae family, is cultivated mainly in Argentina, Egypt, Bulgaria, Hungary, Spain, the Czech Republic, Germany, and Italy (Meireles, 2001; Tavares and Fonseca, 2004; Franke and Schilcher, 2005). There are two principal products derived from the chamomile flower: essential oil and water-alcohol extract, which have uses in medicine, food and cosmetics. The water-alcohol extract is used as an anti-inflammatory and anti-pyretic, musculo-tropo spasmolytic, anxiolytic, vulnerary, deodorant, antiseptic and skin metabolism stimulant (Svehlíková and Repčák, 2006). The content of flavonoids in the water-methanol extract is the quality factor, and apigenine is a major constituent in this extract. In commercial preparations of chamomile flowers contents of this flavonoid are found in a heterogeneous spectrum (Franke and Schilcher, 2005). For this reason, it is important to find simple, fast, and sensitive analytical methods to quantify flavonoids

*Autor responsable

Recibido: Junio, 2007. Aprobado: Enero, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 425-433. 2008.

y Repcák, 2006). El contenido de flavonoides en el extracto hidroalcohólico de flor de manzanilla es el factor de calidad, y la apigenina es un constituyente mayoritario de este extracto; además en las preparaciones comerciales de flor de manzanilla se encuentra un espectro heterogéneo de contenido de este tipo de flavonoide (Franke y Schilcher, 2005). Considerando lo anterior, es necesario buscar métodos analíticos simples, rápidos y sensibles para cuantificar los flavonoides en la flor de manzanilla que validen su calidad.

Se han usado diferentes técnicas para extraer flavonoides presentes en flor de manzanilla (Cuadro 1) y su éxito depende de: parte utilizada de la planta, proporciones de disolventes, tiempo y temperatura. Por ejemplo, si el tiempo de extracción es 1 h los disolventes más usados son alcohol mezclado con agua (Cuadro 1). No se encontraron reportes del tiempo-temperatura de extracción, la cantidad de disolvente o la parte usada de la flor, lo cual es necesario para obtener un proceso reproducible. La eficiencia del proceso de extracción depende del tiempo, la temperatura, la proporción de disolventes y el tamaño de partícula (Grosso *et al.*, 2005).

La combinación de factores que permite la máxima eficiencia de extracción puede determinarse con técnicas de optimización. El análisis del arreglo ortogonal de Taguchi se usa para optimizar los procesos con el mínimo número de experimentos. Su ventaja principal es que se pueden clasificar los factores de un experimento en controlables e incontrolables, y se pueden usar numerosos factores (Küçük y Kocakerim, 2005).

Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue determinar las variables óptimas de la extracción hidro-alcohólica de flavonoides de la flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). La hipótesis fue que la relación óptima de los factores de extracción permitirá la mejor extracción de flavonoides y un mejor rendimiento de ellos.

in the chamomile flower in order to validate their quality.

Several techniques have been used to extract flavonoids present in chamomile flowers (Table 1), and their success depends on the part of the plant used, solvent proportions, time and temperature. For example, if extraction time is 1 h, the most used solvent is alcohol mixed with water (Table 1). Reports on time and temperature of extraction, amount of solvent, or part of the flower used were not found in the literature, factors that are necessary to obtain a repeatable process. Efficiency of the extraction process depends on time, temperature, proportion of solvents, and particle size (Grosso *et al.*, 2005).

The combination of factors that allows for maximum extraction efficiency can be determined by optimization techniques. The analysis of the orthogonal arrangement of Taguchi is used to optimize processes with a minimal number of experiments. Its main advantage is that experimental factors can be classified as controllable or uncontrollable, and numerous factors can be used (Küçük and Kocakerim, 2005).

Therefore, the objective of this study was to determine the optimal variables for water-alcohol extraction of chamomile (*Matricaria recutita* L.) flower flavonoids. The hypothesis was that the optimal relation of extraction factors will permit better flavonoid extraction and yield.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at the Colegio de Postgraduados, Montecillo, State of México, México. Chamomile (*Matricaria recutita* L.) flowers harvested in December 2005 were provided by growers of the Joyacan region, Cuijingo, State of México. Flowers were harvested when they were in complete opening, that is, when the ligulate flowers were in a horizontal position and 50 to 75% of the tubular flowers were open. The flowers were dehydrated at room temperature for 17 d, deheaded and, using #10 (2 mm) and #40 (0.42 mm) screen mesh, particles were separated by size into

Cuadro 1. Trabajos sobre extracción de flavonoides de manzanilla.
Table 1. Studies on flavonoid extraction from chamomile.

Parte analizada	Procedimiento de extracción		Compuesto determinado	Rendimiento (mg g ⁻¹)	Método de determinación	Referencia
	Disolventes (proporción)	Tiempo/temperatura				
Flor	---	---	Flavonoides totales	3 y 29.6	---	Franke y Schilcher (2005)
Flor	Acetona:acetato de etilo (50:50)	---	Flavonoides totales	7.1±0.4	AlCl ₃ [†]	Miliauskas <i>et al.</i> (2004)
Flor	Alcohol al 45%	---	Apigenina	Superior a 80	---	WHO (1999)
Flor	Metanol a reflujo	1 h	Apigenina-7-glucósido	8-44	HPLC fase reversa	Redaelli <i>et al.</i> (1981)

[†] AlCl₃ = Tricloruro de aluminio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. La flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.) proporcionada por los productores de la región de Joyacan, Cuijingo, Estado de México, México, se cosechó en diciembre de 2005. La cosecha se hizo cuando la flor estaba en plena apertura, es decir, cuando las flores liguladas estaban en posición horizontal y de 50 a 75% de flores tubulares abiertas. La flor se deshidrató a temperatura ambiente por 17 d, se descabezó y, mediante los tamices de malla 10 (2 mm) y 40 (0.42 mm), se separaron las partículas de acuerdo a su tamaño en: a) partícula grande (>2.00 mm) con 20.5% flores liguladas, 7.7% flores amarillas y 71.8% de tallo; b) partícula mediana (2.00 a 0.42 mm) con 19.3% flores liguladas, 62% flores tubulares y 19.3% de tallo; c) partícula pequeña (<0.42 mm) con 10.2% flores liguladas, 53.3% flores tubulares y 36.5% de tallo. El material se empacó en bolsas individuales de plástico con doble cierre hermético resellable y se mantuvo a 20 ± 2 °C en un cuarto oscuro.

La extracción se hizo en tubos de ensaye con tapa de bakelita conteniendo 20 mL de disolvente y 1 g de flor de manzanilla; para tener la concentración deseada de disolvente se empleó agua desionizada. Para conocer el número de tratamientos requeridos se realizó la interacción de los factores y niveles (Cuadro 2). Los tratamientos a 70 ± 0.5 °C se hicieron con incubación. El extracto se filtró y refrigeró para su estabilización por 3 d. Los flavonoides se cuantificaron con el método colorimétrico de cloruro de aluminio (Chang *et al.*, 2002). Para obtener la curva tipo en la cuantificación de flavonoides, expresados como quercetina, se prepararon soluciones en concentraciones de 0 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la ecuación generada fue:

$$A = -0.00869 + 0.007017C, \quad (1)$$

donde, A = la absorbancia a 415 nm; C = la concentración de la solución usada para el análisis colorimétrico ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Los tratamientos se describen en el Cuadro 2. Para el análisis estadístico se consideraron factores controlables: proporción del disolvente, tiempo-temperatura y tamaño de partícula. Los niveles para proporción de disolvente se determinaron con base en lo reportado en la literatura (Cuadro 1) y se complementó con pruebas preliminares. El tiempo de extracción se seleccionó con base en lo

a) large (>2.00 mm) with 20.5% ligulate flowers, 7.7% yellow flowers, and 71.8% stem; b) medium (2.00 to 0.42 mm) with 19.3% ligulate flowers, 62% tubular flowers, and 19.3% stem; c) small (<0.42 mm) with 10.2% ligulate flowers, 53.3% tubular flowers and 36.5% stem. The material was packed in separate double-seal plastic bags and stored in a dark room at 20 ± 2 °C.

Extraction was performed in test tubes with Bakelite stoppers containing 20 mL of solvent and 1 g of chamomile; to obtain the desired concentration of solvent, de-ionized water was used. To determine the number of treatments required, factors and levels were crossed (Table 2). The treatments at 70 ± 0.5 °C were carried out in an incubator. The extract was filtered and stabilized under refrigeration for 3 d. The flavonoids were quantified with the aluminum chloride colorimetric method (Chang *et al.*, 2002). To obtain the reference curve in the quantification of flavonoids, expressed as quercetin, solutions of 0 to $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared and the resulting equation was

$$A = -0.00869 + 0.007017C, \quad (1)$$

where A = absorbance at 415 nm; C = solution concentration used in colorimetric analysis ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Treatments are described in Table 2. For the statistical analysis, solvent proportion, time-temperature, and particle size were considered controllable factors. Levels for solvent proportion were determined based on reports found in the literature (Table 1) and complemented by preliminary tests. Selected extraction time was based on reports by Nacz and Shahidi (2004), whose periods varied from 1 min to 24 h, and on data described in the literature (Table 1). For temperature, a treatment at room temperature was included. No data were found in the reviewed literature regarding flower particle size (Table 2).

An experimental design with a $6 \times 4 \times 3$ factorial was used with four replications. The statistical model was

$$SN_{Lijk} = \mu + \text{temph}_i + \text{disol}_j + \text{tampart}_k + (\text{temph} \times \text{disol})_{ij} + (\text{disol} \times \text{tampart})_{jk} + (\text{temph} \times \text{tampart})_{ik} + e_{ijk} \quad (2)$$

where

$$SN_L = -10 \log_{10} \left(\frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^{n_r} \frac{1}{y_i^2} \right) \quad (3)$$

Cuadro 2. Niveles de los tres factores del experimento.
Table 2. Levels of the three factors of the experiment.

Factores	Niveles					
	1	2	3	4	5	6
A Tiempo(h) y temperatura	1, 70 ± 0.5 °C	2, 70 ± 0.5 °C	4, 70 ± 0.5 °C	12, 20 ± 2 °C	24, 20 ± 2 °C	48, 20 ± 2 °C
B Proporción del disolvente (metanol:agua)	50:50	75:25	80:20	70:30		
C Tamaño de partícula (mm)	Pequeño (<0.42)	Mediano (0.42–2.00)	Grande (>2.00)			

reportado por Naczky y Shahidi (2004), donde los períodos varían de 1 min a 24 h y con respecto a los datos descritos en literatura (Cuadro 1); para la temperatura se incluyó un tratamiento a temperatura ambiente; respecto al tamaño de partícula para la flor de manzanilla, no se encontraron datos en la literatura revisada (Cuadro 2).

Se usó un diseño experimental con un arreglo factorial $6 \times 4 \times 3$ y cuatro repeticiones. El modelo estadístico fue:

$$SN_{Lijk} = \mu + \text{temph}_i + \text{disol}_j + \text{tampart}_k + (\text{temph} \times \text{disol})_{ij} + (\text{disol} \times \text{tampart})_{jk} + (\text{temph} \times \text{tampart})_{ik} + e_{ijk} \quad (2)$$

donde:

$$SN_L = -10 \log_{10} \left(\frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^{n_r} \frac{1}{y_i^2} \right) \quad (3)$$

y = mg quercetina g^{-1} materia seca; n_r = número de repeticiones del tratamiento.

Taguchi (1991) define la Ecuación 3 cuando se desea optimizar el proceso, maximizando la variable de respuesta. A esta transformación la denomina mayor es mejor (larger-the-better), que maximiza la señal sobre el ruido. SN_{Lijk} significa el efecto que tiene el i -ésimo nivel de tiempo-temperatura, del j -ésimo nivel de disolvente, del k -ésimo nivel de tamaño de partícula sobre mg de quercetina g^{-1} materia seca (y), transformado (Ecuación 3) μ = media general; temh_i = tiempo-temperatura al i -ésimo nivel; $i = 1, \dots, 6$; disol_j = proporción disolvente al j -ésimo nivel; $j = 1, \dots, 4$; tampart_k = tamaño de partícula al k -ésimo nivel; $k = 1, \dots, 3$; e_{ijk} = error del i -ésimo nivel de tiempo-temperatura, del j -ésimo nivel de proporción del disolvente, del k -ésimo nivel de tamaño de partícula.

Conviene destacar que cuando el objetivo del proceso es alcanzar el valor máximo como en este caso, los valores máximos obtenidos por SN_L son los óptimos (Küçük y Kocakerim, 2005).

En la Ecuación 4 se muestra el modelo general de producción para los factores significativos (Roy, 1990):

$$\hat{Y}_{\text{óptimo}} = y + (F_{11} - y) + (F_{21} - y) + \dots + (F_{nm} - y) \quad (4)$$

donde, $\hat{Y}_{\text{óptimo}}$ = resultado calculado a condiciones óptimas; F_{nm} = factor n a nivel m ; y = promedio de las corridas.

El intervalo de confianza (I.C.) para la predicción del valor óptimo (Ecuación 4) fue:

$$I.C. = \hat{Y}_{\text{óptimo}} \pm \sqrt{\frac{F(n_1, n_2) \cdot Ve}{Ne}} \quad (5)$$

donde, $F(n_1, n_2)$ = valor de F para los grados de libertad (g.l.) n_1 y n_2 a los niveles de significancia α ($\alpha = 95\%$); el nivel de confianza es $(1-\alpha)$; n_1 = grados de libertad (g.l.) de la media (el cual siempre es igual a 1); n_2 = g.l. del error; Ve = varianza del error; Ne = número de réplicas equivalentes y está dado por:

y = mg quercetina g^{-1} dry matter; n_r = number of replications of the treatment.

Taguchi (1991) defines Equation 3 when the process is to be optimized, maximizing the response variable. He called this transformation "the larger the better", which maximizes the signal above the noise. SN_{Lijk} refers to the effect of the i th level of time-temperature of the j th level of solvent, of the k th level of particle size over mg of quercetin g^{-1} dry matter (y), transformed (Equation 3) μ = general mean; temh_i = time-temperature at the i th level; $i = 1, \dots, 6$; disol_j = solvent proportion at the j th level; $j = 1, \dots, 3$; e_{ijk} = error of the i th level of time-temperature of the j th level of solvent proportion of the k th level of particle size.

It is important to point out that when the objective of the process is to reach the maximum value, as in this case, the maximum values obtained by SN_L are the optimal values (Küçük and Kocakerim, 2005).

Equation 4 shows the general production model for significant factors (Roy, 1990):

$$\hat{Y}_{\text{optimal}} = y + (F_{11} - y) + (F_{21} - y) + \dots + (F_{nm} - y) \quad (4)$$

where $\hat{Y}_{\text{optimal}}$ = calculated results under optimum conditions; F_{nm} = factor n at level m ; y = average of the runs.

The confidence interval (I.C.) for predicting the optimal value (Equation 4) was

$$I.C. = \hat{Y}_{\text{optimal}} \pm \sqrt{\frac{F(n_1, n_2) \cdot Ve}{Ne}} \quad (5)$$

where $F(n_1, n_2)$ = value of F for degrees of freedom (g.l.) n_1 and n_2 at levels of significance α ($\alpha = 95\%$); the level of confidence is $(1-\alpha)$; n_1 = degrees of freedom (g.l.) of the mean (which is always equal to 1); n_2 = d.f. of the error; Ve = variance of the error; Ne = number of equivalent replicas and is given by

$$Ne = \frac{(\text{number of tests})}{[\text{d.f. mean (always 1)} + \text{d.f. of all factors used in estimations}]} \quad (6)$$

RESULTS AND DISCUSSION

With the calibration curve (Equation 1), concentration of flavonoids from the prepared experimental extracts was calculated. The Box and Whiskers diagram for flavonoid content is shown in Figure 1, where it can be seen that the extracts are between 1.42 and 10.89 mg g^{-1} , forming two groups: high yielding, which were obtained with treatments at 70 ± 0.5 °C, and low-yielding, which were processed at room temperature (20 ± 2 °C).

$$Ne = \frac{(\text{número de ensayos})}{[\text{g.l. de la media (siempre 1) + g.l. de todos los factores usados en la estimación}]} \quad (6)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la curva de calibración (Ecuación 1) se calculó la concentración de flavonoides de los extractos preparados en el experimento. El diagrama de Box y Whiskers para el contenido de flavonoides se muestra en la Figura 1, donde se aprecia que los extractos están entre 1.42 a 10.89 mg g⁻¹ y se forman dos grupos: los rendimientos altos se obtienen con los tratamientos realizados a 70±0.5 °C y los bajos con los efectuados a la temperatura ambiente (20±2 °C).

Para encontrar los niveles óptimos de cada factor (tiempo-temperatura, proporción del disolvente y tamaño de partícula), primero se obtuvo el promedio de cada corrida. El promedio de cada corrida se sustituyó en la Ecuación 3 para obtener los valores SN_L . Con los resultados originales (y) y SN_L (Cuadro 3), se realizaron dos análisis de varianza (A de V) (Cuadros 4 y 5), usando SAS versión 8.0. Los tres factores principales y todas las interacciones resultaron significativas respecto a y (Cuadro 4). Para la variable SN_L los factores principales y la interacción tiempo-temperatura×proporción de disolvente, sólo resultaron significativos (Cuadro 5). Además, la transformación “mayor es mejor” identifica las señales significativas a pesar del ruido existente en cada corrida, lo que no ocurre con la variable de respuesta sin transformar.

To find the optimal levels of each factor (time-temperature, solvent proportion and particle size), first the average of each run was calculated. The average of each run was substituted in Equation 3 to obtain SN_L values. With the original results (y) and SN_L (Table 3), two analyses of variance (ANOVA) were performed (Tables 4 and 5) using SAS version 8.0. The three principal factors and all of the interactions were significant with respect to y (Table 4). For the SN_L variable, only the principal factors and the interaction time-temperature×solvent proportion were significant (Table 5). Furthermore, the “bigger the better” transformation was able to identify the significant signals in spite of the noise present in each run, which does not occur with the response variable without transformation.

The statistical model used to identify the factors, as well as their significant interactions, was

$$SN_{Lijk} = \mu + \text{temph}_i + \text{disol}_j + \text{tampart}_{t_k} + (\text{temph} \times \text{disol})_{ij} + (\text{disol} \times \text{tampart})_{jk} + (\text{temph} \times \text{tampart})_{ik} + e_{ijk} \quad (7)$$

Figure 2 shows the behavior of the SN_L means of the levels of each factor and their interactions. It can be seen that there are significant differences among the six treatments, forming two groups in time-temperature. There were no significant differences in three levels of solvent proportion (75:25, 80:20, and 70:30), nor in particle size at two levels (medium and large) (Figure 2).

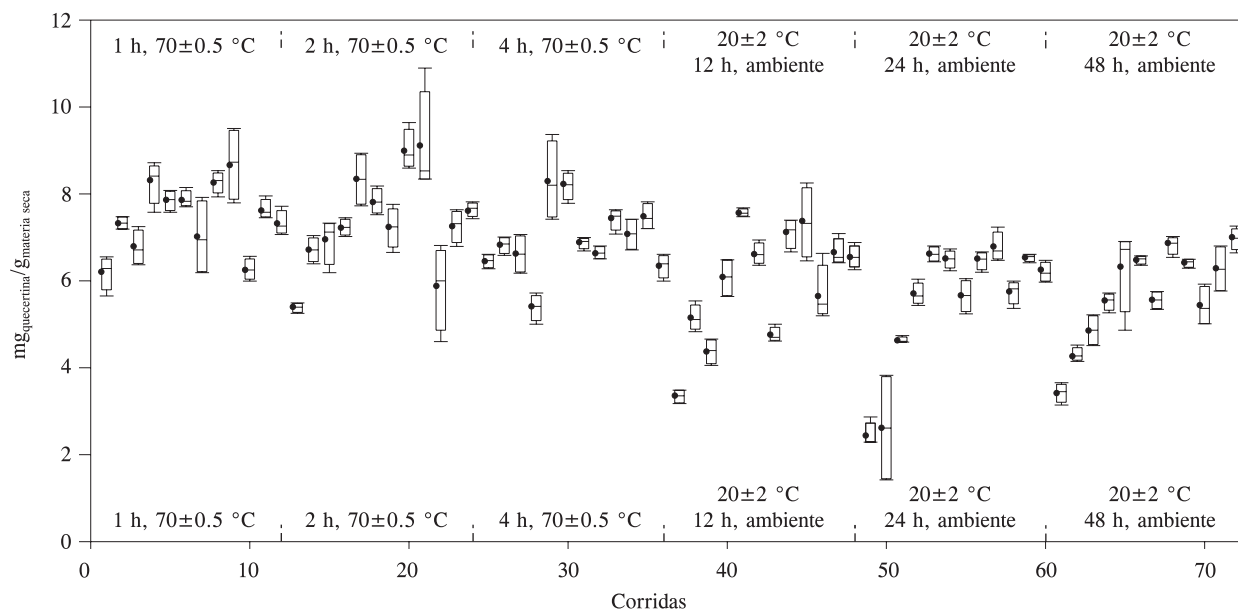


Figura 1. Diagrama de Box y Whiskers, para el contenido de flavonoides en los extractos de los tratamientos.
Figure 1. Box and Whiskers diagram for flavonoid content in treatments extracts.

Cuadro 3. Arreglo ortogonal del diseño experimental y variables de respuesta: y , SN_L .**Table 3. Orthogonal arrangement of the experimental design and response variables: y , SN_L .**

Observaciones o corridas	A	B	C	$y = \text{mg quercetina g}^{-1} \text{ muestra seca}$	SN_L
	temh	disol	tampart	Promedio	
1	1	1	1	6.193	15.798
2	1	1	2	7.330	17.298
3	1	1	3	6.760	16.565
4	1	2	1	8.279	18.323
5	1	2	2	7.849	17.887
:	:	:	:	:	:
68	6	3	2	6.823	16.670
69	6	3	3	6.415	16.142
70	6	4	1	5.418	14.603
71	6	4	2	6.276	15.874
72	6	4	3	6.965	16.846
Promedio total				6.486	15.931

temh= tiempo-temperatura; disol= proporción del disolvente; tampart= tamaño de partícula.

Cuadro 4. Análisis de varianza de la variable respuesta y .**Table 4. Analysis of variance of the response variable y .**

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados Tipo I	Cuadrado medio	Valor-F	Significancia
temh	5	186.44	37.28	111.69	< .001
disol	3	157.94	52.64	157.70	< .001
tampart	2	73.46	36.73	110.03	< .001
temh×disol	15	52.58	3.50	10.50	< .001
disol×tampart	6	3.67	0.61	1.83	0.093
temh×tampart	10	8.80	0.88	2.64	0.004
Error	246	82.12	0.33		
Total corregido	287	565.04			

temh = tiempo-temperatura; disol = proporción del disolvente; tampart = tamaño de partícula.

Cuadro 5. Análisis de varianza de la variable respuesta SN_L .**Table 5. Analysis of variance of the response variable SN_L .**

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados Tipo I	Cuadrado medio	Valor-F	Significancia
temh	5	110.98	22.19	19.23	< .001
disol	3	114.84	38.28	33.16	< .001
tampart	2	38.54	19.27	16.70	< .001
temh×disol	15	68.11	4.54	3.93	0.001
disol×tampart	6	4.03	0.67	0.58	0.742
temh×tampart	10	11.20	1.12	0.97	0.488
Error	30	34.62	1.15		
Total corregido	71	382.35			

temh = tiempo-temperatura; disol = proporción del disolvente; tampart = tamaño de partícula.

El modelo estadístico usado para identificar los factores así como sus interacciones significativas fue:

$$SN_{Lijk} = \mu + \text{temph}_i + \text{disol}_j + \text{tampart}_k + (\text{temph} \times \text{disol})_{ij} + (\text{disol} \times \text{tampart})_{jk} + (\text{temph} \times \text{tampart})_{ik} + e_{ijk} \quad (7)$$

Figure 3 shows the double interactions of each factor. There is significant interaction ($p \leq 0.05$) between the principal factors time-temperature×solvent proportion (ANOVA, Table 5). The interaction indicates that time-temperature (temh) is dependent on solvent proportion (disol).

To find the optimal values and, in spite of the fact that in some cases the levels of some factors are

En la Figura 2 se muestra el comportamiento de las medias SN_L de los niveles de cada factor y sus interacciones. Se observa que existen diferencias significativas en los seis tratamientos, formándose dos grupos en tiempo-temperatura. No hubo diferencias significativas en tres niveles de proporción del disolvente (75:25, 80:20 y 70:30), ni en tamaño de partícula en dos niveles (mediano y grande) (Figura 2).

En la Figura 3 se muestran las interacciones dobles de cada factor. Hay interacción significativa ($p \leq 0.05$) entre los factores principales tiempo-temperatura $\times$ proporción de disolvente (A de V, Cuadro 5). La interacción indica que tiempo-temperatura (temh) depende de la proporción del disolvente (disol).

not statistically different, the maximum values are considered. Thus, the optimal value in terms of the original values (Table 6) is calculated as follows:

$$\hat{Y}_{optimal} = \bar{y} + (F_{11} - \bar{y}) + (F_{23} - \bar{y}) + (F_{33} - \bar{y}) + (F_{12}F_{23} - \bar{y})$$

$$\hat{Y}_{optimal} = 6.48 + (7.456 - 6.48) + (7.06 - 6.48) + (6.85 - 6.48) + (8.43 - 6.48) + (8.43 - 6.48) = 10.34$$

using Equation (4),

where the interval at 95% confidence is

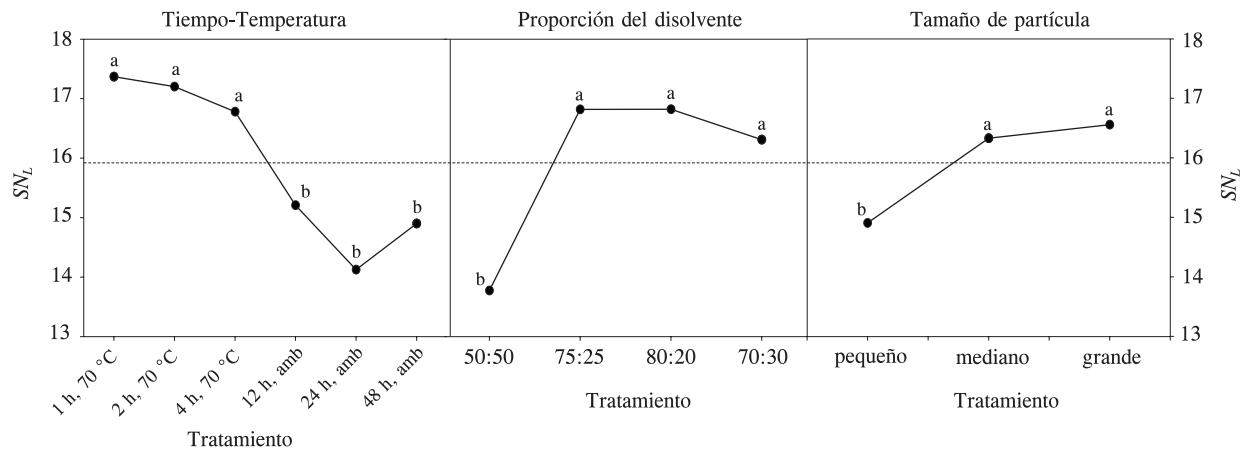


Figura 2. Efectos de los factores principales en unidades de SN_L . Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). amb = 20 ± 2 °C.

Figure 2. Effects of the principal factors in SN_L units. Means with different letters are statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$)

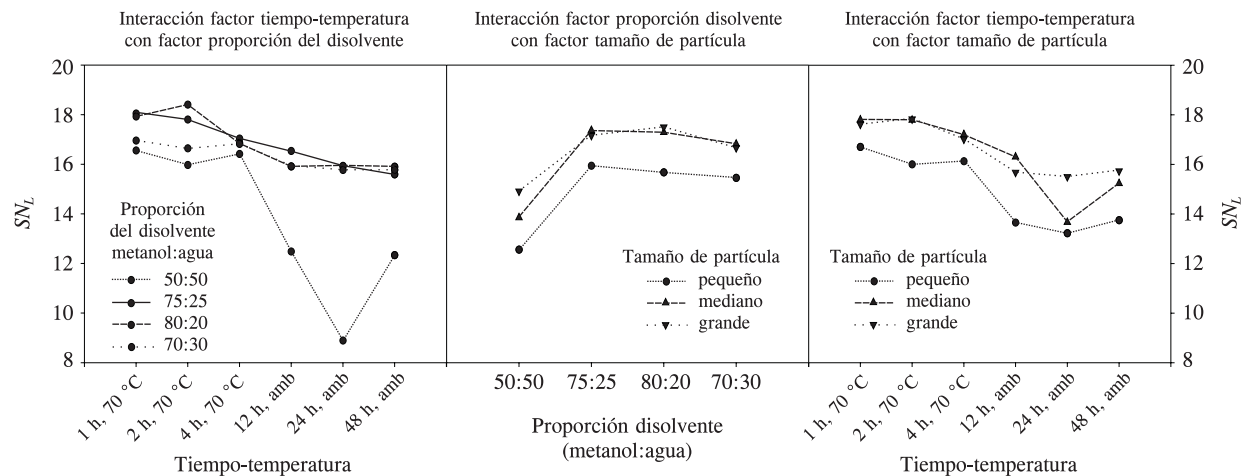


Figura 3. Interacción de factores principales en unidades de SN_L . amb. = $(20 \pm 2$ °C).

Figure 3. Interaction of principal factors in SN_L units. amb. = $(20 \pm 2$ °C).

Para encontrar el óptimo, y a pesar de que en algunos casos los niveles de algunos factores no resultaron estadísticamente diferentes, se consideraron los máximos de estos valores (Cuadro 6). Así, el valor óptimo en términos de los valores originales (Cuadro 6), se calculó como:

$$\hat{Y}_{\text{óptimo}} = \bar{y} + (F_{11} - \bar{y}) + (F_{23} - \bar{y}) + (F_{33} - \bar{y}) + (F_{12}F_{23} - \bar{y})$$

$$\hat{Y}_{\text{óptimo}} = 6.48 + (7.456 - 6.48) + (7.06 - 6.48) + (6.85 - 6.48) + (8.43 - 6.48) + (8.43 - 6.48) = 10.34$$

usando la Ecuación (4),

donde el intervalo al 95 % de confianza es:

$$I.C. = 10.34 \pm \sqrt{\frac{(3.8415) \cdot (0.3338)}{\frac{72}{26}}} = 10.34 \pm 0.68$$

usando la Ecuación (5)

$F(n_1, n_2) = F_{0.05} \ n_1 = 1 \ n_2 = \text{g.l. del error } 246, 3.8415$

$Ve = \text{cuadrado medio del error, } 0.33$

$Ne = 72/26 \ (25 \text{ g.l.} + 1),$

calculados en función del A de V de los datos originales (Cuadro 4).

Se consideraron los factores e interacciones significativos del A de V de SN_L (Cuadro 5) para la estimación de $\hat{Y}_{\text{óptimo}}$, ya que SN_L maximiza la señal y minimiza el ruido.

Una vez definidas las condiciones óptimas del proceso (Cuadro 6) y establecido el intervalo de confianza, se continuó con la prueba de confirmación con los mismos parámetros óptimos y el resultado fue 9.76 mg quercetina g^{-1} muestra en base seca (b.s.) (I.C. ± 0.68), el cual es superior al $\hat{Y}_{\text{óptimo}}$ estimado con valor de 10.34 mg quercetina g^{-1} muestra b.s. La media general en rendimiento fue 6.48 mg quercetina g^{-1} muestra b.s., siendo 59.56% menor con respecto al proceso óptimo esperado y confirmando la eficiencia del proceso. El proceso con la combinación óptima obtuvo un rendimiento de 8.69 mg quercetina g^{-1} muestra b.s., un resultado que se encuentra dentro de los valores reportados (Cuadro 1).

Las diferencias observadas entre el valor estimado y el promedio de las tres corridas de confirmación se deben a factores como variedades empleadas (Redaelli *et al.*, 1981), condiciones de desarrollo del cultivo (Tavares y Fonseca, 2004), manejo poscosecha (Franke y Schilcher, 2005) y proceso de extracción (Cuadro 1).

$$I.C. = 10.34 \pm \sqrt{\frac{(3.8415) \cdot (0.3338)}{\frac{72}{26}}} = 10.34 \pm 0.68$$

using Equation (5)

$F(n_1, n_2) = F_{0.05} \ n_1 = 1 \ n_2 = \text{d.f. of the error } 246, 3.8415$

$Ve = \text{mean square error, } 0.33$

$Ne = 72/26 \ (25 \text{ d.f.} + 1),$

calculated in function of the ANOVA of the original data (Table 4).

The significant factors and interactions from the ANOVA of SN_L (Table 5) were considered for the estimation of optimal $\hat{Y}$, since SN_L maximizes the signal and minimizes the noise.

Once the optimal conditions of the process (Table 6) are defined and the interval of confidence established, we proceeded with the confirmation test with the same optimal parameters, and the result was 9.76 mg quercetin g^{-1} dry base (d.b.) sample (I.C. ± 0.68), which is above the optimal $\hat{Y}$ estimated with the value of 10.34 mg quercetin g^{-1} d.b. sample. The general mean yield was 6.48 mg quercetin g^{-1} d.b. sample, which is 59.56% less than the expected optimal process, confirming the efficiency of the process. The process with the optimal combination had a yield of 8.69 mg quercetin g^{-1} d.b. sample, a result that is found within reported values (Table 1).

The differences observed between the estimated value and the average of the three confirmation runs are due to factors such as varieties used (Redaelli *et al.*, 1981), crop growing conditions (Tavares and Fonseca, 2004), postharvest handling (Franke and Schilcher, 2005), and the extraction process (Table 1).

Nacz and Shahidi (2004) report that long periods of extraction, which vary from 1 min to 24 h, increase the opportunity for phenols to oxidize. Regarding methanol:water solvent proportions, the least efficient was 50:50.

Flavonoid content was high in large particle size, contradicting the fact that smaller particles have a larger area of transference and thus greater extraction.

Cuadro 6. Niveles óptimos de los factores significativos.
Table 6. Optimal levels of significant factors.

Factores	Proceso óptimo	
	Valor	Nivel
A Tiempo(horas) y temperatura	1h, 70 °C	1
B Proporción del disolvente (metanol:agua)	80:20	3
C Tamaño de partícula (mm)	Grande (>2mm)	3

Naczky y Shahidi (2004) reportan que los largos periodos de extracción que varían de 1 min a 24 h, incrementan la oportunidad de oxidación de los fenoles. Respecto a la proporción del disolvente metanol:agua, 50:50 fue la menos eficiente.

El contenido de flavonoides fue alto en la partícula grande, lo cual contradice el hecho de que un menor tamaño de partícula ofrece una mayor área de transferencia y por ende una mayor extracción. La explicación a esta discrepancia radica en que la partícula grande contiene flores liguladas que contienen 7-9% de apigenina-7-glucósido, el flavonoide más abundante en la flor de manzanilla (Franke y Schilcher, 2005; Švehlíková y Repčák, 2000; Maier *et al.*, 1993).

CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas de extracción de flavonoides a partir de manzanilla son tratamiento de 1 h a 70 ± 0.5 °C, proporción de disolventes de 80:20 (metanol:agua), empleando un tamaño de partícula grande (> 2.00 mm, donde existen flores liguladas).

Los valores predichos y los de confirmación están dentro del intervalo de confianza; entonces el modelo es adecuado para obtener un mayor rendimiento en la extracción de flavonoides.

Las condiciones óptimas identificadas con la metodología de Taguchi fueron reproducidas en el laboratorio. Este proceso de laboratorio es muy útil y puede reproducirse a escala industrial.

LITERATURA CITADA

- Chang, C. C., M. H. Yang, H. M. Wen, and J. C. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10: 178-182.
- Franke, R., and H. Schilcher. 2005. Chamomile. Industrial Profiles. Medical and Aromatic Plants-Industrial Profiles. Taylor & Francis, Florida. 289 p.
- Grosso, N. R., V. Nepote, and C. A. Guzmán. 2005. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skin. *J. Sci Food Agric.* 85: 33-38.
- Küçük, Ö., and M. M. Kocakerim. 2005. Optimization of dissolution of ulexite in water saturated with sulphur dioxide. *Chem. Eng. Proces.* 44: 1005-1011.
- Maier, R., C. Reinhold, K. Wolfgang, and R. Ernst. 1993. Purification and characterization of flavone 7-O-glucoside-specific glucosidase from ligulate florets of *Chamomilla recutita*. *Planta Med.* 59: 436-441.
- Meireles M. A. de A. 2001. Supercritical extraction of essential oils, pigments and nutraceuticals from herbs, spices and medicinal plants. IV Encontro Brasileiro sobre Fluidos Supercríticos. Vol. 1 Salvador, BA, Brasil. pp: 25-26.
- Miliauskas, G., P. R. Venskutonis, and T. A. Van Beek. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85: 231-237.
- Naczky, M., and F. Shahidi. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatog. A.* 1054: 95-111.
- Redaelli, C., L. Formentini, and E. Santaniello. 1981. Reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of apigenin and its glucosides in flowers of *Matricaria chamomilla* and chamomile extracts. *Planta Medica. J. Medical Plant Res.* 42: 288-292.
- Roy R. 1990. A Primer on the Taguchi Method. Van Nostrand Reinhold (VNR), New York. pp: 116-139.
- Švehlíková, V., and M. Repčák. 2000. Variation of apigenin quantity in diploid and tetraploid *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Plant Biol.* 2: 403-407.
- Švehlíková, V., and M. Repčák. 2006. Apigenin chemotypes of *Matricaria chamomilla* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 34: 654-657.
- Taguchi, G. 1991. System of Experimental Design. Engineering Methods to Optimize Quality and Minimize Costs. Quality Resources and American Supplier Institute, New York. 1189 p.
- Tavares, M. F. M., and F. N. Fonseca. 2004. Validation of a capillary electrophoresis method for the quantitative determination of free and total apigenin in extracts of *Chamomilla recutita*. *Phytochem. Anal.* 15:65-70.
- WHO (World Health Organization). 1999. Monographs on Selected Medicinal Plants. Volume 1. Flos Chamomillae. World Health Organization. Geneva. pp: 86-94.

CONCLUSIONS

Optimal conditions of flavonoid extraction from chamomile are 1 h at 70 ± 0.5 °C, 80:20 solvent proportion (methanol:water), using large particles (> 2.00 mm) in which there are ligulate flowers.

Predicted and confirmation values are within the confidence interval; thus, the model is adequate for obtaining higher yield in flavonoid extraction.

The optimal conditions identified with the Taguchi methodology were reproduced in the laboratory. This laboratory process is very useful and can be reproduced on an industrial scale.

—End of the English version—

