

**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CON CO₂ SUPERCRÍTICO A ESCALA PILOTO
DE LAS ESPECIES: *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium
guajava***

**ANDERSON JULIAN ARIAS VELANDIA
EDWIN ALEXANDER RAMÍREZ PÉREZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTADER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CON CO₂ SUPERCRÍTICO A ESCALA PILOTO
DE LAS ESPECIES: *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium
guajava***

**ANDERSON JULIAN ARIAS VELANDIA
EDWIN ALEXANDER RAMÍREZ PÉREZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Químico**

Directores

Dra. Elena E. Stashenko

Dr. Jairo René Martínez

Co-director

Prof. Crisostomo Barajas Ferreira

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTADER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena Stashenko y al Dr. Jairo René Martínez por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, donde nos orientaron y corrigieron en el desarrollo del proyecto. Su experiencia y conocimiento fueron indispensable para el desarrollo del trabajo, al igual que su confianza en nosotros.

A las entidades que financiaron el proyecto 8183 de la VIE: “Desarrollo de nuevos productos antioxidantes para la industria cosmética”.

A Carlos Ruiz y Gustavo Avellaneda por su colaboración y porque no sólo fueron compañeros de trabajo, nos apoyaron como amigos.

Ginna Arias y Eva Vásquez por su contribución al desarrollo del proyecto

DEDICATORIA

A mis padres, Myriam y Gildardo; a mis hermanos Jonathan y Miguel, quienes han alimentado la idea en mi mente de que puedo lograr grandes cosas. Este, es apenas un pequeño paso, un pequeño logro resultado de su esfuerzo durante casi 20 años de educación, este libro es de ellos, porque gracias a su cuidado, apoyo y respaldo, pudo ser escrito.

A mi tía Leonor, de quien siempre sentí un apoyo moral y económico en la carrera. A mis tíos, tías abuelos que contribuyeron en algún modo a que hoy pueda recibir el título de Ingeniero Químico.

A Katherine, por su amor que ha llenado mi mundo de momentos felices, y junto con ella a los compañeros de la carrera, Ángel, Walter y Jennifer con quienes siempre conté. A mis amigos del laboratorio, Gustavo Avellaneda, Carlos Ruiz, Edwin, Cori, Natalie, Vanesa, Eva, César, Paola, Jorge, Marce, Yuri y Camilo, de quienes siempre tuve algo que aprender.

A los distintos profesores que durante toda mi vida de educación han construido las bases de un edificio de conocimiento que quisiera llevar hasta las nubes, en especial a la Dra. Elena y el Dr. Jairo a quienes considero mis padres en la ciencia y con su apoyo éste trabajo pudo ser lo que fue.

A Dios, quien me puso en este tiempo y espacio para poder hacer lo que he hecho con quienes lo he hecho y donde lo he hecho

Anderson Julián Arias Velandía.

DEDICATORIA

Resulta difícil plasmar en un papel, los sentimientos que suscitan los logros cumplidos gracias al apoyo de tantas personas. Sin embargo, con escasas palabras dedico este triunfo a mis padres, por su incesante apoyo, valores inculcados, amor y porque nada hubiese sido posible sin su compañía. Siempre están presentes en mi mente y en mi corazón.

Parte vital de la consecución de esta meta fue el apoyo de toda mi familia. Agradezco a mis hermanas, a mis tíos y tías, a mis abuelitas y a mi madrina, por motivarme diariamente de una u otra manera y depositar tanta confianza en mí.

En el camino para alcanzar esta meta, llegaron a mi vida personas importantes, todas y cada una de ellas con características diferentes, que permitieron definir mi carácter, mis creencias, la conciencia social y un sin número de características que describen lo que soy ahora. A los amigos de la sede, Zafra, Mono, Victor, Stefann, Yady; a los amigos del laboratorio, Ñeque, Natha, Julian, Joaco, Cori; Paolita, Vane, Marce; a los compañeros del colegio, el “G8 y las niñas” y a personas muy especiales como: Noryda, Carlos, Kathe y la señora Alis. A todos ellos agradezco hacer parte de este sueño, haber dejado en mí lo mejor de ustedes y compartir conmigo momentos memorables.

A cada uno de los buenos maestros que dejaron en mí, parte de sus conocimientos en pro de mi formación intelectual. A la Dra. Elena Stashenko y al Dr. Jairo René por contribuir al desarrollo del país usando como herramienta la ciencia.

Edwin Alexander Ramírez Pérez

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEÓRICO	20
1.1. ESPECIES VEGETALES.	20
1.1.1. Romero (<i>Rosmarinus officinallis</i> L).	20
1.1.2. Salvia (<i>Salvia officinalis</i> L).	20
1.1.3. Guayaba (<i>Psidium guajava</i> L).	21
1.2 ANTIOXIDANTES DE ORIGEN NATURAL Y DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA.	21
1.3. EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES CON CO ₂ SUPERCRÍTICO	22
1.4 EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN.	22
1.4.1 Tamaño de partícula y humedad.	22
1.4.2 Presión y temperatura.	23
1.4.3 Flujo de solvente y tiempo de extracción.	25
1.5 FENÓMENOS DE TRANSFERENCIA DE MASA EN LA EXTRACCIÓN	26
1.6 EQUILIBRIO	30
2. METODOLOGÍA	31
2.1 ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA	31
2.2 EXTRACCIÓN CON CO ₂ SUPERCRÍTICO	31
2.2.1 Condiciones de operación.	32
2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	34

2.4 VALIDACIÓN	34
2.5 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA	35
2.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA <i>IN-VITRO</i>	35
2.7 ANÁLISIS POR HPLC.	36
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	37
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	37
3.1.1 Análisis de varianza.	37
3.1.2 Modelos de regresión.	38
3.1.3 Validación.	38
3.2 EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN.	39
3.2.1. Efecto del tiempo de extracción.	39
3.2.1 Efecto del flujo.	40
3.2.3 Efecto de la presión.	41
3.3 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ÁCIDO CARNÓSIDO, ACTIVIDAD ANTIRRADICALARIA Y RENDIMIENTO	42
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	55

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Densidad del CO ₂ en función de la presión a diferentes isothermas.	24
Figura 2. Variación de la solubilidad (Y^*) del fenantreno en SF-CO ₂ con la presión.	25
Figura 3. Representación de las variables para un balance de masa diferencial.	26
Tabla 2. Mecanismos de transferencia de masa presentes en la extracción con SF.	27
Figura 4. Diagrama esquemático de la extracción con SF.	32
Figura 5. Comparación de datos experimentales de romero con los modelos empíricos.	45
Figura 6. Comparación de datos experimentales de salvia con los modelos empíricos.	46
Figura 7. Comparación de datos experimentales de hojas de guayaba con los modelos empíricos.	46

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Valores típicos de densidad, viscosidad y coeficiente de difusión, para el CO ₂ .	23
Tabla 2. Mecanismos de transferencia de masa presentes en la extracción con SF.	27
Tabla 3. Modelo de Sovová para la extracción de productos naturales.	30
Tabla 4. Variables independientes con los niveles empleados en el diseño.	34
Tabla 5. Análisis de varianza ANOVA para el rendimiento.	37
Tabla 6. Resultados experimentales y predichos para el rendimiento	38
Tabla 7. Modelos de rendimiento propuestos.	39
Tabla 8. Resultados del contenido del ácido carnósico, actividad antirradicalaria y rendimiento de extractos.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Actividad Antirradicalaria
AC	Ácido carnósico
ACRESS	Asociación Municipal de Usuarios Campesinos el Retiro Veredas Aledañas Sucre Santander
ANDI	Asociación Nacional de Industriales
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CGE	Curvas Generales de Extracción
d_B	Diámetro de la cámara de extracción
F	Masa cargada a la cámara de extracción
H/D	Relación altura / diámetro
HAT	Hydrogen Atom Transfer
H_B	Altura de la cámara de extracción
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
J	Flujo de masa interfacial
X_0	Rendimiento global de extracción
K_{XA}	Coeficiente de transferencia de masa en la fase sólida
K_{YA}	Coeficiente de transferencia de masa en la fase fluida
LOO	Leave One Out
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
P_c	Presión crítica
Q_{CO_2}	Flujo de CO_2

R^2	Coeficiente de correlación
R^2_{adj}	Coeficiente de correlación ajustado
RMSEC	Error cuadrático medio en calibración (<i>Root Mean Square Error for Calibration</i>)
SF-CO ₂	CO ₂ Supercrítico
SFE	Extracción con Fluido Supercrítico (<i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
SPME	Microextracción en fase sólida (<i>Solid Phase Micro Extraction</i>)
SS	Suma de cuadrados de los residuales (<i>Sum of Squares</i>)
T_C	Temperatura crítica
t_{CER}	Periodo de extracción constante
t_{FER}	Periodo de caída de extracción
X_k	Soluto en las paredes celulares
X_p	Soluto presente dentro de las células
Y	Masa del soluto / Masa del solvente
Y^*	Solubilidad en SF-CO ₂
ρ	Densidad del fluido
ρ_s	Densidad del sólido libre del soluto

RESUMEN

TITULO: OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CON CO₂ SUPERCRÍTICO A ESCALA PILOTO DE LAS ESPECIES: *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava* *.

AUTORES: Anderson Julián Arias Velandia.
Edwin Alexander Ramírez Pérez.**

PALABRAS CLAVES: Fluido supercrítico, extracción, productos naturales, antioxidantes, ORAC, peroxidación lipídica, HPLC.

Se realizó la extracción de salvia (*Salvia officinalis*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y guayaba (*Psidium guajava*), empleando CO₂ en estado supercrítico para evaluar el efecto de algunos parámetros del proceso de extracción sobre el rendimiento: presión (300 – 500 bar), flujo de CO₂ (25 – 50 g/min) y tiempo de extracción (0.5 – 2 h). Se utilizó un diseño experimental central compuesto, con tres replicas en el punto central. Se encontró que el flujo y el tiempo son los factores con más influencia sobre el rendimiento de extracción. Para la extracción de romero y salvia el mayor rendimiento se obtuvo en los niveles superiores del diseño. El mayor rendimiento para guayaba fue a 50 g/min, 2 horas y 300 bar; se observó un comportamiento atípico en el rendimiento con la disminución de la presión. Se realizó el ajuste de los datos a modelos de segundo orden con regresión lineal múltiple. El porcentaje de variabilidad explicado por los modelos fue registrado y se empleó el método *LOO* para validar y hallar el error de predicción.

Las graficas de superficie de respuesta mostraron flujo y presión óptimos para salvia y romero respectivamente. El ajuste de los datos a las curvas generales de extracción mostró que para salvia la extracción fue directamente proporcional a la relación flujo/carga en sus diferentes etapas, pero para romero y guayaba la relación no favoreció la etapa difusiva de la extracción. Para conocer la capacidad antioxidante, se estudió la inhibición ejercida por los extractos en la peroxidación lipídica de una base cosmética. El extracto de romero mostró el mayor porcentaje de inhibición, seguido de la salvia y hojas de guayaba; así mismo se determinó que los mejores resultados de actividad antirradicalaria correspondieron a los extractos de romero y salvia, los cuales presentaron el mayor contenido de ácido carnósico.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez. Codirector: Crisóstomo Barajas.

ABSTRACT

TITLE: OBTAINING SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTS TO PILOT SCALE OF SPICES: *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* and *Psidium guajava**.

AUTHORS: Anderson Julián Arias Velandia.
Edwin Alexander Ramírez Pérez.**

KEYWORDS: Supercritical fluid extraction, natural products, antioxidants, ORAC, lipid peroxidation, HPLC.

The supercritical CO₂ extraction of sage (*Salvia officinalis*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and guava (*Psidium guajava*) was studied by changing pressure (300 – 500 bar), CO₂ flux (25 – 50 g/min) and extraction time (0.5 – 2 hours) in order to evaluate their effect on the yield. A central composite experimental design with three replicates in the central point was used. Flux and time were the factors which more influence on the extraction yield. For rosemary and sage extraction the highest yield was obtained at the higher levels of the design. The highest yield for guava was obtained at 50 g/min, 2 h and 300 bar. An atypical yield - pressure relationship was observed. The data were fit to second order models by means of multiple linear regression. The variance percentage explained by the models was registered and the LOO method was employed to validate and find the prediction error. The response surface plots showed optimal flow and pressure values for sage and rosemary. The adjustment of the data to the overall extraction curves showed for sage that flux/ loaded material relationship favored the different extraction stages, but for rosemary and guava the relationship did not follow the expected trend at the diffusive extraction stage. The inhibition exerted by the extracts on the lipidic peroxidation of a cosmetic base was used as a measure of antioxidant capacity. The rosemary extract showed the highest percentage of inhibition, followed by sage and guava; the best antiradical activity results corresponded to rosemary and sage extracts, which had the highest carnosic acid content.

* Graduation Project

** Physicochemical Faculty of Engineering. School of Chemical Engineering. Directors: Elena E. Stashenko and Jairo René Martínez. Codirector: Crisóstomo Barajas.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de antioxidantes de origen natural que puedan ser sucedáneos de los compuestos de origen sintéticos, usados actualmente en las industrias alimenticia, de cosméticos, farmacológica, entre otras (López *et al.*, 1998), toma gran importancia debido a los posibles efectos adversos y toxicidad que estas sustancias sintéticas pueden tener. El consumidor hoy en día también se inclina por los aditivos naturales (Díaz *et al.*, 2006). El butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), compuestos ampliamente usados en la industria (JECFA, 1996), ahora son reconocidos como tóxicos debido a su posible acción carcinogénica y de interferencia con funciones hormonales (DHI, 2007).

En los últimos años, diferentes entidades del gobierno nacional han identificado un mercado potencial en los cosméticos y productos de aseo; por ejemplo, Proexport concluye en un estudio realizado sobre este sector, que el mercado colombiano posee alto potencial, al compararlo con los mercados más importantes de Latinoamérica (Proexport, 2010); a su vez, el Ministerio de Industria y Turismo colombiano, asegura que el mercado de cosméticos está en constante crecimiento (MCIT, 2009) y, según la ANDI, Colombia ocupó en 2007 el tercer puesto en el mercado de productos cosméticos en Latinoamérica, con 2.724 millones de dólares. En respuesta a las tendencias del mercado de estos productos y a la oportunidad de tener un crecimiento del sector 10 veces mayor en un corto plazo, el Ministerio de Comercio, Industria y Turismo decidió incluir en 2010 a los cosméticos y productos de aseo como uno de los 8 sectores de clase mundial. Claramente, la iniciativa del gobierno debe ir de la mano con la investigación, aplicada a mejorar la calidad de los productos e innovar continuamente.

El romero (*Rosmarinus officinalis*), familia Labiadas, la salvia (*Salvia officinalis*), familia Labiadas y la guayaba (*Psidium guajava*), familia Mirtácea son plantas que se cultivan en el departamento Santander, Colombia. La capacidad antioxidante

de sus extractos ha sido documentada (Rau *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2008). Estas especies se han identificado como posibles fuentes naturales de antioxidantes con prometedoras aplicaciones para la industria de cosméticos y productos de aseo. Los cultivos tradicionales de la región podrían tener un nuevo destino y mayor aprovechamiento económico.

Existen diferentes formas de extraer los compuestos bioactivos de las plantas, pero debe tenerse en cuenta que algunas moléculas de interés pueden degradarse u oxidarse a altas temperaturas o con la exposición al oxígeno y la luz. La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es una técnica que aprovecha las características que presentan las sustancias por encima de sus condiciones críticas (T_c , P_c). El CO_2 es el solvente más usado para esta técnica (Sovová, 2011), porque el extracto resultante se colecta libre de residuos de solvente, no tiene restricciones medioambientales, ni problemas de regulación en la salud pública (Meireles *et al.*, 2005). A su vez el CO_2 posee baja toxicidad, baja inflamabilidad, costo y condiciones supercríticas de obtención asequibles (7,4 MPa, 305 K),

La gran mayoría de las investigaciones publicadas se han realizado en equipos SFE cuya cámara de extracción posee un volumen de algunos decilitros. La extrapolación de estos resultados a procesos productivos industriales encuentra el obstáculo de que para factores de escalamiento mayores de 100, hay procesos que interfieren y que no podían ser detectados en los experimentos a escala de laboratorio. Esto sucede con variables como la difusión, la homogeneidad del flujo del agente extractor y la uniformidad de la distribución de la temperatura.

El objeto de este trabajo fue encontrar, por medio de la evaluación de los parámetros de extracción, presión, tiempo y flujo de CO_2 , el efecto sobre el rendimiento de extracción de las tres especies, al igual que realizar la identificación de los compuestos de cada extracto, su actividad antirradicalaria y el comportamiento como inhibidor de la peroxidación lipídica en una base cosmética

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ESPECIES VEGETALES.

Las especies vegetales seleccionadas como fuente de sustancias antioxidantes, se cultivan en el departamento de Santander; su actividad biológica ya ha sido reportada en la literatura. Entre los metabolitos secundarios de estas especies, se encuentra el ácido carnósico (Rau *et al.*, 2006); este compuesto es el único diterpeno fenólico presente en el romero en estado nativo (SDPN, 1994); su capacidad antirradicalaria supera a las reportadas para el BHT y el BHA.

1.1.1. Romero (*Rosmarinus officinalis* L). Los extractos de las hojas de este arbusto poseen propiedades antioxidantes debido a su contenido de diterpenos fenólicos, que también se encuentran en otras plantas pertenecientes a la familia *Lamiaceae* (Thorsen y Hildebrant, 2003). Los siguientes compuestos son asociados con la actividad antioxidante de los extractos de romero: carnosol, rosmanol, ácido carnósico y metil carnosato, así como también los ácidos, rosmarínico y caféico (Ibáñez *et al.*, 2003). Para esta planta se han encontrado condiciones de extracción con CO₂ supercrítico (SF-CO₂) que permiten rendimientos del 2,6% en un equipo con las mismas características del utilizado en este proyecto (Fornari *et al.*, 2011).

1.1.2. Salvia (*Salvia officinalis* L). Es una planta perteneciente a la familia *Lamiaceae*. Su actividad antioxidante se debe principalmente a los ácidos carnósico y rosmarínico (Cuvelier *et al.*, 1996). Sin embargo, esta actividad biológica depende también de la presencia de compuestos activos, incluyendo terpenoides, flavonoides y ácidos fenólicos (Bisio *et al.*, 1997). Algunos de estos compuestos revelan una excelente actividad de captación de oxígenos activos, tales como el anión-radical superóxido, radicales hidroxilo y el oxígeno singulete (Masaki *et al.*, 1995).

1.1.3. Guayaba (*Psidium guajava* L). Es un cultivo tradicional de Santander. La planta es originaria de América tropical. Estudios revelan que, tanto la fruta como la hoja son fuentes de flavonoides, polifenoles y otras sustancias bioactivas (Pérez *et al.*, 2008). Adicionalmente, se han encontrado en los extractos de hoja de guayaba, ácidos fenólicos tales como el ferúlico; a estos ácidos se les atribuye la mayor capacidad antioxidante de los extractos de la hoja, en comparación con los extractos obtenidos de la fruta de guayaba (Chen y Yen, 2007).

1.2 ANTIOXIDANTES DE ORIGEN NATURAL Y DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA.

Los antioxidantes naturales son, en su mayoría, compuestos fenólicos o polifenoles, extraídos comúnmente a partir de plantas o tejidos animales (Mukhopadhyay, 2000), los cuales, al estar presentes en bajas concentraciones, en comparación con la del sustrato oxidable, inhiben o previenen su oxidación (Madhavi *et al.*, 1995). Varios métodos de medición se han desarrollado con base en la habilidad de captación de radicales libres (De Simone *et al.*, 2001). El método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) es uno de los métodos más comunes para medir la actividad antirradicalaria (Ou *et al.*, 2001); actúa bajo el principio de la donación de un átomo de hidrógeno (HAT) (Bertucco y Vetter, 2001). Se ha sugerido la evaluación de la actividad antirradicalaria por otros métodos (Miquel *et al.*, 2004), entre ellos, la medición de los compuestos carbonílicos producidos durante la oxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta (UV) en sistemas de referencia.

1.3. EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES CON CO₂ SUPERCRÍTICO

Los fluidos supercríticos (SF) son sustancias cuya condición termodinámica de presión y temperatura está por encima de su punto crítico (ANEXO B) (Rosa *et al.*, 2009). Esto les confiere propiedades que están entre las de los gases y los líquidos (Luque *et al.*, 1993) (Véase **Tabla 1**). La extracción con SF-CO₂, puede ser el proceso convencional más eficaz para recuperar extractos vegetales con actividad antioxidante (Domínguez *et al.*, 2006). Estudios realizados teniendo en cuenta las materias primas, la actividad antioxidante de los productos extraídos y las condiciones de operación para la extracción y fraccionamiento (Reverchon y De Marco, 2006), muestran las ventajas comparativas de esta técnica en comparación con otras, sobre todo, en cuanto a la recuperación de compuestos antioxidantes (López *et al.*, 1998; Schwarz y Ternes, 1992).

El proceso consiste en una extracción sólido-líquido dentro de una cámara, donde el solvente está en condiciones supercríticas. Inicialmente, se deben alcanzar condiciones de presión y temperatura por encima de los valores críticos (T_c y P_c), posteriormente, el solvente entra en contacto con la matriz vegetal, dependiendo del tipo de proceso (estático o dinámico). Una vez transcurrido el tiempo de extracción, la mezcla soluto-solvente que sale de la cámara, es separada en un recipiente donde el soluto extraído es colectado en el fondo, y el solvente es retirado como gas; debido al cambio de fase generado en la despresurización.

1.4 EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN.

1.4.1 Tamaño de partícula y humedad. Estudios del efecto del tamaño de partícula en la extracción con SF-CO₂, muestran un aumento en el rendimiento de extracción con la disminución del tamaño de partícula de la matriz extraída (Bensebia *et al.*, 2009). Extracciones de *S. officinalis* con tamaños entre 0,22 y

1,76 mm confirman el efecto positivo que presenta la disminución del tamaño sobre el rendimiento (Ruiz *et al.*, 2011).

En el proceso de extracción con CO₂ supercrítico, la humedad puede ayudar o puede ser perjudicial. Para sustancias apolares el agua actúa como una barrera en la transferencia de masa (Lehotay, 1997). Por otro lado, la presencia de agua favorece a compuestos polares porque aumenta la polaridad del fluido, aun cuando ésta es solamente ~0,3% soluble en CO₂ (Montagna *et al.*, 1983)

Tabla 1. Valores típicos de densidad, viscosidad y coeficiente de difusión, para el CO₂.

Propiedad física	CO ₂		Naftaleno en CO ₂
	Densidad, kg m ⁻³	Viscosidad, μPa s	Coefficiente de difusión, m ² s ⁻¹
Gas, 313 K - 0,1 MPa.	2	16	5,1 x 10 ⁻⁶
Supercrítico, 313 K.- 10 MPa.	632	17	1,4 x 10 ⁻⁸
Líquido, 300 K, - 50 MPa.	1029	133	8,7 x 10 ⁻⁹

*Adaptada de Williams y Cliford, 2000.

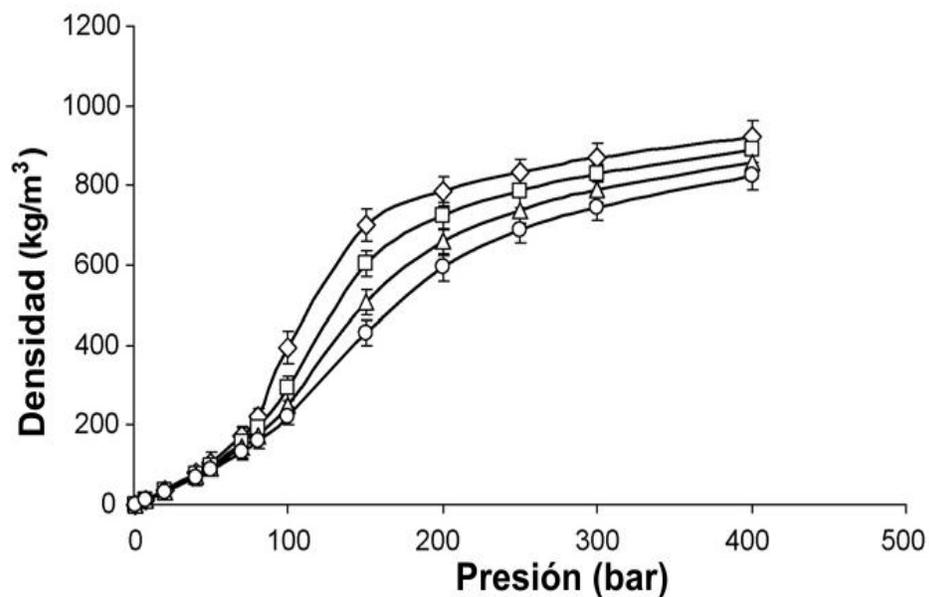
1.4.2 Presión y temperatura. Estos parametros afectan el equilibrio y la cinética de extracción además de la densidad y la capacidad disolvente del SF (Díaz *et al.*, 1996). El poder disolvente está relacionado con la densidad y, en condiciones isotérmicas, aumenta con la presión. Cerca de la región crítica, pequeños cambios en la presión pueden dar lugar a importantes cambios en la densidad (Gupta y Shim, 2007). En la **Figura 1** se observa la variación de la densidad del CO₂ con la presión para diferentes isoterms.

La solubilidad puede tener un impacto directo en la velocidad, rendimiento, diseño y economía del proceso (Gupta y Shim, 2007). Además de las condiciones termodinámicas, la solubilidad de compuestos puros es influenciada por su peso

molecular, polaridad y tipo de grupos funcionales presentes (Díaz *et al.*, 1996). Un comportamiento interesante de la solubilidad de compuestos puros en SF, se presenta en un valor de presión llamado en la literatura *crossover pressure*, en el que varias isotermas convergen, y el efecto de la temperatura sobre la solubilidad se invierte según las condiciones de presión (Gupta y Shim, 2007). En la **Figura 2** se muestra el comportamiento de la solubilidad del fenantreno en CO₂.

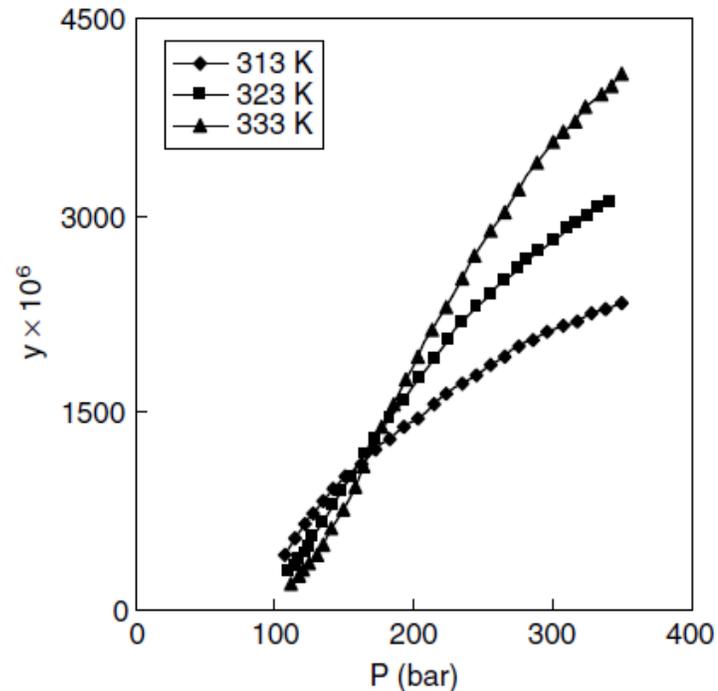
Para la extracción de compuestos fenólicos y terpenoides, de plantas medicinales, presiones entre 15 y 40 MPa (Domínguez *et al.*, 2006) y temperaturas entre 40 y 60 °C son las más usadas para aislar los antioxidantes (Yang *et al.*, 2002).

Figura 1. Densidad del CO₂ en función de la presión a diferentes isotermas.



* (◇) 50°C, (□) 60°C, (Δ) 70°C y (○) 80°C, P_c=73,7 bar. Adaptado de Shi, 2009.

Figura 2. Variación de la solubilidad (Y^*) del fenantreno en SF-CO₂ con la presión.



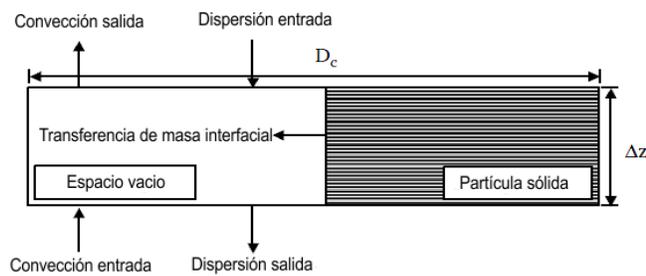
* Adaptado de Gupta y Shim, 2007.

1.4.3 Flujo de solvente y tiempo de extracción. La tasa óptima de solvente depende de la naturaleza del sistema disolvente-soluto, la geometría del extractor, la temperatura y la presión (Hasan y Kumoro, 2006). Para caudales grandes, no hay suficiente tiempo para saturar el disolvente y para caudales muy bajos, tanto la dispersión axial como el bajo coeficiente de masa interfacial disminuyen la concentración de solutos (Rosa *et al.*, 2009). En extracciones de romero con SF-CO₂ la variación del flujo entre 1 y 5 g/min resultó no tener un efecto importante en la cinética de extracción (Bensebia *et al.*, 2009). Magoulas *et al.*, (2000) encontraron que, para tiempos de extracción mayores de 2 horas y variaciones en el flujo de solvente, el cambio en el rendimiento no justifica el consumo extra de CO₂ y tiempos de extracción largos (>2h) hacen que el rendimiento no dependa tan fuertemente de otras variables.

1.5 FENÓMENOS DE TRANSFERENCIA DE MASA EN LA EXTRACCIÓN

Los principales puntos que deben ser determinados en la operación unitaria de extracción con SF son la cinética del proceso de extracción y la solubilidad del soluto. La variación de la concentración en el solvente supercrítico dentro de la columna de extracción puede ser determinada por medio de un balance de masa realizado en un volumen diferencial de la partícula como lo muestra la **Figura 3**.

Figura 3. Representación de las variables para un balance de masa diferencial.



* Adaptado de Meireles *et al.*, 2009.

El término convectivo tiene en cuenta que la masa se transporta con el flujo de solvente. Para determinar el flujo de masa convectiva, la concentración del fluido en la cámara de extracción se expresa como la masa del soluto sobre la masa del solvente (Y). El valor Y incrementa al fluir el solvente en la columna de extracción como resultado de la transferencia de masa interfacial, que, a su vez, decrece con el tiempo. En consecuencia, Y es función de la posición axial y del tiempo $Y(z,t)$. La dispersión axial ocurre por la diferencia del valor de Y en la dirección del flujo, de esta manera habrá una transferencia de masa molecular en la dirección opuesta del flujo para disminuir el gradiente de masa, que se expresa en términos de la ley de Fick. El flujo de masa interfacial (J) puede ocurrir por dos mecanismos de transferencia de masa: por la convección debida al movimiento del fluido

alrededor de las partículas y por la difusión. La **Tabla 2** muestra la definición de cada uno de los términos arriba expuestos.

Tabla 2. Mecanismos de transferencia de masa presentes en la extracción con SF.

Termino	Definición	Nomenclatura	Comentario
Velocidad del solvente	$v = \frac{Q_V}{A_T \varepsilon}$	v velocidad del solvente Q_V flujo volumétrico de solvente A_T sección transversal de la columna ε porosidad	El producto de A_T y ε representan el área de la sección transversal donde el solvente puede fluir. La definición supone un tamaño de partícula homogéneo.
Flujo conectivo (FC)	$FC = \rho v Y(z, t)$	ρ densidad del solvente Y concentración v velocidad	Es el producto de la ρ , v y Y de la solución, sin embargo usualmente la solución está diluida, por tanto es posible usar la ρ del solvente.
Flujo dispersión axial	$\text{flujo dispersión axial} = \rho D_{az} \frac{\partial Y(z, t)}{\partial z}$	D_{az} coeficiente de dispersión axial. z posición axial	Esta transferencia de masa es expresada en términos de la ley de Fick.
Flujo de masa interfacial	$J = J(Y, X)$	Y concentración del soluto en la solución X concentración del soluto en las partículas sólidas	La concentración en el solvente y en las partículas sólidas son las variables independientes de esta función no definida con precisión.

Considerando la región vacía de la **Figura 3** como superficie de control, la ecuación de balance de masa puede describirse como:

$$A_T \varepsilon \rho v Y|_z + A_T \varepsilon \rho D_{az} \frac{\partial Y}{\partial z} \Big|_{z+\Delta z} + J(Y, X) A_T \Delta z = A_T \varepsilon \rho v Y|_{z+\Delta z} + A_T \varepsilon \rho D_{az} \frac{\partial Y}{\partial z} \Big|_z + \frac{\partial}{\partial t} (\rho A_T \Delta z Y). \quad (1)$$

Balance de masa para el volumen de control.

El último término de la **Ecuación 1** representa la masa acumulada de soluto en el tiempo. En este balance de masa se asume que no ocurre reacción química durante el proceso de extracción. Para el límite cuando Δz tiende a cero, es posible determinar una expresión final para el balance de masa diferencial en la cámara de extracción. Esta expresión está dada por la **Ecuación 2**.

$$\frac{\partial}{\partial z} \left(D_{az} \frac{\partial Y}{\partial z} \right) + \frac{J(Y, X)}{\rho \varepsilon} = v \frac{\partial Y}{\partial z} + \frac{\partial Y}{\partial t} \quad (2)$$

Balance de masa diferencial en la columna de extracción.

La **Ecuación 2** representa la variación de la concentración del soluto en la fase supercrítica como función de la posición axial y el tiempo. De la misma forma haciendo un balance de masa del conjunto de partículas presentes en el volumen diferencial de la **Figura 3**, la variación de la concentración del soluto en las partículas sólidas puede determinarse, según la **Ecuación 3**.

$$\frac{\partial X}{\partial t} = - \frac{J(Y, X)}{\rho_s (1 - \varepsilon)} \quad (3)$$

Ecuación de balance de masa en la fase sólida.

Donde ρ_s es la densidad del sólido libre del soluto y se considera constante. Las **Ecuaciones 2 y 3** son el punto de partida para la mayoría de los modelos matemáticos presentes en la literatura, que describen las curvas generales de extracción (CGE)*. La resolución completa de estas ecuaciones diferenciales

* Representan la variación con el tiempo de la concentración del soluto en la fase fluida a la salida de la columna de extracción. No deben ser confundidas con las curvas de extracción acumulada (CEA) que son el

puede llegar a ser un proceso complejo, así que la mayoría de los modelos aplican ciertas simplificaciones, especialmente, en la definición del término de transferencia interfacial.

Uno de los modelos más usados para la extracción de matrices vegetales es el propuesto por Sovová (1994). El modelo está basado en la suposición de que el soluto presente dentro de las células X_p es extraído fácilmente cuando se rompen las paredes celulares, mientras que el resto X_k permanece en las paredes. De esta manera, la extracción con SF se divide en tres etapas: (1) el periodo de extracción constante (t_{CER}), donde solamente el soluto de fácil acceso es removido y, por lo tanto, es controlado por la convección en la fase fluida; (2) el periodo de caída de extracción (t_{FER}), donde ambos, la convección y la difusión son importantes; y, por último, (3) el periodo de extracción por difusión controlada, donde el resto del soluto es extraído de las paredes celulares.

Suponiendo, que en la cámara de extracción, la distribución de tamaño de partícula es homogénea, y que el solvente en condiciones supercríticas está libre de soluto al entrar a ésta, atravesándola axialmente, Sovová resuelve el balance de masa para las fases sólida y fluida llegando a las ecuaciones que se muestran en la **Tabla 3** para calcular la masa extraída (m) como una función del tiempo de extracción (t). La temperatura y presión definen la densidad del fluido (ρ), la solubilidad del extracto en el solvente (Y^*) y el rendimiento global de extracción (X_0), k_{YA} y k_{XA} son los coeficientes de transferencia de masa en la fase fluida y sólida respectivamente. Este modelo tiene, en general, un muy buen ajuste a las curvas de extracción y puede ser usado en estudios de escalamiento (Rosa *et al.*, 2005).

resultado de pruebas de laboratorio y corresponden a valores del rendimiento del soluto versus el tiempo de extracción (Del Valle *et al.*, 2005).

1.6 EQUILIBRIO

Es importante conocer el equilibrio entre el SF y los solutos que son extraídos si se desea diseñar la cámara de extracción. Todo el sistema puede simplificarse si se considera el equilibrio entre el solvente, la mayoría de los componentes del soluto y la matriz sólida, como una mezcla ternaria. El equilibrio puede determinarse experimentalmente por varios métodos, que pueden ser dinámicos o estáticos. En el modelo dinámico el solvente entra continuamente a la columna de extracción a una temperatura y presión dadas, usando un flujo que asegure la saturación a la salida de la columna. El flujo óptimo es función del sistema usado, pero los valores de solubilidad son los mismos a diferentes geometrías de la cámara de extracción.

Tabla 3. Modelo de Sovová para la extracción de productos naturales.

Etapas	Ecuación	Parámetros
Extracción constante	$m = QY^* \times [1 - e^{-z}]t$	$Z = \frac{m_{SI}k_{YA}\rho}{Q(1 - \varepsilon)\rho_s}$
Caída de extracción	$m = QY^* \times [t - t_{CER} e^{Z_w - Z}]$	$W = \frac{m_{SI}k_{XA}}{Q(1 - \varepsilon)}$
Difusión controlada	$m = m_{SI} \left\{ X_0 - \frac{Y^*}{W} \times \ln[1 + A] \right\}$ $A = \left(e^{\frac{WX_0}{Y^*}} - 1 \right) \left(e^{\frac{WQ(t_{CER} - t)}{m_{SI}}} \right) \left(\frac{X_k}{X_0} \right)$	$Z_w = \frac{ZY^*}{WX_0} \ln \left\{ \frac{X_0 e^{\left(\frac{WQ(t - t_{CER})}{m_{SI}} \right)} - X_k}{X_0 - X_k} \right\}$ $t_{CER} = \frac{m_{SI}(X_0 - X_k)}{Y \times ZQ}$ $m_{SI} = X_0 F$

2. METODOLOGÍA

2.1 ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

Las hojas y tallos de romero y salvia, con un contenido de humedad entre 20 y 30%, fueron suministradas por la Asociación de cultivadores ACRESS; por otra parte, la empresa Farmavicola S.A. proporcionó las hojas de guayaba en condiciones de humedad similares.

La reducción de tamaño se efectuó en un picador/triturador forrajero TRF 300 (Metalúrgica TRAPP Ltda. Jaraguá do Sul, Brasil) acondicionado con un tamiz de 0,8 mm, para lograr un tamaño de partícula similar al empleado por Meireles *et al.* (2005). Seguidamente, se determinó la distribución del tamaño de partícula con un tamizador vibratorio (Shaker RX-24, Cleveland, OH, EE.UU.) usando tamices del estándar Tyler, series de malla -20+150.

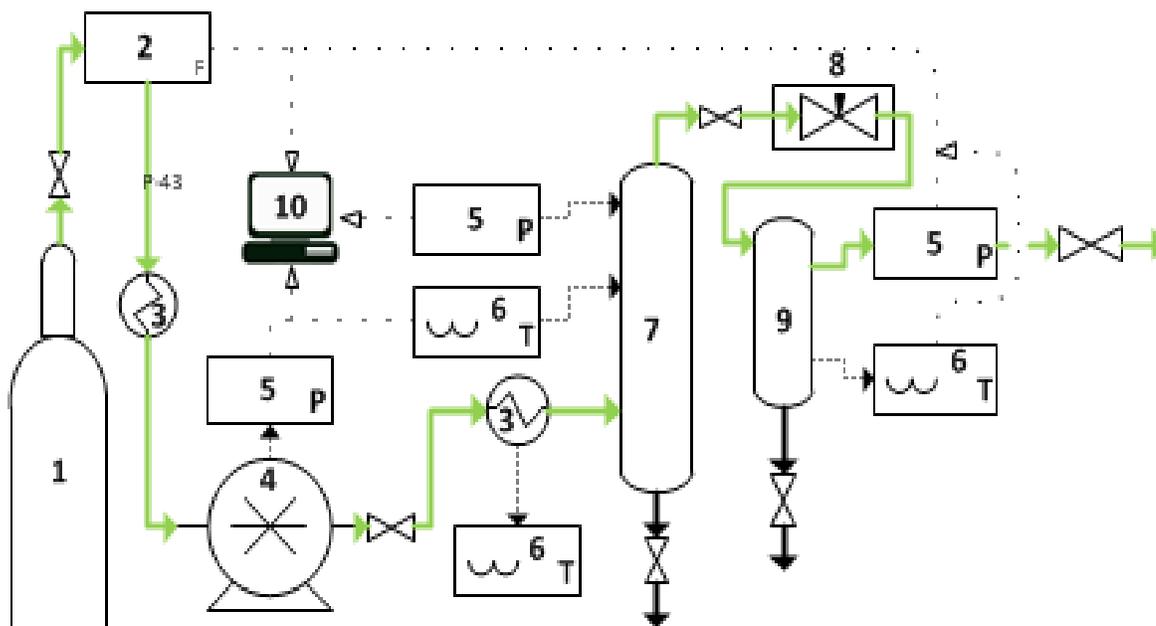
La etapa de secado se desarrolló con base en los resultados obtenidos por Ruiz *et al.* (2011) en el secado de *S. officinalis*, donde se determinó un tiempo de 18 horas a 40 °C para alcanzar un equilibrio en el contenido de humedad. Se supuso que en las demás matrices, debido a su naturaleza, sólido granular, con una distribución de tamaño similar, los mecanismos de transferencia en la evaporación del agua se dan de la misma manera, y, por tanto, se aplicaron a las otras especies. El secado se realizó en un horno de bandejas (INDUMEGAS, Bucaramanga, Colombia).

2.2 EXTRACCIÓN CON CO₂ SUPERCRÍTICO

Las extracciones se llevaron a cabo en un equipo de extracción con fluido supercrítico a escala piloto (Thar Technology, Pittsburgh, PA, EE.UU., modelo

SF2000) (**ANEXO C**), que consta de una columna de extracción de $0,002 \text{ m}^3$ y un separador con capacidad $5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$, control independiente de temperatura y presión. El recipiente de extracción tiene una relación altura / diámetro de 5,5 (0,42 m de altura, 0,076 m de diámetro interior). Para cada experimento, el cilindro extractor se cargó con 0,55 kg de material vegetal, valor muy cercano al reportado por Fornari *et al.* (2011). En la **Figura 4** se muestra un diagrama esquemático del sistema de extracción con SF-CO₂

Figura 4. Diagrama esquemático de la extracción con SF.



*1.Cilindro de CO₂; 2. Medidor de flujo; 3. Intercambiadores de calor; 4. Bomba flujo pistón; 5. Medidores de presión; 6. Sensores de temperatura; 7. Columna de extracción; 8. Válvula ABPR; 9. Ciclón colector; 10. Controlador.

2.2.1 Condiciones de operación. El material vegetal se cargó al extractor con una densidad aparente, constante para todas las extracciones, de 310 kg/m^3 , ocupando el total del volumen disponible en el extractor ($0,00178 \text{ m}^3$). Estos valores se aproximan a los reportados por Meireles *et al.*, (2005) en los estudios cinéticos de la extracción con CO₂ supercrítico de romero. La temperatura de

extracción se mantuvo constante en 323 K. Este es el punto central del rango de temperaturas reportado para la extracción de antioxidantes (Domínguez *et al.*, 2006). Así mismo, los datos de densidad del CO₂ para presiones que se encuentran por encima de 30 MPa, presentaron los mayores valores a esta temperatura (Shi *et al.*, 2009).

Los niveles para la presión y el flujo se seleccionaron con base en estudios realizados para la solubilidad del ácido carnósico (compuesto presente en las tres especies) en CO₂. Se encontró que la solubilidad de este compuesto aumenta significativamente cuando se opera a presiones superiores a 30 MPa (Rižnar *et al.*, 2008). Fornari *et al.* (2011) en los estudios a escala piloto utilizaron la **Ecuación 4** para establecer el flujo de solvente, donde H_B, es la altura correspondiente, d_B, diámetro del cilindro; F, masa cargada (kg) y Q_{CO₂}, flujo de CO₂ (kg s⁻¹). El flujo calculado que permitió mantener el mismo comportamiento cinético del trabajo realizado por Meireles *et al.*, (2005), a pesar del cambio en la geometría del lecho y la carga de alimentación, fue de 2,4 kg/h. Este valor se tomó como referencia para establecer los límites superior e inferior del diseño.

$$\frac{Q_{CO_2^2}}{Q_{CO_2^1}} = \left(\frac{F_2}{F_1}\right)^2 * \frac{H_{B1}}{H_{B2}} * \left(\frac{d_{B1}}{d_{B2}}\right)^3 \quad (4)$$

Correlación propuesta por Meireles *et al.* (2005) para mantener el mismo comportamiento cinético en dos unidades de extracción diferentes con SF-CO₂

Fornari *et al.* (2011) midieron el rendimiento acumulado a 2 y 4 horas. Como resultado se obtuvo, que luego de 2 horas se aísla aproximadamente el 75,5% de la masa total extraída durante las 4 horas. Por esta razón, con el ánimo de minimizar costos y evitar que las demás variables disminuyan su efecto en el rendimiento, debido a tiempos de extracción largos, el nivel superior del tiempo se fijó en 2 horas.

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para establecer el efecto de los parámetros de extracción (flujo, presión y tiempo) sobre el rendimiento de extracción, se realizó un diseño factorial 2^3 más estrella centrado en las caras, con 3 réplicas en el punto central, empleando para su análisis la metodología de superficie de respuesta. El *software* utilizado fue *Statgraphics Centurión XV* (versión de prueba) y las herramientas estadísticas de *Microsoft Office Excel*. En la **Tabla 4** se presentan los rangos y niveles para las variables independientes.

Tabla 4. Variables independientes con los niveles empleados en el diseño.

Variable independiente	Código de niveles		
	-1	0	1
<i>F</i> , kg/h	1,5	2,25	3
<i>P</i> , MPa	30	40	50
<i>t</i> , h	0,5	1,25	2

* Flujo (*F*), Presión (*P*) y Tiempo (*t*).

2.4 VALIDACIÓN

Se utilizó el método de validación cruzada dejando uno por fuera LOO (*Leave One Out*), de modo que fue necesaria la creación de un algoritmo en *Scilab 5.3.3* (**ANEXO D**), que encontrara los coeficientes y los parámetros estadísticos para cada iteración dejando fuera del cálculo un dato a la vez. Se determinaron la suma del cuadrado de los residuales, el RMSEC, R^2 , R^2_{adj} y la diferencia entre el valor que se dejó por fuera y el calculado por el modelo, para cada iteración. El promedio de la suma de cuadrados de los residuales y el promedio del error medio

cuadrático de calibración, se calcularon con base en el valor presentado para estos estadísticos, en cada uno de los 17 modelos analizados. De igual modo, se halló la diferencia entre el valor experimental y el valor calculado por cada iteración. Este dato se empleó para determinar el error de predicción del modelo, el cual se define mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Error de predicción} = \sqrt{\frac{\sum(Y_i - \hat{Y}_i)^2 - (\frac{1}{m} \sum(X_i - \bar{X}_i))^2 * n}{n}} \quad (5)$$

Fórmula para determinar el error de predicción calculado para datos de validación.

Donde n es el número de experimentos, $Y_i - \hat{Y}_i$ es la diferencia entre el valor experimental y el calculado por el modelo para cada punto que se deja por fuera en la secuencia de validación. El término restante en la ecuación, es la varianza de las m réplicas en el punto central del diseño, multiplicada por el número total de experimentos.

2.5 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA

La determinación de la capacidad antirradicalaria de los extractos se realizó mediante el ensayo ORAC descrito por Ou *et al.* (2001), que se llevó a cabo en un espectrofotómetro Modulus™ II, Microplate reader, 645 N. Turner Biosystems, (North Mary Avenue, Sunnyvale, CA, EE.UU) con longitudes de onda de 490 en emisión y 570 excitación, en microplacas de 96 pozos. El ensayo fue realizado por personal adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL.

2.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA *IN-VITRO*

La microextracción en fase sólida (SPME) con derivatización simultánea en la fibra (Stashenko *et al.*, 2000; Stashenko *et al.*, 2002) se utilizó para determinar la

inhibición ejercida por los extractos, en la peroxidación lipídica de una base cosmética, proporcionada por Laboratorios M y N (Bogotá, Colombia). Mezclas homogéneas de las sustancias de análisis y la base cosmética fueron expuestas durante 12 h a radiación ultravioleta, en un fotorreactor, con el fin de acelerar la peroxidación lipídica. Los ensayos fueron realizados por personal adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL

2.7 ANÁLISIS POR HPLC.

El análisis por HPLC se llevó a cabo en un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 con un detector UV-Vis de arreglo de diodos G1315B y columna KINETICS 2.6u C18 (100 mm x 4,6 mm x 5 µm). La temperatura de la columna se mantuvo en 35 °C y el volumen de muestra inyectada fue de 20 µL. La fase móvil A fue ácido acético (0,3%), la fase móvil B fue acetonitrilo. Las siguientes fueron condiciones cromatográficas: 0-13 min, 4,5% B; 14-17 min, 15% B; 20-28 min, 22% B, 30-33 min, 100% B; 34-45 min, 4,5% B. Se utilizó un flujo de la fase móvil de 1 ml/min. Los extractos se disolvieron en metanol: ácido acético (0.5%) (1:1). Se determinaron los tiempos de retención de 24 analitos catalogados como compuestos antioxidantes de tipo flavonoides (Véase **ANEXO E**). Sin embargo, el ácido carnósico fue el único compuesto de los patrones certificados, que se encontró en los tres extractos.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Luego del picado, los tamaños de partícula para las tres especies presentaron un comportamiento similar. La distribución de tamaño fue: <0,17 mm (16,3 %), 0,17-0,25 mm (16,3 %), 0,25-0,42 mm (59,7 %) y > 0,42 mm (7,6 %). Esta distribución se aproxima a los valores reportados por Meireles *et al.* (2011) y permiten obtener una configuración similar respecto a la geometría del cámara de extracción y para comparar los efectos de los demás parámetros.

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1.1 Análisis de varianza. Con base en el valor F umbral del ANOVA (Véase **Tabla 5**), se determinaron las variables que tuvieron incidencia significativa sobre la respuesta con un nivel de confianza del 95 %. Los datos de rendimiento de los 17 experimentos para cada especie se presentan en la **Tabla 6**.

Tabla 5. Análisis de varianza ANOVA para el rendimiento.

Factor	SS			Valor F			Valor F umbral: 18,512
	R	S	G	R	S	G	
F	0,475	0,760	0,300	57,907	484,909	332,388	Varianza: R: 0,0082 S: 0,0016 G: 0,0009
P	0,247	0,206	0,003	158,646	131,365	3,415	
t	0,643	0,979	0,252	412,487	625,220	278,938	
Ft	0,041	0,113	0,002	26,259	72,175	1,832	
FP	0,015	0,001	0,062	9,898	0,380	69,244	
Pt	0,018	0,015	0,002	11,546	9,499	1,962	
FPt	0,001	0,019	0,001	0,554	12,076	1,097	

* R: Romero, S: Salvia, G: Guayaba.

3.1.2 Modelos de regresión. Los modelos de regresión (Véase **Tabla 7**) se calcularon para analizar la superficie de respuesta (**ANEXO F**) e identificar los puntos óptimos de extracción.

Tabla 6. Resultados experimentales y predichos para el rendimiento

NE	F, g/min	P, Ba	T, min	RENDIMIENTO, (g/g base seca *100%)					
				ROMERO		SALVIA		GUAYABA	
				Exp	Pred	Exp	Pred	Exp	Pred
1	25	300	30	0,497*	0,465	0,615*	0,598	0,279*	0,278
2	50	300	30	0,950	0,805	1,108	0,712	0,792	0,804
3	25	500	30	0,863	0,846	0,964	1,034	0,443	0,414
4	50	500	30	1,098	1,186	1,228	1,148	0,647	0,642
5	25	300	120	0,847	0,961	1,088	1,104	0,553	0,749
6	50	300	120	1,545	1,599	1,862	1,892	1,168**	1,192
7	25	500	120	1,361	1,341	1,415	1,540	0,821	0,885
8	50	500	120	1,924**	1,979	2,349**	2,328	1,038	1,072
9	25	400	75	0,871	0,944	1,264	1,069	0,615	0,581
10	37,5	300	75	0,844	0,852	1,368	1,295	0,753	0,800
11	37,5	400	30	0,880	0,972	0,898	1,091	0,462	0,579
12	50	400	75	1,588	1,433	1,448	1,520	0,938	0,917
13	37,5	500	75	1,559	1,232	1,870	1,731	0,832	0,808
14	37,5	400	120	1,809	1,616	1,917	1,934	1,100	1,029
15	37,5	400	75	1,050	1,189	1,616	1,538	0,845	0,804
16	37,5	400	75	1,105	1,189	1,553	1,538	0,843	0,804
17	37,5	400	75	1,227	1,189	1,543	1,538	0,792	0,804

*Menor rendimiento, **Mayor rendimiento, Exp: Experimental, Pred: Predicho.

3.1.3 Validación. En general, se observó que los coeficientes no presentaron variaciones significativas entre las iteraciones. El modelo escogido fue el de mejor R^2_{adj} , reportando el error promedio de todos los 17 modelos.

Tabla 7. Modelos de rendimiento propuestos.

ESPECIE	MODELO DE REGRESIÓN		
Romero	$Y = 1,188 + 0,245 \cdot F + 0,190 \cdot P + 0,322 \cdot t - 0,146 \cdot P^2 + 0,106 \cdot t^2 + 0,075 \cdot F \cdot t$		
	RMSEC: 0,025	$R^2 = 0,88$ $R^2_{adj} = 0,79$	Error de predicción: 0,224
Salvia	$Y = 1,513 + 0,265 \cdot F + 0,178 \cdot P + 0,382 \cdot t + 0,119 \cdot F \cdot t - 0,179 \cdot F^2$		
	RMSEC :0,0122	$R^2 = 0,94$ $R^2_{adj} = 0,91$	Error de predicción: 0,146
Guayaba	$Y = 0,794 + 0,187 \cdot F + 0,023 \cdot P + 0,205 \cdot t - 0,064 \cdot F^2 - 0,088 \cdot F \cdot P + 0,014 \cdot F \cdot t$		
	RMSEC: 0,0039	$R^2 = 0,94$ $R^2_{adj} = 0,90$	Error de predicción: 0,039

3.2 EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN.

3.2.1. Efecto del tiempo de extracción. Como se esperaba, el tiempo es la variable que tuvo el efecto más significativo sobre el rendimiento de extracción. Esto debido a la relación directa que tiene con la cantidad de CO₂, y el periodo de contacto con la matriz vegetal. A partir de este resultado, fácilmente se deduce que a mayores tiempos de extracción mayor será el rendimiento. Esto coincide con lo observado en las superficies de respuesta (Ítem B y C de cada una de las figuras del **ANEXO F**). Para salvia y romero, se observó que el aumento del flujo y el tiempo favorecen el rendimiento, manteniéndose esta tendencia para valores por encima de las condiciones del diseño; mientras que, para las hojas de guayaba, se encontró que a las condiciones 50 MPa y 2 h, flujos mayores a 2,91 kg/h decrecen el rendimiento, esto debido a que el solvente no está en contacto con la matriz vegetal el tiempo suficiente para arrastrar los solutos.

La interacción flujo – tiempo, que relaciona la cantidad de CO₂ utilizado en la extracción, presentó un efecto positivo en el rendimiento. Con flujos por encima del valor óptimo requerido para saturar el solvente, se necesita más tiempo de

extracción para alcanzar el mismo rendimiento, debido a la disminución del tiempo de residencia del solvente en la cámara, como lo reportan Rosa *et al.*, (2009). Para las tres especies se encontró que aumentar el tiempo de extracción a 5 horas (h), permite obtener el doble de rendimiento en comparación con los experimentos de 2 horas. Sin embargo, las distintas etapas de transferencia de masa dentro de la extracción, hacen que prolongar el tiempo no sea una solución rentable para obtener más extracto. Las primeras horas de extracción, donde predomina la transferencia de masa convectiva, son más provechosas que el resto de tiempo donde la transferencia es controlada por la difusión; esto se debe a la disposición del soluto en la matriz vegetal. Extracciones de romero hechas a 8 h muestran que en las primeras 2 h, se obtiene más del 50 % de la cantidad de extracto acumulado (Fornari, 2011; Meireles *et al.*, 2005).

3.2.1 Efecto del flujo. El flujo mostró un efecto positivo en el rendimiento de las tres especies, dado que su aumento disminuye la resistencia de la transferencia de masa (Yin *et al.*, 2005). Estudios para validar las mediciones de solubilidad en diferentes configuraciones de cámara de extracción, mostraron que existe un flujo óptimo con el cual se logra saturar el solvente justo antes abandonar la cámara. Con flujos mayores no hay suficiente tiempo de contacto para saturar el solvente y, para flujos menores, la dispersión axial y el coeficiente de masa interfacial decrecen la concentración del soluto (Rosa *et al.*, 2009). La gráficas de superficie de respuesta (Figura F2-A **ANEXO F**) muestran para salvia, que el flujo óptimo se presentó en 3,05 kg/h; para romero, el aumento del flujo siempre favorece el rendimiento y para guayaba, el modelo presentó un comportamiento atípico en valores por encima de los establecidos en el diseño; por tal razón el modelo no es extrapolable.

La velocidad del solvente dentro de la cámara de extracción está descrita mediante la ecuación 6 (Fornari *et al.*, 2011). Los resultados para las extracciones de romero indican una baja relación flujo de CO₂ / carga de alimentación, por tal razón, el fenómeno de dispersión axial es predominante, ocasionando una

disminución en el rendimiento. Sin embargo, con el aumento del flujo se logra saturar el solvente a la salida de la cámara y mejorar así, la tasa de extracción. En la superficie de respuesta para el romero (Figura F1-A **ANEXO F**) se evidencia que, cambiando el flujo de operación de 3 kg/h a 6 kg/h se obtiene un incremento en el rendimiento de ~75 % pasando de 2 % a un máximo de 3,5 %. En los experimentos con salvia, se observó que la velocidad del solvente a través de la cámara de extracción es muy alta para la cantidad de material vegetal cargado (0,55 kg) y las condiciones de presión empleadas (50 MPa); en este caso, el solvente no está el suficiente tiempo en contacto con la matriz vegetal. En la gráfica de superficie de respuesta para salvia (Figura F2-A **ANEXO F**), el aumento de la presión se presenta como una solución para mejorar el rendimiento a las condiciones de flujo constante, debido a que se produce una mayor interacción entre el SF-CO₂ y la matriz vegetal a causa del incremento de la densidad del solvente. Sin embargo, las condiciones de presión que permiten mejorar el rendimiento, están por encima del rango de operación del equipo y, aún así, sólo se lograría un rendimiento máximo de 3,0 % a 110 MPa.

$$Velocidad\ CO_2 = (Q_{CO_2} / \rho_{CO_2}) / (\pi D^4 / 4) \quad (6)$$

Velocidad del CO₂ en la cámara de extracción

3.2.3 Efecto de la presión. En las tres especies objeto de estudio, éste parámetro tuvo un comportamiento diferente. Las extracciones de romero presentaron un valor óptimo en ~46,5 MPa, por encima del cual el rendimiento decrece. Este comportamiento fue descrito por Rosa *et al.* (2009), quienes lo explican como un efecto de la dispersión axial y el bajo coeficiente de transferencia de masa interfacial del sistema. Las gráficas de superficie de respuesta para romero (Figura E1 **ANEXO F**) muestran que, para aumentar el rendimiento es necesario incrementar el flujo o el tiempo de extracción. En los experimentos realizados con

salvia, el aumento de la presión favorece el rendimiento, incluso para valores por encima del nivel superior establecido en el diseño (50 MPa). Este comportamiento fue reportado por Sovová y Aleksovski (2007) y se atribuye a la tendencia de la solubilidad a incrementar con la presión. Sin embargo, esta variable no es la más significativa entre los parámetros de extracción estudiados, puesto que se observó que con un incremento de 30 a 60 MPa, empleando un flujo de 3 kg/h y un tiempo de extracción de 2 horas, la variación en el rendimiento no fue grande, pasando de 2 a 2,5 % (Véase Figura F2-C **ANEXO F**). Contrario a lo observado en las dos especies mencionadas anteriormente, en el caso de las hojas de guayaba, la presión fue el factor con el efecto menos relevante (valor $F = 3,415$), como se puede evidenciar en el análisis de varianza y en la Figura F3-A **ANEXO F**.

3.3 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ÁCIDO CARNÓSIDO, ACTIVIDAD ANTIRRADICALARIA Y RENDIMIENTO

El resultado de los análisis realizados a los extractos que presentaron mayor rendimiento se muestra en la **Tabla 8**. Para las extracciones de salvia y romero, el mayor rendimiento se presentó a las condiciones de 50 MPa, 3 kg/h y 2 h, mientras que para hojas de guayaba a 30 MPa, 3 kg/h y 2 h.

Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se identificó la presencia del ácido carnósido en los tres extractos (Véase **ANEXO G**). Se observó también, la presencia de picos cromatográficos diferentes al del ácido carnósido, tanto en el análisis del compuesto patrón como en los extractos, lo que permite suponer una posible degradación del compuesto a productos como el carnosol (Moura *et al.*, 2012)

El patrón del ácido carnósido (AC) analizado, presentó una actividad antirradicalaria (AA) de 10,80 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / mg extracto; este valor es tres veces más alto que el encontrado para la salvia, por lo que se esperaba que el extracto

de romero presentara la mayor AA, debido al contenido del compuesto en el extracto (Véase **Tabla 8**). Sin embargo, contrario a los análisis reportados por Ivanović *et al.* (2009); la AA del extracto de salvia, fue mayor que la de romero, incluso que el BHT y la vitamina E. A pesar de ello, el alto contenido de AC en el extracto de romero contribuyó a que este presentara el mayor efecto protector, siendo equiparable con el del BHT y superior en comparación con las demás especies.

Tabla 8. Resultados del contenido del ácido carnósico, actividad antirradicalaria y rendimiento de extractos.

Especie	Rendimiento, g extracto/ g base seca *100%	AA $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / mg extracto	EP, %	Contenido de AC, μg de AC/ mg de extracto
Romero	1,924	1,91	90 \pm 3,5	22,3
Salvia	2,349	3,20	80 \pm 1,7	2,8
Guayaba	1,168	1,03	43 \pm 0,6	1,1
BHT	NR	2,80	90 \pm 2,2	NR
Vitamina E	NR	3,00	60 \pm 4,5	NR
AC	NR	10,80	NR	NR

*AA: Actividad antirradicalaria. EP: Efecto protector. AC: Ácido carnósico. NR: No reportado

Dada la importancia del ácido carnósico, Fornari *et al.* (2011) realizaron estudios con extractos de romero donde calcularon los parámetros del modelo de Sovová descrito en la sección 1.5. En este estudio, se encontró que la solubilidad para el extracto de romero calculada como la pendiente de la CGE en el periodo de extracción constante (t_{CER} : 0,16 h) a 30 MPa y 313 K fue de 0,0033 kg de extracto/kg CO₂. Empleando la misma metodología para los datos experimentales de romero, se encontró que el extracto a las condiciones de 30 MPa y 323 K para el mismo periodo t_{CER} , presenta un valor de solubilidad (0,0035 kg de extracto/kg CO₂) muy similar aunque ligeramente mayor al encontrado por Fornari. Con base en estos resultados y lo reportado por Rižnar *et al.* (2008) sobre el aumento de la

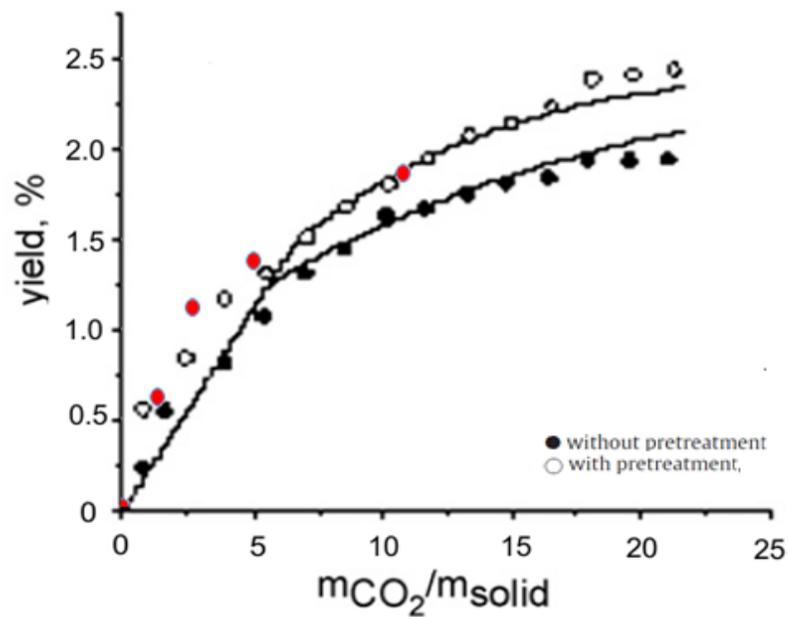
solubilidad del ácido carnósico con el aumento de la temperatura y presión de extracción, se esperaba que la cantidad de ácido carnósico presente en el extracto obtenido de romero a 50 MPa y 323 K, superara al encontrado por Meireles *et al.* (2005) a 30 MPa y 313 K. Sin embargo, los resultados del análisis por HPLC mostraron que la cantidad de ácido carnósico en el extracto fue mucho menor (~25 veces) que la reportada por Meireles. La razón de este comportamiento puede observarse mediante el análisis de la **Figura 5**, donde se muestra la CGE junto con el modelo de Sovová aplicado a la extracción de romero realizada por Meireles *et al.* (2005) para diferentes relaciones diámetro/altura. Los puntos rojos en la figura, indican los resultados obtenidos de los experimentos realizados a 30 MPa, 50 °C y 5,54 H/D. Los datos fueron ajustados a la CGE realizada por Meireles manteniendo la relación masa CO₂/masa de romero cargado*. En la figura anteriormente mencionada se observa que los datos obtenidos experimentalmente se ajustan muy bien a la tendencia predicha por el modelo de Sovová para el periodo de extracción constante, donde la transferencia de masa es gobernada por la convección. Sin embargo, para el periodo de extracción donde el efecto difusivo fue predominante, los datos se desviaron mucho de la tendencia del modelo. Este fenómeno evidencia que el periodo de extracción gobernado por la difusión se llevó a cabo de una manera más lenta que el reportado por Meireles, debido a que el flujo utilizado no fue el óptimo para la extracción de los diterpenos fenólicos del romero, en especial el ácido carnósico. La prolongada estadía del CO₂ en la cámara de extracción, debido a la baja velocidad del mismo, contribuyó a que el fenómeno de dispersión axial influenciara significativamente el resultado de la extracción.

Stamenic *et al.* (2010), muestran el resultado del modelo de Sovová para la extracción de salvia con y sin pretartamiento del material vegetal antes de extraer. La **Figura 6** muestra el comportamiento de los datos obtenidos experimentalmente a 30 MPa y 323 K (puntos rojos), junto con la tendencia del modelo hallado por

* Las curvas generales de extracción pueden relacionarse manteniendo la relación masa de CO₂-material cargado. $Flujo_{CO_2}^1 * t_{extracción}^1 / M_{cargada}^1 = Flujo_{CO_2}^2 * t_{extracción}^2 / M_{cargada}^2$

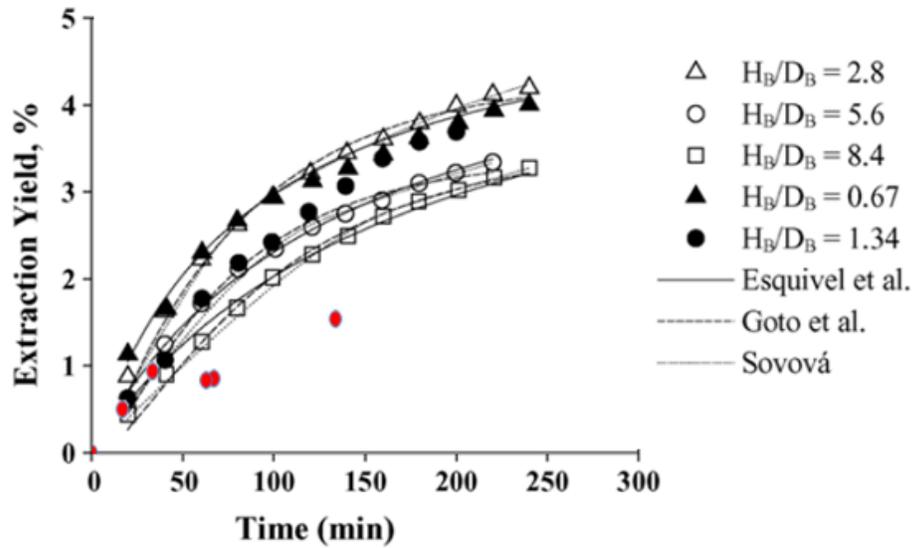
Stamenic, a 30 MPa y 313 K. Se observa que en general los datos de la extracción de salvia, se ajustan a la tendencia predicha por el modelo de Sovová, con un desfase entre la tendencia del modelo sin pretratamiento (puntos negros) y los datos experimentales, debido principalmente al aumento de la temperatura, que favoreció la solubilidad de los solutos en la matriz.

Figura 5. Comparación de datos experimentales de romero con los modelos empíricos.



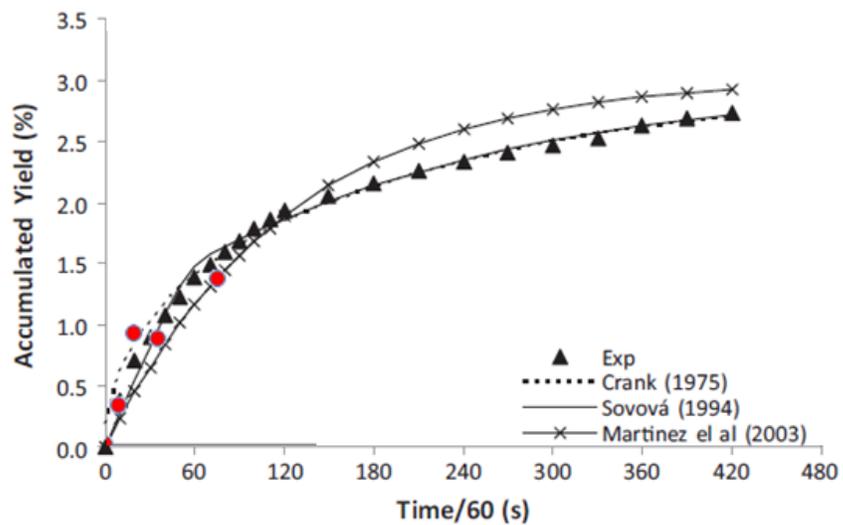
*30 MPa y 313 K. Adaptado de Meireles *et al.* (2005).

Figura 6. Comparación de datos experimentales de salvia con los modelos empíricos.



*30 MPa y 313 K. Adaptado de Stamenic *et al.* (2010).

Figura 7. Comparación de datos experimentales de hojas de guayaba con los modelos empíricos.



*30 MPa, 328 K y 5 % etanol. Adaptado de Moura *et al.* (2012).

En la **Figura 7** se muestra el comportamiento de los datos obtenidos experimentalmente a 30 MPa y 323 K (puntos rojos), junto con la tendencia del modelo de Sovová, hallado por Moura *et al.* (2012), a 30 MPa y 323,5 K, para la extracción de hojas de guayaba. Al igual que para el romero, el comportamiento de los datos en el periodo de extracción constante muestra que la tendencia del modelo se mantiene; sin embargo, la etapa gobernada por la difusión se ve afectada en este caso por el poco tiempo de contacto del solvente con la matriz vegetal, como lo muestran las gráficas de superficie de respuesta, anteriormente analizadas.

CONCLUSIONES

Los extractos obtenidos por SFE de romero y salvia, poseen propiedades antioxidantes, superiores o equiparables a las reportadas para los antioxidantes comúnmente utilizados en el mercado. Sumado a esto, los resultados del efecto protector sobre una base, permiten vislumbrar una posible aplicación industrial, en remplazo de los compuestos sintéticos BHA y BHT.

Como se esperaba, el tiempo de extracción fue el parámetro con mayor efecto sobre el rendimiento. Sin embargo, la dependencia que presentó el rendimiento de extracción con el flujo de CO₂, para las tres especies, demostró la importancia de establecer un flujo óptimo de saturación, en el que, según la geometría del lecho, el solvente esté el tiempo necesario en contacto con la matriz vegetal, evitando que el rendimiento decrezca por el efecto de la dispersión axial o el flujo sea tan alto que el solvente no pueda arrastrar la mezcla de solutos.

Los extractos de salvia a 30 MPa mantuvieron la tendencia del modelo de Sovová encontrado en la literatura para los tres diferentes periodos de extracción, debido a que la relación entre el flujo de CO₂ y el material vegetal cargado en los experimentos, favoreció la solubilidad de los compuestos en esta planta. Para obtener mejores rendimientos en romero y hojas de guayaba es necesario encontrar la relación óptima flujo-carga, ya que el estrecho intervalo escogido para las extracciones impidió que la etapa dominada por la difusión tuviera un efecto significativo en el rendimiento y en la solubilidad de compuestos fenólicos, a los que se atribuye la mayor capacidad antioxidante.

RECOMENDACIONES

Para mejorar la extracción de romero, se recomienda fijar el parámetro de la presión en el valor óptimo encontrado (46,5 MPa); ajustar la relación flujo de CO₂/ carga de alimentación y explorar el comportamiento de la solubilidad del ácido carnósico a diferentes temperaturas para así, obtener un mejor ajuste al modelo de Sovová en las tres etapas de extracción.

Los resultados de rendimiento, actividad antirradicalaria (AA) y efecto protector del extracto de salvia, revelan una potencial implementación como sucedáneo del BHT y BHA. Sin embargo, se recomienda realizar las pruebas de AA por una técnica distinta al método ORAC y la evaluación in vivo, completando así, el protocolo propuesto por Miquel *et al.* (2004) para la aplicación de antioxidantes en productos alimenticios y cosméticos.

BIBLIOGRAFÍA

BENSEBIA, O.; BARTH, D.; BENSEBIA, B.; DAHMANI, A. Supercritical CO₂ extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modeling. En: *J. Supercrit. Fluids*. 2009, vol. 49, p. 161-166.

BERTUCCO, A Y VETTER, G. High pressure process technology : fundamentals and applications. Nueva York.: Elsevier, 2001. 659 p. ISBN 9780444504982.

BISIO, A.; ROMUSSI, G.; CIARALLO, G.; DE TOMMASI, N. Flavonoids and triterpenoids from *Salvia blepharophylla*. En: *Pharmazie*. 1997, vol. 73, p. 330–331

CHEN, H.-Y y YEN, G.-C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidiumguajava* L.) leaves. En: *Food Chem*. 2007, vol. 101, p. 686–694.

CUVELIER, M.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. En: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, vol. 73 no. 5, p. 645–652.

DE SIMONE, J.; BUNYARD, W.; De YOUNG, J.;KADLA, J. Viscosity effects on the thermal decomposition of bis(perfluoro- 2N-propoxypropionyl) peroxide in dense carbon dioxide and fluorinated solvents En: *J. Am. Chem. Soc.* 2001, vol. 123 no. 30., p. 7199-206.

DEL VALLE, J.; DE LA FUENTE, J.; CARDARELLI, D. Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in latin america. En: *J. Food Eng.* 2005, vol. 67, p. 35-57.

DHI Water and Environment. Study on Enhancing the Endocrine Disrupter Priority List with a Focus on Low Production Volume Chemicals. Revised Report to DG Environment. Hershholm, Denmark: DHI, 2007. http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/final_report_2007.pdf.

DÍAZ, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. Antioxidant Extraction by Supercritical Fluids. En: MARTÍNEZ, L.; Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. Boca Raton, FL.: CRC PRESS LLC, 1996. p. 275-304.

DOMÍNGUEZ, H.; DÍAZ, B.; MOURE, A.; PARAJÓ, J. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. En: *J. Agric. Food Chem.* 2006, vol. 54 no. 7, p. 2441-2469.

FORNARI, T.; R, M.; GARCÍA, Risco.; HERNÁNDEZ, E.; VICENTE,G.; SEÑORÁNS, F.; REGLERO, G. Kinetic study of pilot-scale

supercritical CO₂ extraction of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. En: *J. Supercrit. Fluids*. 2011, vol. 55, p. 971-976.

GUPTA, R Y SHIM, J. Solubility in Supercritical Carbon Dioxide. Boca Raton, FL.: CRC PRESS LLC, 2007. 960 p.

HASAN, M y KUMORO, A. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Andrographolide from *Andrographis paniculata*: Effect of the Solvent Flow Rate, Pressure, and Temperature. En: *Chin. J. Chem. Eng.* 2007, vol. 15 no. 6, p. 877-883.

IBANEZ, L.; KUBÁTOVÁ, A.; SEÑORÁN, F.; CAVERO, S.; REGLERO, G.; HAWTHORNE, S. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. En: *J. Agric. Food Chem.* 2003, vol. 51 no. 2, p. 375-82.

IVANOVIĆ, J.; ĐILAS, S.; JADRANIN, M.; VAJS, V.; BABOVIĆ, N.; PETROVIĆ, S.; IŽOVIĆ, I. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). En: *J. Serb. Chem. Soc.* 2009, vol. 77 no. 7, p. 717–732.

JECFA. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. En: Who Food Additives Series, 1996 vol. 35. p. 3–86. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva.

LEHOTAY, S. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. En: *J. Chromatogr. A*. 1997, vol. 785, p. 289-312.

LÓPEZ, S.; RAMOS, E.; IBÁÑEZ, E., BUENO, J.; BALLESTER, L.; TABERA, J.; REGLERO, G. Dearomatization of antioxidant rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide. En: *J. Agric. Food Chem.* 1998, vol. 46 no. 1, p. 13-19

LUQUE, M; VALCARCEL, M; TENA, M. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Barcelona.: Editorial REVERTÉ, S.A., 1993. 480 p. ISBN 9788429179873.

MADHAVI, D.; DESHPANDE, S.; SALUNKHE, D. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. Nueva York.: Marcel Dekker. 1995. 512 p. ISBN 9780824793517.

MAGOULAS, K.; PAPAMICHAIL, I.; LOULI, V. Supercritical fluid extraction of celery seed oil. En: *J. Supercrit. Fluids*. 2000, vol. 18, p. 213- 226.

MASAKI, H.; SAKAKI, S.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. En: *Biol. Pharm. Bull.* 1995, vol. no.1, p. 162–166.

MCIT. Informe final: Sector Cosmético y Productos de Aseo. Bogotá, 2009, p. 306.

- MEIRELES, A.; CARVALHO Jr, R.; MOURA, L.; ROSA, P. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. En: *J. Supercrit. Fluids*. 2005, vol. 35 p. 197-204.
- MIQUEL, E.; NISSEN.; SKIBSTED, L. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. En: *Eur. Food Res. Technol.* 2004, vol. 219 no. 6, p. 561-571.
- MONTAGNA, J.; PAULAITIS, M.; PENNINGER, J.; GRAY, R.; DAVISON, K. (Eds.). Chemical engineering at supercritical conditions. Michigan.: Elsevier Science & Technology Books, 1983. 543 p. ISBN 0250405644.
- MOURA, P.; PRADO, G.; MEIRELES, A.; PEREIRA, C. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. En: *J. Supercrit. Fluids*. In Press, Corrected Proof. 2012.
- MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. Boca Raton, FL.: CRC PRESS LLC, 2000. 337 p. ISBN 0-8493-0819-4.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. En: *J. Agric. Food Chem.* 2001, vol. 4, p. 4619-4626.
- PÉREZ, R.; MITCHELL, S.; VARGAS, R. *Psidiumguajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. En: *J. Ethnopharmacol.* 2008, vol. 117, p. 1-27.
- PROEXPORT, Sector cosméticos. Editado por Augusto Castellanos. Bogotá D.C.: Fiducoldex- Fideicomiso Proexport Colombia. 2010. 32p. ISSN 2027-3568.
- RAU, O.; WURGLICS, M.; PAULKE, A.; ZITZKOWSKI, J.; MEINDL, N.; BOCK, A.; DINGERMANN, T.; ABDEL-TAWAB, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ M. Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiates herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. En: *Planta Medica*. 2006, vol. 76, p. 881-887.
- REVERCHON, E. y DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. En: *J. Supercrit. Fluids*. 2006, vol. 38, p.146-166.
- RIŽNAR, K.; ČELAN, Š.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Solubility of carnosic acid and carnosol from rosemary extract in supercritical CO₂. En: *Acta Chim. Slov.* 2008, vol. 55, p. 516-520.

ROSA, P. T. V.; PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; MOURE, A.; DÍAZ, B.; SMITH, R. L. Jr.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L. J., PETERS, C. J.; GOTO, M.; LUCAS, S.; MEIRELES, M. (Ed). Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. En: MEIRELES, M. Extracting bioactive compounds for food products: Theory and applications. Boca Raton, FL.: CRC PRESS LLC. 2009. p. 269-288.

RUIZ, C.; ARIAS, J.; RAMIREZ, E.; ARIAS, G.; STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. Combined Optimization of Antioxidant Activity, Phenol Content and Yield of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts Obtained by Supercritical CO₂ Extraction. En: International conference: "Renewable Wood and Plant Resources: Chemistry, Technology, Pharmacology, Medicine" (21-24, Junio: San Petersburgo, Rusia). Memorias. 2011 p. 180.

SOVOVÁ, H. y ALEKSOVSKY, S. Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. En: *J. Supercrit. Fluids*. 2007, vol. 40, p. 23-245.

SCHWARZ, K y TERNES, W. Antioxidative Constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. En: *Z. Lebensm. Unters Forsch.* 1992, vol. 195 no. 2, p. 95-8

SDPN, SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. Utilización del ácido carnósico por sus propiedades anticarcinógenas y antivíricas. Inventores: AESCHBACH, R. y PHILIPPOSIAN, G. Int. Cl.: A61K 31/19. Fecha de solicitud: 6, octubre, 1990. España. Patente de investigación. ES 2 137 963 T39, febrero, 1994.

SHI, J.; KHATRI, M.; JUN XUE, S.; MITTAL, G.; MA, Y.; LI, D. Solubility of lycopene in supercritical CO₂ fluid as affected by temperature and pressure. En: *Sep. Purif. Technol.* 2009, vol. 66, p. 322-328.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetables oil extraction with supercritical CO₂. I Modelling of extractions curves. En: *Chem. Eng. Sci.* 1994, vol. 4, p. 409-414.

SOVOVÁ, H. Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. En: *J. Supercrit. Fluids*. 2011. In Press, Corrected Proof .

STAMENIC, M.; ZIZOVIC, I.; EGGERS, R.; JAEGER, P.; HEINRICH, H.; RÓJ, E.; IVANOVIC, J.; SKALA, D. Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide. En: *J. Supercrit. Fluids*. 2010, vol. 52, p. 125-133.

STASHENKO, E. E., PUERTAS, M.; MARTÍNEZ, J. SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in-vitro antioxidant activity. En: *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, vol. 373, p. 70-74.

STASHENKO, E. E., PUERTAS, M.; SALGAR, W.; DELGADO, W.; MARTÍNEZ, J. Solid-Phase Microextraction with On-Fibre Derivatisation Applied to the Analysis of Volatile Carbonyl Compounds. En: *J. Chromatogr. A*. 2000, vol. 886, p. 175-181.

THORSEN, M y HILDEBRANDT, K. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification. En: *J. Chromatogr. A*. 2003, vol.95, p.119-125

WILLIAMS, J y CLIFORD, A. Supercritical Fluid Methods and Protocols. Totowa, New Jersey.: Humana Press Inc. 2000. p. 272.

YANG, C.; XU, Y.; YAO, W. Extraction of pharmaceutical components from Ginkgo biloba leaves using supercritical carbon dioxide. En: *J. Agric. Food Chem.* 2002, vol. 50 no.4, p. 846–849.

YIN, J.; WANG.; WEI, W.; LIU, Y.; SHI, W. Analysis of de operation conditions for supercritical fluid extraction of seed oil. En: *Sep. Purif. Technol.* 2005, vol. 43, p. 163-167.

ANEXOS

ANEXO A. PLANTAS ESTUDIADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.



El Romero (*Rosmarinus officinalis*), familia Labiada, es una hierba aromática densa, perenne y resistente de 90 a 200 cm de altura con hojas pequeñas (2-4 cm) puntiagudas, pegajosas y resistentes. Se emplea en alimentos funcionales, nutracéuticos botánicos y cosméticos. El romero ha sido aceptado como una de las especias con alta actividad antioxidante. Las sustancias asociadas con la actividad antioxidante de los extractos de romero son diterpenos fenólicos, entre los cuales el ácido carnósico y el carnosol, son los más útiles; su contenido en las hojas secas oscila entre 1,5 y 2,5 % para el ácido carnósico y 0,3 - 0,4 % para el carnosol.



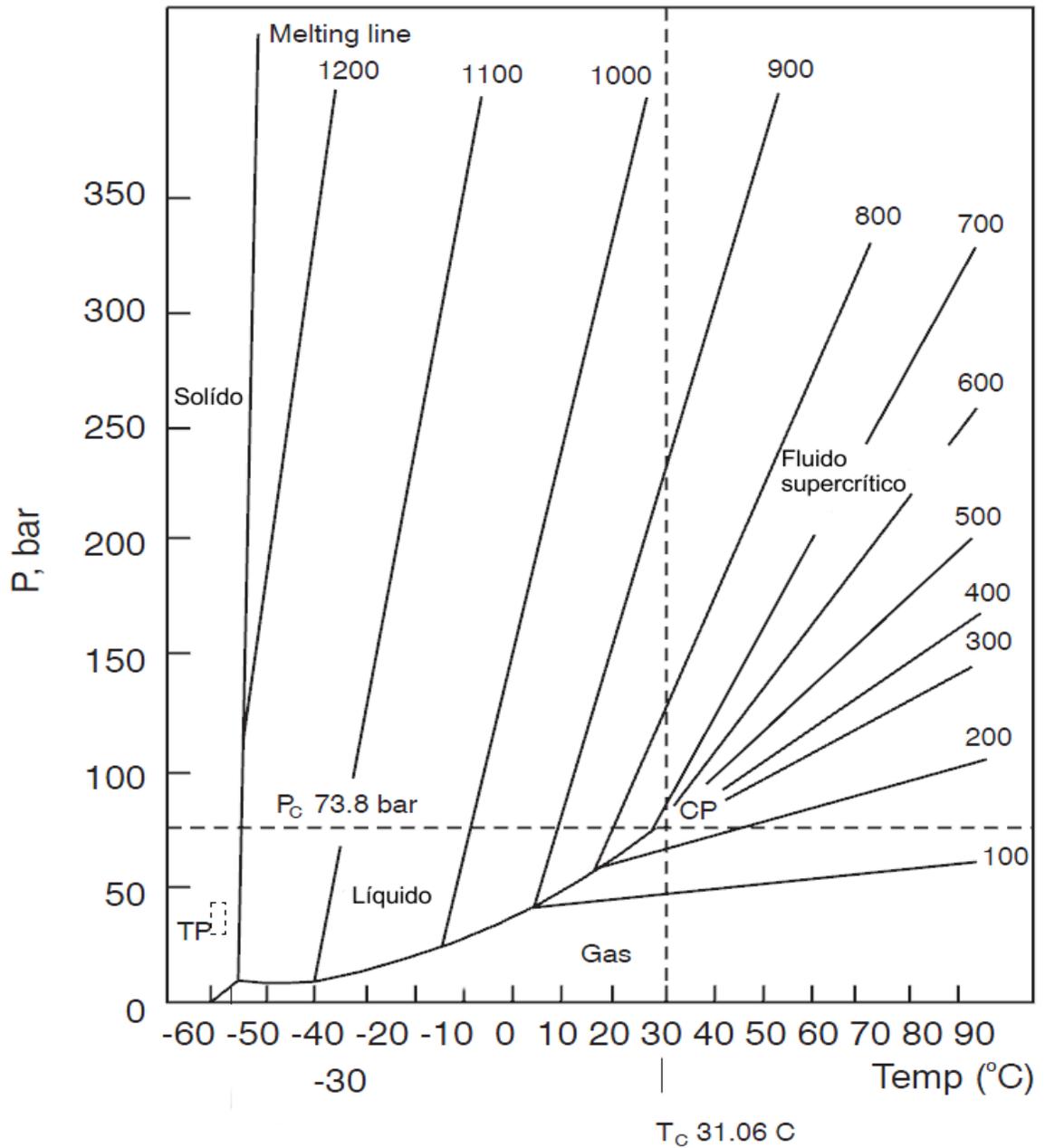
La Salvia (*Salvia officinalis*), familia Labiada, es una planta perenne aromática de hasta 70 cm de altura, con hojas ovaladas, nervadura bien marcada y flores violetas en racimos. Los metabolitos presentes en esta planta poseen efectos medicinales reportados y su actividad antioxidante se debe principalmente al ácido carnósico y ácido rosmarínico.



La guayaba (*Psidium guajava*), familia Mirtacea, es un pequeño árbol perenne de 2 a 7 m de altura ramificado de madera dura. Posee blancas, grandes y olorosas flores. Tanto la fruta como la hoja son fuentes de flavonoides, polifenoles y otras sustancias bioactivas. Es originaria de América tropical y es la más conocida de las frutas Mirtáceas.

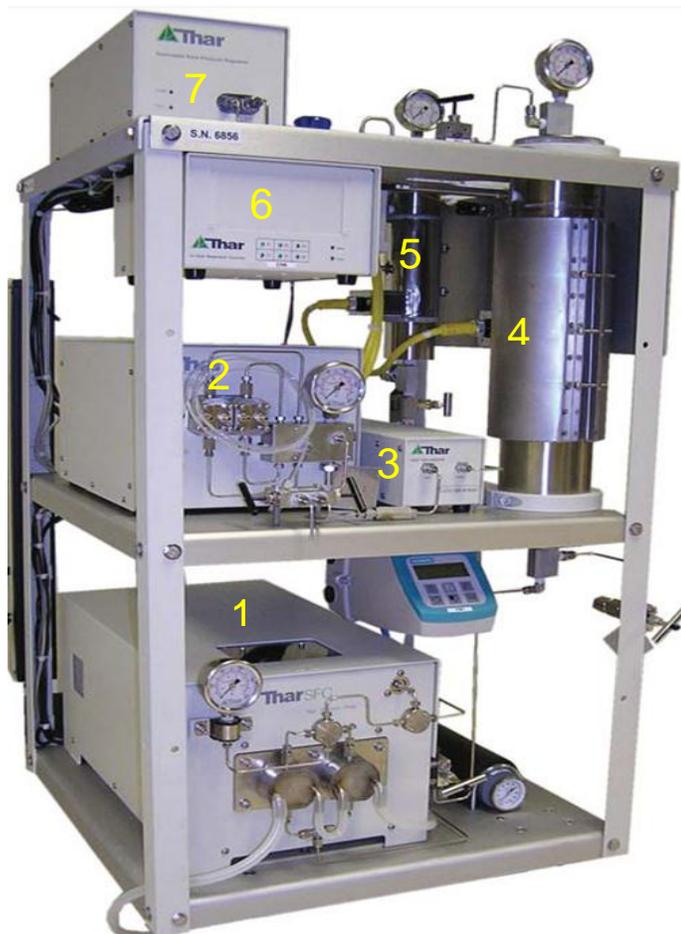
ANEXO B. DIAGRAMA DE FASES CO₂

Figura B3. Diagrama de fases CO₂.



ANEXO C. PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO.

Figura C1. Planta piloto de extracción con fluido supercrítico



Partes principales

1. Bomba de alta presión
2. Bomba de cosolvente
3. Intercambiador de calor
4. Cámara de extracción
5. Cilindro colector
6. Controlador
7. Válvula de alta presión BPR

Tabla C1. Especificaciones técnicas

PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO	
SFE-2000-2-FMC50 (Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.)	
Volumen	0.00178m ³ (altura: 0,41m; Diámetro: 0,074m)
Rango de temperatura	0- 120 °C
Rango de Flujo	3- 200 g/min
Rango de presión	1- 600 Bar
Solventes aprobados para bombas <i>Thar Technologies</i>	Acetonitrilo, metanol, alcohol isopropílico, etanol, dióxido de carbono, cloroformo.

ANEXO D. ALGORITMO PARA LA VALIDACIÓN DEJANDO UNO POR FUERA (LOO)

```

clc
disp('METODO LEAVE ONE OUT')

//Ingresar los datos

nomvars=['Numero de experimentos';'Numero de terminos'];
txtvars=string(zeros(2,1));
txtvars=x_mdialog('Ingrese los siguientes datos',nomvars,txtvars);
valvars=evstr(txtvars);

NE=valvars(1,1);
NT=valvars(2,1);

X=[zeros(NE,NT)];
titulos=['Matriz de datos (pulse OK para actualizar)';'Termino1, Termino2, Termino3, Termino4, Termino5, ...'];
X=x_matrix(titulos,X);

Y=[zeros(NE,1)];
titulos2=['Matriz de datos (pulse OK para actualizar)';'Observable'];
Y=x_matrix(titulos2,Y);

//Entran datos a las matrices

MDE=[zeros(NE-1,NT)];
Y1=[zeros(NE-1,1)];
MDR=zeros(NE,NT+6);

k=1;
j=1;
i=1;
ret=0;
for k = 1:NE
for j = 1:NT
for i = 1:(NE - 1)
if i < k
MDE(i, j) = X(i, j);
Y1(i,1) = Y(i, 1);
ret = i;
else
MDE(i, j) = X(1 + i, j);
Y1(i,1) = Y(1 + i, 1);
end
end
end

B=(inv(MDE'*MDE)*MDE')*Y1;
YC=MDE*B;
E=(Y1-YC);
SSresid=E.^2;
SSregr=(YC-(sum(Y1)/(NE-1))).^2;
SStot=(Y1-(sum(Y1)/(NE-1))).^2;
RMSEC=(sum(SSresid)/(NE-1));
R2=sum(SSregr)/sum(SStot);
R2ajust=((sum(SStot)/(NE-2))-(sum(SSresid)/(NE-NT-2)))/(sum(SStot)/(NE-2));
YCV=X(ret+1,:)*B;
SSregreval=(Y(ret+1,1)-YCV)^2;

```

```

MDR(k,1)=k;
fori=2:NT+1
MDR(k,i)= B(i-1);
end
MDR(k,NT+2)=sum(SSresid);
MDR(k,NT+3)=RMSEC;
MDR(k,NT+4)=R2;
MDR(k,NT+5)=R2ajust;
MDR(k,NT+6)=SSregreval;

end

MDRR=string(zeros(NE+1,NT+6));
MDRR(1,1)='Experimento';
MDRR(1,2)='INTERCEPTO';
fori=1:NT-1
MDRR(1,i+2)='BETTA';
end
MDRR(1,NT+2)='SSresiduales';
MDRR(1,NT+3)='RMSEC';
MDRR(1,NT+4)='R2';
MDRR(1,NT+5)='R2 ajustado';
MDRR(1,NT+6)='E de valid al cuadrado';
MDRR(2:NE+1,1:NT+6)=string(MDR);
MDSS=mean(MDR(:,NT+2));

disp(MDRR);
disp('Media de los residuales');
disp(MDSS);
disp('Suma de los errores de validación al cuadrado');
disp(mean(MDR(:,NT+6)));

RESPUESTA=MDR;
editvar RESPUESTA

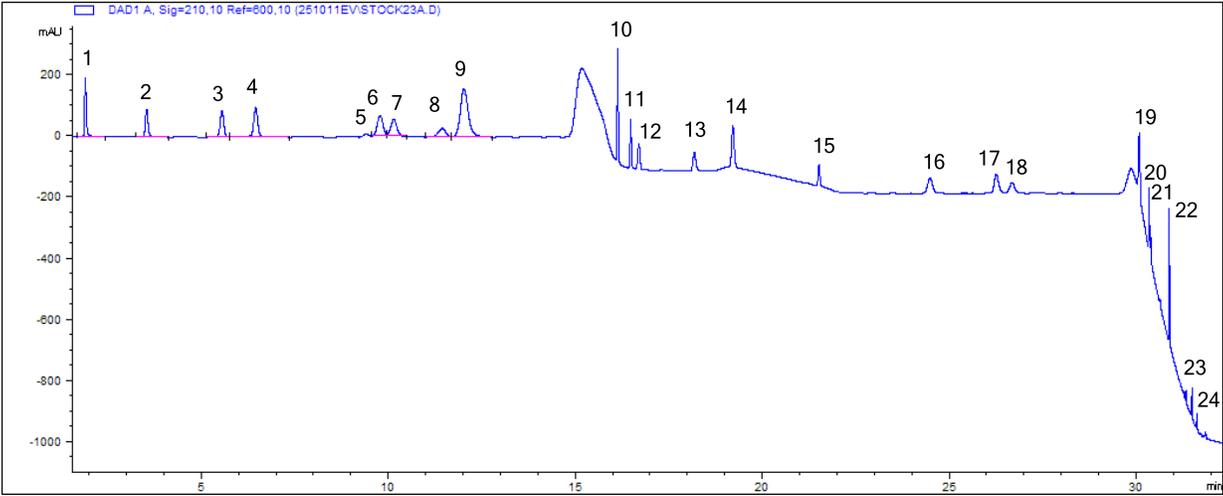
```

ANEXO E. ANÁLISIS POR HPLC.

Tabla E1. Tiempo de retención promedio de los 24 compuestos antioxidantes, analizados por HPLC-DAD

N° Pico	Analito	Tiempo de retención
1	Ácido gálico	1.88
2	Teobromina	3.46
3	Teofilina	5.45
4	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	6.38
5	(-)-Epigallocatequina	9.05
6	(±)-Catequina	9.60
7	Ácido vanílico	9.99
8	Ácido caféico	11.28
9	Cafeína	11.75
10	(-)-Epicatequina	16.10
11	(-)-Epigallocatequina galato	16.45
12	Ácido <i>p</i> -cumárico	16.66
13	Ácido ferúlico	18.15
14	(-)-Epicatequina galato	19.20
15	Ácido rosmarínico	21.51
16	Ácido <i>trans</i> -cinámico	24.48
17	Quercetina	26.26
18	Luteolina	26.67
19	Naringenina	30.07
20	Apigenina	30.33
21	Kaempferol	30.37
22	Pinoembrina	30.87
23	Ácido carnósico	31.48
24	Ácido ursólico	32.40

Figura E1. Perfil cromatográfico de una solución 20 ppm de los 24 compuestos antioxidantes



ANEXO F. GRÁFICAS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA RSM

Figura F1. Rendimiento del extracto en función de las variables independientes flujo, presión y tiempo; en el modelo propuesto para la especie de romero.

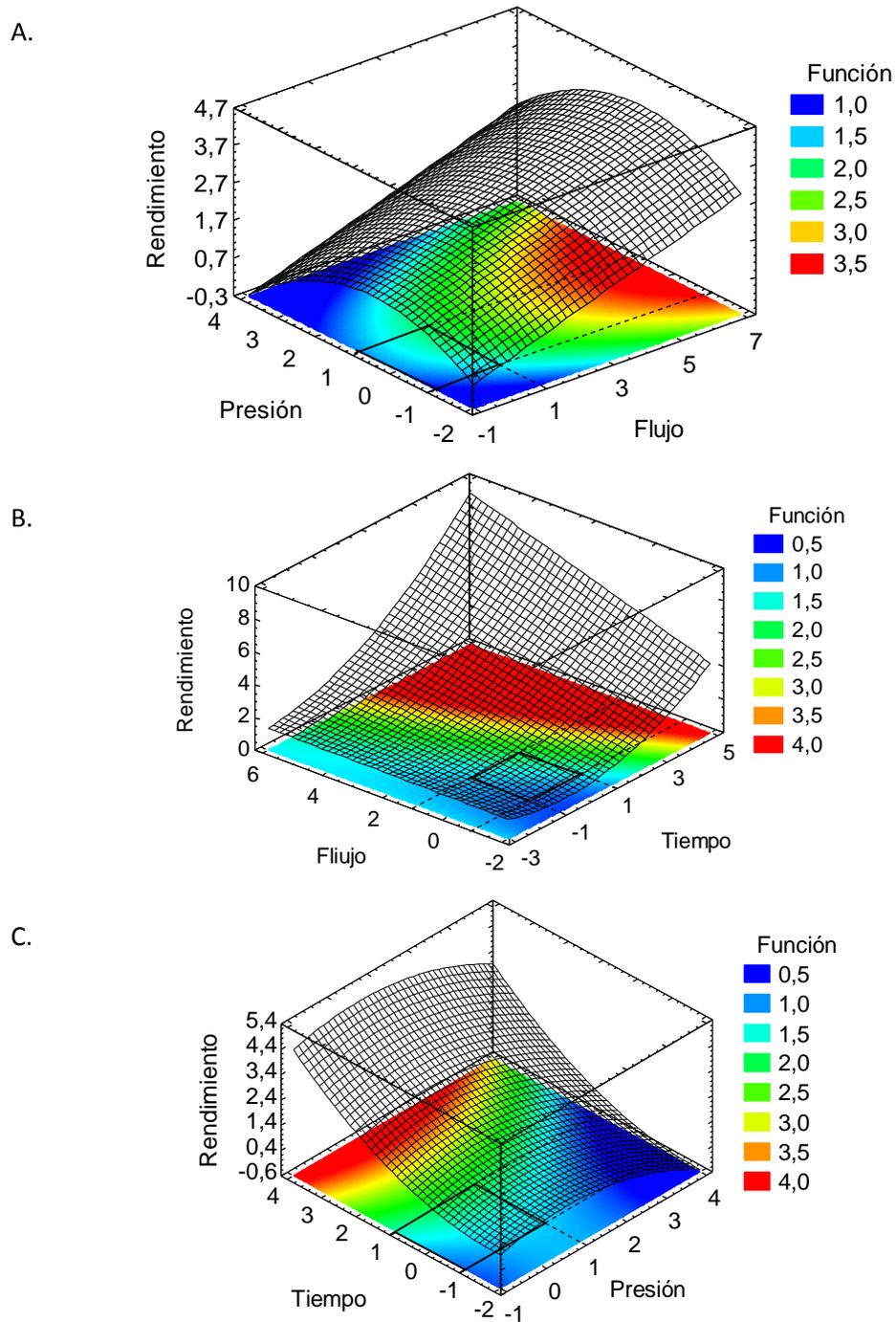


Figura F2. Rendimiento del extracto en función de las variables independientes flujo, presión y tiempo; en el modelo propuesto para la especie de salvia.

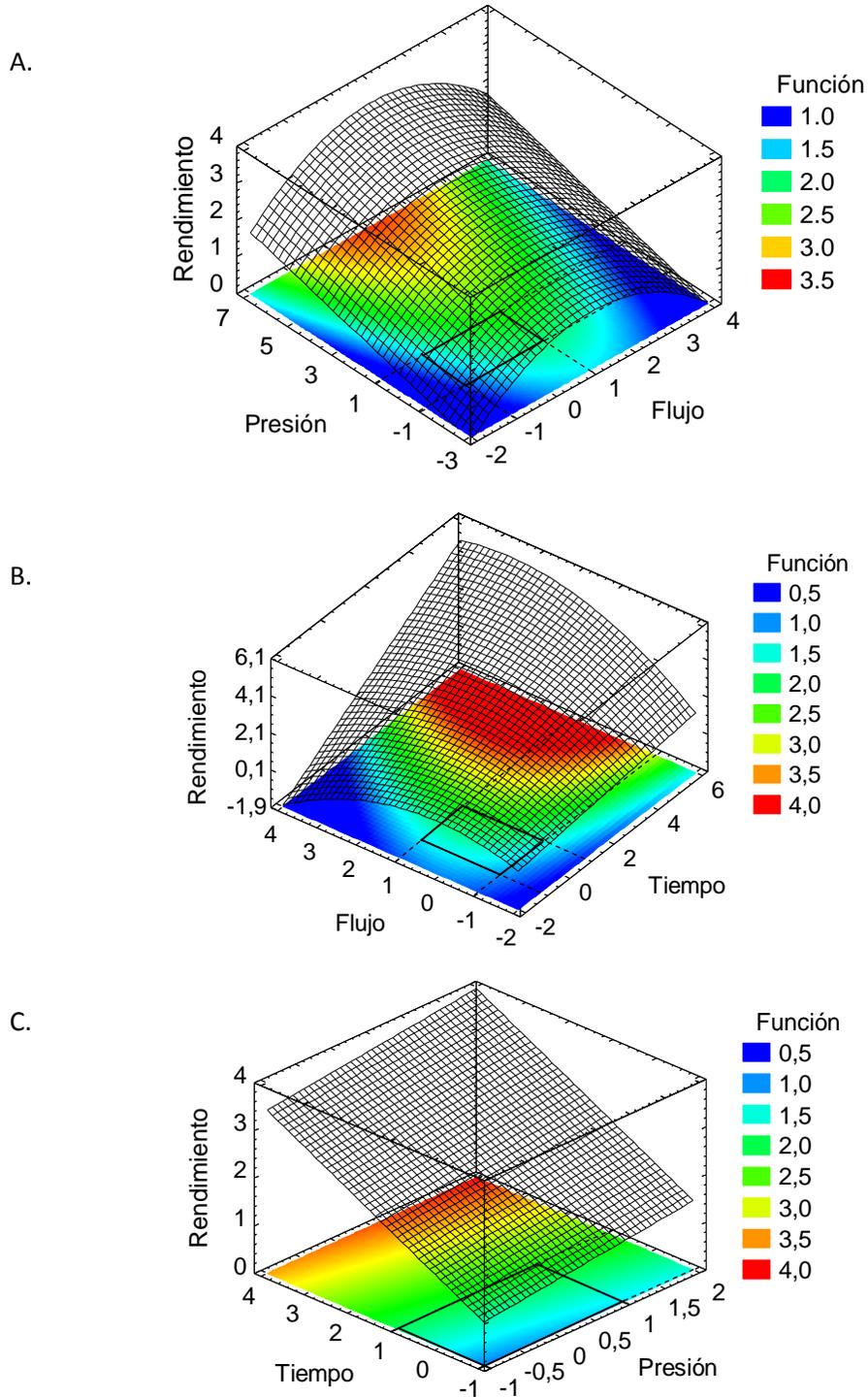
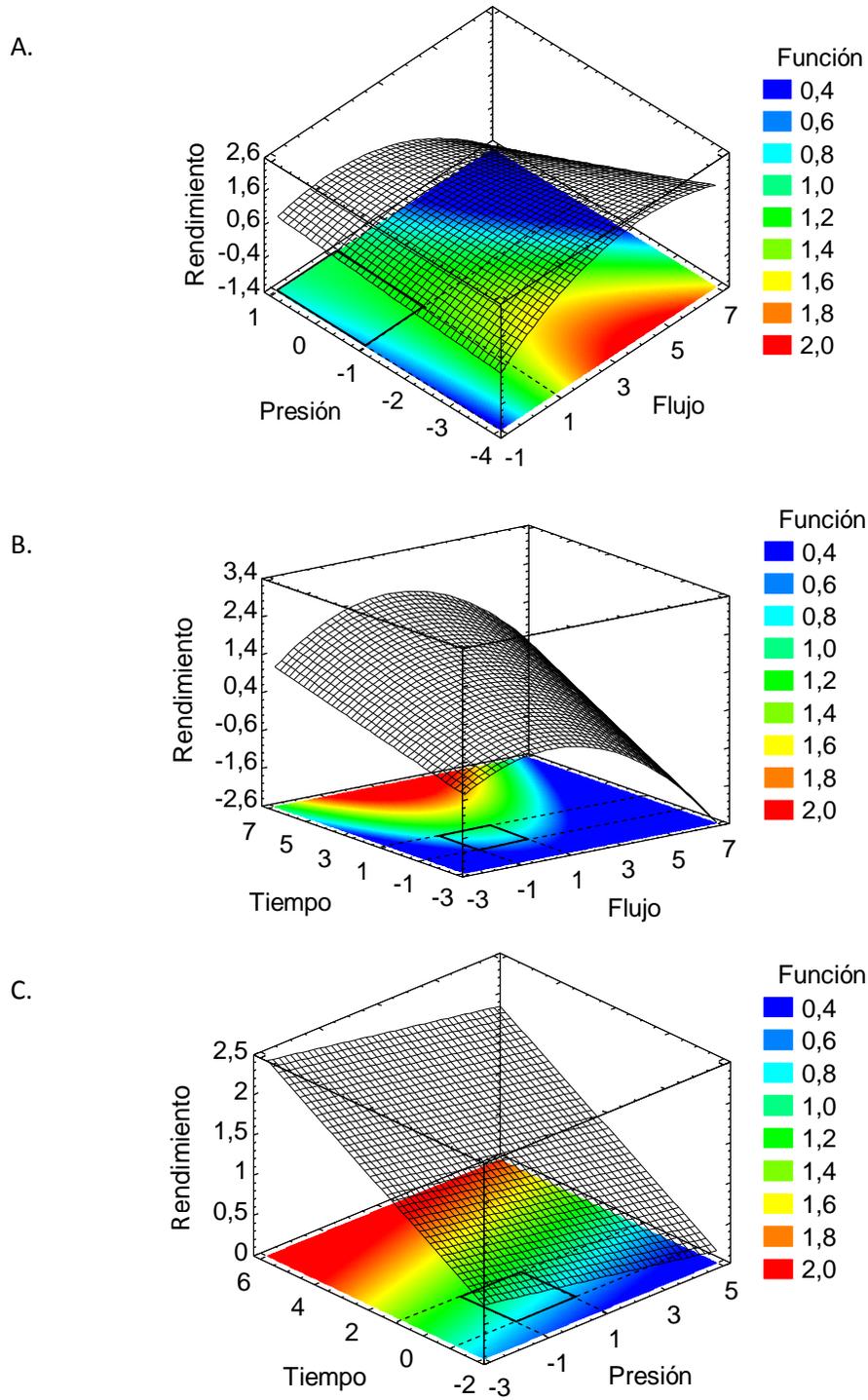


Figura F3. Rendimiento del extracto en función de las variables independientes flujo, presión y tiempo; en el modelo propuesto para la especie de guayaba.



ANEXO G. FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE LOS CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC-DAD.

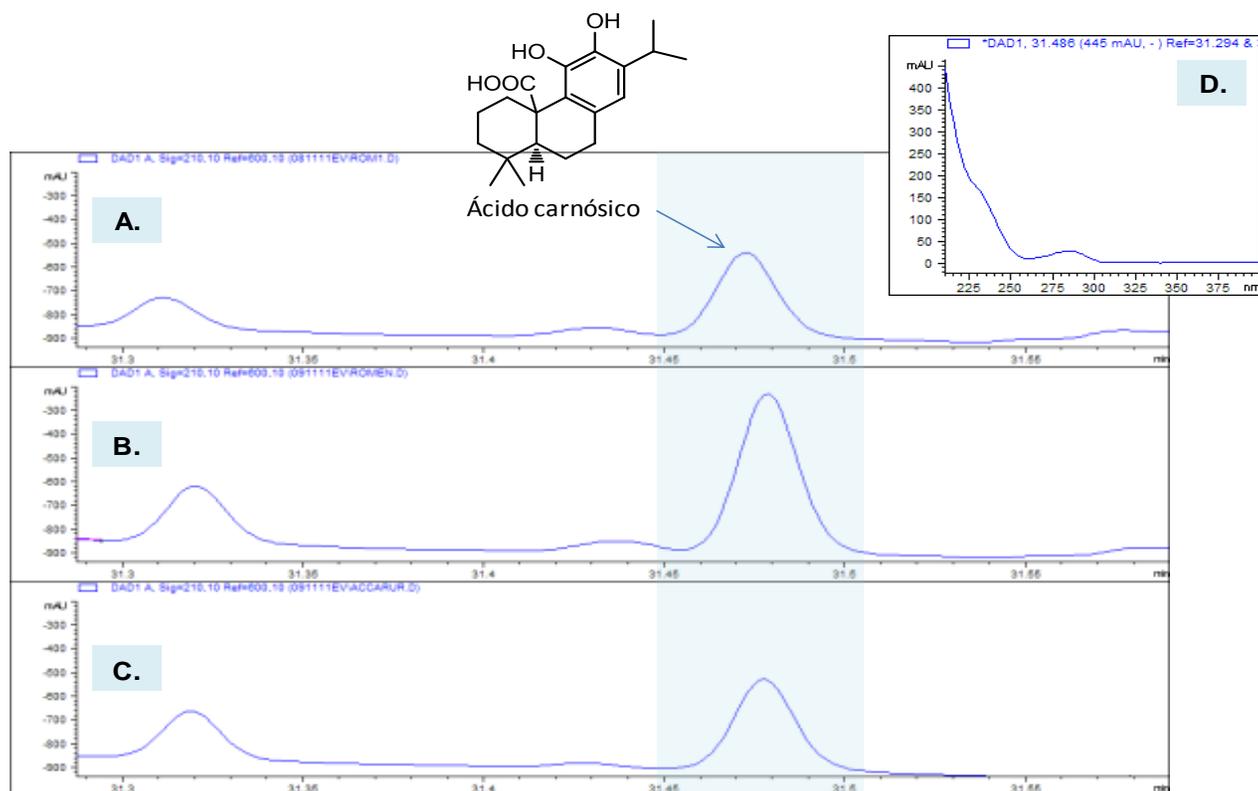


Figura G1. **A.** Extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.). **B.** Extracto de romero enriquecido con ácido carnósico. **C.** Solución patrón de ácido carnósico (40 ppm). **D.** Espectro ultravioleta- visible del ácido carnósico tomado a 210 nm. Columna KINETICS 2.6u C18 100Å (100 mm x 4,6 mm x 2,6 µm). Tomado del informe de avance No. 3, del proyecto “Desarrollo de nuevos productos antioxidantes naturales para la industria cosmética” realizado por el grupo de investigación CIBIMOL para la Gobernación de Santander.

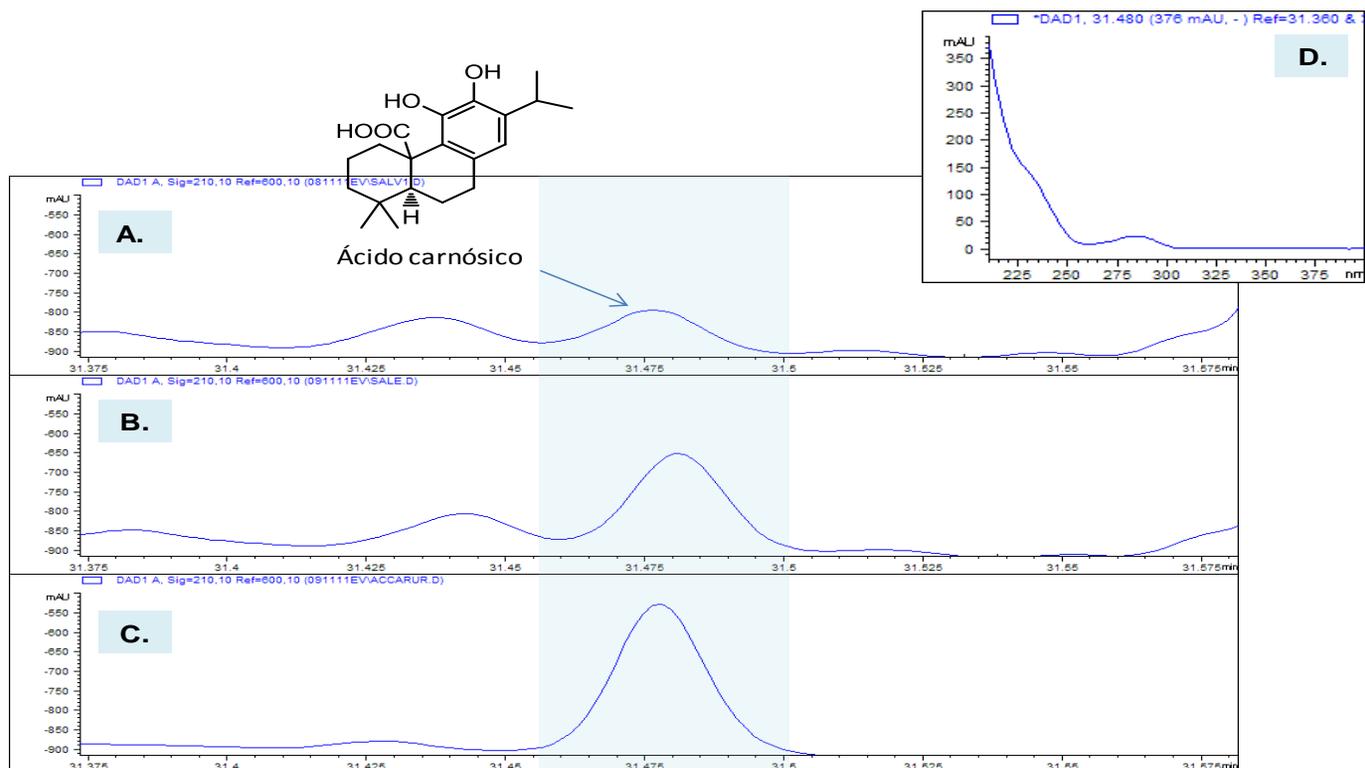


Figura G2. A. Extracto de salvia (*Salvia officinalis* L.). B. Extracto de salvia enriquecido con ácido carnósico. C. Solución patrón de ácido carnósico (40 ppm). D. Espectro ultravioleta- visible del ácido carnósico tomado a 210 nm. Columna KINETICS 2.6u C18 100Å (100 mm x 4,6 mm x 2,6 µm). Tomado del informe de avance No. 3, del proyecto “*Desarrollo de nuevos productos antioxidantes naturales para la industria cosmética*” realizado por el grupo de investigación CIBIMOL para la Gobernación de Santander.

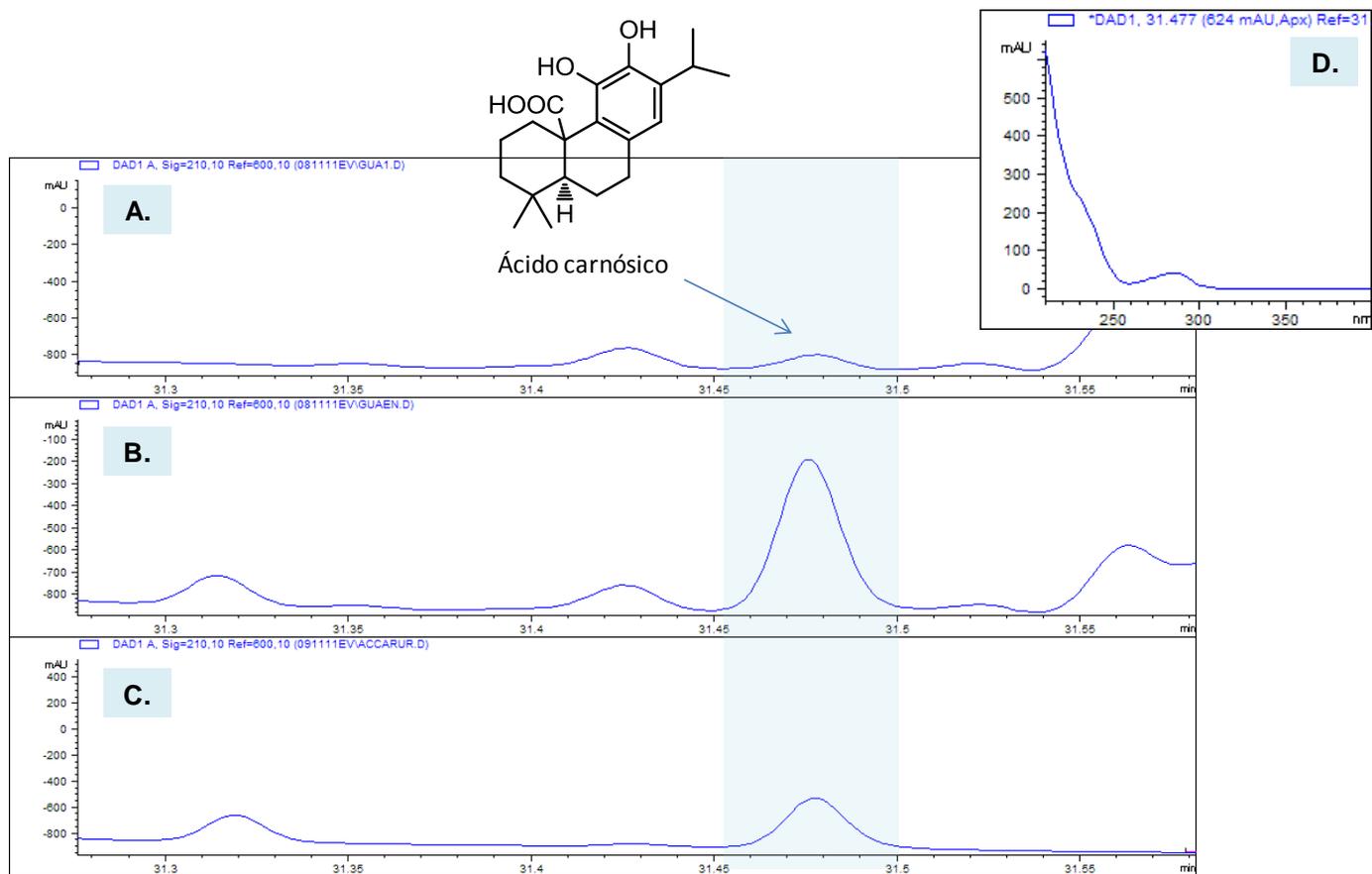


Figura G3. **A.** Extracto de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.). **B.** Extracto de hojas de guayaba enriquecido con ácido carnósico. **C.** Solución patrón de ácido carnósico (40 ppm). **D.** Espectro ultravioleta- visible del ácido carnósico tomado a 210 nm. Columna KINETICS 2.6u C18 100Å (100 mm x 4,6 mm x 2,6 µm). Tomado del informe de avance No. 3, del proyecto “Desarrollo de nuevos productos antioxidantes naturales para la industria cosmética” realizado por el grupo de investigación CIBIMOL para la Gobernación de Santander.