

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO (CO₂) DE
ANTIOXIDANTES PRESENTES EN *S. officinalis* y *T. vulgaris*.**

CARLOS ALBERTO RUIZ NOVA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2013**

**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO (CO₂) DE
ANTIOXIDANTES PRESENTES EN *S. officinalis* y *T. vulgaris*.**

CARLOS ALBERTO RUIZ NOVA

**Trabajo de investigación presentado
como requisito parcial para optar
al título de Magister en Química**

**Directores: Elena Stashenko. Química, Ph. D.
Jairo René Martínez. Químico, Ph. D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

*A la persona que me enseñó
el significado del amor y
por Ella eternamente amaré*

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Elena Stashenko por todas sus enseñanzas académicas, por las lecciones de vida, por su dedicación, por su interminable tiempo, por su energía y fortaleza transferida a todos sus alumnos y por hacer de la Universidad y el país lugares mejores.

Al doctor Jairo René Martínez por sus valiosos aportes en todas áreas del conocimiento que se aplicaron en este trabajo y por todos los momentos compartidos.

A los Doctores Fabián Parada y Enrique Mejía por todos los aportes a la realización de esta investigación.

A la persona más importante de mi vida porque sin su fortaleza, carácter, puntualidad y apoyo esto no hubiera sido posible, juntos sufrimos y disfrutamos de esta experiencia. Sin su amor, compañía y paciencia nada hubiera llegado a feliz término.

A mi mamá por toda la fuerza positiva que me envió a 100 km de distancia durante mis estudios, por su sufrimiento y orgullo de Mamá. A mi hermanita por estar pendiente de mí siempre y ser mi confidente. A mis hermosas sobrinitas por regalarme siempre sus sonrisas. A mi abuelitas Socorro y Hercilia por mostrarme con temple y sabiduría los caminos de la vida. A los demás familiares por preocuparse por mí.

A todos mis compañeros del laboratorio en especial a Néstor, Julián, Edwin, Camilo, Beatriz, Mónica, Corina, Natalie, Yuri, Freys, Joaquín, Gustavo, David, Paola y José V. A donde quiera que vaya los llevaré e mis pensamientos.

Carlos Alberto Ruiz Nova

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	27
1. MARCO TEÓRICO	30
1.1. DEFINICIÓN DE FLUIDO SUPERCRÍTICO	30
1.2. EL CO ₂ COMO FLUIDO SUPERCRÍTICO	30
1.3. PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	32
1.4. SOLUBILIDAD EN UN SOLVENTE SUPERCRÍTICO	37
1.4.1. Isotermas de solubilidad.	37
1.4.2. Isóbaras de solubilidad.	39
1.4.3. Efectos de la presión y la temperatura.	40
1.5. PROCESO DE EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	41
1.6. ANTIOXIDANTES	43
1.6.1. Antioxidantes fenólicos.	44
1.6.2. Cuantificación de antioxidantes fenólicos.	44
1.6.3. Determinación de la capacidad antioxidante.	45
1.7. DISEÑOS DE EXPERIMENTOS Y OPTIMIZACIÓN	46
1.7.1. Diseños de experimentos factoriales fraccionados.	47
1.7.2. Optimización mediante el método <i>Simplex</i> .	48
1.8. PLANTAS BAJO ESTUDIO	49
1.8.1. <i>Salvia officinalis</i> .	49
1.8.2. <i>Thymus vulgaris</i> .	49
2. ANTECEDENTES	50
2.1. ANTIOXIDANTES DE TIPO FENÓLICO PRESENTES EN LAS PLANTAS ESTUDIADAS	50
2.2. SOLUBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN CO ₂ -SC	51
2.3. EFECTO DE LAS VARIABLES OPERATIVAS EN EL	55

RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CANTIDAD DE ANTIOXIDANTES

2.3.1.	Presión.	56
2.3.2.	Temperatura.	58
2.3.3.	Modificador.	59
2.3.4.	Tamaño de partícula y densidad de carga.	61
2.3.5.	Humedad y secado del material vegetal.	62
2.3.6.	Flujo del solvente.	63
2.3.7.	Tiempo de extracción.	63
2.3.8.	Condiciones de separación.	64
3.	METODOLOGÍA	66
3.1.	MATERIAL VEGETAL Y TRATAMIENTO POSTCOSECHA	66
3.2.	SOLVENTES Y REACTIVOS	68
3.3.	OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON CO ₂ -SF DE ANTIOXIDANTES A PARTIR DE SALVIA Y TOMILLO	68
3.4.	PROCEDIMIENTOS	69
3.4.1.	Extracción con CO ₂ -SF	69
3.4.2.	Obtención de extractos mediante extracción con etanol.	71
3.4.3.	Preparación de las muestras para la determinación de la capacidad antirradicalaria, el contenido total de fenoles y el análisis cromatográfico.	71
3.4.4.	Determinación de la capacidad antirradicalaria mediante ORAC.	72
3.4.5.	Medición de la cantidad total de fenoles.	73
3.4.6.	Análisis mediante HPLC-DAD.	73
3.4.7.	Análisis mediante GC-MS en columna de fase estacionaria apolar.	74
3.4.8.	Extracción de los metabolitos secundarios volátiles mediante HS-SPME.	75
3.4.9.	Análisis mediante GC-MS en columna de fase estacionaria polar.	75
3.4.10.	Identificación y cuantificación de los analitos de interés.	76

4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	78
4.1.	IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA	78
4.2.	TRATAMIENTO POST-COSECHA	80
4.2.1.	Picado.	80
4.2.2.	Secado.	81
4.2.3.	Influencia de la temperatura de secado y el tamaño de partícula en la capacidad antirradicalaria.	83
4.2.4.	Cantidad de metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles en los extractos en función de la temperatura de secado y el tamaño de partícula.	86
4.3.	OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON CO ₂ -SC DE ANTIOXIDANTES A PARTIR DE SALVIA	92
4.3.1.	Resultados del diseño experimental factorial fraccionado.	93
4.3.2.	Análisis de los factores (variables).	101
4.3.3.	Cuantificación de los ácidos carnósico y ursólico mediante HPLC-DAD.	109
4.3.4.	Composición volátil y semi-volátil de la fracción soluble en metanol de los extractos SFE.	115
4.3.5.	Búsqueda de los niveles óptimos de los factores más relevantes.	122
4.3.6.	Cantidad de antioxidantes en los extractos de la optimización.	133
4.3.7.	Comparación de la cantidad de volátiles entre el HS y la fracción metanólica de los extractos.	134
4.3.8.	Verificación del vértice óptimo.	140
4.3.9.	Comparación de las respuestas entre el óptimo y los extractos etanólicos.	142
4.4.	OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON CO ₂ -SF DE ANTIOXIDANTES DE TOMILLO	146
4.4.1.	Resultados del diseño experimental factorial fraccionado.	146
4.4.2.	Análisis de factores.	149

4.4.3.	Composición volátil y semi-volátil de la fracción soluble en metanol de los extractos SFE.	153
4.4.4.	Búsqueda de los niveles óptimos de los factores más relevantes.	158
4.4.5.	Comparación de la cantidad de volátiles entre el HS y la fracción metanólica de los extractos.	161
4.4.6.	Verificación del vértice óptimo.	166
4.4.7.	Comparación de las respuestas del óptimo con las del extracto etanólico.	168
5.	CONCLUSIONES	170
	BIBLIOGRAFÍA	173
	ANEXOS	191

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.	Algunas propiedades de los disolventes en diferentes estados de agregación de la materia.	31
Tabla 2.	Parámetros a optimizar del proceso de extracción con fluidos supercríticos.	42
Tabla 3.	Ubicación y concentración de algunos antioxidantes en salvia y tomillo.	49
Tabla 4.	Solubilidad de algunos compuestos fenólicos en CO ₂ -SF.	53
Tabla 5.	Condiciones de presión ensayadas en diferentes estudios de la extracción con CO ₂ a partir de las especies bajo estudio.	56
Tabla 6.	Condiciones de temperatura ensayadas en diferentes estudios de la extracción con CO ₂ a partir de las plantas bajo estudio.	58
Tabla 7.	Cantidad necesaria, µg/mL, para reducir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH.	61
Tabla 8.	Dominio experimental en la optimización de la extracción de antioxidantes a partir de salvia y tomillo.	68
Tabla 9.	Promedios de las condiciones ambientales durante la época de cosecha.	77
Tabla 10.	Nombres científicos y números asignados en el Herbario Nacional Colombiano.	77
Tabla 11.	Resultados del proceso de tamizado de cada una de las especies estudiadas (3.05 kg).	80
Tabla 12.	Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los	87

extractos SFE de salvia según las pruebas de secado y tamaño de partícula.

- Tabla 13.** Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de tomillo según las pruebas de secado y tamaño de partícula. 88
- Tabla 14.** Resultados obtenidos a partir del diseño factorial fraccionado 2^{7-2} . 95
- Tabla 15.** Análisis de la varianza para los efectos significativos en la combinación de observables descrita en la **Ecuación 8**. 101
- Tabla 16.** Concentraciones de los terpenos fenólicos detectados en 12 extractos seleccionados. 111
- Tabla 17.** Coeficientes de correlación, r , entre respuestas y compuestos activos. 113
- Tabla 18.** Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de salvia obtenidos a partir del diseño 2^{7-2} . 116
- Tabla 19.** Comparación de las cantidades relativas de los componentes volátiles y semi-volátiles mayoritarios en los extractos de salvia. 120
- Tabla 20.** Resultados de la optimización mediante la metodología *Simplex*. 122
- Tabla 21.** Domino experimental y niveles óptimos de las variables en la SFE de extractos de café. 127
- Tabla 22.** Estudios de optimización de la SFE de algunas matrices vegetales mediante la metodología de superficie de respuesta. 130
- Tabla 23.** Cuantificación de los diterpenos y triterpenos encontrados en los extractos obtenidos de los vértices del *Simplex*. 132

Tabla 24.	Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de salvia obtenidos a partir de la optimización y sometidos a extracción con metanol.	135
Tabla 25.	Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de salvia obtenidos a partir de la optimización y monitoreados mediante HS-SPME.	136
Tabla 26.	Resultados de la verificación del punto óptimo en la SFE de salvia.	140
Tabla 27.	Cantidades de los componentes detectados y reconocidos mediante HPLC-DAD.	144
Tabla 28.	Resultados obtenidos a partir del diseño factorial fraccionado 2^{7-2} para tomillo.	146
Tabla 29.	Análisis de la varianza para los efectos significativos según el gráfico de distribución normal.	149
Tabla 30.	Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de tomillo obtenidos a partir del diseño 2^{7-2} .	153
Tabla 31.	Comparación de las cantidades relativas de los componentes volátiles y semi-volátiles mayoritarios en los extractos de tomillo.	156
Tabla 32.	Resultados de la optimización mediante la metodología <i>Simplex</i> para la SFE a partir de tomillo.	158
Tabla 33.	Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de tomillo obtenidos a partir de la optimización y sometidos a extracción con metanol.	162
Tabla 34.	Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%)	163

de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de salvia obtenidos a partir de la optimización y monitoreados mediante HS-SPME.

Tabla 35. Resultados de la verificación del punto óptimo en la SFE de 166 tomillo.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama de “Presión-Temperatura” para un componente puro.	30
Figura 2.	Dependencia de la densidad respecto a la presión y la temperatura en un fluido supercrítico.	32
Figura 3.	Variación de la densidad, $\rho(l)$, y la constante dieléctrica, DC(II), con respecto de la presión, para el CO ₂ a 40°C.	32
Figura 4.	Isotermas de viscosidad del CO ₂ .	34
Figura 5.	Variación de la difusividad del CO ₂ en función de la temperatura a varias presiones.	35
Figura 6.	Conductividad térmica en la vecindad del punto crítico del CO ₂ .	35
Figura 7.	Isotermas de solubilidad de un soluto en un fluido.	37
Figura 8.	Isóbaras de solubilidad del naftaleno en CO ₂ .	38
Figura 9.	Principales unidades de un equipo para la extracción con fluido supercrítico: 1 -Cilindro de CO ₂ ; 2 -Intercambiador de calor I; 3 -Flujómetro; 4 -Baño de refrigeración; 5 -Bomba; 6 -Reservorio de solvente; 7 -Bomba para co-solvente; 8 -Mezclador; 9 -Intercambiador de calor II; 10 -Válvula I; 11 -Portamuestra; 12 -Chaqueta de calentamiento I; 13 -Manómetro 1; 14 -Sensor de temperatura; 15 -Válvula II; 16 -Válvula automática de regulación de la presión; 17 -Válvula III; 18 -Separador; 19 -Chaqueta de calentamiento 2; 20 -Manómetro 2; 21 -Válvula manual de regulación de la presión; 22 -Válvula de venteo.	41
Figura 10.	Representación de la optimización por el método <i>Simplex</i> .	47
Figura 11.	Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos con	50

- propiedades antioxidantes.
- Figura 12.** Equipos empleados en el tratamiento de post-cosecha del material vegetal cosechado en Sucre, Santander: A. Molino de cuchillas, *Willey Mill, Standard Model N° 3*, (Pittsburg, PA, EE.UU.); B. Horno eléctrico, *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia); y C. Tamizador, *Sargent-Welch Scientific Company*, (Buffalo, NY, EE.UU). 66
- Figura 13.** Extractor con CO₂ supercrítico *SFE-2000-2-FMC50* (Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.). 69
- Figura 14.** Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*. 71
- Figura 15.** Cromatógrafo líquido con detector de arreglo de diodos *Agilent Technologies 1200* (Miami, FL, EE.UU.) y sistema de procesamiento de datos. 72
- Figura 16.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Network*. 73
- Figura 17.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network Series GC*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975 Inert XL*. 75
- Figura 18.** Cultivo experimental de salvia en la vereda El Retiro, Sucre. 78
- Figura 19.** Cultivo experimental de tomillo en la vereda El Retiro, Sucre. 78
- Figura 20.** Porcentaje de humedad en hojas, tallos y flores de salvia molidos (Tamaño de partícula 0.22-1.76 mm, sin tamizar) en función del tiempo secado. 81
- Figura 21.** Porcentaje de humedad en hojas, tallos y flores de tomillo molidos (Tamaño de partícula 0.22-1.76 mm, sin tamizar) en función del tiempo secado. 82
- Figura 22.** Influencia de la temperatura de secado en la capacidad 83

	antirradicalaria de los extractos de salvia y tomillo.	
Figura 23.	Influencia del tamaño de partícula del MV en la capacidad antirradicalaria de los extractos de salvia y tomillo.	84
Figura 24.	Apariencia del material vegetal empleado en todas las extracciones y de los extractos obtenidos de: A. Salvia; y B. Tomillo.	86
Figura 25.	Variación del factor área cromatográfica del compuesto sobre el área del estándar interno en los extractos de salvia.	90
Figura 26.	Variación del factor área cromatográfica del compuesto sobre el área del estándar interno en los extractos de tomillo.	91
Figura 27.	Gráfica de probabilidad normal para los efectos de primer y segundo orden en la combinación de observables de la Ecuación 8.	100
Figura 28.	Comportamiento de la respuesta con respecto a: A. Presión; B. Flujo; C. Tiempo dinámico y D. Temperatura de separación.	103
Figura 29.	Perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPLC-DAD de: A. Patrones de referencia certificados, B. Extracto obtenido con fluido supercrítico a partir de salvia (experimento 32). Fase móvil conformada por 80 % metanol y 20% agua (modificador, el ácido ortofosfórico 0.1%).	110
Figura 30.	Influencia de A. La presión y B. El tiempo dinámico, en la concentración de los tres componentes reconocidos mediante HPLC-DAD.	114
Figura 31.	Perfil cromatografico, obtenido por GC-MS de los volátiles y semivolátiles del extracto SFE de <i>Salvia officinalis</i> . Columna DB-5MS (60 m), Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).	115
Figura 32.	Cambio en la concentración de los componentes volátiles mayoritarios con respecto las condiciones más influyentes en la capacidad antirradicalaria de los extractos, A. Presión; B.	118

- Flujo; C. Tiempo dinámico; D. Temperatura de separación.
- Figura 33.** Perfiles cromatográficos de A. Extracto metanólico de volátiles y semivolátiles obtenido del vértice 12, GC-FID, columna DB-5 (60 m), *split* 1:30; B. Volátiles aislados mediante HS-SPME, GC-MS, columna DB-WAX (60 m), *split* (1:30). 134
- Figura 34.** Comparación de la cantidades de A. 1,8-Cineol; B. *cis*-Tujona y C. α -Humuleno, determinadas mediante dos metodologías diferentes. 138
- Figura 35.** Comparación de las respuestas en dos tipos de extracción de antioxidantes a partir de salvia. 142
- Figura 36.** Perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPLC-DAD de: A. Extracto SFE (óptimo), B. Extracto obtenido etanol, C. Patrones de los ácidos carnósico (1) y ursólico (3). Fase móvil conformada por 80 % metanol y 20% agua (0.1% ácido ortofosfórico). Los números de cada compuesto se muestran en la **Tabla 27**. 143
- Figura 37.** Gráfica de probabilidad normal para los efectos de primer y segundo orden en la respuesta combinada del rendimiento, la capacidad antirradicalaria y el contenido de fenoles (T: Temperatura de extracción; D: Tiempo dinámico; P: Presión; G: Presión de separación; E: Tiempo estático). 148
- Figura 38.** Comportamiento de la respuesta con respecto a: A. Presión de extracción; B. Temperatura de extracción; C. Presión de separación y D. Tiempo dinámico. 151
- Figura 39.** Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS de los volátiles y semivolátiles del extracto SFE de *Thymus vulgaris*. Columna DB-5MS (60 m), Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). 152
- Figura 40.** Perfiles cromatográficos de A. Extracto metanólico de volátiles y semivolátiles obtenido del vértice 9, GC-FID, columna DB-5 161

(60 m), *split* 1:30; **B.** Volátiles aislados mediante HS-SPME, GC-MS, columna DB-WAX (60 m), *Split*(1:30).

Figura 41. Comparación de la cantidades de A. *p*-Cimeno; y B. Timol 165 determinadas mediante dos metodologías diferentes.

Figura 42. Comparación de las respuestas para dos modos de extracción 167 en tomillo.

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Curvas de calibración.	192
ANEXO A1. Curvas de calibración de compuestos volátiles mediante GC-FID.	192
ANEXO A2. Curvas de calibración de compuestos volátiles mediante HS- SPME/GC-MSD.	197
ANEXO A3. Curvas de calibración de los ácidos carnósico y ursólico mediante HPLC-DAD	202
ANEXO B. Selección de recubrimiento de fibra y tiempo de equilibrio para la extracción de volátiles mediante HS-SPME	204
ANEXO B2. <i>Thymus vulgaris</i>	205

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAPH	(2,2'-Azobis(2-amidinopropano)hidrocloruro)
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzo-tiazolino-6-sulfónico)
AE	Aceite(s) esencial(s)
ACA	Ácido carnósico
ANOVA	Análisis de la varianza
AUR	Ácido ursólico
BHA	<i>Butyl-Hydroxy-Anisole</i> (Butilhidroxianisol)
BHT	<i>Butyl-Hydroxy-Toluene</i> (Butilhidroxitolueno)
CA	Capacidad antirradicalaria
ca.	<i>Circa</i> (Aproximadamente)
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Aromáticas y Medicinales Tropicales
CO₂	Dióxido de carbono
CO₂-SF	Dióxido de carbono en estado de fluido supercrítico
CME	Carnosato de metilo
CTF	Contenido total de fenóles
C.V.	Coeficiente de variación
D	Tiempo dinámico
Da	Daltons (Masa atómica nominal)
d.i.	Diámetro interno, mm
d_f	Espesor de la fase estacionaria, μm
DPPH	2,2'-Difenil-1-picrilhidracilo
E	Tiempo estático
EI	Energía de ionización
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
EE.UU.	<i>United States of America</i> (Estados Unidos).
ET	<i>Reaction and Assay Basedon Electron Transfer</i> (Reacciones

	de transferencia de un electrón)
eV	Electrón voltio
F	Flujo
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Ester</i> (Metil ésteres de ácidos grasos)
FL	<i>Flurescein</i> (Fluorescina)
G	Presión de separación
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GC-FID	<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía con detector de ionización en llama)
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
H	Temperatura de separación
h	Hora
HAT	<i>Assays Based on Hydrogen Atom Transfer</i> (Reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos)
HS	<i>Headspace</i> (Espacio de cabeza)
HS-SPME	<i>Headspace-Solid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el modo espacio de cabeza)
<i>i.e.</i>	<i>id ets.</i> (Es decir)
IR	Índice(s) de retención lineal(es)
<i>Istd</i>	<i>Internal standard</i> (Estándar interno)
Lab. Cromatografía	Laboratorio de cromatografía
LC-DAD	<i>Liquid Chromatography-Diode Array Detector</i> (Cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos)
<i>m/z</i>	Relación masa carga
MADR	Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
MSD	<i>Mass Spectrometric Detector</i> (Detecto Selectivo de Masas)

MV	Material vegetal
N.D.	No detectado
N.M.	No se menciona
N.R.	No reconocido
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorption Capacity</i> (Capacidad de absorción del radical oxígeno)
P	Presión
P_c	Presión crítica
PDMS	Poli(Dimetilsiloxano)
PDMS/DVB	Poli(Dimetilsiloxano)/Divinilbenceno
ppm	Partes por millón
R	Rendimiento
R_f	<i>Response factor</i> (Factor de respuesta)
<i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
ρ	Densidad
ρ_c	Densidad crítica
<i>S. officinalis</i>	<i>Salvia officinalis</i>
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
CO₂-SF	<i>Supercritical Fluid-Carbon Dioxide</i> (Dióxido de carbono bajo condiciones supercríticas)
SF	<i>Supercritical Fluid</i> (Fluido supercrítico)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
T	Temperatura
T_c	Temperatura crítica
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidad antioxidante equivalente a la del Trolox)
TIC	<i>Total Ionic Current</i> (Corriente iónica total)
t_R	Tiempo de retención (min)
TRAP	<i>Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter</i> (Parámetro antioxidante total de la captura de radicales)
<i>T. vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>

UIS	Universidad Industrial de Santander
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos)
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
Vs.	<i>Versus</i>

RESUMEN

TÍTULO: OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON FLUIDO SUPERCRÍTICO (CO₂) DE ANTIOXIDANTES PRESENTES EN *S. officinalis* y *T. vulgaris**.

AUTORES: Carlos Alberto Ruiz Nova**

PALABRAS CLAVE: SFE, optimización, rendimiento de extracción, capacidad antirradicalaria, contenido total de fenoles, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*.

Inicialmente se estudió la influencia del secado y el tamaño de partícula del material vegetal, en la capacidad antirradicalaria de los extractos. Se realizaron diseños factoriales fraccionados para determinar la influencia de las presiones de extracción y separación; temperaturas extracción y separación; tiempos de extracción dinámicos y estáticos; y el flujo de solvente. La optimización de aquellas variables más importantes se realizó por medio de la metodología *Simplex*. Se verificaron las condiciones óptimas y las respuestas óptimas se compararon con las de extractos obtenidos por maceración asistida por ultrasonido en etanol. La composición de los volátiles y de algunos componentes fenólicos se realizó mediante cromatografía de gases y líquida.

El secado se fijó en 40 °C y el tamaño de partícula en 0.5-1.0 mm. Las condiciones de extracción óptimas para las dos especies fueron las siguientes: salvia: tiempo de extracción dinámico= 65.6 min, flujo= 2.8 kg/h, presión de extracción=47.3 MPa y temperatura de separación=313 K, con estas condiciones la capacidad antirradicalaria=2.42 μmol de Trolox[®]/mg de extracto, contenido total de fenoles= 75.3 mg de ácido gálico/g de extracto y rendimiento=1.7%; tomillo: temperatura de extracción=353 K, el tiempo dinámico=100.3 min, presión de extracción=44.4 MPa, presión de separación=0.5 MPa y tiempo estático=18.2 min, y las correspondientes respuestas fueron: Capacidad antirradicalaria=1.98 μmol de Trolox[®]/mg de extracto, contenido total de fenoles=71.3mg de ácido gálico/g de extracto y rendimiento=1.9 %. El extracto obtenido por maceración con etanol presentó mejores resultados para el contenido de fenoles en el caso del tomillo y para el rendimiento en el caso de salvia.

Los principales componentes volátiles en los extractos de las dos plantas fueron: *S. officinalis*: manol (20%) y *trans*-β-cariofileno (18%); *T. vulgaris*: timol (30%) y *p*-cimeno (11%). En la salvia se detectaron los ácidos carnósico y ursólico, en el tomillo no se detectó ningún compuesto fenólico.

* Trabajo de investigación de Maestría en Química.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de ciencias, Escuela de Química.
Directores: Elena stashenko y Jairo René Martínez

ABSTRACT

TITLE: OPTIMIZATION OF SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION (CO₂) OF ANTIOXIDANTS PRESENT IN *S. officinalis* AND *T. vulgaris.**

AUTHORS: Carlos Alberto Ruiz Nova**

KEYWORDS: SFE, optimization, extraction yield, antiradical capacity, total phenolic content, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*.

The first part of the study examined the influence of plant material drying and particle size, on the antiradical capacity of the extracts. Fractional factorial designs were conducted to determine the influence of extraction and separation pressures and temperatures, static and dynamic times, and solvent flow, on supercritical fluid extraction yield and antioxidant capacity. The optimization of variables with significant effect was performed by the Simplex method. Optimal conditions and responses were checked and compared with the extracts obtained by ultrasound assisted maceration in ethanol. The composition of the volatiles and some phenolic compounds were determined by gas and liquid chromatography.

Drying was performed at 40 °C and the particle size employed was 0.5-1.0 mm. The optimum extraction conditions for the two species were as follows: sage: dynamic extraction time= 65.6 min, flow= 2.8 kg/h, extraction pressure = 47.3 MPa and separation temperature = 313 K. With these conditions the antiradical capacity = 2.42 μmol of Trolox[®]/mg, phenolic content= 75.3 mg of gallic acid/g and yield = 1.7%; thyme: extraction temperature = 353 K, dynamic time = 100.3 min, extraction pressure = 44.4 MPa, separation pressure = 0.5 MPa and static time = 18.2 min, and the corresponding results were: antiradical capacity = 1.98 μmol of Trolox[®]/mg extract, phenolic content = 71.3 mg of gallic acid/ g and yield = 1.9 %. The extract obtained by maceration with ethanol showed better results for the phenolic content in the case of thyme, while better yield for sage.

The main volatile components in the extracts of the two plants were: *S. officinalis*: manool (20%) and *trans*-β-caryophyllene (18%); *T. vulgaris*: thymol (30%) and *p*-cymene (11%). Carnosic and ursolic acids were detected in sage, but no phenolic compound was detected in thyme.

* Graduation project of Master in Chemistry.

** Industrial University of Santander, Science Faculty, School of Chemistry.
Directors: Elena stashenko and Jairo René Martínez

INTRODUCCIÓN

Durante la década de los años 80 se han desarrollado dos técnicas que hacen uso de los fluidos supercríticos para la separación y análisis de muestras ambientales, alimenticias, biomédicas, entre otras [1,2]. Estas técnicas son la cromatografía con fluido supercrítico (SFC) y la extracción con fluido supercrítico (SFE). La demanda creciente por antioxidantes de origen natural ha hecho que gran parte de la investigación fitoquímica se vuelque hacia la extracción y caracterización de estas sustancias a partir de una gran variedad de matrices y especies vegetales. Las ventajas de la SFE sobre otros métodos de extracción de metabolitos secundarios son varias, aunque también, hay algunas desventajas. La extracción con fluidos supercríticos produce extractos libres de solventes tóxicos, y cuando se utiliza CO₂ como solvente, las condiciones de extracción no son drásticas pues se alcanza el estado supercrítico a 31.1 °C y 7.38 MPa, además es económico y de fácil adquisición, no es tóxico ni inflamable y a condiciones ambientales es gaseoso. Las desventajas son el alto costo de los equipos y la falta de polaridad del CO₂, que lo hace poco apto para extraer metabolitos polares.

La lista de plantas, que poseen propiedades antioxidantes comprobadas por algunas de las técnicas de medición es larga [3]; dentro de estas plantas figuran la uva, el tomate, ginko biloba y algunas plantas de la familia Labiatae [3]. Con la familia Labiatae, existe un gran interés en el romero y la salvia, pues en estas plantas se han encontrado varias sustancias con alta capacidad antioxidante, e.g., flavonoides, ácidos fenólicos y ácidos diterpénicos [4,5]. Actualmente, existen empresas principalmente europeas, que se dedican a la extracción y comercialización de extractos (SFE o Etanólicos) antioxidantes cuyos principios activos son romero, salvia o mezclas de ellos. Estos extractos son comercializados desde la década del 90, con nombres como: Rosemary Deodorized™ (Pfizer);

Spicer Extract AR™ (Nestlé); Herbalox™ (Kalsec) y Flavor Guard™ (OM Ingredients) [5]. Más recientemente han ingresado al mercado empresas como Flavex con Flavoxan 25™. Actualmente también existen muchas empresas pequeñas que comercializan estos extractos a través de Internet en volúmenes menores (10, 20 y 100 mL) Los extractos naturales son extractos sin solventes residuales, son aceptados por distintos organismos de control como la FDA y la USDA, no presentan restricciones en el tipo de aplicaciones ni en los niveles de uso, pueden ser comercializados bajo la premisa de orgánicos y naturales y se pueden encontrar dispersos en agua o aceite. Pero en la mayoría de los casos son menos efectivos que los productos sintéticos, son costosos y pueden tener olor y sabor.

Teniendo en cuenta lo anterior nació la propuesta de presentar el macro-proyecto “Fortalecimiento y aumento de la competitividad de la cadena productiva nacional de aceites esenciales y productos derivados” ante el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), y fue uno de sus ejes, considerar la producción de extractos antioxidantes limpios, aprovechando la gran variedad de condiciones agroclimáticas de nuestro país que hacen que plantas de otras latitudes se puedan cultivar y cosechar, teniendo como base estudios de adaptabilidad realizados anteriormente en el Laboratorio de Cromatografía. En el presente proyecto se trabajó con plantas aromáticas sobre las cuales existen reportes de la presencia de compuestos antioxidantes, su cultivo fue apto en climas templados como el de Sucre (Santander). El proyecto contó con el respaldo tecnológico y científico del Laboratorio de Cromatografía, las instalaciones y equipos del Complejo Agroindustrial Piloto del CENIVAM que se encuentran ubicados en la Universidad Industrial de Santander, y fue financiado con recursos del MADR y el Laboratorio de Cromatografía.

Se emplearon diseños factoriales exploratorios para estudiar las variables más relevantes en el rendimiento, la capacidad antirradicalaria (determinada mediante el método ORAC) y el contenido total de fenoles (medido por el método *Folin-*

Ciocalteu). Las metodologías enunciadas anteriormente fueron implementadas para hacerlas menos contaminantes, económicas, confiables y rápidas. Luego, se buscaron los niveles óptimos de las variables tenidas en cuenta para obtener los máximos en las respuestas mediante la metodología *Simplex*. La realización de este trabajo permitió encontrar rendimientos altos en la extracción con fluidos supercríticos y se obtuvieron dos extractos -uno por cada especie- con aceptables propiedades antioxidantes. También se determinaron algunos de los compuestos que más contribuyeron en la actividad de los extractos mediante HPLC-DAD, metodología que fue desarrollada y validada en el laboratorio. Las propiedades de los extractos obtenidos con fluido supercrítico se compararon con las de otros extractos, obtenidos utilizando técnicas tradicionales de extracción como la maceración en etanol (que es un solvente seguro por no tener efectos adversos para la salud a nivel de trazas) asistida con Ultrasonido.

Finalmente, teniendo en cuenta que nuestro país no tiene diversificación de cultivos a niveles industriales, este proyecto se presenta como una alternativa de diversificación de la producción rural nacional. Es así como el proyecto contribuyó al desarrollo de la agroindustria del país, específicamente, a la del municipio de Sucre, Santander. También se llevó bienestar a las comunidades campesinas, pues sus habitantes fueron entrenados mediante talleres dirigidos por expertos y estudiantes universitarios, en el manejo de cultivos, tratamientos post-cosecha, operación de calderas y destiladores, secado y almacenamiento de aceites esenciales y lo más importante los jóvenes aprendieron a elaborar algunos productos cosméticos. Algunos de los extractos generados en este y en otros trabajos fueron ensayados en pruebas de estabilidad de productos cosméticos en una empresa nacional.

1.MARCO TEÓRICO

1.1. DEFINICIÓN DE FLUIDO SUPERCRÍTICO

Se denomina fluido supercrítico (SF) aquella sustancia que se encuentra a condiciones de presión y temperatura superiores a los valores de presión y temperatura críticos (punto crítico). La temperatura crítica (T_c) es la temperatura a partir de la cual no puede existir en fase líquida una sustancia independientemente de la presión. La presión de vapor de una sustancia a su temperatura crítica es su presión crítica (P_c) [1]. Cuando un gas se comprime suficientemente, se convierte en líquido; si el mismo gas se calienta hasta cierta temperatura específica y se comprime, éste se convertirá no en líquido sino en un fluido supercrítico. En la **Figura 1**, se puede observar un diagrama de fases en donde se ponen de manifiesto varios aspectos. Las curvas que representan los estados de equilibrio de las distintas fases en función de la presión y la temperatura se llaman “Sólido-Líquido”, “Sólido-Gas” y “Líquido-Gas”, su punto de coexistencia se denomina el punto triple (TP). La curva “Líquido-Gas”, posee una longitud finita y finaliza en el punto triple, por encima de éste, las propiedades de la sustancia son un promedio de los estados líquido y gas (espacio rayado diagonalmente) [2].

1.2. EL CO₂ COMO FLUIDO SUPERCRÍTICO

El CO₂ es el disolvente en estado supercrítico, más utilizado para extraer productos naturales, con aplicaciones en alimentos y en cosméticos. Los extractos obtenidos con CO₂ en estado supercrítico (CO₂-SF) se consideran “naturales” y, al ser incorporados en alimentos, son reconocen como “GRAS”, por sus siglas en inglés (*Generally Recognized as Safe*) [3]. Este compuesto es un gas inerte, relativamente económico, disponible e inodoro, sin sabor, menos contaminante

que otros disolventes y tiene baja toxicidad; además, en los procesos en los cuales interviene no quedan sus residuos en los extractos, debido a que disminuyendo la presión hasta la atmosférica éste se torna gaseoso. La P_c del CO_2 es 7.37 MPa y la T_c es de 304.2 K [2,3]. Las temperaturas de operación hacen que el $\text{CO}_2\text{-SF}$ sea adecuado para la extracción de compuestos termolábiles. La energía requerida para llevar el CO_2 a condiciones supercríticas es más baja que la asociada con la destilación de disolventes orgánicos convencionales [3,4].

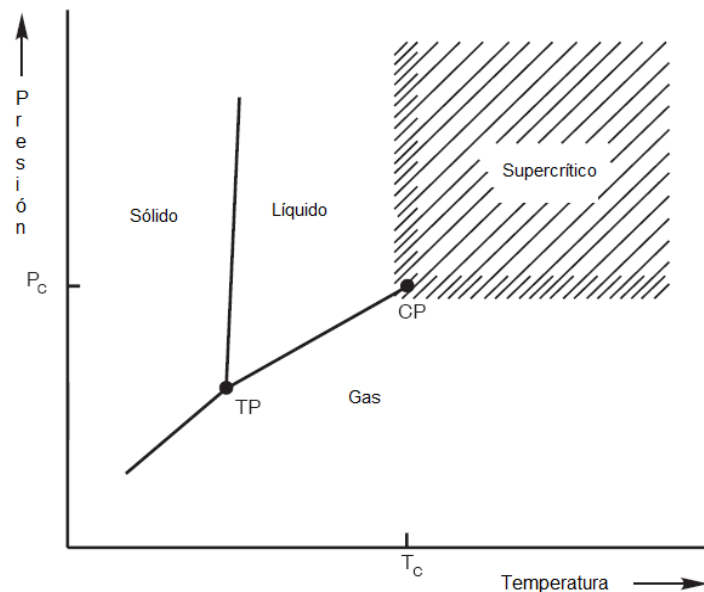


Figura 1. Diagrama de “Presión-Temperatura” para un componente puro.

La eficiencia de la extracción con $\text{CO}_2\text{-SF}$ depende de algunas características de los solutos, de grupos funcionales presentes en sus estructuras, el peso molecular y la polaridad; *e.g.*, algunos hidrocarburos y otros componentes de bajo peso molecular y relativamente baja polaridad como ésteres, éteres, aldehídos, cetonas, lactonas y epóxidos se extraen a presiones entre 7.5 y 10 MPa. A estas presiones, otros componentes como derivados del benceno con grupos carboxilo o hidroxilo y

de polaridad media son poco solubles, mientras que a presiones mayores de 25.0 MPa presentan solubilidad más alta [5].

1.3. PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Un fluido supercrítico se considera macroscópicamente homogéneo, pero microscópicamente heterogéneo. Que sea homogéneo macroscópicamente es obvio, puesto que, si el fluido se encuentra a una presión y temperatura superiores a T_c y P_c , se forma una sola fase. La heterogeneidad microscópica consiste en que se forman *clusters* de moléculas de solvente y volúmenes vacíos; esta característica depende significativamente de la densidad del fluido [6].

Las densidades de los SF están más cerca a las de los líquidos y les confieren poder disolvente, mientras que las viscosidades y difusividades son cercanas a las de los gases, lo que permite lograr una alta transferencia de masa de los solutos desde la matriz vegetal hacia el fluido [2,7] (véase **Tabla 1**).

Tabla 1. Algunas propiedades de los disolventes en diferentes estados de agregación de la materia [2].

Propiedad	Estado de agregación		
	Gaseoso	Fluido supercrítico	Líquido
Densidad, g/mL	10^{-3}	0,3	1
Difusividad, cm^2/s	10^{-1}	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-6}$
Viscosidad, g/cm.s	10^{-4}	10^{-4}	10^{-2}

La densidad varía con los cambios de presión y temperatura como queda evidenciado en la **Figura 2**. Un aumento en la presión ejercida sobre el fluido, que en la figura se expresa como la presión reducida, $P_R = P/P_c$, conduce a que la densidad reducida, $\rho_R = \rho/\rho_c$, se incremente, lo cual es más notorio en las cercanías

al punto crítico; de modo contrario, un aumento en la temperatura reducida, $T_R=T/T_c$, hace que disminuya el valor de ρ_R .

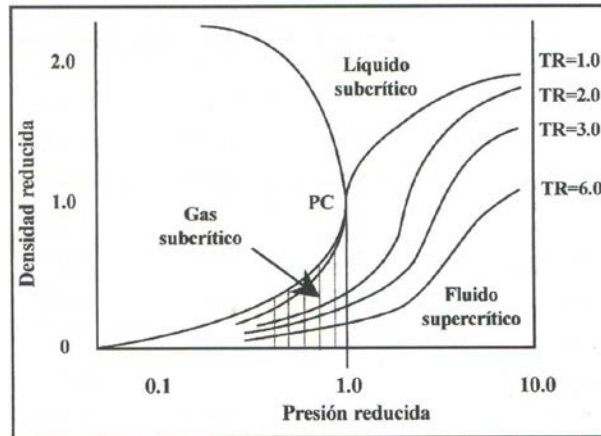


Figura 2. Dependencia de la densidad respecto a la presión y la temperatura en un fluido supercrítico [7].

La constante dieléctrica y la densidad muestran tendencias similares frente a los cambios de presión, sobre todo, en cercanías al punto crítico (**Figura 3**). Entre 70 y 150 bar (7-15 MPa), tanto la densidad como la constante dieléctrica aumentan rápidamente.

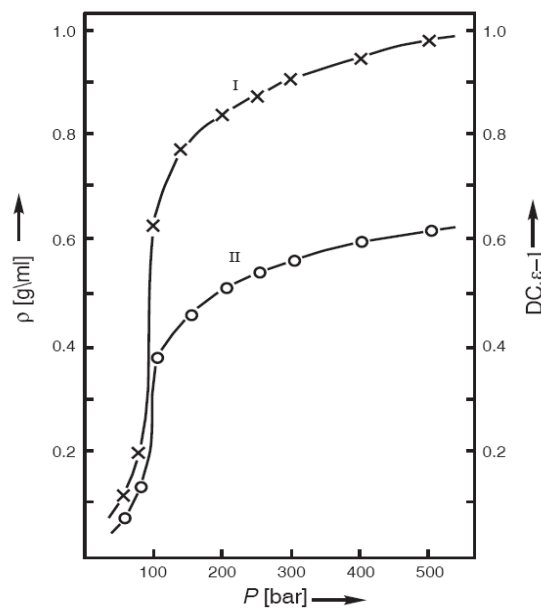


Figura 3. Variación de la densidad, $\rho(l)$, y la constante dieléctrica, DC(II), con respecto de la presión, para el CO₂ a 40°C [5].

La constante dieléctrica para el CO₂ a 200 bar (20 MPa) y 40°C (313K), ($\rho > 800$ kg/m³) es aproximadamente 0.5; en la **Figura 3**, a más de 200 bar estos dos parámetros presentan valores similares a los de los líquidos, esto explica porque los SF presentan alto poder disolvente a partir de ciertas presiones [5,8].

Para llevar a cabo de una manera eficiente los procesos de extracción con fluidos supercríticos no basta conocer las características básicas del disolvente, sino entender las propiedades de transporte que tiene, e.g., CO₂ en estado supercrítico. Existen tres propiedades de transporte fundamentales, a saber: la viscosidad, η , la difusividad, D , y la conductividad térmica, λ , las cuales caracterizan la dinámica del proceso de extracción y están relacionadas con el transporte de momento lineal debido a una diferencia de presión, el transporte de masa debido a una diferencia de concentración y la transferencia de calor debido a diferencias de temperatura [5,9,10].

En términos generales, la viscosidad de un fluido supercrítico a una temperatura constante se incrementa con el aumento de presión interna y decrece hasta un valor mínimo -de igual manera que los líquidos-, con el incremento de temperatura a una presión dada [5,7,8]. La **Figura 4** expone el comportamiento de la viscosidad con respecto a la temperatura y la presión. La viscosidad del CO₂ a 37°C (310 K) y entre 300 y 500 bar (30-50 MPa) es de tan solo 0.09 cp, un orden de magnitud más baja que la de los líquidos [10]. Algunas reacciones de fotoisomerización como la conversión del *cis*- al *trans*-estilbena dependen de la viscosidad del fluido, la conversión al isómero *trans*- es favorecida a medida que la viscosidad del medio aumenta [10]. Los incrementos de presión (a temperatura constante) hacen que disminuya la difusividad de los solutos en el fluido

supercrítico y por tanto, la transferencia de masa, pero de otro lado, la solubilidad también aumenta, ya que se incrementa la densidad.

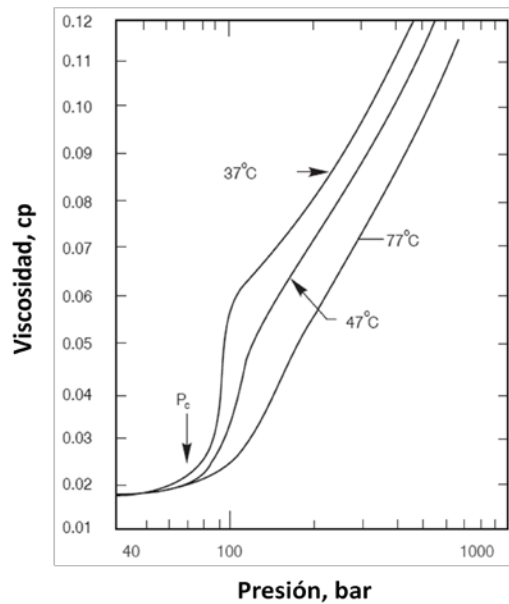


Figura 4. Isotermas de viscosidad del CO₂[10].

La difusividad en un fluido supercrítico es una función que implica la concentración del soluto en el disolvente y en la matriz, y depende de la presión y temperatura a la cual se somete el fluido. En la **Figura 5** se muestra el comportamiento de la difusividad con el cambio de la presión y la temperatura; las difusividades de los solutos en solventes orgánicos ($10^{-5}\text{cm}^2/\text{s}$) son de aproximadamente dos órdenes de magnitud menores que en CO₂-SF [5,7,8,10]. La difusividad en el CO₂ aumenta con el incremento de temperatura y disminuye con la presión; a bajas presiones *e.g.*, 7-8 MPa, es casi independiente de la composición de las fases, pero a presiones mayores, *e.g.*, 20 MPa, la dependencia de la composición se hace significativa [5,10].

La conductividad térmica también depende de la temperatura y presión; ésta decrece cuando se aumenta la temperatura del fluido, presenta un máximo en las cercanías a la densidad crítica, 474 kg/m^3 , y se hace más agudo a medida que la temperatura disminuye como se muestra en la **Figura 6** [5].

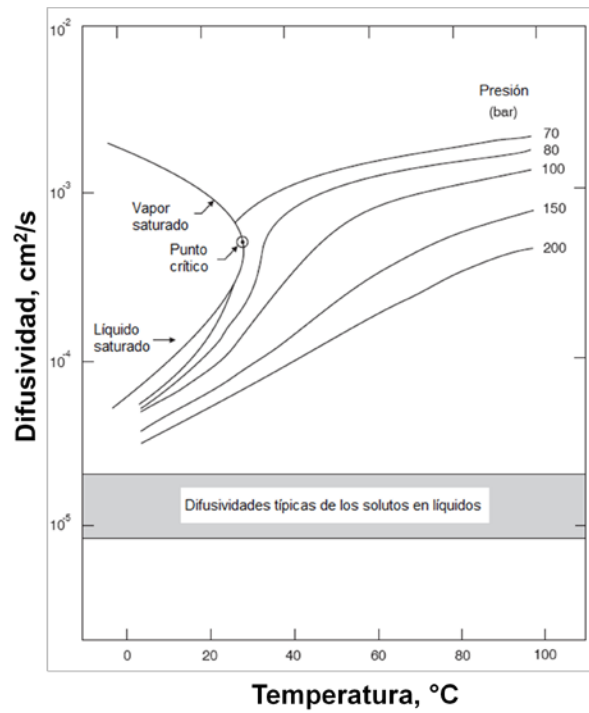


Figura 5. Variación de la difusividad del CO₂ en función de la temperatura a varias presiones [10].

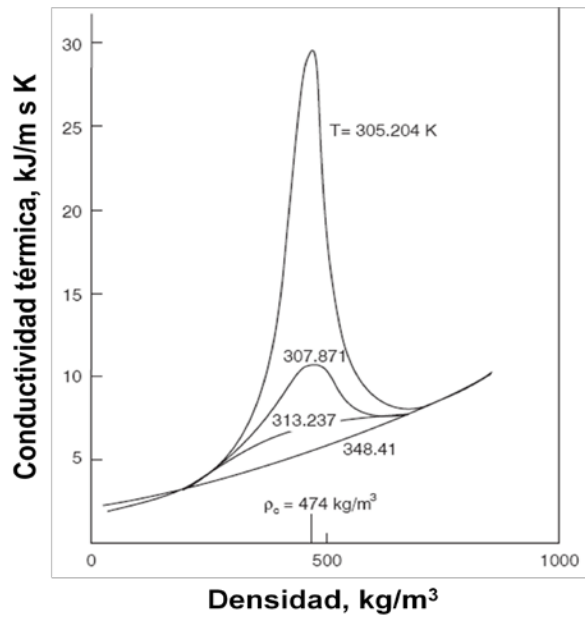


Figura 6. Conductividad térmica en la vecindad del punto crítico del CO₂[5].

1.4 SOLUBILIDAD EN UN SOLVENTE SUPERCRÍTICO

La solubilidad es la cantidad de una sustancia disuelta por el disolvente en el equilibrio termodinámico; para una mezcla, las distintas solubilidades de los componentes determinan la selectividad y resuelven el problema de la separación [8,9]. La solubilidad de los sólidos varía exponencialmente con la densidad del solvente supercrítico. La densidad, la constante dieléctrica y por ende, la solubilidad en CO₂-SF dependen de la presión y la temperatura [9]. La alta variabilidad de la densidad en la vecindad del punto crítico (Véase **Figura 3**), se explica en términos de la compresibilidad isotérmica, K_T [5], la que se define por:

$$K_T = -\frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial \rho}{\partial P} \right)_T \text{ Ecuación 1}$$

En donde ρ , es la densidad molar. La compresibilidad de cualquier fluido es muy alta en la vecindad de su punto crítico y diverge al infinito, de manera semejante a un gas [3,5]. Cuando la presión se incrementa, la densidad también, y el promedio de la distancia intermolecular decrece, lo que hace que las interacciones específicas entre las moléculas de soluto y solvente aumenten con la disminución de la compresibilidad [3].

1.4.1. Isotermas de solubilidad. Las isotermas de solubilidad exhiben un comportamiento que depende de la presión. En la **Figura 7**, la solubilidad dada en fracción molar, para un sistema sólido-fluido, inicialmente decrece hasta un mínimo, luego aumenta exponencialmente en las cercanías del punto crítico, y, a partir de este punto, el incremento se torna menos pronunciado. La región entre los puntos P_L^* y P_U^* , en donde las isotermas convergen, se denomina “región de cruce” [4,5], el punto crítico está ubicado entre estos dos puntos. En esta zona un incremento isobárico de la temperatura conduce a una disminución de la solubilidad, lo cual coincide con la región de alta compresibilidad del fluido.

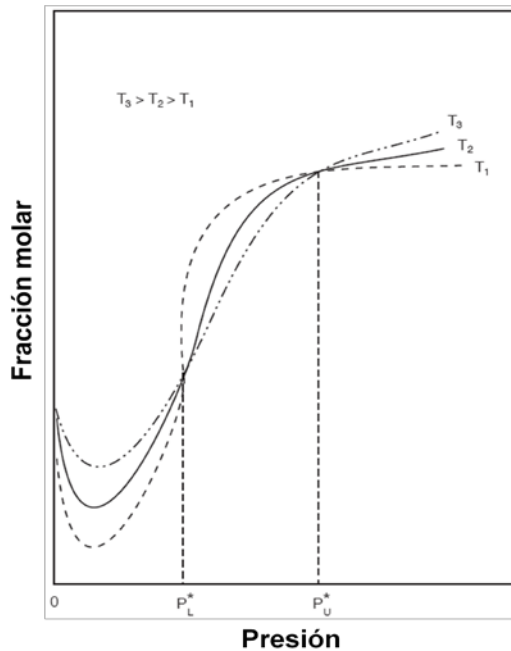


Figura 7. Isotermas de solubilidad de un soluto en un fluido [5].

La densidad por sí sola no da una explicación completa del aumento de la solubilidad, hay otro factor importante, *i.e.*, la volatilidad del soluto [2-5,7,10]. Un incremento isobárico de la temperatura disminuye la densidad del fluido, pero incrementa la volatilidad del soluto. A una presión mayor que P_U^{*}, el efecto de la volatilidad del soluto se hace más pronunciado que el efecto de la densidad del fluido, lo que resulta en un incremento de la solubilidad debido al aumento de temperatura [4,5]. Una aproximación de la solubilidad de un sólido en un fluido supercrítico se puede obtener con la siguiente ecuación [2,5,10], que está basada en el equilibrio de un soluto poco volátil entre la fase sólida y supercrítica:

$$y = \left(\frac{P^S}{P\Phi} \right) e^{\frac{V^S P}{RT}} \text{ Ecuación 2}$$

Donde y es la solubilidad, P^S , V^S y Φ son la presión de sublimación, el volumen molar y el coeficiente de fugacidad en la mezcla supercrítica respectivamente; Φ representa las interacciones moleculares específicas entre las moléculas de

soluto y solvente, y es sensible a los cambios de presión, en un gas ideal $\Phi=1$. La “región de cruce” es distinta para cada soluto y ésta se puede emplear para la separación de solutos en mezclas binarias [10].

1.4.2. Isóbaras de solubilidad. Para entender la variación de la solubilidad isobárica con la temperatura se puede tomar como ejemplo el comportamiento del naftaleno en $\text{CO}_2\text{-SF}$ [5,10]. Como se observa en la **Figura 8**, no hay una “región de cruce” pero sí una variación del comportamiento de las isóbaras.

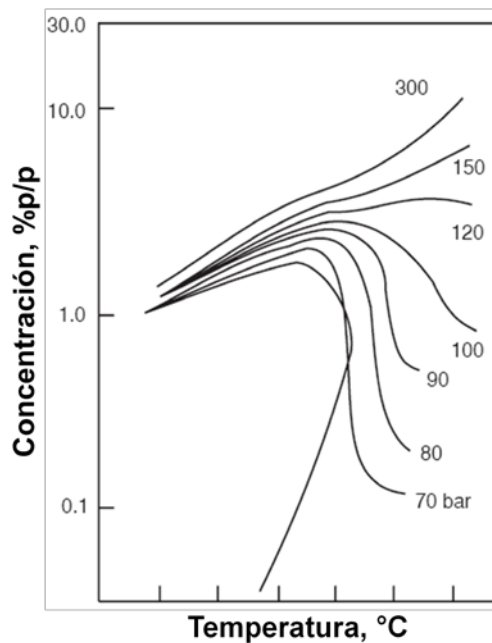


Figura 8. Isóbaras de solubilidad del naftaleno en CO_2 [10].

Dependiendo del nivel de presión, los efectos del aumento de temperatura son diferentes, a 300 y 90 bar (30 y 9 MPa) los valores de la solubilidad se incrementan y disminuyen, respectivamente; lo anterior se debe a que la densidad del fluido disminuye mientras la presión de vapor del soluto aumenta con la temperatura a presiones mayores de 120 bar (12 MPa). Se puede concluir, que la presión de vapor compensa en exceso la caída de densidad [5].

1.4.3. Efectos de la presión y la temperatura. Los efectos de la presión y la temperatura en el comportamiento de la solubilidad en un SF pueden ser analizados a través de propiedades termodinámicas básicas como los volúmenes y entalpías molares parciales. Las derivadas de la solubilidad con respecto a la temperatura y presión están directamente relacionadas con propiedades molares de acuerdo con las siguientes expresiones [4,5]:

$$\frac{\partial(\ln y)}{\partial P} = \frac{(V^s - \bar{V})/RT}{[1 + (\partial \ln \Phi / \partial \ln y)_{T,P}]} \text{Ecuación 3.}$$

$$\frac{\partial(\ln y)}{\partial T} = \frac{-(h^s - \bar{h})/RT}{[1 + (\partial \ln \Phi / \partial \ln y)_{T,P}]} \text{Ecuación 4.}$$

Dónde \bar{V} y \bar{h} denotan los volúmenes y entalpías molares parciales del soluto en el fluido. Las mediciones del volumen molar parcial a condiciones de dilución infinita, revelan que este valor es negativo y muy pequeño en las cercanías del punto crítico, haciéndose menos pequeño a medida que aumenta la temperatura. A presiones de más de 10 MPa este valor se torna positivo [4,5,6,10]. La negatividad del volumen molar se atribuye a las fuerzas atractivas entre el soluto y el solvente que hacen que la presión total del sistema disminuya, debido a que la compresibilidad en las cercanías del punto crítico es alta, la restauración de la presión del sistema requiere una disminución muy pequeña del volumen, que es igual al volumen molar parcial [4]. A presiones inmediatamente por debajo del punto crítico, el volumen molar parcial del sistema se hace aproximadamente igual al volumen molar del sólido [4]. De igual manera, la entalpía molar parcial a condiciones de dilución infinita, diverge a infinito cerca del punto crítico, y la restauración de la temperatura del sistema requiere disminución pequeña de la entalpía, los solutos con baja solubilidad en el fluido en condiciones cercanas al P_c presentan este comportamiento [4].

1.5. PROCESO DE EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Los siguiente son tres pasos principales en la extracción con fluidos supercríticos: (1) extracción, (2) expansión y (3) separación; los correspondientes componentes del equipo en donde éstos se llevan a cabo son: (1) un extractor de alta presión, (2) una válvula de reducción de la presión y (3) un colector-separador de baja presión. Otros aditamentos como bombas de alta presión, intercambiadores de calor, medidores de densidad y flujo, válvulas manuales, permiten ajustar la presión, el flujo y la temperatura [2]. El material a extraer –generalmente sólido- se deposita en el extractor de alta presión, a través de éste se hace pasar el fluido supercrítico a presiones entre 8-50 MPa. Luego, el extracto llega a la válvula de reducción de presión en donde se alcanzan los 5 MPa. Posteriormente, el extracto se lleva al separador en donde el CO₂ se dirige a un venteo o a un sistema de reciclado para su posterior utilización. Finalmente, el extracto queda depositado en el colector. Las partes de un equipo SFE se muestran en la **Figura 9**. Dependiendo del objetivo de la extracción, se pueden considerar dos escenarios [5]:

- i. Separación de componentes no deseados de la matriz vegetal: en este caso, la carga en el portamuestra es el producto, *e.g.*, en los procesos de eliminación del alcoholde bebidas, remoción de compuestos con olores desagradables o decafeineización del café.
- ii. Extracción de componentes de la matriz vegetal: los componentes extraídos en el colector son los productos, *e.g.*, extracción de terpenos volátiles y de sustancias antioxidantes.

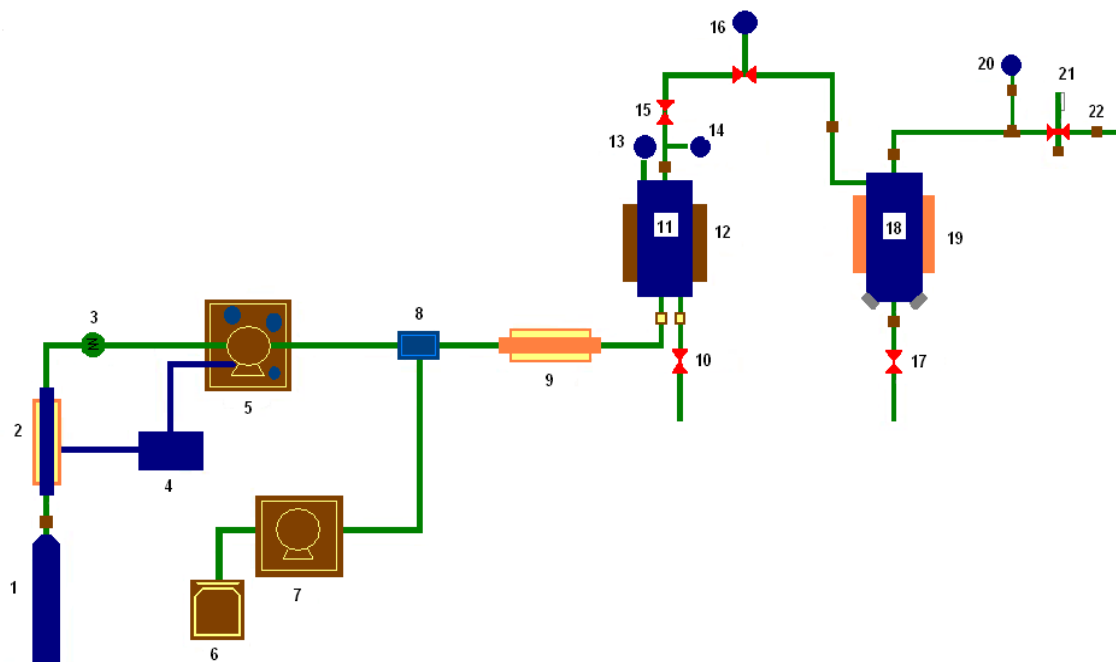


Figura 9. Principales unidades de un equipo para la extracción con fluido supercrítico: 1-Cilindro de CO₂; 2-Intercambiador de calor I; 3-Flujómetro; 4-Baño de refrigeración; 5-Bomba; 6-Reservorio de solvente; 7-Bomba para co-solvente; 8-Mezclador; 9-Intercambiador de calor II; 10-Válvula I; 11-Portamuestra; 12-Chaqueta de calentamiento I; 13-Manómetro 1; 14-Sensor de temperatura; 15-Válvula II; 16-Válvula automática de regulación de la presión; 17-Válvula III; 18-Separador; 19-Chaqueta de calentamiento 2; 20-Manómetro 2; 21-Válvula manual de regulación de la presión; 22-Válvula de venteo.

Para optimizar los procesos de extracción por SFE se necesita conocer los efectos causados por las variables operacionales. Diferentes diseños de experimentos se han aplicado para optimizar el rendimiento de extracción, el total de compuestos fenólicos aislados y la actividad antioxidante de los extractos [2]. A continuación, en la **Tabla 2**, se muestran las condiciones operacionales de mayor influencia en la obtención de extractos con poder antioxidante y los modos de operación en las etapas de extracción y separación.

Tabla 2. Parámetros a optimizar del proceso de extracción con fluidos supercríticos [2].

Condiciones del material vegetal	Condiciones de operación	
	Extracción	Separación
<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño • Humedad • Destrucción celular • Peletización 	<ul style="list-style-type: none"> • Presión • Temperatura • Tiempo • Flujo del solvente • Relación solvente-material vegetal 	<ul style="list-style-type: none"> • Presión • Temperatura
	Formas de llevar a cabo la operación	
	<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones constantes • Condiciones variables 	<ul style="list-style-type: none"> • Etapa simple • Separación fraccionada

1.6. ANTIOXIDANTES

De acuerdo con dos definiciones muy utilizadas, un antioxidante es “cualquier sustancia que en bajas concentraciones, comparadas con las del sustrato oxidable, prevenga o inhiba su oxidación” [11]. Desde el punto de vista biológico es “aquel compuesto que protege a los sistemas vivos de los agentes que causan deterioro oxidativo” [12]. Los antioxidantes tradicionalmente se han dividido en dos grupos: (1) los **antioxidantes primarios**, *e.g.*, compuestos fenólicos o vitamina E, que se descomponen durante el periodo de inducción e inhiben la etapa de iniciación de la reacción en cadena con el radical; (2) los **antioxidantes secundarios** o preventivos, que actúan a baja velocidad y permiten proteger el sustrato mediante enlaces con oxígeno del aire o a través de la formación de complejos con átomos metálicos [2,13]. Otras clasificaciones, menos aceptadas, se hacen con base en el origen del antioxidante: Productos naturales,

semisintéticos y sintéticos; y de acuerdo con su estructura química: fenóles, quinonas, compuestos de azufre y enzimas [14].

1.6.1. Antioxidantes fenólicos. Los compuestos fenólicos figuran entre las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas y son responsables de su color, polinización y protección contra la radiación UV e inclusive contra los patógenos. Estos compuestos incluyen fenoles simples, cumarinas, flavonoides, lignanos y taninos hidrolizables que son polifenoles de elevado peso molecular [13]. Por un lado, son muy susceptibles de ser oxidados, así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interaccione con los electrones del anillo. De otro lado, estas sustancias pueden actuar como quelantes y formar complejos con metales di- o trivalentes, especialmente, con el hierro y el aluminio, lo que tiene implicaciones nutricionales [15]. La reducción de la actividad de las enzimas que catalizan la producción del anión superóxido, como la xantina oxidasa y la proteína quinasa C, es otra de las maneras de prevención de la oxidación que los antioxidantes, e.g., flavonoides presentan [16,17].

1.6.2. Cuantificación de antioxidantes fenólicos. Es importante conocer las cantidades de antioxidantes en los extractos obtenidos a partir del material vegetal, puesto que se necesita relacionarlas con el valor de la capacidad antioxidante que presentan, para determinar de esta manera la masa o el volumen en que se deben adicionar a los productos cosméticos o alimenticios. Dos de las técnicas más empleadas en la actualidad para la cuantificación de antioxidantes fenólicos son: (1) el método de *Folin-Ciocalteu* y (2) la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

- **Método de *Folin-Ciocalteu*.** Este método se basa en la oxidación de compuestos fenólicos por un reactivo de molibdeno y wolframio en medio básico [18]; la transferencia de electrones bajo estas condiciones, hace que

los complejos de estos metales se transformen en óxidos coloreados de azul intenso, lo cual se detecta y relaciona con el número de grupos hidroxilo en las moléculas de antioxidantes [18]. El gran problema de esta medición consiste en que todas las moléculas que poseen grupos OH generaran la respuesta, e.g., proteínas, ácidos ascórbico y úrico, algunos aminoácidos y nucleótidos, azúcares, aminas aromáticas y algunas sales inorgánicas [14], sustancias que no necesariamente son responsables de la capacidad antioxidante de los extractos.

- **HPLC.** La cromatografía líquida es un método, que mediante mecanismos físicos (e.g., adsorción, absorción, disolución, etc.) separa los componentes de una mezcla por su distribución entre dos fases inmiscibles, una móvil, en estado líquido –que le da el nombre a la técnica-, y la otra llamada fase estacionaria [19]. La HPLC de fase estacionaria apolar, designada como “fase reversa”, se usa más frecuentemente para separar los antioxidantes fenólicos [19,20]; los detectores más empleados para este análisis son de arreglo de diodos (DAD) y el selectivo de masas (MSD) [20]. Con las anteriores configuraciones, se han podido separar, en una sola corrida cromatográfica, y detectar hasta 27 compuestos fenólicos, entre los cuales se encuentran diterpenos, ácidos fenólicos y flavonoides [21]. Sin embargo, para lograrlo se requiere una optimización exhaustiva de las condiciones cromatográficas, la combinación de variables como composición, flujo y gradiente de elución de la fase móvil, tipo de fase estacionaria, temperatura, adición de ácidos inorgánicos, entre otras variables [19].

1.6.3. Determinación de la capacidad antioxidante. Existen varios ensayos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante. Para la elección de uno o más métodos se deben tener en cuenta los tipos de sustratos, las condiciones operacionales, los iniciadores, antioxidantes y métodos de medida [3,11]. El problema de utilizar más de una técnica de medición es que sus resultados no siempre pueden ser correlacionados [22]. Hay algunos métodos que pueden ser

automatizados e implementados para hacer mediciones de diferentes muestras simultáneamente [22]. Las técnicas más sencillas y ampliamente usadas se pueden clasificar de acuerdo con las reacciones de desactivación de los radicales, a saber: 1. Reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT), *e.g.*, capacidad de absorción de oxígeno radical, ORAC y parámetro antioxidante total de la captura de radicales (TRAP) y 2. Reacciones de transferencia de un electrón(ET), *e.g.*, capacidad antioxidante equivalente a la del Trolox® (TEAC) [23]. El resultado final de estos dos procesos químicos es el mismo, pero la cinética y las reacciones secundarias que ocurren son diferentes [23,24]. La transferencia de electrones y las reacciones HAT pueden ocurrir en paralelo. El mecanismo dominante será determinado por la estructura y propiedades del antioxidante individual o en mezcla, la solubilidad, el coeficiente de partición y el solvente del sistema [24].

- **ORAC.** Las mediciones obtenidas por el método ORAC, de la inhibición de radicales peroxilo inducidos por reacciones de oxidación, es un ejemplo del rompimiento de reacciones en cadena por transferencia de un átomo de hidrógeno proveniente de un compuesto antioxidante. En este ensayo los radicales peroxilo reaccionan con un compuesto fluorescente formando un producto que no presenta fluorescencia. La capacidad antioxidante se determina con base en la disminución de la fluorescencia y la cantidad de producto formado en función del tiempo [14].

1.7. DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y OPTIMIZACIÓN

Un proceso de optimización es aquel que busca saber cuáles son los niveles de los factores o las variables que se deben utilizar para obtener una respuesta máxima o mínima, según sea el caso. Antes de comenzar un proceso de optimización se debe determinar cuáles factores o variables afectan de una manera significativa la respuesta, ello, para reducir el tiempo de análisis o

experimentos y ahorrar recursos [25]. Lo anterior se puede determinar realizando experimentos factoriales o factoriales fraccionados, si el número de factores es mayor de 3. En los experimentos se asignan niveles altos y bajos a los factores. La elección de tales niveles depende del grado de conocimiento y experiencia del investigador y las limitaciones operacionales del sistema [26]. Cuando los diferentes factores variables e interacciones ya se han identificado, se necesita aplicar métodos para determinar las combinaciones de los niveles de los factores que proporcionarán la respuesta óptima [25].

1.7.1. Diseños de experimentos factoriales fraccionados. Una vez se han escogido las variables para el estudio y sus niveles, el experimentador deberá calcular todas las combinaciones, que, en otras palabras, representan el número de experimentos que deberá llevar a cabo para tomar decisiones. Un diseño en el que se estudien 3 variables, con dos niveles, requerirá $2^3 = 8$ combinaciones o experimentos, más otros, para hallar el error experimental, *e.g.*, dos o más réplicas de una combinación. Si se requiriera estudiar 7 variables, el número de experimentos sería de 128, bajo estas condiciones se pueden utilizar diseños que utilicen la mitad (64), un cuarto (32) o un octavo (16) del número total de experimentos [25,27].

Los experimentos factoriales fraccionados son muy útiles en estudios exploratorios, ya que con un número grande de factores no es necesario realizar todos los experimentos para hallar los efectos principales e interacciones de segundo orden [27]. Las siguientes son dos desventajas principales: 1. Con este tipo de diseños hay que hacer la suposición de que las interacciones de tres factores o más son despreciables y 2. La estimación del error experimental se calcula con base en la variación de aquellos efectos que no tuvieron un efecto significativo en la respuesta y no con la desviación de las réplicas [26,27]. En todo caso, estos diseños son estudios legítimos si se utilizan como revisiones

preliminares cuyo objetivo es preparar el camino para experimentos más rigurosos [25].

1.7.2. Optimización mediante el método *Simplex*. Cuando la respuesta de un sistema analítico depende de dos factores que son variables continuas, la relación entre la respuesta y las variables se puede representar como una superficie tridimensional o superficie de respuesta. Un método conveniente para encontrar los máximos o los mínimos de una superficie de respuesta es el método *Simplex*, el cual permite estudiar un número mayor de variables sin aumentar el número de experimentos [26]. Un *Simplex* es una figura geométrica que tiene $k+1$ vértices, cuando se trata de optimizar una respuesta respecto a k factores, e.g., para dos factores el *Simplex* será un triángulo, como se observa en la **Figura 10**[26].



Figura 10. Representación de la optimización por el método *Simplex* [26].

En los primeros experimentos se mide la respuesta en cada una de las tres combinaciones de los niveles del factor dadas por los vértices del triángulo 1,2,3. La peor respuesta se encuentra en el punto 3, por lo tanto, la mejor sería el punto marcado como 4. El siguiente daría que el punto 1 es el peor, es decir, el 5 sería el

siguiente vértice y así sucesivamente. En el triángulo 5,6,7 la peor respuesta es el 6, pero la mejor no es 8. Un problema con el método es la elección del *Simplex* inicial, pues si es muy pequeño o muy grande se tienen problemas como el exceso en el número de experimentos o la falta de precisión para encontrar el óptimo, respectivamente [25,26]. Para superar estos problemas, las áreas de las figuras geométricas se pueden variar a medida que el estudio avanza [26].

1.8.PLANTAS BAJO ESTUDIO

Las plantas bajo estudio son dos especies de porte herbáceo o arbustivo, que se utilizan como especies aromáticas y medicinales. Sus aceites esenciales se comercializan ampliamente debido a las buenas propiedades organolépticas y alta actividad biológica que exhiben.

1.8.1. *Salvia officinalis*. La salvia es un arbusto de hasta 70 cm de altura que pertenece a la familia Lamiaceae. Presenta numerosos tallos, tomentosos de color grisáceo. Sus hojas son oblongas o lanceoladas, más claras en el envés en donde son pubescentes. Las flores son de color violeta o azulado, agrupadas en grupos de hasta 10 [28]. La salvia, que es nativa del Mediterráneo, se emplea como antiséptico, astringente, antiinflamatorio, carminativo, bacteriostático, eupéptico, antitranspirante y cicatrizante [28,29].

1.8.2. *Thymus vulgaris*. El tomillo pertenece a la familia Lamiaceae, alcanza de 15 a 30 cm de altura, tiene hojas opuestas, lanceoladas, con los bordes enrollados y densamente pilosas. Las flores son diminutas, agrupadas en racimos terminales muy densos, son de color rosa o blancas [28]. Es una planta de origen mediterráneo, muy apreciada en culinaria. El tomillo presenta propiedades digestivas, estimula el apetito, es antiparasitario, antihelmíntico, anticatarral, antimicrobiano, antiséptico, cicatrizante, antiespasmódico, carminativo, expectorante, astringente suave, diaforético y tonificante [29].

2. ANTECEDENTES

2.1. ANTIOXIDANTES DE TIPO FENÓLICO PRESENTES EN LAS PLANTAS ESTUDIADAS

En la **Tabla 3** se listan algunos ácidos fenólicos, diterpenos, flavonoides y monoterpenos volátiles, posibles responsables de las propiedades antioxidantes de los extractos obtenidos de las plantas estudiadas, salvia y tomillo. La mayoría de estas sustancias posee una capacidad antioxidante superior a las de los antioxidantes sintéticos, BHA y BHT [3].

Tabla 3. Ubicación y concentración de algunos antioxidantes en salvia y tomillo.

Especie vegetal	Antioxidante	Parte de la planta	Concentración, $\mu\text{g/g}$	Refs.
<i>Salvia officinalis</i>	Ácido ascórbico	Hojas	320-350	[30]
	Ácido gentísico	Hojas	2.4×10^3	[30,31]
	Ácido ferúlico	Hojas, tallos y flores	4.9×10^3	[30,31]
	Ácido rosmarínico	Hojas, tallos y flores	3.0×10^4	[30,32]
	Ácido salvianólico L	Hojas, tallos y flores	N.D.*	[32,33]
	Ácido ursólico	Hojas	$1.2-1.3 \times 10^3$	[30,34]
	7-O-Glucósido de luteolina	Hojas	N.D.	[30,35]
	Canfeno	Hojas	$20-1.9 \times 10^4$	[30]
<i>Thymus vulgaris</i>	Ácido caféico	Hojas, tallos y flores	5.8×10^3	[30,31]
	Ácido ursólico	Hojas, tallos y flores	$1.5-1.9 \times 10^4$	[30]
	Ácido siringico	Hojas, tallos y flores	5.0×10^3	[31]
	Ácido 3-hidroxibenzóico	Hojas, tallos y flores	1.4×10^3	[30,31]
	Ácido rosmarínico	Hojas	$6.3-2.6 \times 10^3$	[30,31]
	Rosmanol	Hojas, tallos y flores	N.D.	[30]
	Naringenina	Hojas	N.D.	[30]
	Timol	Hojas, tallos y flores	$15-2.4 \times 10^4$	[30]

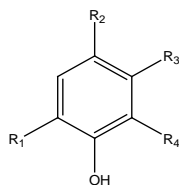
*N.D.= No determinado.

La cantidad de metabolitos secundarios depende de su ubicación en la planta. Se pueden encontrar o no en diferentes órganos de ésta. Por ejemplo en la extracción de volátiles con fluido supercrítico a partir de *Sphylantes americana*, los extractos de los tallos presentaron altas cantidades de sesquiterpenos, mientras que los de las hojas y flores, compuestos oxigenados y nitrógenados (espilantol) [36]. La mayoría de los metabolitos secundarios se encuentran localizados en la superficie de la célula o en espacios intracelulares. La concentración y tipo de compuestos encontrados en estas especies varían de una región a otra, debido principalmente a la edad de la planta o su estado fenológico, condiciones ambientales, composición del suelo, etc.

2.2. SOLUBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN CO₂-SF

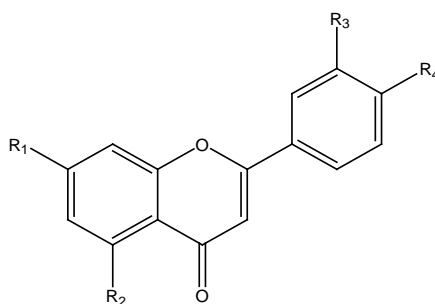
En la **Figura 11**, se muestran las estructuras de algunos compuestos fenólicos presentes en la salvia y el tomillo.

Figura 11. Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes.

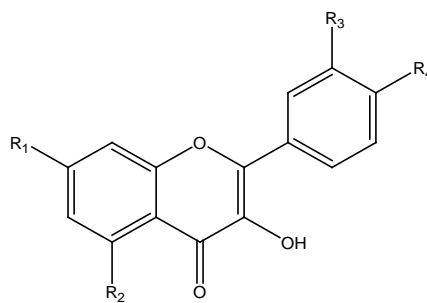


Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Carvacrol	CH ₃	H	CH(CH ₃) ₂	H
Timol	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H
Ácido o-hidroxibenzoico	COOH	H	H	H
Ácido m-hidroxibenzoico	COOH	H	H	H
Ácido p-hidroxibenzoico	H	COOH	H	H
Ácido caféico	OH	CH=CH-COOH	H	H
Ácido ferúlico	OCH ₃	CH=CH-COOH	H	H
Ácido siríngico	OCH ₃	COOH	H	O-CH ₃
Ácido p-cumárico	H	CH=CH-COOH	H	H

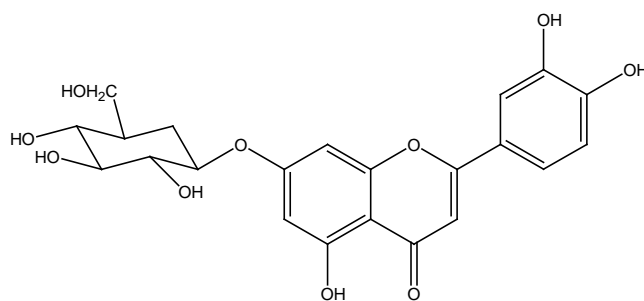
Figura 11. Continuación.



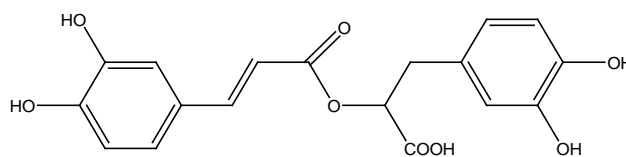
Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Flavona	H	H	H	H
Luteolina	OH	OH	OH	OH
Apigenina	OH	OH	H	OH



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Flavonol	H	H	H	H
Quercetina	OH	OH	OH	OH
Kaempferol	OH	OH	H	OH

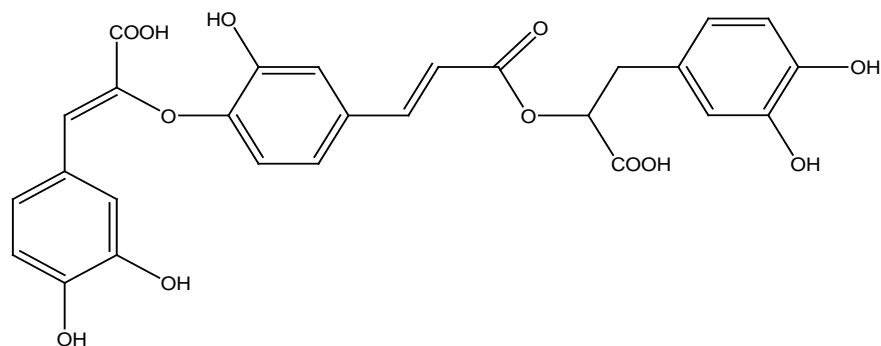


Luteolin-7-glucósido

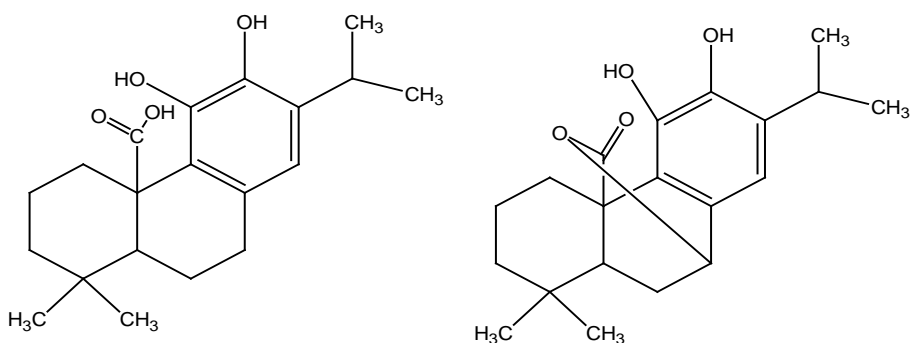


Ácido rosmarínico

Figura 11. Continuación.



Ácido salvianólico L



Ácido carnósico

Carnosol

Aunque en el presente trabajo no se determinaron las solubilidades de los antioxidantes presentes en los extractos, fue necesario tenerlas en cuenta cuando se optimizó el proceso de extracción. En la **Tabla 4** se muestran las condiciones de extracción y el valor de solubilidad en $\text{CO}_2\text{-SF}$ de algunos compuestos fenólicos presentes en la salvia y tomillo.

El CO_2 tiene un momento dipolar nulo, por esta razón, a condiciones supercríticas es un excelente disolvente de muchas moléculas orgánicas apolares. Sin embargo, el CO_2 posee un momento cuadrupolar el cual hace que disuelva a solutos levemente polares e inclusive a algunos polares a presiones mayores de 25 MPa [5,37]. En la práctica, el $\text{CO}_2\text{-SF}$ se utiliza en promedio, a temperatura y presión 1.2 y 3.5 veces mayores, respectivamente, que las del punto crítico [5,6].

Los antioxidantes de tipo fenólico, como los ácidos fenólicos y flavonoides, son compuestos polares debido a los grupos funcionales hidroxilo, carbonilo y carboxilo, presentes en sus estructuras.

Tabla 4. Solubilidad de algunos compuestos fenólicos en CO₂-SF.

Compuesto	Condiciones		Solubilidad, fracción molar	Referencia
	P, MPa	T, K		
Carvacrol	0.26-30.8	313-323	0.029-1.78	[38]
Timol	5.7-14	323-343	0.51-12.6x10 ⁻³	[39]
Ácido o-hidroxibenzoico	9.6-25	313-328	0.34-5.83x10 ⁻⁴	[40]
Ácido m-hidroxibenzoico	10.1-20.3	318	0.57-3.37x10 ⁻⁵	[41]
Ácido p-hidroxibenzoico	20-41.4	318-373	0.29-7.49x10 ⁻⁵	[42]
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	10-50	313-333	0.023-25.9x10 ⁻⁷	[43]
Ácido o-metoxibenzoico	9.98-24.7	308-328	0.89-11.1x10 ⁻²	[44]
BHA*	13-20	313-333	1.44-4.6x10 ⁻²	[45]
Ácido caféico	8.5-50	313-333	0.08-4.7x10 ⁻⁸	[46,47]
Ácido ferúlico	12-50	301-333	1.55-25.5x ⁻⁷	[48]
Ácido siríngico	8.5-50	313-333	0.01-127.1x10 ⁻⁷	[49]
Flavona	9.1-25.3	308-318	0.35-5.61x10 ⁻⁴	[50]
Flavonol	9.1-25.3	308-318	0.79-5.56x10 ⁻⁴	[50]
Ácido carnósico	20-37	313-373	1-90x10 ⁻⁹	[51]

* Butil-hidroxianisol, antioxidante sintético.

De la **Tabla 4**, se puede concluir lo siguiente:

- i. Una característica común de los compuestos fenólicos es que su solubilidad en el CO₂-SF, aumenta con la temperatura -debido a que tiene más efecto la volatilidad de los solutos que la disminución de la densidad del fluido,- sobre todo, a presiones alejadas de la presión crítica. Para el ácido ferúlico, cuando

la temperatura aumenta de 301 a 333 K, el incremento de la solubilidad es de 20%, a 12 MPa, mientras que a 28 MPa, el aumento es del 90% [48].

- ii. La presencia de algunos sustituyentes en los esqueletos básicos, como el del fenol, hacen que la solubilidad aumente o disminuya según sea el caso. Los sustituyentes hidróxilo y metóxilo hacen que la solubilidad se reduzca e incremente, respectivamente. Esta tendencia se puede visualizar mejor en los ácidos ferrúlico y caféico, que presentan solubilidades de 25.5×10^{-7} y 0.472×10^{-7} fracción molar, respectivamente, a 50 MPa y 333 K [46] (Véanse sus estructuras en la **Figura 11**).
- iii. La solubilidad a 20 MPa y 318 K del ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-HBA, en el sistema *p*-HBA/CO₂-SF es dos órdenes de magnitud más baja (2.86×10^{-6}) que la del *o*-HBA en el sistema *o*-HBA/CO₂-SF (4.36×10^{-4}); pero, si se midiera en el sistema ternario *p*-HBA/*o*-HBA/CO₂-SF, la solubilidad del *p*-HBA aumenta un 169% (7.53×10^{-6}), mientras que la del *o*-HBA (4.47×10^{-4}) aumenta tan solo el 3% [52]. Lo anterior puede ser resumido en el postulado de Dobbs y Johnston que reza “un sólido más soluble causa un aumento en la solubilidad del sólido menos soluble, pero en viceversa no ocurre” [53].
- iv. El peso molecular es otro factor importante que altera la solubilidad; el BHA cuyo peso molecular es 184.18 g/mol, presenta una solubilidad siete órdenes de magnitud mayor que la del ácido carnósico, 332.43 g/mol. Para mejorar la solubilidad, se pueden agregar pequeñas cantidades de etanol, e.g., 0.7%; bajo estas condiciones, la solubilidad del ácido carnósico aumenta de 1.90×10^{-9} a 7.12×10^{-6} fracción molar [54].

2.3. EFECTO DE LAS VARIABLES OPERATIVAS EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CANTIDAD DE ANTIOXIDANTES

Los reportes sobre las extracciones con CO₂-SF de salvia, tomillo y otras plantas con propiedades aromáticas y antioxidantes, se dividen en dos tipos: (1) Las que

buscan obtener extractos de componentes volátiles (monoterpenoides y sesquiterpenoides), a condiciones de presión y temperatura bajas; (2) Las que dan como resultado extractos enriquecidos en antioxidantes de tipo fenólico (ácidos fenólicos, flavonoides y diterpenos fenólicos), a condiciones de presión y temperatura altas.

2.3.1. Presión. Usualmente, los componentes volátiles se extraen a presiones menores o iguales de 10 MPa [2,3], aunque también se ha encontrado que un aumento en la presión desde 25 a 35 MPa dobla de 1,2 a 2,4% el rendimiento del extracto de *Hypericum perforatum* [55]; en el romero, la cantidad de volátiles en el extracto aumenta en un 45.9% cuando la presión se incrementa de 10 a 18 MPa [56].

Las fracciones de componentes volátiles se han separado de las fracciones de antioxidantes a partir de salvia, romero y tomillo, realizando una etapa inicial de extracción a 10-11.5 MPa y, luego, una segunda a 35-40 MPa; estas últimas fracciones poseen capacidades antioxidantes superiores a las de las primeras [57-59]. En la **Tabla 5**, se reportan los valores de presión ensayados en la extracción supercrítica de las especies bajo estudio, y del romero, junto con los valores máximos obtenidos de las respuestas evaluadas por los distintos autores y la presión requerida para su obtención [56, 60-68].

En la **Tabla 5**, también se muestran algunos datos de las extracciones con CO₂-SC del romero, debido a que esta especie, que pertenece a la misma familia botánica de la salvia y el tomillo, presenta similitudes con éstas en cuanto a la composición de sustancias fenólicas y terpénicas. Además, sobre el romero, existe un número mayor de artículos disponibles, lo cual se aprovechó para realizar este trabajo de investigación.

Autores/ [Ref.]	Presiones, MPa		Valor máximo de la respuesta
	Experimental	Requerida para obtener el mejor resultado	
Salvia			
<i>Babovic, N., et.al.</i> [57]	11.5 y 35	35	26.4 y 18.5% / Cantidades relativas de ácido carnósico y carnosol, respectivamente.
<i>Reverchon, E. and Taddeo, R.</i> [60]	8,9,10	9	N.M.* / Cantidad relativa de monoterpenos oxigenados; fragancia más agradable.
<i>Glisic, S., et.al.</i> [61]	150 y 300	300	1.33 % / Cantidad relativa de diterpenos fenólicos
<i>Aleksovski, S and Sovová, H.</i> [62]	9,10,11,11.9,12.8	12.8	4.8% / Rendimiento de extracción; 8.14 mg/kg MV / cantidad de monoterpenos oxigenados.
<i>Glisic, S., et.al.</i> [63]	7,10,15,20,30	20	28.82% / Cantidad relativa de diterpenos fenólicos.
Tomillo			
<i>Babovic, N., et.al.</i> [57]	11.5 y 35	35	26.4 y 20.3% / Cantidad de un derivado no identificado del ácido carnósico y timohidroquinona, respectivamente.
<i>García, M., et.al.</i> [64]	15, 30 y 40	15	29.6% / Cantidad relativa más alta de timol
<i>Díaz, M., et.al.</i> [65]	9,10,12,15	15	87.3 % / Cantidad relativa de componentes de alta relevancia en la fragancia del extracto.
<i>Zekovic, Z., Lepojevic, Z. and Vujic, D.</i> [66]	8,10,15,20,40	20	0.85 mg/g / Cantidad de timol, por cantidad de material vegetal
Romero			
<i>Bensebia, O., et.al.</i> [56]	10,12,15,18	18	4.57x10 ⁻⁴ kg/kg / Solubilidad del extracto de volátiles en el CO ₂
<i>Genena, A., et.al.</i> [67]	10,20,30	30	3.52 % / Rendimiento de extracción; 25.50 µg/mL IC ₅₀ capacidad antioxidante más alta.
<i>Carvalho, R., et.al.</i> [68]	10,30	30	1.073% / Ácido carnósico en el extracto; 5% rendimiento de extracción.
<i>Tena, M., et.al.</i> [69,70]	7.7-38.3	38.3	N.M.* / Área del pico cromatográfico del ácido carnósico, carnosol y carnosato

Tabla 5. Condiciones de presión ensayadas en diferentes estudios de la extracción con CO₂ a partir de las especies bajo estudio.

* No se menciona el valor máximo.

Las presiones usadas en la extracción de antioxidantes pueden llegar hasta los 100 MPa [71-73]; sin embargo, algunos flavonoides como pinocembrina se han aislado de *Lippia origanoides* a 8 MPa [74]. La obtención de extractos con potencial antioxidante a partir de romero, salvia, tomillo y orégano se ha llevado a cabo a presiones entre los 50 y 100 MPa, con lo cual se logró obtener extractos, con valores de capacidad antioxidante, similares a los del BHA y BHT, además de obtener aumentos significativos en los rendimientos y disminución de los tiempos de extracción; asimismo, los contenidos de volátiles sólo fueron del 2%, según lo reportado en las patentes de Uy y colaboradores [71] y Nguyen y colaboradores [72,73].

2.3.2. Temperatura. La temperatura, al igual que la presión, varía de acuerdo con el tipo de metabolitos secundarios que se desee extraer, las temperaturas desde 303 K (condición subcrítica) hasta 323 K son las más comunes para la extracción de compuestos volátiles como mono- y sesquiterpenos [75].

Muchas sustancias se descomponen a altas temperaturas, por ejemplo, algunos flavonoides pueden polimerizarse u oxidarse a temperaturas superiores a los 323 K, aunque algunos ácidos fenólicos son más resistentes [2,3]. A la temperatura de los 313 K, se han alcanzado rendimientos aceptables en la extracción del carnosol, a partir de mejorana, *i.e.*, 1.5 mg/kg de MV seco [76] y apigenina, a partir de manzanilla, cantidad comparable con la obtenida en la extracción *Soxhlet* [77]. Las temperaturas mayores de 343 K causan la isomerización del *trans*-licopeno a su isómero *cis*-, que es menos bioactivo [78]. Además, se ha observado que las temperaturas mayores de 323 K actúan negativamente sobre propiedades como la textura, fragancia y color de los extractos de bambú (*Phyllostachys heterocycla*)

[79] y de cereza brasilera (*Eugenia uniflora*) [80]. En algunos casos, las temperaturas superiores o iguales a 373 K no afectaron la capacidad antioxidante de los extractos, por lo tanto, no ocurrió degradación térmica en compuestos como los ácidos carnósico y rosmarínico, carnosol y rosmanol obtenidos a partir de salvia, romero, tomillo y orégano [71-73]. En la **Tabla 6**, se tabulan los valores de temperatura ensayados en la extracción supercrítica de las especies bajo estudio y el romero, los valores máximos obtenidos de las respuestas evaluadas por los distintos autores y la temperatura requerida para su obtención.

Tabla 6. Condiciones de temperatura ensayadas en diferentes estudios de la extracción con CO₂ a partir de las plantas bajo estudio.

Autores [Ref.]	Temperaturas, K		Valor máximo de la respuesta
	Experimentales	Requerida para obtener el mejor resultado	
Salvia			
<i>Reverchon, E. and Taddeo, R.</i> [60].	318, 323 y 333	323	N.M.* / Cantidad relativa de monoterpenos oxigenados; fragancia más agradable.
<i>Aleksovski, S. and Sovová, H.</i> [62].	298, 313 y 323	323	4.8% / Rendimiento de extracto, 8.14 mg/kg MV/ Cantidad de monoterpenos oxigenados.
<i>Ivanović, J., et.al.</i> [81].	313-373	373	1.74% / Rendimiento de la fracción antioxidante; mayor capacidad antioxidante
Tomillo			
<i>Díaz, M., et.al.</i> [65].	303 y 313	303	87.3 % / Cantidad relativa de componentes de mayor relevancia en la fragancia del extracto.
Romero			
<i>Bensebia, O., et.al.</i> [56].	313 y 333	313	4.57x10 ⁻⁴ kg/kg / Solubilidad del extracto de volátiles en el CO ₂
<i>Genena, A., et.al.</i> [67].	303, 313 y 323	323	3.52 % / Rendimiento de extracción; 25.50 µg/mL IC ₅₀ mayor capacidad antioxidante.
<i>Carvalho, R., et.al.</i> [68].	303 y 313	313	1.073% / Ácido carnósico en el extracto; 5% rendimiento de extracto.

<i>Tena, M., et.al</i> [69,70].	313-393	393	N.M.* / Área del pico cromatográfico de ácido carnósico, carnosol y carnosato de metilo.
------------------------------------	---------	-----	---

* No se menciona el valor máximo.

2.3.3. Modificador. El CO₂ es un disolvente adecuado para la extracción de compuestos apolares y de baja polaridad; sin embargo existen excepciones, por ejemplo, el licopeno, β-caroteno, luteína y astaxantina, se obtienen con menores rendimientos, ya que las solubilidades son bajas ($\leq 10^{-6}$ en fracción molar), y poseen pesos moleculares relativamente altos, y estructuras lineales largas [78,82-85].

La presión y la temperatura tienen efectos limitados sobre la solubilidad y el rendimiento de la extracción con CO₂-SF de compuestos polares. Por esta razón, ha sido necesario aumentar la capacidad de solvatación del CO₂ con ciertas cantidades de disolventes convencionales como agua, etanol, metanol, isopropanol, poli(etilenglicol) o sus mezclas [4-7]. La solubilidad y la actividad antioxidante de los extractos de *Zingiber officinale* mejoró significativamente cuando se adicionó etanol (1.2%) o iso-propanol (1.2%) al CO₂-SF [86], mientras que la solubilidad del ácido carnósico se incrementó desde 7.12×10^{-6} hasta 54.57×10^{-6} en fracción molar cuando se aumentó la proporción de etanol/CO₂ de 0.7 al 10% [54].

La adición de aceptores de hidrógeno o bases de Lewis produce mejoras significativas en la solubilidad; la presencia de estas especies aumenta la densidad del fluido, permite interacciones específicas entre las moléculas de soluto y solvente (puentes de hidrógeno), posiblemente, altera la estructura de la matriz vegetal y disminuye las interacciones de los solutos con la matriz [56,87]. La proporción de modificador tiene un límite, debido a que se invierte la selectividad del fluido puesto que la solvatación de compuestos polares se mejora, pero disminuye la de los apolares [75]. Algunas veces, se ha logrado aumentar el

rendimiento de la extracción, pero la cantidad de compuestos con mayor bioactividad en el extracto disminuye, e.g., se aumenta la cantidad de clorofilas en la extractode jengibre al adicionar 10% de etanol, aunque disminuyen simultáneamente gingeroles y shogaoles [86].

De varios modificadores empleados, el etanol es el menos tóxico y ambientalmente inocuo, cuando éste se agrega al fluido, la solubilidad de ginsenólidos [88], polifenoles [89] y carotenoides [90]aumenta. En untrabajo realizado con romero la capacidad antioxidante del extracto y las cantidades del ácido carnósico y carnosol aisladas fueron superiores cuando se utiliza etanol en una proporción del 7%, a 15 MPa y 313 K, en comparación con CO₂-SF puro a 40 MPa y 313 K [91]. Un problema relacionado con la utilización de etanol es que al final hay que retirarlo del extracto mediante evaporación, lo cual puede causar la degradación de los antioxidantes o pérdida de volátiles, además, se aumentan el costo energético y el tiempo del proceso [71,72].

2.3.4. Tamaño de partícula y densidad de carga.El tamaño y la forma del material vegetal tienen un efecto importante sobre la transferencia de masa del soluto desde la matriz al solvente. Si el material se pica y pulveriza, su área superficial se incrementa y, por ende, los rendimientos de la extracción, pero también, se puede presentar la reabsorción del soluto en la matriz [75]. El tamaño del material se ve limitado por las condiciones de su empaquetamiento en el portamuestra; sí el tamaño del material es grande, la densidad de carga será menor, y de esta manera, menos material cabrá en el portamuestra, lo que aumentará los costos de extracción. Algunos investigadores reportaron la disminución de los rendimientos de extracción debido a pérdidas por volatilización o por degradación de los polifenoles y terpenos contenidos en los rizomas de cúrcuma y hojas de romero [90,91].

Louli y colaboradores [92] encontraron que una disminución en el tamaño de partícula de semilla de perejil (*P. crispus*), de 293 a 495 μm representa un

aumento de más del 30% en el rendimiento de la extracción de su aceite; en el romero, la cantidad de extracto aumentó de 2.3 a 2.8 g por g de MV, cuando el tamaño de partícula disminuyó de 436 a <150 μm [56]. Sabio y colaboradores [93] reportan disminuciones del 50% en la extracción del licopeno a partir de cáscaras de tomate, al reducir el tamaño de partícula de 345 a 80 μm . De cualquier manera, cada material es diferente y se deben ensayar más de un tamaño de partícula y densidad de carga, para lograr los mejores resultados posibles. Para la extracción de antioxidantes a partir del romero y salvia, se reportan tamaños de partícula entre 150 y 999 μm y densidades reales entre 300 y 1046 kg/m^3 [56,59,63,68].

2.3.5. Humedad y secado del material vegetal. La presencia de agua no se recomienda, ya que la humedad actúa como una barrera en la transferencia de masa desde la fase sólida a la supercrítica, este efecto es más significativo para los compuestos apolares [5,94,95]. Además, la coextracción de agua hace que algunos compuestos sufran descomposición hidrolítica [75]. Aproximadamente un 0,3% de agua es soluble en $\text{CO}_2\text{-SF}$, esto sirve para aumentar la polaridad del fluido. Un exceso de agua en el material hace que los analitos polares o hidrofílicos prefieran permanecer en la fase líquida, lo que hace que su transferencia hacia la fase supercrítica sea muy baja [94]. Se han reportado contenidos de agua entre un 7 y 19% en base húmeda [95].

Tabla 7. Cantidad necesaria, $\mu\text{g}/\text{mL}$, para reducir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH.

Forma de secado	Fracción de antioxidantes	Fracción de volátiles
Liofilización	43.9	148
En horno, 45 °C	153.8	177.7
En rotoevaporador, 35 °C	128.4	5331

En el trabajo de Ibáñez y colaboradores [58], se compararon los extractos obtenidos de *R. officinalis*, que se secó de diferentes maneras, a saber: 1. Secado

en frío (liofilización); 2. Secado en horno a 45 °C; y 3. Secado en rotoevaporador a 35°C. El rendimiento de extracción más alto se obtuvo a partir del material seco obtenido por el Método 1, pues las pérdidas de compuestos volátiles fueron menores a temperaturas bajas; además el secado por el Método 2, alteró negativamente la fragancia del extracto. La actividad antioxidante de extractos se calculó como la cantidad de extracto necesaria para que los antioxidantes presentes en él, “atrapen” DPPH, según los datos que aparecen en la **Tabla 7**.

2.3.6. Flujo del solvente. El flujo de solvente afecta principalmente la extracción de solutos que están fácilmente disponibles en la matriz, como ceras, que se encuentran en la superficie de las hojas, o terpenos volátiles, ubicados en tricomas glandulares [4]. Durante el inicio del proceso de extracción, flujos altos mejoran los rendimientos, pero si la extracción dura 3 h, este efecto se torna irrelevante [3,96]. El flujo del solvente afecta los rendimientos de aceite obtenido de las semillas de apio [97]: al disminuir el flujo desde 3 a 1 kg/h, se mejora el rendimiento en un 20% debido al mayor tiempo de contacto entre el CO₂ y la matriz vegetal. En la extracción de compuestos fenólicos a partir de los residuos de la uva [88], flujos altos no tuvieron ningún efecto sobre la cantidad de componentes extraídos. El rendimiento del extracto de romero no presentó una variación significativa al aumentar el flujo desde 1 a 5 g/min [56]. Es importante tener en cuenta que los flujos altos incrementan los costos operacionales del proceso y este parámetro se debe tener en cuenta cuando se realiza el proceso a nivel industrial [95].

2.3.7. Tiempo de extracción. Los reportes sobre esta variable muestran rangos de operación amplios; para etapas estáticas –flujo igual a cero- que suelen aplicarse antes de las etapas dinámicas, se citan tiempos entre 1 min y 2 h, y para las dinámicas, tiempos entre 15 min y más de 5 h [3,95,96]; esta metodología de trabajo ha mostrado resultados positivos. Tiempos muy prolongados de extracción reducen la dependencia del rendimiento de otras variables operacionales, como es el caso del extracto de caléndula. Durante su extracción, el rendimiento no varió

significativamente bajo diferentes condiciones de presión, cuando se evaluaban tiempos de tres horas, pero los costos de extracción sí se aumentaron [98]. Pourmortazavi y colaboradores [75] citan, que operando con un periodo estático de 25 min y fijando periodos dinámicos de 20 o 30 min, la cantidad de compuestos poco volátiles (flavonoides, ceras y diterpenos) aumentaba, a la vez que la cantidad de componentes más volátiles disminuía (monoterpenos). Para compuestos solubles en el CO₂-SF, los tiempos de extracción largos no influyen significativamente, pero sí para los compuestos poco solubles [96,98].

2.3.8. Condiciones de separación. La separación y la recuperación de los extractos son variables comúnmente ignoradas por algunos autores de libros y artículos científicos sobre el tema, aunque son muy importantes para la recuperación de los componentes de interés. Las opciones actualmente disponibles incluyen: 1. Restrictores de presión y controles de temperatura en donde el extracto queda condensado en viales o recipientes cilíndricos; 2. Adsorción sobre materiales porosos para retener el extracto y reciclar el fluido; 3. Disolución del extracto en solventes líquidos y 4. Tecnologías de nanofiltración en membranas u osmosis inversa [3,75,95].

Dentro de la primera opción, figuran los equipos en donde el extracto se despresuriza hasta alcanzar presiones cercanas a la atmosférica y forma un ciclón dentro de un recipiente cilíndrico, lo que permite separar los componentes del CO₂ gaseoso. En estos recipientes el control de la presión y la temperatura es importante, pues de estas dos variables depende el grado de fraccionamiento del extracto [59]. Las configuraciones de los equipos con esta opción de separación incluyen, por lo general, dos o tres recipientes cilíndricos en acero inoxidable. Cada uno de estos separadores recibirá una fracción distinta en cuanto a su composición química, propiedades antioxidantes y rendimiento; una de las fracciones es la que contendrá los compuestos más volátiles, responsables de la fragancia de la planta; otra, será conformada por los compuestos con propiedades

antioxidantes, que son poco volátiles; y otra más, las grasas o ceras cuticulares, que son indeseables en la mayoría de los casos. Nunca obtendrán fracciones con grado de pureza alto, pues cada una de ellas contendrá un pequeño porcentaje de las otras, e.g., se han llegado a obtener fracciones de antioxidantes fenólicos con hasta 2% de compuestos volátiles [72]. Las siguientes fueron las condiciones de presión y temperatura empleadas por Herrero y colaboradores [91], para separar los compuestos fenólicos (fracción 1), de los terpenos y sesquiterpenos volátiles (fracción 2), en la extracción de romero: 10 MPa y 313 K, y 0.1 MPa y 313 K, respectivamente.

3. METODOLOGÍA

3.1. MATERIAL VEGETAL Y TRATAMIENTO POSTCOSECHA

El material vegetal, MV, de las dos especies bajo estudio se cosechó en el municipio de Sucre, Santander. La identificación taxonómica de las especies estudiadas, se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá).

Las hojas, tallos y flores procedentes de parcelas experimentales ubicadas en el municipio de Sucre, Santander, se secaron bajo condiciones temperatura y humedad ambientales, protegidos de la luz solar y del agua. El material vegetal se envió al Complejo Agroindustrial Piloto, CENIVAM, en donde se picó manualmente con tijeras de jardinería y posteriormente se molió en un molino de cuchillas *Willey Mill, Standard Model N° 3*, (Pittsburg, PA, EE.UU.), hasta alcanzar un tamaño promedio de 1 mm. La caracterización por tamaño del MV se llevó a cabo en un tamizador *Tyler Portable Sieve Shaker Model RX-24*, (Columbus, MI, EE.UU), equipado con mallas *Sargent-Welch Scientific Company*, (Buffalo, NY, EE.UU).

El material molido se sometió a un proceso de secado controlado, en un horno eléctrico *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia) hasta alcanzar valores de humedad menores de 10% (base húmeda) [99]; se siguió la metodología consignada en el trabajo de Gómez [100], desarrollada previamente en el Laboratorio de Cromatografía (UIS). Para obtener el valor (en porcentaje) de

humedad el MV previamente molido (0.21-1.76 mm), se sometió a secado “total” en horno con ventilación a 115 °C durante 24 h. Se restó la masa del MV seco de la del húmedo, y esta diferencia representó la humedad. Finalmente para expresar el valor en porcentaje se utilizó la **Ecuación 5**. Los equipos para la molienda y el secado son mostrados en la **Figura 12**.

$$M_H = \frac{\text{kg de humedad}}{\text{kg de MV húmedo}} * 100 = \frac{\text{kg de humedad}}{\text{kg de humedad} + \text{kg de MV seco}} * 100 \text{Ecuación 5}$$

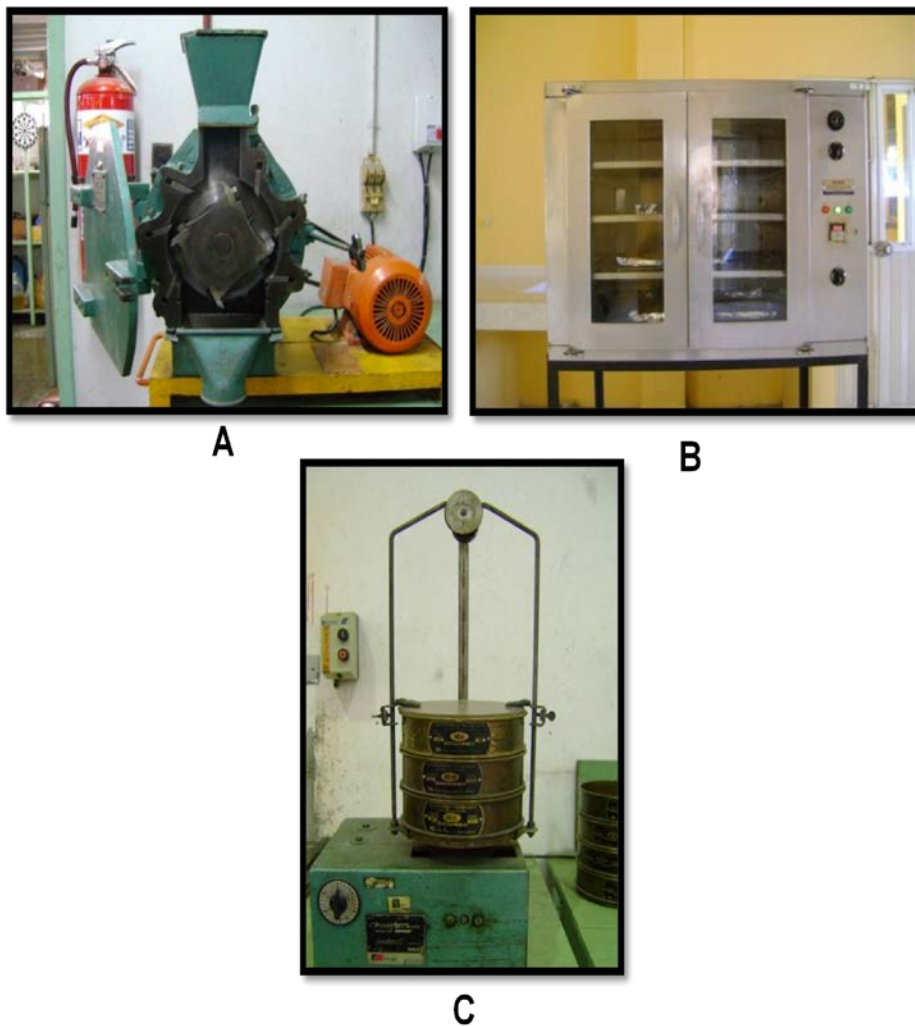


Figura 12. Equipos empleados en el tratamiento de post-cosecha del material vegetal cosechado en Sucre, Santander: A. Molino de cuchillas, *Willey Mill*,

Standard Model N° 3, (Pittsburg, PA, EE.UU.) ; B. Horno eléctrico, *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia); y C. Tamizador, *Sargent-Welch Scientific Company*,(Buffalo, NY, EE.UU). Fotos: Carlos Ruiz, noviembre de 2009.

Se llevaron a cabo extracciones con CO₂-SF para estudiar la influencia del secado a 313 y 323 K y el tamaño de partícula para los rangos entre 0.22-0.5, 0.5-1.0 y 1.0-1.76 mm.

3.2. SOLVENTES Y REACTIVOS

Se utilizó CO₂ del 99.9% de pureza (Linde de Colombia, Bogota, Colombia). El metanol, etanol, isopropanol y el reactivo de *Follin-Ciocalteu* (2N) utilizados fueron grado HPLC (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.). El Trolox[®] 97%, (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico); la vitamina E (α -tocoferol) 97%,; el (*tert*-butilhidroxianisol) BHA 95%,; el BHT (*tert*-butilhidroxtolueno) 99%,; la fluorescina (FL); el AAPH (*di*-didrocloruro de 2-2'-azobis aminopropano); los patrones de los ácidos *p*-cumárico (98%), gálico (99%), caféico (98%), rosmarínico (97%), ursólico (90%) y carnósico (98%); y los flavonoides apigenina (95%), naringenina (95%), luteolina (98%) y quercetina (98%), fueron suministrados por *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EE.UU.). El agua tipo 1, se obtuvo de un equipo Milli-Q[®] (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.).

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON CO₂-SF DE ANTIOXIDANTES A PARTIR DE SALVIA Y TOMILLO.

Se diseñaron experimentos factoriales fraccionados 2⁷⁻² para determinar cuáles factores (presión, temperatura, flujo, tiempo estático, tiempo dinámico, presión de separación y temperatura de separación) tienen una incidencia significativa sobre los observables evaluados (capacidad antioxidante, cantidad total de fenoles y rendimiento del extracto). En la **Tabla 8** se muestran los factores evaluados, el símbolo asignado en este trabajo y el dominio experimental. Los efectos

principales e interacciones de dos factores se evaluaron con gráficos de probabilidad normal inversa y con el análisis de la varianza, ANOVA. Además se construyeron algunos modelos lineales con el propósito de obtener una aproximación de las condiciones de partida para la optimización por el método *Simplex*.

Tabla 8. Dominio experimental en la optimización de la extracción de antioxidantes a partir de salvia y tomillo.

N° Factor	Símbolo	Factores	Dominio	
			-	+
1	P	Presión, MPa	30	50
2	T	Temperatura, K	313	353
3	F	Flujo, kg/h	1.2	3.6
4	D	Tiempo dinámico, min	30	120
5	E	Tiempo estático, min	0	30
6	G	Presión de separación, MPa	0.1	1
7	H	Temperatura de separación, K	301	331

3.4. PROCEDIMIENTOS

3.4.1. Extracción con CO₂-SF. Las extracciones con fluido supercrítico se llevaron a cabo en un equipo *Thar SFE-2000-2-FMC50* (Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.) que se muestra en la **Figura 13**, equipado con un portamuestra en acero inoxidable con capacidad de $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$; un sistema de separación y colección de los extractos tipo ciclón, con capacidad de $5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$; regulador automático de presión; bombas de alta presión *P-200A* (Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.), para el CO₂ y *P-50* (Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.), para el modificador y un medidor de flujo *Sitrans FC Massflo tipo MASS*

6000 (Siemens AG, Berlín, Alemania). El control de las presiones, temperaturas y flujo, se llevó a cabo desde un computador, mediante el *Software Process Suite Thar* (Thar Thecnologies, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.).



Figura 13.Extractor con CO₂ supercrítico SFE-2000-2-FMC50(Thar Instruments, Inc, Pittsburg, PA, EE.UU.). Foto: Carlos Ruiz, julio de 2011.

En cada una de las extracciones se depositaron en el portamuestra (extractor), 500 ± 10 y 522 ± 13 g, con una humedad de 7.0 ± 0.6 y $8.7 \pm 0.4\%$ para salvia y tomillo, respectivamente (base húmeda), un tamaño de partícula entre 0.22 y 1.76 mm y una densidad de carga de 284 ± 32 kg/m³. La combinación de los niveles de los factores mostrados en la **Tabla 8**, dio como resultado 32 experimentos para el diseño 2^{7-2} . Los tiempos de extracción dinámico y estático se cronometraron una vez las condiciones de temperatura y presión seleccionadas se alcanzaron. Una vez obtenidos, los extractos se escurrieron mediante prensado manual para

eliminar el agua; luego, se pesaron en una balanza analítica *Metler ToledoPB1502-S*, ± 0.005 g (Küsnacht, Suiza), con el fin de determinar el rendimiento de extracción; posteriormente, se envasaron en viales ámbar bajo atmósfera de N_2 y se sellaron con papel parafina, para protegerlos de la luz y minimizar la oxidación por el aire; finalmente, se almacenaron a 257 K, hasta su posterior análisis.

3.4.2. Obtención de extractos mediante extracción con etanol. Para la obtención de los extractos se implementaron las metodologías aplicadas en los trabajos de Durling y colaboradores [32] y Tena y colaboradores [69], con algunas modificaciones. Se pesaron 50 g de salvia o tomillo y se agregaron 300 g (380 mL) de etanol absoluto (relación 1:6 en masa), la mezcla se sometió a sonicación a 35 KHz (*Elmasonic E30 H* (Singen, Alemania) durante 2 horas a 50 °C, luego se filtró al vacío en un embudo *Bushner* y el material vegetal se sometió a dos maceraciones más. Las tres porciones de etanol se mezclaron con 80 g de carbón activado en un agitador orbital a 800 rpm (Duran) durante dos horas para reducir la coloración verde luego se filtró al vacío y el nuevo filtrado se sometió a rotoevaporación (*Büchi Rotavapor R*, Flawil, Suiza). El extracto obtenido se llevó a sequedad con una corriente de nitrógeno (99.995%, Linde de Colombia, Bogotá, Colombia) y finalmente se pesó en una balanza *Metler ToledoAL204*, ± 0.0001 g (Küsnacht, Suiza).

3.4.3. Preparación de las muestras para la determinación de la capacidad antirradicalaria, el contenido total de fenoles y el análisis cromatográfico. De cada extracto se pesaron 10 ó 20 mg según fuera el caso: 10 mg para el análisis de la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles; y 20 mg para el análisis mediante cromatografía líquida y gaseosa (fracción metanólica del extracto). A la masa de extracto se agregó 1 mL de metanol y la mezcla se sometió a sonicación a una frecuencia de 35 kHz durante 30 min en un equipo *Elmasonic E30 H* (Singen, Alemania), agitación orbital a 2500 rpm durante 1 min

en un *MS2 Minishker, IKA* (Wilmington, NC, EE.UU.) y a centrifugación a 3600 rpm durante 15 min en una centrifuga *Clay Adams Compact II* (Sparks, MD, EE.UU.). Del líquido sobrenadante se tomaron las alícuotas para los respectivos análisis. A las fracciones metanólicas del extracto se les agregó 1 μm de *n*-tetradecano (estándar interno).

3.4.4. Determinación de la capacidad antirradicalaria mediante ORAC. La determinación de la capacidad antirradicalaria se realizó en un lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader* con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos y equipado con módulos de absorbancia y fluorescencia (*Sunnyvale, CA, EE.UU.*), que aparece en la **Figura 14**. Las muestras o el *Trolox®* se disolvieron en una mezcla metanol:agua (50:50 v/v). Se adicionó *buffer* fosfato, FL y las soluciones de las muestras en la microplaca, se agitó e incubó a 310 K. Cuando la temperatura alcanzó los 37°C, se adicionó el AAPH y se inició la medición de la disminución de la fluorescencia en función del tiempo. Como estándar de control en las mediciones se usó *Trolox®* y se cuantificó, usando la curva de calibración.



Figura 14.Lector de microplacas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader*.Foto: Ginna Arias, Julio de 2011.

3.4.5. Medición de la cantidad total de fenoles. Los fenoles totales fueron estimados como equivalentes del ácido gálico, GAE, y se expresaron como mg /L de ácido gálico. El volumen total de reacción fue reducido a 200 μ L. 50 μ L de solución de la muestra se mezclaron con 50 μ L del reactivo de *Folin-Ciocalteu*, luego de 1 min, se adicionaron 100 μ L de NaCO₃(6% p/v). Después de 2 h de incubación a 298 K en el equipo mostrado en la **Figura 14**, se midió la absorbancia de la mezcla a 750 nm y se comparó con la curva de calibración del ácido gálico elaborada con mediciones realizadas de la misma manera que las de las muestras de los extractos.

3.4.6. Análisis mediante HPLC-DAD. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 (Miami, FL, EE.UU.), que consta de una bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, un inyector manual *Agilent Technologies* Series 1200 G1328B y un detector UV-Vis de arreglo de diodos G1315B. El procesamiento de los datos se realizó bajo el sistema de datos *Agilent ChemStation* LC (**Figura 15**).



Figura 15. Cromatógrafo líquido con detector de arreglo de diodos *Agilent Technologies* 1200 (Miami, FL, EE.UU.) y sistema de procesamiento de datos. Foto: Mónica Cala, noviembre de 2009.

Se empleó una columna Zorbax-Eclipse C₁₈ 150x4.6 mm, tamaño de partícula 3.5 μm; los analitos se eluyeron con una fase móvil conformada por metanol y agua, en gradiente de elución (0.1% ácido ortofosfórico).

3.4.7. Análisis mediante GC-MS en columna de fase estacionaria apolar.

La separación e identificación de los metabolitos secundarios de la fracción metanólica de los extractos SFE se realizó en un equipo GC *Agilent Technologies* 6890 Plus (Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5975 Network (Véase **Figura 16**). La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar con fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm, d_f. Se empleó helio (99.995%, gas AP, Linde Colombia, Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre en el análisis cromatográfico, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min.



Figura 16. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890Plus*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975Network*. Foto: Ginna Arias, julio de 2011.

La temperatura del inyector fue de 250°C, modo de inyección *split* (1:30) y un volumen de inyección de 2 µL. En el horno del cromatógrafo la temperatura durante la corrida cromatográfica se programó de 45°C (5 min), luego se aumentó @ 4°C/min hasta 150°C (2 min), después @ 5°C/min hasta 250°C y finalmente @10°C/min hasta 275°C (15 min). En la cámara de ionización la fuente de ionización (*MS source*) se mantuvo a 230°C, mientras que el cuadrupolo (*MS quadrupole*) a 150°C. Los iones fragmento en los espectros de masas se obtuvieron por impacto con electrones de energía de 70 eV, en un rango de masas, *m/z*, entre 45 y 450, con una velocidad de *scan* de 2 *A/D samples*.

3.4.8. Extracción de los metabolitos secundarios volátiles mediante HS-SPME. Para encontrar el recubrimiento que tuviera una mayor afinidad con los analitos presentes en el espacio de cabeza de los extractos de salvia y tomillo se compararon dos recubrimientos, a saber: poli(dimetilsiloxano) (PDMS 100 µm) y poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (PDMS/DVB 65 µm) (*Supelco*, Bellafonte, CA, EE.UU.). Se determinó la temperatura de extracción y el tiempo de equilibrio. Se tomaron 10 mg de extracto y se depositaron en un vial ambar de 10 mL, se agregaron 2 mL de agua tipo I, la mezcla se sometió a sonicación durante 30 min. Luego el vial con su contenido se sometieron a calentamiento (40°C) con una placa de calentamiento ($\pm 2^\circ\text{C}$, *Boeco*, Hamburgo, Alemania) durante 10 min (pre-equilibrio), luego se insertó la fibra a través del *septum* de silicona que sellaba el vial. El tiempo de exposición fue de 40 min. Para homogenizar se agitó con ayuda de un magneto.

3.4.9. Análisis mediante GC-MS en columna de fase estacionaria polar. La desorción de la fibra se realizó en un GC *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* (*Agilent*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector

selectivo de masas *Agilent Technologies 5975 Inert XL*. La separación de los metabolitos secundarios volátiles se llevó a cabo en una columna de sílice fundida DB-WAX (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*), con fase estacionaria entrecruzada e inmobilizada de poli(etilenglicol) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f , con una presión de entrada de la columna de 20.75 psi. La temperatura del horno se programó desde 45 °C (5 min) hasta 150°C (3min) @ 3°C/min, y hasta 220°C (5min) @ 4°C/min. La desorción se llevó a cabo en puerto de inyección a 250 °C durante 10 min. Las demás condiciones operacionales se mantuvieron iguales a las mencionadas anteriormente en el **Numeral 3.4.7**. El equipo se muestra en la **Figura 17**.



Figura 17. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network Series GC*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975 Inert XL*.

Foto: Carlos Ruiz, julio de 2011.

3.4.10. Identificación y cuantificación de los analitos de interés. La identificación de algunos de los componentes antioxidantes de los extractos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención, t_R y los espectros UV-Vis con

los de sustancias de referencia certificadas, e.g. ácido rosmarínico, carnósico, caféico y apigenina. La cuantificación se realizó por el método del estándar externo, se construyeron curvas de calibración (Áreas Vs. Concentración), y se obtuvieron con ellas, el factor de respuesta R_f , del detector para cada componente (ver **Ecuación 6**). Con base en este factor se calcularon las concentraciones de los metabolitos secundarios antioxidantes en el extracto.

$$R_f = \frac{\text{Concentración}(\mu\text{g /mL})}{\text{Área}(\text{cuentas})} \text{Ecuación 6.}$$

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

El material vegetal de estudio se cosechó en parcelas experimentales ubicadas en la zona rural del municipio de Sucre, Santander, veredas El Retiro, La Pradera y La Granja. La cosecha se llevó a cabo después de 4 meses a partir de la siembra en campo, cuando las plantas se encontraban en floración. Las condiciones ambientales se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Promedios de las condiciones ambientales durante la época de cosecha.

Fecha de cosecha	Temperatura, °C		Humedad, %		Pluviosidad, mm
	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	
28-03-10 (salvia)	11	22	50	61	0
27-07-10 (tomillo)	9	21	62	73	54

Las muestras de las especies estudiadas fueron identificadas en el Herbario Nacional Colombiano, COL, por el Dr. José Luis Fernández, a quien el autor del presente trabajo le manifiesta su agradecimiento. Una muestra de cada especie quedó depositada como pliego-testigo en este herbario y en el Herbario de CENIVAM, la identificación de las especies se muestra en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Nombres científicos y números asignados en el Herbario Nacional Colombiano.

Nombre común	Nombre científico	Numero COL
Salvia	<i>Salvia officinalis</i> L.	555844

Los cultivos experimentales ubicados en la vereda El Retiro, Sucre, Santander se muestran en las **Figuras 18 y 19**.



Figura 18. Cultivo experimental de salvia en la vereda El Retiro, Sucre. Foto: Carlos A. Ruiz, diciembre de 2010.



Figura 19. Cultivo experimental de tomillo en la vereda El Retiro, Sucre. Foto: Carlos A. Ruiz, diciembre de 2010.

4.2. TRATAMIENTO POST-COSECHA

Después de la cosecha de todas las parcelas o lotes, el secado de las plantas se prolongó aproximadamente 15 días en caneyes recubiertos de plástico y fibra poli-sombra, hasta el momento en que las plantas secas se empacaron en costales de fibra sintética (polipropileno) y se enviaron al Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, UIS-Bucaramanga. Con el secado en las condiciones indicadas, se logró obtener un producto libre de hongos, que además conservó sus características organolépticas. Una vez en el Complejo Piloto Cenivam, el material vegetal (MV) se pesó y se seleccionó de acuerdo con los siguientes requisitos:

- ✓ Que el lote seleccionado fuera de máximo dos parcelas, con el fin de disminuir el error aleatorio.

- ✓ Que la masa de material vegetal de cada especie fuera suficiente (ca 40 kg), para realizar la totalidad de las extracciones.

4.2.1. Picado. Posteriormente, el material vegetal se sometió a molienda y tamizado, esta clasificación dio como resultado tres intervalos de tamaños de partícula. En la **Tabla 11**, se muestran dichos intervalos y la masa de cada uno de ellos, luego de una prueba de clasificación por tamizado con 3.05kg de material vegetal de cada una de las especies.

Los rangos se escogieron teniendo en cuenta que la masa de MV en cada uno fuera proporcional. El material vegetal retenido por el tamiz N° 10 fue descartado, *i.e.* 28 g, en el caso de salvia y 22 g, para el tomillo, por considerársele muy grande y de composición homogénea, es decir, este material de tamaño mayor estaba conformado solamente por trozos de tallos, lo que significa que no contiene cantidades altas de los metabolitos de interés [99].

Tabla 11. Resultados del proceso de tamizado de cada una de las especies estudiadas (3.05 kg).

N° de malla	Diámetro de tamiz, mm	Masa de MV retenido por tamiz, g		Rango escogido, mm
		Salvia	Tomillo	
10	1.76	28	22	Desechado
14	1.40	301	419	1.00-1.76
18	1.00	460	438	
20	0.850	465	400	0.500-1.00
35	0.500	566	597	
50	0.300	737	643	0.210-0.500
70	0.212	474	492	
	Fondo	19	39	Desechado
	Total	3050	3050	---

El MV seco a 40 °C de cada tamaño de partícula se le realizaron extracciones por duplicado, se determinó el rendimiento de extracción, y se escogió el intervalo de tamaño adecuado para las extracciones del análisis de variables y de la optimización. Las condiciones escogidas las extracciones fueron: Presiones de extracción y separación 40 y 0,5 MPa; temperatura de extracción y separación 333 y 316 K; flujo 2,4 kg/h; y tiempos dinámicos y estáticos 75 y 15 min, respectivamente. Los valores anteriores corresponden a los puntos medios del dominio experimental mostrado en la **Tabla 8**.

4.2.2. Secado. El material vegetal picado y sin caracterizar por tamaño (tamizado) se sometió a pruebas de secado en un horno eléctrico, a dos temperaturas, 313 y 323 K, con el fin de alcanzar valores de humedad menores del 10 %. Estos valores se determinaron con la **Ecuación 5**. Con lo anterior se minimiza el efecto del agua que podría actuar como una barrera para la difusión del CO₂ en los órganos internos de la planta. Además, el agua compite por la solubilidad de los metabolitos secundarios, según lo han reportado varios autores [3,5,63]. Una ventaja del secado en horno sobre el ambiental es que se evita la contaminación del MV y los tiempos prolongados, que pueden sobrepasar las 120 h en el caso de tener instalaciones tipo vivero en donde el sol proporciona la energía térmica [101].

La **Figura 20** muestra la variación de la humedad presente en 550.5 g de hojas, tallos y flores de salvia, molidos y sin caracterizar por tamaño, en función del tiempo de secado en el horno eléctrico (Véase **Figura 12**), cuando ellos se sometieron a las temperaturas escogidas. La curva que representa el cambio de humedad en el MV de salvia, permite observar que se alcanza un equilibrio rápidamente (480 min) para una temperatura de secado de 313 K y para 323 K, ca. 300 min.

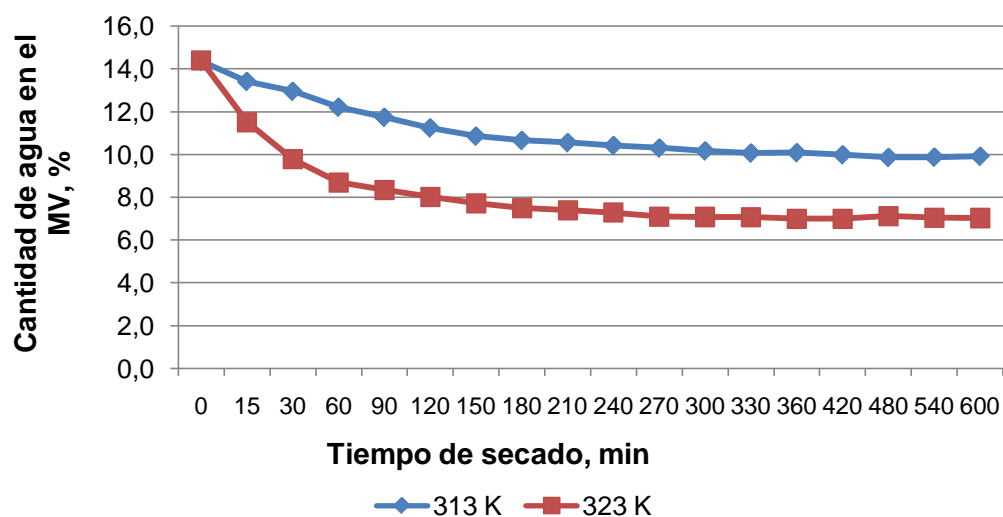


Figura 20. Porcentaje de humedad en hojas, tallos y flores de salvia molidos (Tamaño de partícula 0.22-1.76 mm, sin tamizar), en función del tiempo secado.

A diferencia de la curva de secado de salvia (**Figura 20**), la de tomillo (**Figura 21**), se prolonga más en el tiempo, lo cual quiere decir que la condición de equilibrio se alcanza en tiempos mayores, debido a que los tallos de tomillo son más leñosos y duros, además, sus hojas son diminutas y rígidas; en cambio, las de salvia son más blandas y porosas, lo cual hace que contengan una mayor cantidad de agua y que, a la vez, sea más fácil perderla. El equilibrio para las hojas tallos y flores de tomillo a 313 K se logra a los 900 min, mientras que a 323 K se alcanza a los 720 min. Los valores iniciales de humedad (tiempo= 0 min) en las graficas representan el porcentaje de agua que contenía el MV después del secado en caneyes en el campo, para la salvia y el tomillo fueron de alrededor 14,3 %.

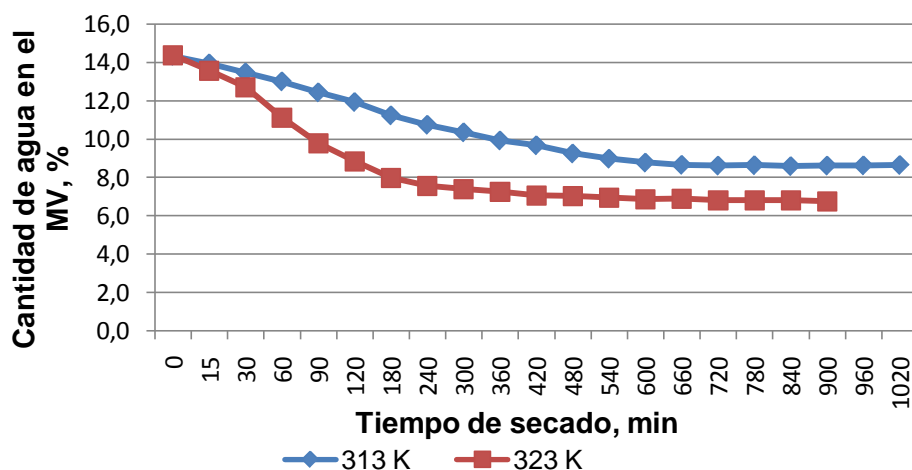


Figura 21. Porcentaje de humedad en hojas, tallos y flores de tomillo molidos (Tamaño de partícula 0.22-1.76 mm, sin tamizar), en función del tiempo secado.

4.2.3. Influencia de la temperatura de secado y el tamaño de partícula en la capacidad antirradicalaria. Los tratamientos post-cosecha causan la degradación de algunos compuestos fenólicos y también pérdidas por evaporación de los compuestos volátiles. Cuando el MV se somete a temperaturas elevadas, *i.e.* mayores de 50 °C [99], éste puede sufrir variaciones significativas en su composición. Para la salvia y el tomillo se recomiendan temperaturas máximas de secado de 45 y 48°C, respectivamente [101,102]. En las **Figuras 22** y **23** se muestra la influencia que ejercen estas dos variables de post-cosecha sobre la capacidad antirradicalaria (CA) medida en los extractos de salvia y tomillo. Las extracciones que se llevaron a cabo con las condiciones enunciadas en la **Sección 3.1** para las pruebas de secado y picado se realizaron por duplicado. Para salvia se escogió 50°C como temperatura de secado para el análisis de variables mediante el diseño experimental fraccionado. Se tomaron como criterios el rendimiento y la humedad final obtenida después del proceso de deshidratación. Durante la realización de dichas pruebas aún no se había implementado la técnica de medición de la actividad antirradicalaria mediante la capacidad de absorción del radical oxígeno, (ORAC). Al final de todos los experimentos, se midió la CA, y para

el proceso de optimización de la SFE a partir de salvia, se cambió la temperatura de secado a 40°C, que resultó ser más favorable para conservar dicha propiedad.

En el caso del tomillo, no se presentó la anterior situación, pues cuando se realizó el diseño experimental ya se contaba con las mediciones de CA, por lo tanto, para todas la pruebas se empleó la temperatura de secado más baja (**Figura 23**).

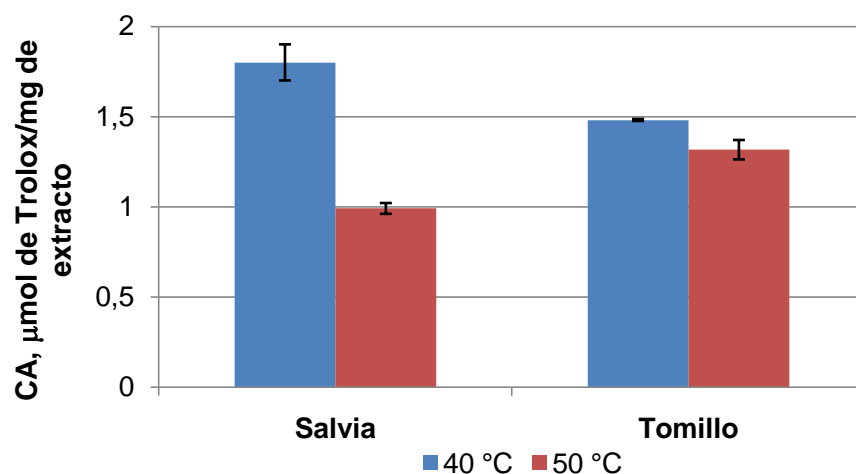


Figura 22. Influencia de la temperatura de secado en la capacidad antirradicalaria de los extractos de salvia y tomillo.

La temperatura de secado de 50 °C, afectó de una manera más drástica los compuestos con propiedades antioxidantes de la salvia que los del tomillo. El rendimiento en la salvia no varió significativamente para el caso de salvia pero si para tomillo, a 40 y 50 °C fue de 2.4 y 2.6%, respectivamente, en el caso de salvia y para tomillo de 1.1 y 1.7%, respectivamente. Los principales antioxidantes en la salvia y el romero son los mismos [81]. De la misma manera, la temperatura y el modo de secado afectaron drásticamente la capacidad antirradicalaria de los extractos SFE obtenidos a partir de romero [58]. El secado en horno a 50°C presentó disminuciones de más del 150% respecto al secado mediante liofilización en los valores de esta propiedad y el secado con roto-evaporador tiene la desventaja de llevarse a cabo sin protección de la luz, aún así, a 35°C resulta un

17% mejor para la CA de los extractos que el secado en horno en ausencia de luz a 50°C [58].

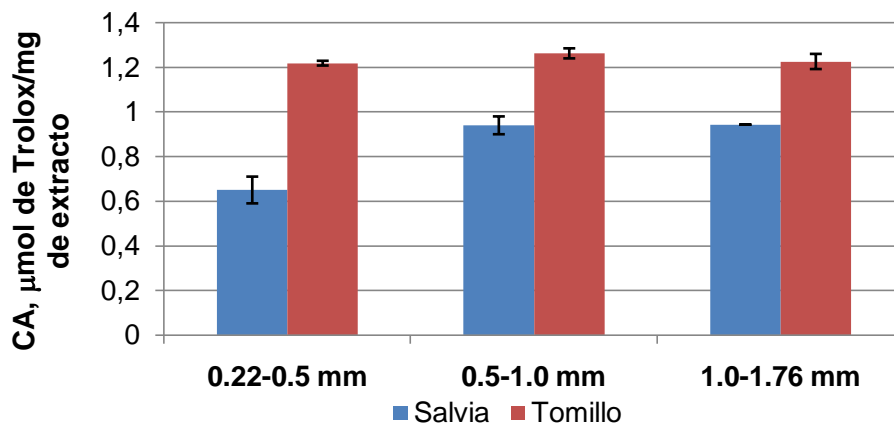


Figura 23. Influencia del tamaño de partícula del MV en la capacidad antirradicalaria de los extractos de salvia y tomillo.

Según otros autores el agua co-extraída, durante la SFE hace que algunos compuestos como matricina se degraden a lo largo del almacenamiento de los extractos [75], razón por la cual se prefiere que el MV antes de la extracción presente la menor humedad posible; adicionalmente el agua en los órganos internos de hojas, tallos y flores actúa como una barrera a la difusión del dióxido de carbono supercrítico, CO₂-SF [5,94,95]. En la extracción de volátiles mediante hidrodestilación a partir de hojas de salvia, el secado en horno a 45°C afectó el rendimiento y la capacidad antirradicalaria frente a otras técnicas, como el secado medioambiental, el secado con luz infrarroja y el secado con microondas; más aun, el aumento en la temperatura de secado en el horno desde 45 a 65°C produce pérdidas del 92.3% en la cantidad de volátiles [103], esto es debido a que las células epiteliales se rompen y liberan los componentes al ambiente con facilidad [104].

El picado afectó significativamente la CA de salvia pero no la de tomillo, puesto que los diterpenos fenólicos son susceptibles al calentamiento excesivo que se

pudo producir en el molino. Se ha estudiado la influencia de tres tamaños de partícula para el tomillo [105], sobre el rendimiento y la composición de volátiles en el extracto SFE; el tamaño más pequeño (0.4 mm) resultó ser el más adecuado con 1.1% de rendimiento, frente a 0.7 y 0.8% para 0.6 y 0.8 mm, respectivamente; así mismo la cantidad relativa de los componentes más importantes, e.g., timol, carvacrol, timoquinona y *trans*- β -cariofileno fue la más alta. Para la salvia, los reportes de la influencia del tamaño de partícula sobre el rendimiento de la SFE son contradictorios. En el trabajo de Langa y colaboradores [106], el tamaño de partícula, 0.3 y 0.8 mm, no tuvo ninguna influencia; mientras que en el trabajo de Catchpole y Grey [107], la disminución de 1.53 hasta 0.68 mm casi duplicó el rendimiento, y en el de Reverchon y Tadeo [60] la disminución de 3.1 a 0.25 mm aumentó significativamente la cantidad de extracto obtenido. La cantidad de agua co-extraída depende de la humedad del material vegetal y la masa cargada, pero no del tamaño de partícula [60]. Se escogió el intervalo 0.5-1.0 mm como tamaño de partícula para las dos especies vegetales bajo estudio, pues así se obtuvieron las CA más altas.

4.2.4. Cantidad de metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles en los extractos en función de la temperatura de secado y el tamaño de partícula.

En las **Tablas 12 y 13** se muestran los componentes mayoritarios reconocidos en salvia y tomillo, y sus cantidades relativas (%). Se pueden apreciar las diferencias en la composición de los extractos al cambiar de temperatura de secado o tamaño de partícula. En promedio, se detectaron 70 y 49 componentes en los extractos de salvia y tomillo, respectivamente (cantidad relativa mayor del 0.09%) y se logró el reconocimiento de 34 componentes, en promedio, para la primera especie y 19, para la segunda.

En las dos especies para la temperatura de secado de 50°C, el porcentaje del área cromatográfica total de picos identificados fue menor que la obtenida de los extractos de plantas secadas a 40°C, así como también fue más bajo el número

de compuestos detectados. Esto se presentó porque muchos compuestos volátiles se evaporaron del material vegetal, a la temperatura más alta [75,101,104], entre ellos, el 1,8-cineol y las tujonas, que disminuyeron su cantidad en los extractos de salvia, mientras que el α -terpineno y β -felandreno solo se detectaron a nivel de trazas (cantidad relativa menor del 0.1%) en los extractos de tomillo. En la **Figura 24**, se muestra el material vegetal picado a un tamaño de partícula entre 0.5 y 1.0 mm, y los extractos obtenidos de cada especie vegetal.



Figura 24. Apariencia del material vegetal empleado en todas las extracciones y de los extractos obtenidos de: A. Salvia; y B. Tomillo. Fotos: Carlos Ruiz, julio de 2011.

Tabla 12. Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de salvia, según las pruebas de secado y tamaño de partícula.

N° Pico	Compuesto	I _R ^a	Cantidad relativa, % ± s (n=6, duplicado de extracción, tres muestras de cada extracto)				
			Secado a 40°C	Secado a 50°C	Tamaño 0.22-0.5 mm	Tamaño 0.5-1.0 mm	Tamaño 1.0-1.72 mm
8	1,8-Cineol**	1039	6.7±0.1	5.7±0.4	4.7±0.2	8.2±0.8	8.42±0.09
11	cis-Tujona**	1113	5.7±0.4	3.8±0.2	2.13±0.08	4.3±0.4	5.2±0.1
12	trans-Tujona	1125	1.3±0.1	0.87±0.07	0.61±0.05	1.2±0.02	1.5±0.1
13	Alcanfor	1157	2.0±0.2	1.6±0.05	1.6±0.01	2.4±0.2	2.7±0.1
19	trans-β-Cariofileno	1442	6.3±0.2	5.2±0.04	3.9±0.1	6.6±0.5	6.52±0.08
23	Aromadendreno	1462	0.47±0.02	0.45±0.04	0.63±0.07	1.1±0.1	1.1±0.1
25	α-Humuleno**	1476	3.7±0.3	3.2±0.3	2.81±0.07	4.6±0.4	4.8±0.1
26	allo-Aromadendreno	1484	0.25±0.04	0.26±0.02	0.18±0.02	0.28±0.02	0.38±0.05
28	Valenceno	1517	0.53±0.01	0.59±0.05	0.48±0.03	0.51±0.05	0.74±0.08
32	Óxido de cariofileno	1610	0.60±0.05	0.29±0.01	0.40±0.04	0.49±0.04	0.39±0.01
33	Viridiflorol	1620	12.4±0.9	12.6±0.7	10.9±0.8	10.6±0.9	9.74±0.07
38	Neofitadieno	1957	0.42±0.02	0.44±0.02	0.36±0.05	0.33±0.05	0.33±0.02
39	Ácido n-hexadecanoico	1968	1.4±0.1	1.9±0.1	1.7±0.1	1.3±0.1	2.3±0.1
40	Ácido palmítico*	1975	0.85±0.07	0.96±0.08	0.91±0.09	0.6±0.1	1.2±0.1
41	Hexadecanoato de etilo*	2012	1.1±0.1	1.21±0.08	1.06±0.09	0.49±0.08	1.1±0.1
42	Manol	2094	25.7±0.8	27.5±0.9	22.2±0.7	20.7±0.9	18.7±0.9
45	Tricosano	2299	0.54±0.04	1.1±0.1	0.61±0.03	0.95±0.03	0.44±0.04
46	trans-Ferruginol*	2361	0.23±0.03	0.31±0.04	0.37±0.04	0.32±0.03	0.39±0.02
47	Tetracosano	2412	1.2±0.01	1.3±0.1	2.08±0.07	1.4±0.1	2.2±0.2
48	β-Sitoesterol*	2843	1.8±0.1	2.04±0.09	3.54±0.09	1.6±0.2	3.6±0.1
Total, %/Detectados/Reconocidos			80.3/77/36	77.9/72/35	66.7/76/37	76.7/68/41	77.9/59/33

*Reconocidos tentativamente. No se muestran todos los componentes reconocidos.

** Identificados con base en los espectros de masas y tiempos de retención de patrones de terpenos certificados.

^aÍndices de retención lineales experimentalmente obtenidos en la columna DB-5.

Tabla 13. Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de tomillo, según las pruebas de secado y tamaño de partícula.

N° Pico	Compuesto	I _R ^a	Cantidad relativa, % ± s (n=6)				
			Secado a 40°C	Secado a 50°C	Tamaño 0.22-0.5 mm	Tamaño 0.5-1.0 mm	Tamaño 1.0-1.76 mm
3	α-Terpineno	1023	0.28±0.02	tr ^b	0.182±0.003	tr ^b	tr ^b
4	p-Cimeno**	1031	9.2±0.3	6.0±0.3	3.63±0.08	5.1±0.2	2.35±0.04
5	β-Felandreno	1036	0.53±0.02	tr	tr	0.27±0.02	tr
6	1,8-Cineol**	1040	0.95±0.01	0.68±0.05	0.41±0.02	0.33±0.02	0.28±0.02
7	γ-Terpineno	1066	0.88±0.03	0.80±0.04	tr	0.61±0.04	0.271±0.007
8	cis-Hidrato de sabineno	1075	0.36±0.03	tr	0.23±0.03	0.20±0.02	tr
9	Linalol	1101	1.4±0.06	0.94±0.04	0.74±0.03	0.73±0.02	0.64±0.02
11	Alcanfor	1157	0.53±0.01	0.43±0.02	0.23±0.02	0.21±0.01	tr
12	Borneol	1178	2.2±0.1	1.7±0.1	0.94±0.04	0.78±0.05	0.83±0.05
14	Éter metílico de timilo	1238	0.43±0.01	0.37±0.02	0.278±0.005	0.28±0.01	tr
15	Éter metílico de carvacrilo	1248	0.37±0.02	0.31±0.03	0.22±0.01	0.21±0.01	tr
16	Timoquinona*	1256	1.47±0.09	1.7±0.1	1.98±0.06	1.57±0.09	0.81±0.06
17	Timol**	1292	36±1	29±1	29.8±0.4	24.5±0.9	24.5±0.5
18	Carvacrol	1304	5.3±0.4	5.0±0.9	5.6±0.4	4.1±0.4	4.4±0.2
20	trans-β-Cariofileno	1442	1.81±0.06	2.17±0.09	1.08±0.03	1.10±0.03	0.76±0.02
21	α-Humuleno**	1457	2.6±0.1	2.77±0.07	2.2±0.2	2.9±0.1	2.87±0.05
22	γ-Cadineno	1534	tr	tr	0.217±0.006	tr	tr
25	Óxido de cariofileno	1610	1.46±0.06	1.69±0.03	1.93±0.05	0.87±0.06	0.82±0.03
26	epi-α-Cadinol*	1664	0.66±0.05	0.59±0.07	0.74±0.03	0.37±0.02	0.54±0.07
29	Ácido n-hexadecanóico	1965	2.9±0.3	1.9±0.4	6.6±0.2	5.9±0.2	13.4±0.7
31	3-Picenona*	2235	0.781±0.009	1.02±0.04	2.09±0.03	1.6±0.1	2.8±0.3
Total, %/Detectados/Reconocidos			67.8/49/22	57.5/46/18	59.9/62/21	52.0/52/20	55.3/36/14

*Reconocidos tentativamente. No se muestran todos los componentes reconocidos.

** Identificados con base en los espectros de masas y tiempos de retención de patrones de terpenos certificados.

^aÍndices de retención lineales experimentalmente obtenidos en la columna DB-5.

^bDetectado a nivel de trazas (<1.0%).

En cuanto a los componentes de peso molecular más alto, su cantidad relativa (Véase **Tabla 12**), es mayor en los extractos aislados de salvia secada a 50°C, e.g., ácidos carboxílicos (Ver ácido hexadecanóico en la **Figura 25**), *trans*-ferruginol y β -sitoesterol, esto se debió a que el área total del cromatograma del extracto obtenido del MV secado a esta temperatura se redujo por las pérdidas de componentes volátiles. Otro efecto que permitió mejorar la extracción de los componentes más pesados en los extractos de salvia a la temperatura de secado de 50°C, fue la menor humedad del MV (ca. 7.1%), pues la presencia de agua afectó la difusión del CO₂, y a la vez dificultó el transporte de los analitos desde la matriz al flujo del solvente; mientras que a 40 °C la humedad fue de ca. del 10% [3,75,96]. Adicionalmente, el agua puede actuar como un modificador del fluido, haciendo que aquellos compuestos polares y de mayor peso molecular (>230 g/mol) [60], se extraigan con mayor facilidad; este efecto pudo obrar de una manera más positiva con el material vegetal secado a 50 °C. El secado de salvia en horno a 45 °C resultó benéfico solamente para la extracción de α - y β -tujonas comparado con los secados: medioambiental, en horno a 65 °C, con microondas y con luz infrarroja, y también con la planta fresca [103].

Para los extractos (Véase **Tabla 13**) obtenidos de tomillo secado a 40°C, se observa una tendencia similar a la de la salvia, puesto que las cantidades relativas de los componentes fueron más altas que para los extractos provenientes del secado a 50 °C. El número de componentes detectados fue levemente menor para el secado a 50 °C respecto al de 40 °C, de la misma manera, que el de componentes reconocidos.

Con respecto al tamaño de partícula, se aprecia en la **Tabla 12**, que el número de compuestos detectados bajo las condiciones de integración elegidas, aumenta al disminuir el tamaño de partícula. Esto es el resultado del aumento del área superficial en el MV que hace más fácil la transferencia de masa. Además, la disminución del tamaño de la partícula hace que el camino por donde las

moléculas se difunden sea más corto, lo que aumenta la rapidez de la extracción [2,5,75]; esta última consideración sobre la difusión, puede llegar a ser más drástica para el tomillo puesto que sus tallos son lignificados y, por ende, más difíciles de permear por parte del solvente y las moléculas de interés [108].

En las **Figuras 25 y 26** se observa que los compuestos mayoritarios, manol y timol, en los extractos de las especies bajo estudio, siguen la tendencia enunciada anteriormente, es decir, presentan disminución en la relación área del compuesto/área del estándar interno (*n*-tetradecano), que son estadísticamente significativas. Los demás componentes de los extractos mostrados en las figuras no siguen tal tendencia, lo cual se podría explicar por la canalización del CO₂ supercrítico a lo largo del lecho de MV [75,93] cuando el tamaño de partícula fue de 0.22-0.5 mm, debido a que la densidad de carga fue mayor y pudo afectar de una manera significativa la extractabilidad de estos compuestos.

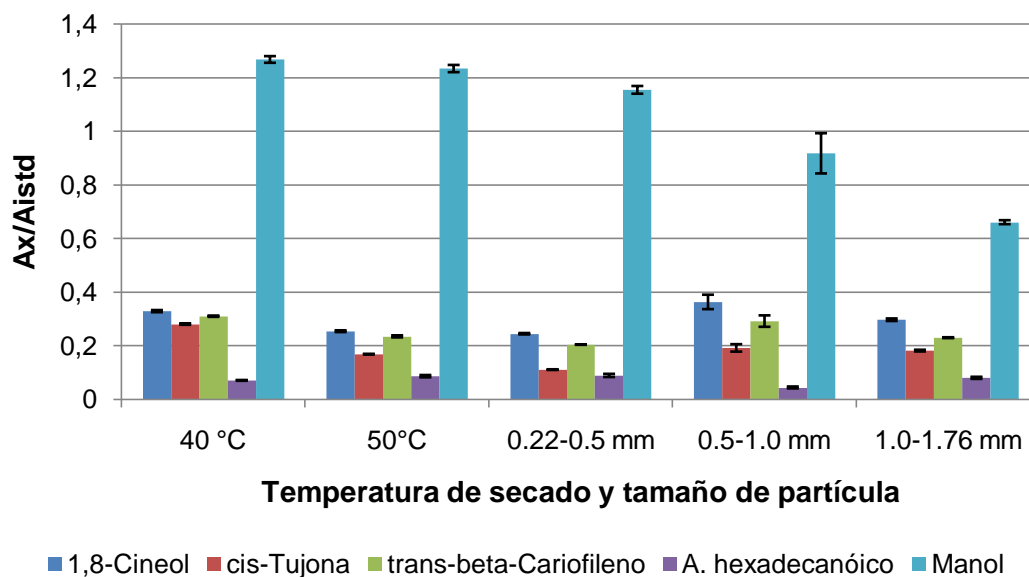


Figura 25. Variación del factor área cromatográfica del compuesto sobre el área del estándar interno en los extractos de salvia.

Otra observación, es la diferencia de composición del MV según el tamaño de partícula, pues durante el proceso de caracterización se notó que el tamaño de 1.0-1.76 mm estaba conformado principalmente por partículas provenientes de los tallos, mientras que el de 0.22-0.5 mm, en su mayoría, por hojas. Las diferencias en las concentraciones de los metabolitos secundarios, según su localización en la planta, se han reportado en especies como *Spilanthes americana* [36], y especies del género *Ocimum* [109].

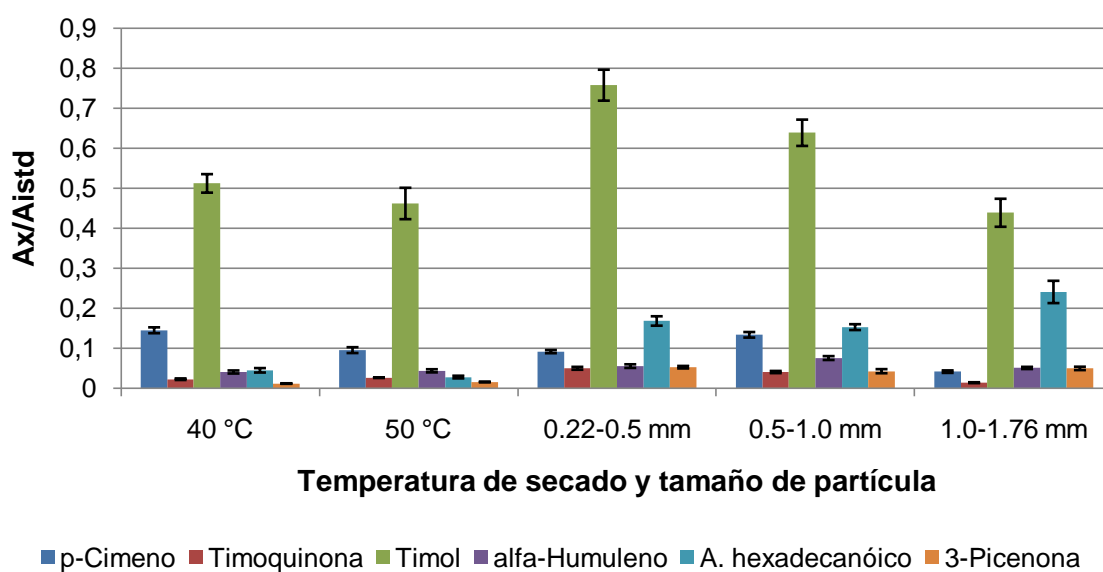


Figura 26. Variación del factor área cromatográfica del compuesto sobre el área del estándar interno en los extractos de tomillo.

4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON CO₂-SF DE ANTIOXIDANTES DE SALVIA

Como primer paso para optimizar el proceso de extracción se identificaron cuáles son las variables operacionales del equipo *Thar SFE 2000-FMC50* que más influyeron sobre el rendimiento, la cantidad de compuestos fenólicos y la capacidad antirradicalaria de los extractos aislados a partir de la especie bajo estudio; además, se establecieron los límites prácticos de estas variables, según

las características del equipo y lo registrado en la literatura disponible [56-63]. El segundo paso, fue encontrar los niveles óptimos de los factores que más influencia tuvieron en los observables evaluados.

4.3.1. Resultados del diseño experimental factorial fraccionado. En el equipo a escala piloto, utilizado en esta investigación, fue posible modificar las presiones de extracción y separación, la primera, mediante el *Software* y la segunda, mediante una válvula manual ubicada en el tubo que conduce el CO₂ desde el separador hacia el venteo. Las temperaturas de extracción y separación pudieron ser modificadas desde el *Software* al igual que el flujo del fluido. Para lograr que la presión se mantuviera constante en el portamuestra sin flujo del fluido, y de esta manera conseguir un tiempo con el CO₂ “estático”, el equipo cuenta con una válvula adicional (Véase **Figuras 9 y 13** de las **Secciones 1.5 y 3.4.1**). El tiempo dinámico se empezó a medir, una vez las condiciones de temperatura alcanzaron los valores deseados, y terminó, cuando se apagaba la bomba. La densidad de carga de MV no se tuvo en cuenta como una variable, pues fue complicado lograr valores reproducibles, por lo tanto, se trató de dejarla constante ca. 280±32 kg/m³. En resumen, se tuvieron en cuenta siete factores con los cuales se construyó un diseño factorial fraccionado 2⁷⁻², con el objetivo de estudiar la influencia de éstos en las respuestas.

Los límites experimentales para cada factor se escogieron con base en los reportes experimentales disponibles: presión (-), temperatura (-), temperatura en el colector (+), tiempos dinámico (-) y estático (+,-); cantidad de CO₂ disponible: flujo (+), tiempo dinámico (+); y con base en los rangos de operación del equipo Thar SFE 2000-FMC-50: presión (+), temperatura (+), presión en el colector (-,+), temperatura en el colector (-) (Véase **Tabla 8** de la **Sección 3.3**). La influencia de los factores se determinó mediante gráficos de probabilidad normal inversa y análisis de la varianza. Para tener en un rango proporcional los valores de los

diferentes observables, cada uno fue normalizado tal como se muestra en la **Ecuación 7**[110].

$$N = \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} * 100 \text{Ecuación 7.}$$

En donde N es la respuesta normalizada, R es la respuesta a normalizar, R_{min}, R_{max} son los valores mínimo y máximo, respectivamente, de las respuestas obtenidas a partir del diseño factorial fraccionado (Véase **Tabla 14**), de esta manera, las respuestas estuvieron contenidas en el rango de 0 a 100.

Con el propósito de obtener una sola respuesta, se buscó una combinación lineal de los observables, asignándole a cada uno un peso de acuerdo con su importancia, *i.e.*, la capacidad antirradicalaria es la característica principal de los extractos, pues ésta es la que agrega más valor al producto, por esta razón se le dio un peso del 40% en la respuesta final. Si la capacidad antirradicalaria es alta, es porque el extracto posee mayoritariamente sustancias de tipo fenólico [57,111], por esta razón, se le dio un peso del 30% a la cantidad total de fenoles y el 30% restante de importancia se le adjudicó al rendimiento debido a que la cantidad de extracto obtenida determina si un proceso es rentable; la combinación lineal se muestra en la **Ecuación 8**.

$$Y = (0.3 * R) + (0.4 * CA) + (0.3 * CTF) \text{Ecuación 8.}$$

Donde R es el rendimiento, CA la capacidad antirradicalaria y CTF el contenido total de fenoles. A continuación, en la **Tabla 14**, se muestran los resultados (sin normalizar), después de realizar los 32 experimentos del diseño 2^{7-2} , los números de los experimentos hacen referencia a la combinación de los niveles de los diferentes factores. Adicionalmente, aparece el código de cada experimento en donde cada letra representa un factor en su nivel alto (+), la ausencia de la letra

(factor) significa que el nivel de dicho factor será bajo (-). El valor de los símbolos (+) y (-) de cada factor aparecen en la **Tabla 8** de la **Sección 3.3**.

En la **Tabla 14** se observa, que cuando aparecen menos letras en el código experimental, las respuestas son bajas, e.g., códigos *gh*, *p*, *t*, *f*, *dh* y *eg* tuvieron resultados menores que los de los experimentos codificados como *ptfdg*, *pdegh*, *fedgh* y *ptfdegh*. Aunque lo anterior a simple vista parezca ser una tendencia generalizada en la mayoría de los datos, cuando se evaluó la correlación lineal, se obtuvieron valores entre la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles de $r=0.610$; entre la capacidad antirradicalaria y el rendimiento, $r=0.192$; y entre el contenido total de fenoles y el rendimiento, $r=0.268$; los coeficientes de correlación demuestran que las respuestas se encuentran pobremente relacionadas.

Entre las razones que explican la falta de correlación entre la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles, posiblemente figuran: se extrajeron compuestos que no son fenólicos (que no dan respuesta en el ensayo con el reactivo *Folin-Ciocalteu*), pero poseen actividad, e.g., carotenos y esteroides [91]; que los extractos contengan compuestos que dan respuesta al reactivo *Folin-Ciocalteu*, e.g., sacáridos y aminos [112]; y que las muestras, para llevar a cabo las mediciones, se realizaron en diferentes solventes siendo más polar el metanol - utilizado en el método ORAC- que el etanol, utilizado en el método *Folin-Ciocalteu* [8]. La relevancia de la concentración del ácido carnósico en la capacidad antirradicalaria medida por el ensayo DPPH, es diferente para los solventes de extracción empleados, diclorometano ($r=0.77$) y etanol ($r=0.66$) [113]. El rendimiento y los demás observables no tienen por qué estar relacionados, puesto que en la masa del extracto obtenida después de cada extracción se encuentran compuestos que pueden ser fenólicos y antioxidantes o no, e.g., terpenos volátiles, ácidos grasos e hidrocarburos lineales.

Tabla 14. Resultados obtenidos a partir del diseño factorial fraccionado 2^{7-2} .

N° Experimento	Código*	R, %	CA, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mg de extracto}$	CTF, $\text{mg de ácido gálico}/\text{g de extracto}$	Combinación de respuestas, Y
1	gh	0.7	0.93±0.04	37.2±0.4	9.5
2	p	0.7	0.92±0.03	45.6±0.4	14.8
3	t	1.0	0.79±0.01	49.5±0.9	15.8
4	ptgh	1.3	1.11±0.03	66±2	41.4
5	f	1.4	0.95±0.03	67±1	37.2
6	pfg	0.6	1.05±0.01	64±1	31.6
7	tfg	1.2	1.07±0.04	50±1	28.3
8	ptf	2.8	0.80±0.01	36±2	23.2
9	dh	1.2	0.89±0.03	43.4±0.7	17.3
10	pdg	1.9	0.89±0.05	46.1±0.8	24.7
11	tdg	1.5	1.20±0.02	56±1	40.6
12	ptdh	1.8	1.76±0.04	66.3±0.9	72.9
13	fdg	1.4	1.39±0.03	68.2±0.3	55.1
14	pdfh	2.0	1.66±0.04	67±1	70.7
15	tfdh	2.2	1.59±0.01	74.7±0.8	75.4
16	ptfdg	3.3	1.41±0.02	73.3±0.4	77.1
17	eg	0.5	0.96±0.03	55±1	21.1
18	peh	0.8	1.37±0.03	64±1	46.6
19	teh	0.7	0.91±0.02	35±1	7.9
20	pteg	1.2	1.09±0.02	46±2	26.7
21	feh	1.1	1.15±0.01	33±1	20.0
22	pfeh	1.1	1.80±0.03	56±1	61.0
23	tfg	1.4	1.18±0.02	54.7±0.6	37.8
24	ptfeh	2.4	0.86±0.02	59.8±0.7	37.6
25	de	1	1.57±0.04	58.7±0.3	51.9
26	pdegh	1.8	1.32±0.03	62.9±0.9	52.6
27	tdegh	2.5	0.83±0.03	43.4±0.8	26.1
28	ptde	2.2	1.00±0.03	53.4±0.6	36.7
29	fddegh	1.3	1.61±0.02	78.0±0.9	69.5
30	pfde	1.9	1.12±0.02	62.6±0.8	44.9
31	tfde	2.7	1.035±0.005	67.4±0.9	52.6
32	ptfddegh	3.8	1.70±0.05	62.0±0.9	85.1

*p: Presión de extracción; t: Temperatura de extracción; f: Flujo del fluido; d: Tiempo dinámico; e: Tiempo estático; g: Presión de separación; h: Temperatura de separación.

De otro lado, la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles deberían estar relacionados, puesto que los fenoles son los principales responsables de la capacidad antioxidante de la salvia [35,114]. Algunos reportes han mostrado que para varias especies de plantas el contenido de fenoles puede estar relacionado con ensayos como TEAC, $r=0.84$ [115] y con las cantidades de carnosol y ácido carnósico cuantificados por HPLC, $r=0.97$ [116]. Pero, en otros casos, no se observó la correlación entre el contenido total de fenoles y TEAC $r=-0.17$, mientras que con el ensayo DPPH esta correlación fue pobre $r=0,65$ [116]. La correlación entre métodos que evalúan la capacidad antirradicalaria y que se rigen por el mismo mecanismo, *i.e.*, reacciones de transferencia de un electrón, es muy buena, *e.g.*, el método DPPH con TEAC $r=0.985$ [117].

Se han reportado altos coeficientes de correlación entre el contenido de fenoles y el método ORAC, cuando se calculan para 19 extractos acuosos de especies empleadas como ingredientes culinarios $r=0.986$, y de 12 especies empleadas en medicina tradicional $r=0.919$ [118]. En el trabajo de Silva y colaboradores [119], se encontró un coeficiente $r=0.837$ para 62 extractos provenientes de 15 especies de plantas amazónicas. De 5 métodos para la estimación de la capacidad antirradicalaria de los extractos acuosos de 30 plantas, el método ORAC fue el que menos correlación mostró con el contenido total de fenoles [120], una razón es que a diferencia de los otros métodos, ORAC toma en cuenta la cinética de los antioxidantes, es decir, el tiempo de inhibición del radical por parte del antioxidante. En un reporte hecho por Tabart y colaboradores [112], la capacidad antirradicalaria medida por tres distinta técnicas (TEAC, DPPH y ORAC) a 24 compuestos fenólicos puros, no mostró en ningún caso relación con el contenido de fenoles, con valores de $r<0.7$; una posible explicación fue que la disociación del protón fenólico conduce a la formación del anión fenolato que es capaz de reducir el reactivo de *Folin-Ciocalteu*. Singleton y Rossi [121], ponen en evidencia que la efectividad del método Folin-Ciocalteu depende del número de grupos hidroxilo oxidables y del tamaño de las moléculas fenólicas. Shan y colaboradores [122]

hicieron una revisión de las correlaciones entre técnicas que miden la capacidad antioxidante, y encontraron que cuando se tienen varias muestras, pero las diferencias entre los valores máximos y mínimos no son amplias, las correlaciones entre el contenido total de fenoles y los demás ensayos no son buenas.

Los rendimientos obtenidos se encuentran entre los rangos citados en la literatura para la SFE de la especie *S. officinalis*. Las extracciones a condiciones bajas, 9-12.8 MPa, 298-323 K, 0.021-0.95 kg/h y tiempos dinámicos de 3 h dan rendimientos del 1.3 al 4.8%; estos extractos estuvieron compuestos por terpenos volátiles [60,62]. Las extracciones a condiciones más altas, 30-35 MPa, 313-373 K, 0.3-0.4 kg/h y tiempos dinámicos de 2.7 a 4.7 h rinden del 1.3 al 4.6% [57,63,81].

No se podría llegar a comparar directamente los rendimientos encontrados en los reportes de la literatura disponible con los de este trabajo, pues las condiciones no fueron idénticas, pero sí se podría hacer, de una manera aproximada, la comparación del experimento 9 con el trabajo de Ivanovic y colaboradores [81], pues en ambos casos las condiciones de presión y temperatura fueron las mismas, 30 MPa y 313 K, respectivamente. El flujo fue mayor en el experimento 9, 1.2, contra 0.3 kg/h del de Ivanovic y colaboradores, y el tiempo en el experimento 9 fue menor, 2 Vs 3.7 h; así pues, comparando el rendimiento de 1.2% en el experimento 9 Vs. 1.3% en el del reporte, vemos que el rendimiento en el trabajo de Ivanovic y colaboradores se obtiene empleando una cantidad menor de CO₂ 1.1 Vs 2.4 kg del experimento 9. El flujo tan alto en el presente trabajo comparado con el del reporte anterior, se justifica por la razón expuesta en párrafos anteriores, en donde se expusieron los límites experimentales, además la masa de material vegetal utilizado es 9 veces mayor y también a que la geometría del recipiente de extracción es diferente [68]. De igual manera, el experimento 11 de la **Tabla 14**, se puede comparar con el trabajo de Babovic y colaboradores [57], en donde las condiciones, 30 MPa, 373 K, 0.3 kg/h y 4.7 h, dieron un rendimiento del

1.5%, que es igual al obtenido en el experimento considerado. En el trabajo de Babovic y colaboradores se emplearon 1.4 kg de CO₂, la cual, es una cantidad menor que en el experimento 11 (2.4 kg); si se quisiera igualar el consumo de solvente, Babovic y colaboradores hubieran tenido que aumentar el tiempo a 8 h de extracción; de la misma manera, que en la anterior comparación la cantidad de MV extraída en el presente trabajo es 9 veces mayor. Teniendo en cuenta las relaciones de cantidad de CO₂ empleado con la masa de MV extraída, los experimentos 11 y 9 resultan, más eficientes que las extracciones de los dos reportes considerados. De todas maneras, hay variables que no fueron las mismas en los casos discutidos anteriormente, e.g., los tratamientos post-cosecha, las condiciones de separación del extracto, variables agroclimáticas de cultivo y parte de la planta utilizada en la extracción; este último factor es muy importante en las diferencias, pues los autores referenciados emplearon sólo hojas y en el presente trabajo se extrajeron hojas, tallos y flores, lo cual reduce los rendimientos.

En cuanto a la capacidad antirradicalaria de los extractos obtenidos de salvia con CO₂-SF, no se encontraron reportes que la evalúen mediante el método ORAC, pero, entre diferentes ensayos puede haber comparaciones, si se tiene en cuenta las respuestas de las muestras de los extractos cotejadas con las respuestas de algunos antioxidantes sintéticos de referencia, e.g., BHA y BHT. En el reporte de Ivanovic y colaboradores [81], una solución de 3 mg/mL del extracto SFE inhibió el 100% de radical DPPH, de igual manera, lo hizo una solución de 0.25 mg/mL de BHA; la solución de extracto neutralizó el radical hidroxilo completamente a una concentración de 10 Vs 2 mg/mL del BHA. En el trabajo de Babovic y colaboradores [57], una solución de 0.4 mg/mL de extracto de salvia, igualó a una solución de 0.2 mg/mL de BHA, en el 100% de la inhibición del radical DPPH, y la inhibición total del radical hidroxilo se realizó con una solución de 2 Vs 3 mg/mL de la solución de BHA, es decir el extracto de salvia fue más efectivo. En la patente de Uy y colaboradores [71] se enuncia que el extracto de salvia presentó un porcentaje similar de reducción de peróxidos que la mezcla de BHA/BHT, bajo las

mismas condiciones de medición, 95 % en el extracto de salvia contra el 97% en la mezcla de antioxidantes sintéticos. En esta investigación, el extracto obtenido a partir del experimento 22, fue el que presentó la capacidad antirradicalaria más alta, 1.80 ± 0.03 μmol de Trolox®/mg de extracto, a una concentración de 10 mg/mL, mientras que el BHA presentó 6.5 ± 0.2 μmol de Trolox®/mg de BHA, a una concentración de 1mg/mL, lo cual quiere decir que los extractos obtenidos a partir del diseño experimental obtuvieron capacidades antirradicalarias muy bajas comparadas con el antioxidante de referencia; y comparándolas con las de los reportes no alcanzaron sus efectividades.

Hay que resaltar, que en los trabajos citados, los ensayos se llevaron a cabo utilizando soluciones en DMF (*di*-metilformamida), mientras en los de la presente investigación el solvente fue metanol, al respecto Cuvelier y colaboradores [123] afirman que en metanol el ácido carnósico, -que posee la actividad antioxidante más alta entre los diterpenos presentes en salvia- se descompone a carnosol y éste, a su vez, en otros compuestos fenólicos con estructuras de δ - y γ -lactonas, que poseen actividades antioxidantes menores que los compuestos predecesores. Thorsen y Hildebrant [124] coinciden con los autores anteriores y agregan que el almacenamiento de soluciones del ácido carnósico en viales ámbar aumenta la degradación del diterpeno fenólico, debido al alto contenido de Fe y Ti en el vidrio de este tipo, que actúan como catalizadores en la oxidación; lo cual, podría ser otra causa de los valores de capacidad antirradicalaria bajos obtenidos en el desarrollo de la investigación.

No se encontraron reportes de la medición del contenido de fenoles mediante el método *Folin-Ciocalteu* de los extractos SFE de salvia en las bases de datos disponibles, sin embargo, se hallaron algunos reportes de tal medición en extractos obtenidos con solventes convencionales [118], los cuales serán discutidos más adelante en la **Sección 4.3.9**.

4.3.2. Análisis de los factores (variables). Los gráficos de probabilidad normal se emplean generalmente para evaluar si los datos proceden de una muestra que se distribuye normalmente, si esto es cierto, los datos se deberían ajustar a una línea recta en un gráfico en el cual, el eje X son los datos y el eje Y la probabilidad normal. Para analizar los efectos significativos en un diseño factorial fraccionado se pueden emplear estos gráficos, suponiendo que aquellos efectos que se encuentran en una línea recta no proporcionan cambios en la respuesta evaluada por arriba de los cambios que produce en ella el error aleatorio [25,125]. Por lo tanto, los efectos que no se alinean no pueden ser atribuidos a la variación aleatoria. En la **Figura 27** se muestran aquellos efectos que presentan un cambio significativo en la combinación lineal de observables.

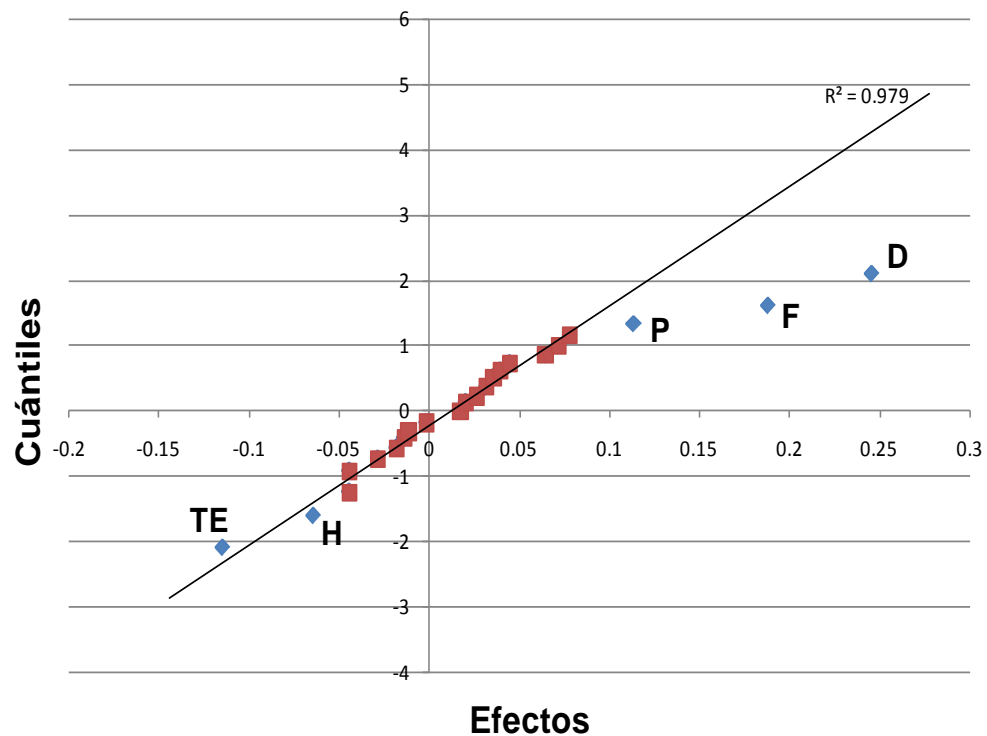


Figura 27. Gráfica de probabilidad normal para los efectos de primer y segundo orden en la combinación de observables de la **Ecuación 8**.

Hay una gran cantidad de puntos que representan efectos principales e interacciones de dos factores que se alinean, en este caso, el gráfico resulta útil, puesto que se puede suponer que el error aleatorio es representado por la mayoría de puntos que están alineados y los efectos de los extremos que no están en la línea, presentan un efecto más grande que el del error aleatorio [25,26,125].

Para corroborar la importancia de estos efectos sobre la respuesta se realizó un ANOVA (Véase **Tabla 15**) con los efectos representados por: el tiempo dinámico, D; el flujo, F; la presión, P; la temperatura en el colector, H, la interacción entre la temperatura y el tiempo estático, TE; de la misma manera se incluyeron la temperatura de extracción, T; y el tiempo estático E.

Tabla 15. Análisis de la varianza para los efectos significativos en la combinación de observables descrita en la **Ecuación 8**.

Factor	Suma de cuadrados	F	F_{1/5}	Pr>F
TE	0.09102	63.23		5.07E-04
H	0.03312	23.01		4.90E-03
E	0.00567	3.94		0.104
T	0.00927	6.48	6.61	0.0515
P	0.10319	71.68		3.77E-03
F	0.28239	196.2		3.34E-05
D	0.48174	334.7		8.98E-06
Error	0.00144			

Una ventaja del análisis de la varianza mostrado en la **Tabla 15**, es que el error utilizado como denominador de la prueba F se calculó con base en las réplicas de los experimentos de las temperaturas de secado y los tamaños de partícula (Vease **Sección 4.2.3**). Un ANOVA es una prueba muy poderosa para conocer las fuentes de variación de la respuesta, por esta razón requiere de réplicas para calcular el error real en la experimentación [25,26].

Todos los efectos principales que no se alinearon en la gráfica de la **Figura 27** resultaron ser significativos con un 95% de confianza (**Tabla 15**). Así mismo el efecto de la interacción, TE, fue significativo, pero se revisó la importancia de los efectos principales, por separado, resultando que T y E no lo fueron, por ésta razón no se tuvieron en cuenta en la optimización.

A continuación, en la **Figura 28**, se describe de un modo gráfico, cómo es la dependencia de la respuesta con respecto de las variables con mayor influencia. En ella, destaca que el efecto con mayor influencia en la respuesta es el tiempo dinámico, seguido del flujo, luego de la presión y, finalmente, por la temperatura en el colector; esto puede ser observado en los cambios en los promedios de la respuesta representada en el eje Y (pendientes). El orden establecido anteriormente también se puede destacar de la figura de distribución normal y del análisis de la varianza.

El nivel alto del tiempo dinámico de extracción empleado en este trabajo se fijó en 120 min para disminuir los costos de extracción, pues el sistema de extracción no contaba con la posibilidad de recuperar el solvente; además, tiempos muy prolongados de extracción reducen la dependencia del rendimiento de otras variables operacionales, como en el caso del extracto de caléndula: durante su extracción el rendimiento no varió significativamente bajo diferentes condiciones de presión, cuando se evaluaban tiempos de tres horas, pero sí se aumentaron los costos de extracción [98]. Para los compuestos solubles en el CO₂-SF, los tiempos de extracción largos no influyen significativamente, pero sí en los compuestos poco solubles [96,98]. La influencia del tiempo en las extracciones de volátiles a partir de salvia (9 MPa, 323 K) se puede evidenciar en el incremento de componentes cuando el tiempo aumenta de 20 a 350 min [60], en la extracción corta, sólo se detectaron monoterpenos y sus análogos oxigenados, en la más

prolongada, se detectaron además sesquiterpenos oxigenados e hidrocarburos lineales.

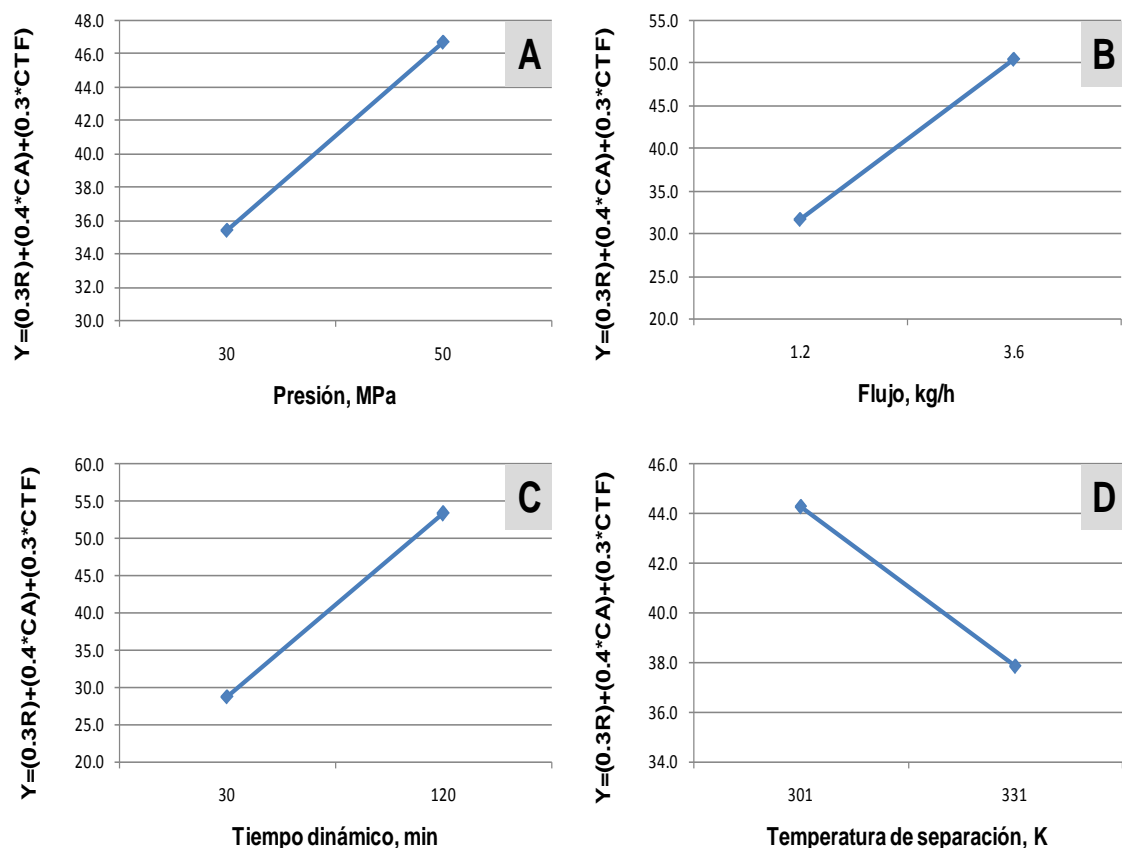


Figura 28. Comportamiento de la respuesta con respecto a: A. Presión; B. Flujo; C. Tiempo dinámico y D. Temperatura de separación.

En las extracciones a partir de rizomas molidos (0.39 mm) de jengibre [86], se determinaron tres periodos de extracción distinguibles por la extensión en el tiempo. El primero fue de extracción constante (rápido), el siguiente fue un de disminución de la razón de extracción, en donde se combinaron el primer y tercer periodo, y el tercero fue el periodo controlado por la difusión (lento); estos se presentaron entre los 30 y 60 min, 120 y 240 min, y 360 y 420 min, respectivamente. En el tercer periodo, predominó la extracción de los compuestos

de mayor peso molecular, gingeroles y shogaoles, mientras en el primer y segundo periodos, α -zingibereno, β -sesquifelandreno, neral y geranial. En general, en todas las extracciones de distintos tipos de material vegetal -hojas, tallos, raíces, rizomas o semillas- se presentan estos tres periodos de extracción pero sus límites temporales dependen del tipo de metabolitos secundarios, el flujo, la estructura y forma del MV. En la extracción de hiperforina y aldiperforina a partir de hojas y flores de la hierba de San Juan [126] durante la primera hora se extrajo el 83 y 88% del primer y segundo componente, respectivamente, al cabo de 1.5 h este porcentaje aumentó al 95 y 97 %, respectivamente, pero a las 2.5 h la suma del porcentaje de los dos compuestos no se incrementó por encima del 4 %. De acuerdo con lo anterior, es posible que para las hojas, tallos y flores de salvia de tamaño de partícula entre 0.51 a 1.00 mm y con las condiciones de tiempo dinámico empleadas en este trabajo, no se alcanzaran a presentar la segunda y tercera etapa para el tiempo dinámico de 30 min de extracción, y la tercera etapa para el tiempo dinámico de 120 min, pero de todas maneras al aumentar el tiempo dinámico de extracción mejoraron las tres respuestas y por ende su combinación lineal.

El flujo está muy relacionado con el tiempo dinámico, puesto que estos dos factores determinan la cantidad de solvente que atravesará el lecho y extraerá los componentes de interés, las 4 combinaciones del flujo con el tiempo resultan en 0.6, 1.8, 2.4 y 7.2 kg de CO₂, lo cual propició que los experimentos, en donde utilizaron 7.2 kg de solvente, fueron los de mayor rendimiento (Véanse los experimentos de la **Tabla 14** en los cuales aparecen las letras fd). La relaciones de masa de CO₂/masa de MV, fueron de 1.2, 3.6, 4.8 y 14.4, respectivamente; en los trabajos sobre SFE de salvia se pueden encontrar relaciones desde 1 hasta 80. Los gráficos que describen el comportamiento del rendimiento con respecto a las relaciones enunciadas siguen una trayectoria exponencial [62,63], que evidencia lo resaltado en el párrafo anterior sobre los tres periodos de extracción, es decir, a medida que aumenta el tiempo, la razón de extracción de los

metabolitos va decayendo. Carvalho y colaboradores [68], propusieron una ecuación (**Ecuación 9**) para el cálculo del flujo de solvente en cualquier equipo con diferentes geometrías del recipiente portamuestras, con base en el buen comportamiento cinético que condujo a rendimientos altos para el romero, 4.0%. Esta ecuación se utilizó en esta investigación para verificar el flujo empleado en el equipo a escala piloto con respecto al de baja capacidad usado en el trabajo citado.

$$\left(\frac{Q_2}{Q_1}\right) = \left(\frac{F_2}{F_1}\right)^2 * \left(\frac{H_1}{H_2}\right) * \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^3 \text{ Ecuación 9.}$$

En donde, Q es el flujo, F es la masa de material vegetal cargada, H es la altura del extractor y D el diámetro del mismo; los subíndices 1 y 2 denotan las condiciones reportadas por Carvalho y colaboradores [68] y las empleadas en el presente trabajo, respectivamente. Para obtener un comportamiento cinético en el equipo utilizado en este trabajo, similar al de Carvalho y colaboradores [68] se requiere un flujo de 1.6 kg/h, que se encuentra entre el rango de experimentación que es de 1.2 a 3.6 kg/h.

En general, los flujos altos aumentan la capacidad de extracción, pero en algunos casos disminuyen el rendimiento de extracto debido al corto periodo de contacto de solvente con la matriz vegetal [95]. En el presente trabajo, el aumento del flujo mejoró el rendimiento y el contenido total de fenoles, pero no la capacidad antirradicalaria. Posiblemente el flujo causó paralelamente el aumento de la extracción de compuestos fenólicos y el de compuestos sin ninguna actividad, interfiriendo o disminuyendo la medición de la capacidad antirradicalaria [63]. Además, el flujo alto pudo propiciar la pérdida de los componentes de interés por el venteo al ser “arrastrados” por la corriente de CO₂ gaseoso, no ocurriendo lo

mismo con componentes de mayor peso molecular, pero sin actividad, tales como ácidos grasos y ceras.

La presión y la temperatura determinan la selectividad del solvente, lo cual es causado por la variación de propiedades como la densidad, la difusividad, la constante dieléctrica, la viscosidad, *etc.* En las investigaciones consultadas se reportan presiones de más de 30 MPa como las adecuadas para mejorar la extracción de componentes antioxidantes (Véase **Tabla 5** de la **Sección 2.3.1**). Sin embargo, los aumentos de presión mejoran las cantidades de la mayoría de componentes presentes en el material vegetal, *i.e.*, terpenos volátiles, carotenos, clorofilas, ácidos grasos, ceras, entre otros, y, por lo tanto, el rendimiento global de extracción [3,5]. En el romero los componentes con fuertes propiedades antioxidantes como el ácido carnósico, rosmanol y carnosol, también presentes en la salvia, se extrajeron inclusive a 15 MPa [59]. La operación de la extracción a altas presiones aumenta la viscosidad del fluido pero disminuye la difusividad [3], haciendo más lenta la tercera etapa de extracción, pero en general, las presiones altas mejoran la solubilidad de los compuestos fenólicos; es así como la solubilidad de los ácidos fenólicos presentes en la uva mejoran hasta 1000 veces cuando la presión aumenta de 10 a 50 MPa [47]. En la presente investigación la presión de 50 MPa resultó más adecuada que 30 MPa, puesto que mejoró el rendimiento, la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles, como era de esperarse, pues a la presión más alta se extrajo un mayor número de componentes, incluyendo compuestos fenólicos con propiedades antirradicalarias como se demostrará en la **Sección 4.3.3**.

Las condiciones de separación determinan las propiedades del CO₂ en el colector del equipo, produciendo cambios en la composición y rendimiento de los extractos. Cuando se utiliza un solo separador, la selección de la presión de operación es primordial para lograr altos rendimientos, como los logrados por Machmudah y colaboradores [127] en la extracción de antioxidantes a partir de *Nigella sativa*. Reducciones en la presión de separación evitan pérdidas por el venteo de

CO₂, debido a que la densidad del fluido se reduce así como su poder solvente, propiciando una mayor deposición del extracto en la superficie del colector. Cuando la temperatura aumenta la densidad del fluido disminuye, pero los metabolitos de interés se pueden perder por el venteo arrastrados por el flujo de CO₂ gaseoso al aumentar su presión de vapor. El equipo utilizado en esta investigación contaba con un separador, por lo tanto, se decidió evaluar el papel que jugaba la presión (la cual no se podía aumentar más de 1.5 MPa) y la temperatura, para una etapa simple de extracción y separación. Basándose en algunos reportes de la separación en dos fracciones del extracto de salvia [128], orégano [129] y romero [59], se seleccionó la máxima temperatura de separación 58 °C. La temperatura mínima se ajustó teniendo en cuenta los límites operacionales y de seguridad del equipo.

Simándi y colaboradores [129] encontraron que la fracción de extracto obtenida a la temperatura más baja 293 K, resultó ser más rica en componentes volátiles (88.5%) que a la temperatura más alta 311 K (15.4%). En la investigación encaminada a fraccionar el extracto de romero mediante el uso de dos colectores; Cavero y colaboradores [59], cuantificaron la cantidad de ácido carnósico y evaluaron la capacidad antirradicalaria en la fracción 1 obtenida a 14 MPa y 313 K, y la fracción 2 recuperada a 2 MPa y 293 K, obteniendo concentraciones más altas en la segunda fracción; las condiciones de extracción para ambas fracciones fueron de 35 MPa y 313 K. Al contrario de lo anterior en la extracción a 15 MPa y 313 K se obtuvieron mejores resultados (cantidad de ácido carnósico y actividad antirradicalaria) para la fracción colectada a las condiciones más altas (7.5 MPa y 313 K) respecto de la fracción a 2 MPa y 293 K. Dauksas y colaboradores [128] emplearon tres colectores aplicando condiciones diferentes en cada uno de ellos. Se realizaron dos extracciones sin modificador a las mismas condiciones, a saber, 35 MPa y 373 K, la diferencia entre ambas fue que el primer colector se operó en la primera extracción a 30 MPa y en la segunda a 25 Mpa, mientras que la segunda fracción se obtuvo a 10 MPa y la tercera a 5 MPa, en todos los casos la

temperatura de separación fue de 40 °C. La segunda y la tercera fracciones fueron las que presentaron las actividades antioxidantes más altas. Se optimizaron el tiempo dinámico, el flujo, la presión de extracción y la temperatura de separación. La temperatura de extracción se fijó en 333 K, tiempo estático en 15 min y la presión de separación en 0.5 MPa

Resumiendo: para las extracciones que se realizan a más de 30 MPa y 313 K las temperaturas de separación bajas, 293 K arrojan mayores capacidades antirradicalarias que aquellas mayores de 313 K. La temperatura de separación de 313 K solo mostró ser propicia para la capacidad antirradicalaria, cuando se combinó con presiones de extracción menores de 15 MPa. El presente trabajo, coincide con lo encontrado por los autores citados anteriormente, puesto que a la temperatura de separación de 301 K se obtuvieron extractos con mayores actividades antirradicalarias que aquellos obtenidos a 331 K; de la misma manera fueron mayores los contenidos de fenoles y el rendimiento de extracción. Posiblemente a 331 K ocurrieron degradaciones o pérdidas de los antioxidantes más termolábiles.

4.3.3. Cuantificación de los ácidos carnósico y ursólico mediante HPLC-DAD.

El método cromatográfico que se empleó constó de la separación y detección de 11 compuestos fenólicos, reportados para la salvia y el tomillo, los cuales son: ácidos caféico, *p*-cumárico, rosmarínico, carnósico y ursólico; apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, naringenina y pinocembrina [30,34,130]. De estos componentes solo se detectaron los ácidos carnósico y ursólico, pues estos terpenoides menos polares, son solubles en CO₂ supercrítico, aunque también se solubilizan en etanol o agua [91]. Otros compuestos, que no se tuvieron en cuenta, pero se han aislado mediante SFE y se han separado y detectado por HPLC-DAD, son los derivados del ácido carnósico, carnosato de metilo, carnosol y rosmanol que son producidos principalmente en los procesos oxidativos durante la extracción, en particular con solventes polares [73,111,131,132]; aunque también

se ha reportado que tales componentes se generan endógenamente como respuesta al estrés hídrico y lumínico, a los cuales la planta se somete [133,134]. De la misma manera, se ha encontrado una variedad de glucósidos de apigenina y luteolina [33,34].

En la **Figura 29** se muestra el perfil cromatográfico obtenido a partir del extracto con mayor concentración de ácido carnósico (ACA), la confirmación de la presencia de dichos compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención y espectros UV con los de patrones de referencia certificados. Además, las muestras de extractos se enriquecieron con los compuestos de interés y se corroboró el aumento en las áreas cromatográficas en cuestión. Se puede apreciar, que para la longitud de onda seleccionada (333 nm) la respuesta del detector fue alta para el ACA, aunque la cantidad de ácido ursólico (AUR) fue mayor, lo cual, se puede evidenciar en las concentraciones mostradas en la **Tabla 16** para el extracto 32, que son de 72 y 93 mg/kg para los ácidos carnósico y ursólico, respectivamente.

Las curvas de calibración del ACA y AUR se muestran en el **Anexo A3**. El pico que corresponde al compuesto que eluye inmediatamente después del ácido carnósico, presumiblemente es el carnosato de metilo, tal conjetura se hace con base en la comparación con otros perfiles cromatográficos de salvia y romero obtenidos con el mismo detector, y con fases estacionaria y móvil similares, los cuales fueron encontrados en la literatura científica disponible [57,69,118,135,136].

La cuantificación del supuesto carnosato de metilo, CME, se realizó con base en la curva de calibración del ACA, teniendo en cuenta que este diterpeno no es de fácil consecución, y que este tipo de procedimiento se ha realizado anteriormente en varios trabajos [69,132,134].

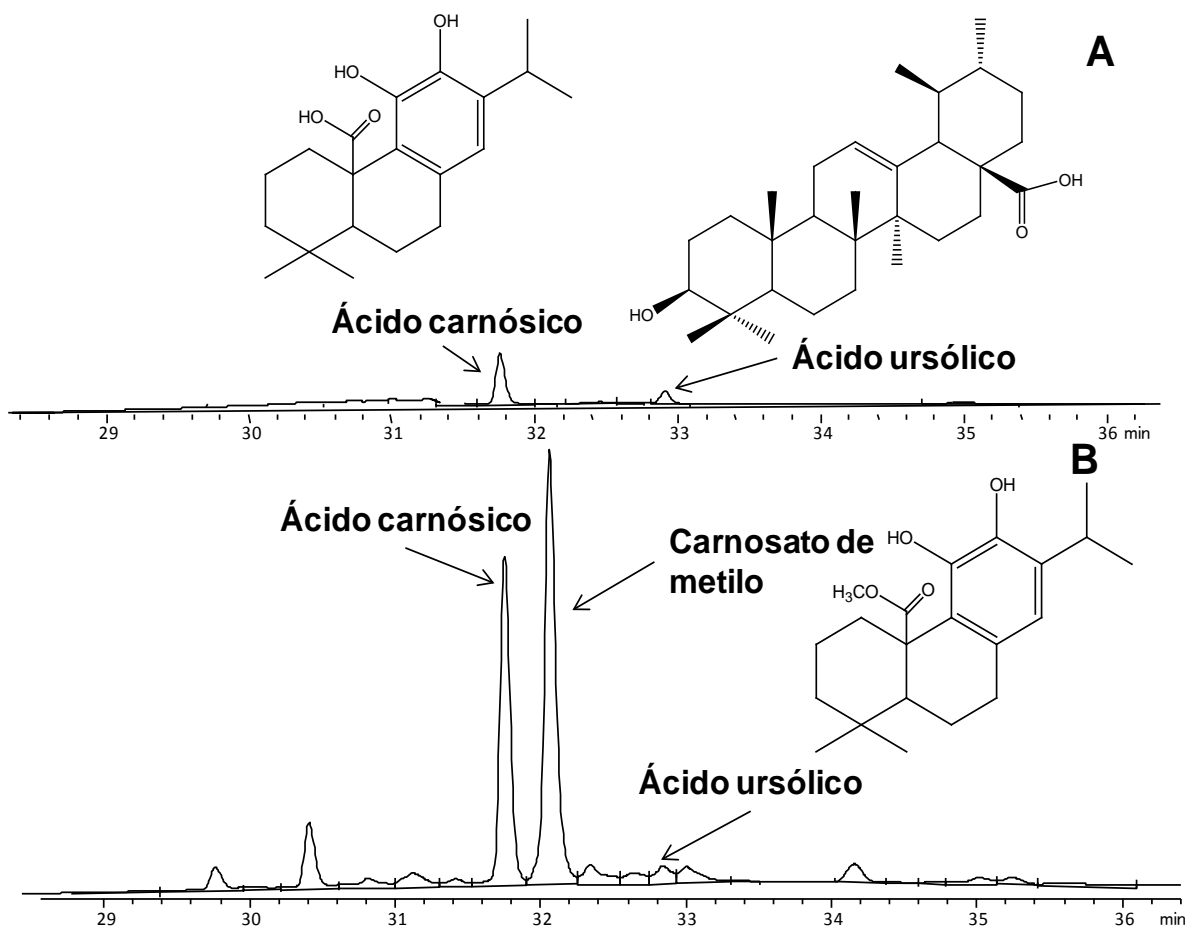


Figura 29. Perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPLC-DAD de: A. Patrones de referencia certificados, B. Extracto obtenido con fluido supercrítico a partir de salvia (experimento 32). Fase móvil conformada por 80 % metanol y 20% agua (modificador, el ácido ortofosfórico 0.1%).

La concentración del ácido carnósico del extracto SFE a 35 MPa, 373 K y 21.2 kg de CO₂/kg de MV, en el trabajo Babovic y colaboradores [57], fue de 137.6 mg/g de extracto, que es más del doble que el obtenido en el experimento 32, las condiciones de este ensayo fueron 50 MPa, 353 K y 14.4 kg de CO₂/kg de MV. Esto podría explicar, hasta cierto punto, los valores inferiores de capacidad antirradicalaria reportados en este trabajo –y que fueron abordados en párrafos precedentes-, comparados con los de la literatura.

Tabla 16. Concentraciones de los terpenos fenólicos detectados en 12 extractos seleccionados.

Experimento	Concentración, mg/g de extracto \pm s (n=2)		
	Ácido carnósico	Ácido ursólico	Carnosato de metilo
1	16.4 \pm 0.3	46.0 \pm 0.6	41 \pm 2
12	46.0 \pm 0.6	57 \pm 1	93.2 \pm 0.8
19	20.4 \pm 0.7	64 \pm 2	57 \pm 2
20	28.3 \pm 0.4	56.2 \pm 0.8	70.56 \pm 0.02
21	18.9 \pm 0.1	54.1 \pm 0.5	56.8 \pm 0.1
23	19.0 \pm 0.4	50 \pm 1	54.1 \pm 0.5
24	30.1 \pm 0.4	60.4 \pm 0.4	74 \pm 2
27	18.6 \pm 0.5	50 \pm 2	54 \pm 1
28	35.1 \pm 0.4	52.3 \pm 0.9	83.3 \pm 0.9
29	47.2 \pm 0.7	56.9 \pm 0.2	92.4 \pm 0.2
31	33.6 \pm 0.2	61.7 \pm 0.1	93.9 \pm 0.8
32	52.7 \pm 0.6	72.2 \pm 0.9	93 \pm 1

Los extractos metanólicos de hojas de salvia vendidas para infusiones y de 7 marcas diferentes, presentaron una concentración de ACA, determinada mediante electroforesis capilar, desde 2.99 hasta 7.16 mg/g de MV [137]. En los extractos en acetona obtenidos de brotes de plántulas propagadas *in vitro* se encontró ACA en 10.1 mg/g de MV [138]. Las concentraciones anteriores superan nuevamente las obtenidas en el experimento 32, calculadas con base en la masa de MV sometido a extracción, 1.9 mg/g de MV. El ACA es considerado el diterpeno con mayor actividad antioxidante, de los detectados en los extractos de salvia, además, la actividad antiinflamatoria de los extractos de salvia y romero se relaciona con el alto contenido de éste componente [111]; por esta razón el ACA es considerado el componente que le proporciona calidad a los extractos de romero y salvia, y además determina su precio [124].

La USDA [30], reportó los contenidos de AUR en los extractos aislados con solventes convencionales a partir de tallos y hojas, 1.25-1.30 y 0-0.2 mg/g de MV, respectivamente; según lo anterior la concentración en el experimento 32 resultó ser más alta que la reportada, pues fue de 2.74 mg/g de MV. En los extractos en diclorometano obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de dos accesiones, Alemania y Eslovenia [139], se encontró AUR en concentraciones de 0.39 y 0.046 mg/g de M.V., respectivamente; esto pone de manifiesto dos cuestiones: (1) La concentración de AUR en las plantas cultivadas en Sucre, Santander es más alta que en los reportes encontrados, lo cual podría sugerir que estas plantas representan un quimiotipo rico en este triterpeno y (2) La concentración de los metabolitos secundarios varía drásticamente de un sitio de cultivo a otro. El ácido ursólico es un componente ampliamente encontrado en la cáscara de la manzana roja (*Pyrus malus* L.), y posee un extenso espectro de actividades, a saber: antiviral (VIH), antifúngica (*Candida albicans*), antiinflamatoria, antialérgica, anticarcinogénica y antiangiogénica [140].

Como ya se ha mencionado anteriormente el ACA y los diterpenos asociados a él, son los principales responsables de la actividad de los extractos SFE de salvia [73,111], por lo tanto en la **Tabla 17** se quiere verificar la dependencia de la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles de las concentraciones de los ácidos carnósico y ursólico, y del supuesto carnosato de metilo.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con la relevancia del ACA en la capacidad antirradicalaria [59,116,141]; en estos trabajos se comprobó que el ACA tuvo la mayor influencia sobre la actividad -evaluada mediante diferentes ensayos- por encima de otros derivados diterpénicos y ácidos fenólicos como el ácido rosmarínico. Aunque la concentración de AUR es mayor que la de ACA, la respuesta es menor al ensayo de contenido de total de fenoles, puesto que el ácido ursólico no es un compuesto fenólico. Esto se comprobó preparando una

solución de la misma concentración para los dos componentes, obteniéndose una respuesta muy superior para el ACA.

Tabla 17. Coeficientes de correlación, r , entre respuestas y compuestos activos.

	Ácidocarnósico	Capacidad antirradicalaria	Contenido de total fenoles	Carnosato de metilo
Capacidad antirradicalaria	0.812	-	-	-
Contenido de total fenoles	0.812	0.610	-	-
Carnosato de metilo	0.924	0.644	0.846	-
Ácidoursólico	0.614	0.397	0.345	0.605

La relación de los diterpenos ACA y CME es alta debido a que el segundo es producido por la descomposición del primero, tal reacción se puede llevar a cabo tanto en la planta *in vivo*, como durante el proceso de extracción [132-134]. El cambio en la concentración de los componentes analizados mediante HPLC-DAD respecto al cambio de la presión y tiempo dinámico de extracción en los experimentos del diseño 2^{7-2} se grafica en la **Figura 30**.

El componente que más aumentó la concentración a medida que se cambiaron los niveles de las variables consideradas fue el carnosato de metilo debido posiblemente a la descomposición del ácido carnósico a medida que transcurrió la extracción. El cambio positivo en el tiempo dinámico y la presión afectaron las cantidades extraídas de los tres componentes, pero para el AUR fue menor. Aunque el AUR es un componente triterpénico más soluble que ACA y CME, y por lo tanto más fácil de extraer con $\text{CO}_2\text{-SF}$.

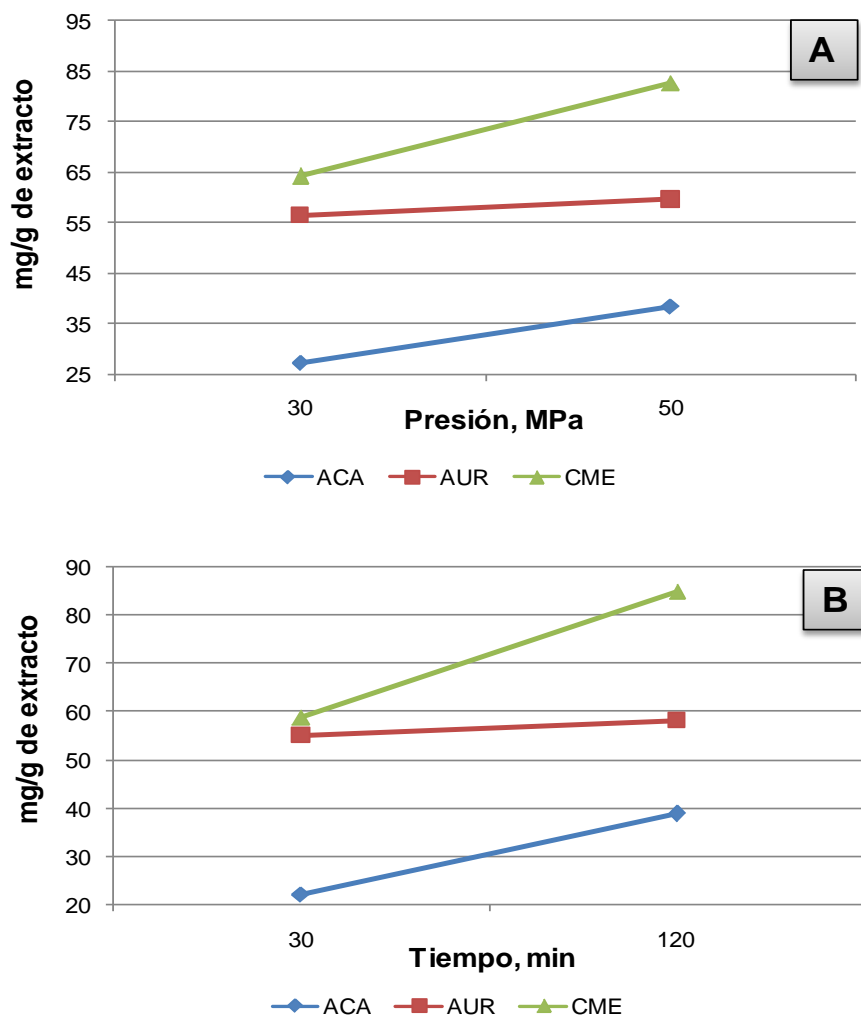


Figura 30. Influencia de A. La presión y B. El tiempo dinámico, en la concentración de los tres componentes reconocidos mediante HPLC-DAD.

4.3.4. Composición volátil y semi-volátil de la fracción soluble en metanol de los extractos SFE. En la **Figura 31** se muestra el perfil cromatografico de los componentes volátiles y semi-volátiles que fueron solubles en metanol, de los cuales el sesquiterpeno oxigenado viridiflorol y el diterpeno manol son los compuestos mayoritarios. Hasta este punto se supone que gran parte de la cantidad de los componentes más volátiles (apolares) pudieron perderse en el precipitado insoluble en metanol, esto se va a hacer evidente en una sección más

adelante, en donde se mostrará el análisis realizado al espacio de cabeza de los extractos obtenidos de la optimización.

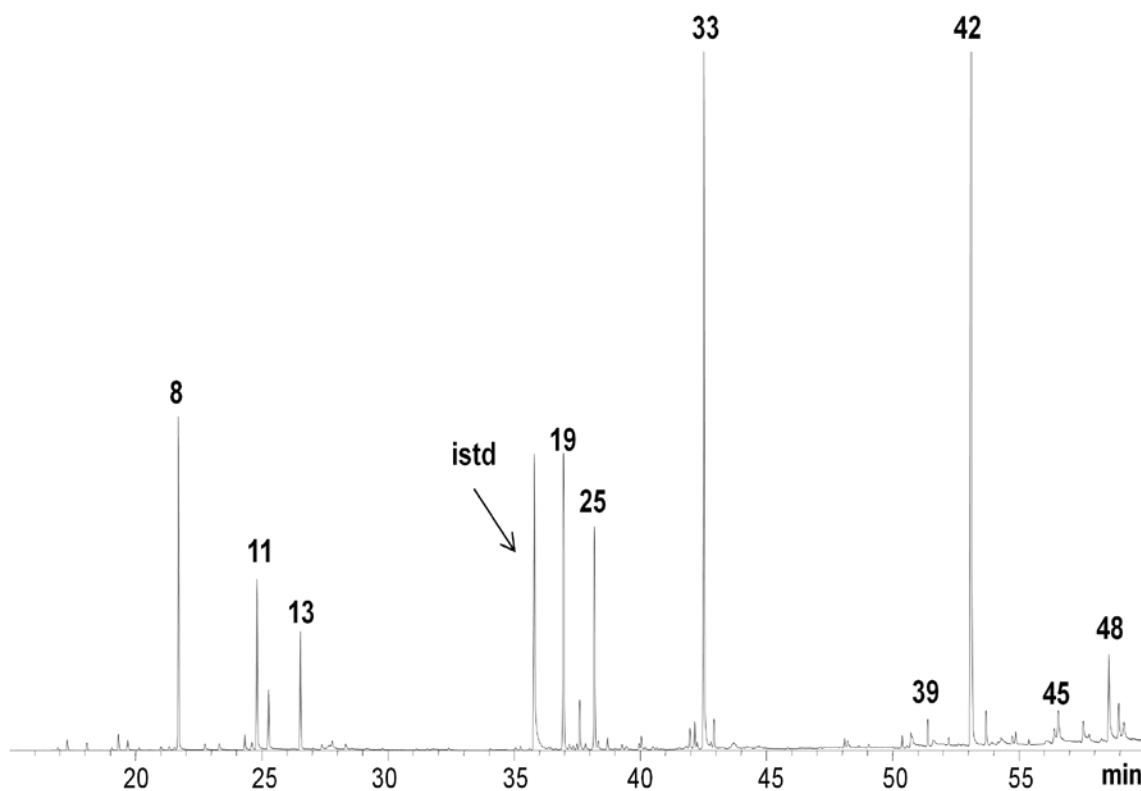


Figura 31. Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS de los volátiles y semivolátiles de la fracción metanólica del extracto SFE de *Salvia officinalis*. Columna DB-5MS (60 m), Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).

En la **Tabla 18** se listan los componentes reconocidos e identificados y se especifican sus cantidades relativas en algunos de los extractos obtenidos, teniendo en cuenta que las condiciones operacionales de algunos experimentos e.g. 1 y 32, pudieron favorecer o no la presencia de estos compuestos en los extractos. También se muestra la composición de los extractos de acuerdo con las familias de componentes.

Tabla 18. Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en la fracción metanólica de los extractos SFE de salvia obtenidos a partir del diseño 2⁷⁻².

N° Pico ^a	Compuesto	I _R ^b	Cantidad relativa, %±σ (n=3)						
			Experimento 1	Experimento 19	Experimento 20	Experimento 23	Experimento 27	Experimento 31	Experimento 32
1	α-Tujeno	933	0.161±0.002	0.205±0.004	0.22±0.01	0.24±0.01	0.25±0.02	0.266±0.005	0.200±0.002
2	α-Pineno	942	0.302±0.005	0.338±0.006	0.189±0.003	0.42±0.02	0.34±0.02	0.427±0.003	0.35±0.01
3	Canfeno	958	0.195±0.001	0.257±0.002	0.145±0.008	0.29±0.02	0.228±0.009	0.279±0.007	0.225±0.005
4	Sabineno	980	0.178±0.004	0.199±0.005	0.227±0.006	0.23±0.02	0.24±0.01	0.251±0.007	0.186±0.008
5	β-Pineno	984	0.455±0.001	0.418±0.005	0.29±0.01	0.50±0.03	0.44±0.01	0.512±0.008	0.421±0.005
7	α-Terpineno	1023	0.175±0.005	0.187±0.008	tr	0.21±0.02	tr	tr	tr
8	1,8-Cineol*	1039	6.74±0.04	6.69±0.03	4.92±0.05	6.41±0.07	5.96±0.07	6.58±0.08	5.0±0.1
11	cis-Tujona*	1113	4.37±0.02	4.04±0.05	3.10±0.06	3.39±0.09	2.83±0.06	3.32±0.07	2.26±0.06
12	trans-Tujona	1125	1.36±0.06	1.51±0.02	0.94±0.08	1.14±0.03	0.85±0.07	1.06±0.03	0.67±0.04
13	Alcanfor	1157	2.55±0.08	3.06±0.03	2.31±0.03	2.44±0.09	2.05±0.03	2.16±0.01	1.46±0.02
14	δ-Terpineol	1178	0.483±0.003	0.37±0.02	tr	tr	tr	tr	tr
16	cis-Cariofileno	1427	0.18±0.01	0.27±0.02	0.19±0.02	tr	tr	tr	tr
17	α-Gurjuneno	1431	0.127±0.008	0.217±0.009	tr	tr	tr	tr	tr
19	trans-β-Cariofileno	1442	6.11±0.03	6.62±0.02	6.11±0.02	5.41±0.09	5.02±0.07	5.48±0.03	3.56±0.05
22	β-Gurjuneno	1459	0.10±0.01	0.125±0.005	tr	tr	tr	tr	tr
23	Aromadendreno	1462	0.71±0.01	0.873±0.008	0.83±0.02	0.75±0.01	0.73±0.03	0.87±0.04	0.58±0.06
24	α-Guaieno	1465	0.16±0.02	0.203±0.007	0.17±0.01	0.17±0.03	0.21±0.02	0.29±0.06	tr
25	α-Humuleno*	1476	4.10±0.02	4.61±0.06	4.38±0.05	3.82±0.08	3.36±0.09	3.84±0.07	2.52±0.04
26	allo-Aromadendreno	1484	0.29±0.03	0.32±0.01	0.28±0.05	0.26±0.04	0.30±0.04	0.36±0.04	0.186±0.003
27	γ-Muroleno	1494	0.27±0.03	0.226±0.006	0.26±0.05	0.20±0.02	0.24±0.03	tr	tr
28	Valenceno	1517	0.637±0.004	0.85±0.02	0.82±0.03	0.74±0.03	0.82±0.03	0.86±0.08	0.59±0.04
30	δ-Cadineno	1541	0.35±0.02	0.290±0.02	0.292±0.005	0.24±0.02	0.24±0.02	tr	tr

Tabla 18, continuación.

31	Espatulenol	1602	0.324±0.009	0.34±0.01	0.37±0.02	0.301±0.008	0.31±0.01	0.31±0.01	tr
32	Óxido de cariofileno	1610	0.49±0.02	0.51±0.02	0.50±0.02	0.435±0.005	0.40±0.01	0.420±0.004	0.27±0.02
33	Viridiflorol	1620	14.0±0.1	14.3±0.8	14.0±0.2	12.2±0.1	12.7±0.2	11.5±0.8	7.47±0.07
35	Epóxido de humuleno II	1638	0.65±0.03	0.73±0.04	0.62±0.04	0.56±0.04	0.56±0.05	0.57±0.05	0.42±0.06
38	Neofitadieno	1957	0.402±0.003	0.415±0.002	0.495±0.007	0.39±0.01	0.43±0.05	0.36±0.03	0.32±0.02
39	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	1968	1.71±0.04	1.42±0.05	2.66±0.05	1.87±0.04	2.29±0.05	2.23±0.07	1.69±0.04
41	Hexadecanoato de etilo**	2012	0.494±0.006	0.52±0.02	0.55±0.04	0.51±0.04	1.30±0.04	0.7±0.2	0.99±0.06
42	Manol	2094	29.0±0.2	29.7±0.8	28.8±0.4	25.8±0.2	27.3±0.4	24.3±0.2	15.8±0.8
43	Ácido <i>cis,cis</i> -9,12-Octadecanoico**	2149	0.66±0.04	tr	1.06±0.09	0.59±0.05	1.06±0.09	0.76±0.06	0.88±0.05
44	Octadecanoato de etilo	2166	0.51±0.01	tr	tr	tr	tr	tr	0.41±0.03
45	Tricosano	2300	0.55±0.03	0.63±0.06	0.43±0.06	0.473±0.006	0.63±0.09	1.08±0.01	0.9±0.1
46	<i>trans</i> -Ferruginol**	2361	0.21±0.04		0.40±0.03	0.42±0.05	0.25±0.06	0.44±0.05	0.57±0.05
47	Tetracosano	2412	1.25±0.02	1.43±0.02	1.7±0.1	2.27±0.07	2.5±0.1	2.73±0.03	3.37±0.1
48	β-Sitoosterol**	2843	1.56±0.02	1.50±0.04	1.6±0.1	1.77±0.07	1.55±0.08	2.73±0.08	6.9±0.1
Compuestos reconocidos e identificados, %			82.7	83.4	79.0	74.5	75.4	74.8	58.3
Hidrocarburos monoterpénicos			1.9	1.6	1.1	1.9	1.5	1.7	1.4
Monoterpenos oxigenados			15.7	15.7	11.3	13.4	11.7	13.1	9.4
Hidrocarburos sesquiterpénicos			13.2	14.6	13.3	11.6	10.9	11.7	7.4
Sesquiterpenos oxigenados			15.4	15.9	15.5	13.5	14.0	12.8	8.2
Diterpenos			29.2	29.7	29.2	26.2	27.6	24.7	16.3
Triterpenos			1.6	1.5	1.6	1.8	1.6	2.7	6.9
Ácidos grasos y ésteres derivados			3.4	1.9	4.3	3.0	4.7	3.7	4.0
Ceras			2.2	2.5	2.6	3.1	3.5	4.2	4.6

^a Número de pico en la **Figura 31**.

^b Índice de retención calculado con base en los tiempos de retención obtenidos en una columna DB-5 (f.e. apolar).

* Identificado por comparación con los índices de retención y espectros de masas obtenidos de patrones de referencia certificados.

** Reconocidos tentativamente.

En total se detectaron 78 picos cromatográficos de los cuales sólo los mostrados en la tabla se reconocieron positivamente. La mayoría de componentes no reconocidos (no mostrados) eluyeron después de la región conformada por los sesquiterpenos, por esta razón se puede suponer que dichos compuestos pudieron ser diterpenos, triterpenos, ceras y ácidos grasos y sus ésteres derivados. Todos los extractos presentaron como componentes mayoritarios los diterpenos, seguidos por los mono- y sesquiterpenos oxigenados, que sumados son más del 60% del total de componentes reconocidos.

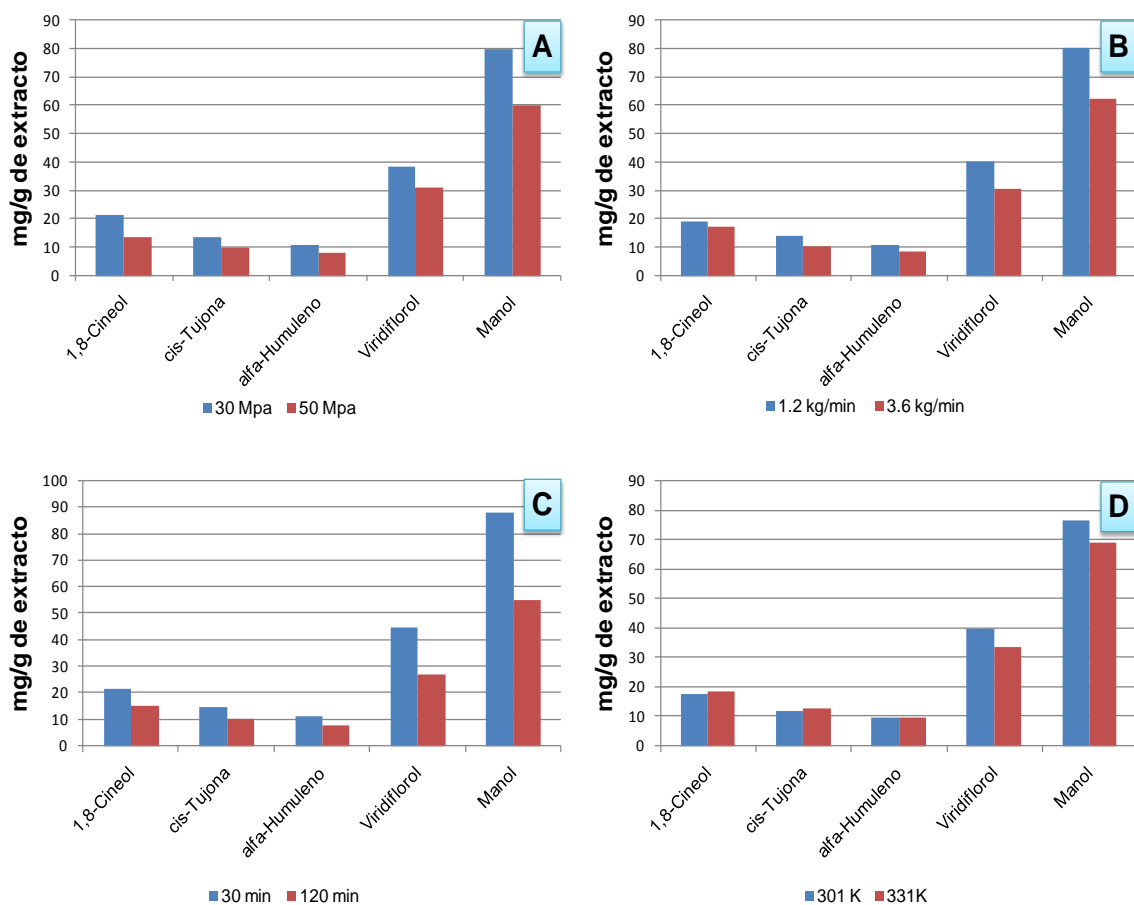


Figura 32. Cambio en la concentración de los componentes volátiles mayoritarios con respecto las condiciones más influyentes en la capacidad antirradicalaria de los extractos, A. Presión; B. Flujo; C. Tiempo dinámico; D. Temperatura de separación.

El detalle más notorio en la **Tabla 18**, es la diferencia en la composición entre el extracto 1 y el 32, pues la cantidad relativa de la mayoría de mono- y sesquiterpenos disminuyó en el extracto 32, además algunos compuestos fueron detectados a nivel de trazas. Lo anterior se debió a las condiciones de extracción más favorables, en el caso del extracto 1, para la extracción de compuestos de bajo peso molecular. Según la composición, los extractos se pueden clasificar de tipo diterpénico, siendo los mono- y triterpenos las familias de compuestos menos abundantes.

En la **Figura 32** se exponen los cambios en las cantidades de los componentes volátiles en los extractos de acuerdo con las cuatro variables más influyentes sobre las respuestas consideradas. Un cambio positivo de las 4 variables afectó negativamente las cantidades de los componentes volátiles y semi-volátiles en los extractos. Con los cambios de presión, flujo y tiempo, posiblemente se aumentó el número de componentes no volátiles en los extractos [3,5,63]. La temperatura más alta en el separador pudo causar la pérdida o degradación de los componentes más volátiles [129].

En la **Tabla 19**, se comparan las composiciones de los extractos SFE de salvia en diferentes países. En todos los experimentos las condiciones de presión y temperatura se ubicaron entre de 9 y 35 MPa; y, 313 y 323 K, respectivamente. Se notan cambios drásticos en la composición de los extractos, los cuales no pueden ser atribuidos solamente a las diferencias en las condiciones de extracción (Véase **Tabla 19** en la cual los cambios no son radicales) y tratamientos post-cosecha. Las condiciones de cultivo, y los aspectos genéticos juegan un rol muy importante en dichos contrastes. Con base en lo anterior se podría suponer que existen cuatro quimiotipos, a saber: un quimiotipo rico en *cis*-tujona (Albania, Estonia y Bosnia y Herzegovina), el segundo abundante en 1,8-cineol (Italia), uno mixto (Croacia) y finalmente como hipótesis uno rico en manol (Colombia).

Tabla 19. Comparación de las cantidades relativas de los componentes volátiles y semi-volátiles mayoritarios en los extractos de salvia.

Compuesto	Cantidad relativa, %					
	Aleksovski y Sovova (Albania)	Reverchon, <i>et.al</i> (Italia)	Glicic, <i>et.al</i> (Croacia)	Menaker, <i>et.al.</i> (Estonia)	Micic, <i>et.a</i> (Bosnia y Herzegovina)	Este trabajo (Colombia)
1,8- Cineol	9.5	54.3	4.0	9.7	1.1	6.7
<i>cis</i> -Tujona	26.5	1.4	16.6	27.7	27.4	4.4
Alcanfor	23.7	5.7	10.3	15.6	23.1	2.6
<i>trans</i> - β -Cariofileno	3.8	7.1	1.4	2.2	1.0	6.1
Viridiflorol	N.D.	0.3	5.8	1.6	N.D.	14.0
Manol	0.65	1.8	18.7	N.D.	N.D.	29.0

N.D. No detectado

4.3.5. Búsqueda de los niveles óptimos de los factores más relevantes. La metodología de optimización *Simplex* requiere de la selección por parte del investigador de un punto inicial y de un tamaño de paso, escogidos con base en su conocimiento previo del dominio experimental. Además, se necesita de una fórmula para calcular los demás vértices del primer *Simplex*. La **Ecuación 10** muestra cómo se calculan los vértices iniciales.

$$V_{i+n} = V_i + (K * Tp) \text{Ecuación 10.}$$

En donde V_{i+n} es cualquier vértice del *Simplex* inicial, V_i es el vértice inicial, K es una constante y Tp es el tamaño de paso [142]. Con esta ecuación se obtienen los vértices de una figura geométrica en el espacio n -dimensional. Cuando se realizan los experimentos correspondientes a los $n+1$ (siendo n el número de factores) vértices, se obtienen las respuestas, se comparan y se identifica la peor, este vértice será el que determine el nuevo vértice. Para hallar la nueva combinación de factores se empleó la **Ecuación 11**.

$$V_{i+n+j} = V_c + b(V_c - V_p) \text{Ecuación 11.}$$

En donde V_{i+n+j} es el nuevo vértice que puede ser producto de una reflexión, expansión o contracción; V_c es el centroide, el cual corresponde al promedio de las respuestas de los vértices no rechazados; b es un factor, el cual viene dado por el movimiento del *Simplex*, es decir, cuando b es igual a 1 es una reflexión, a 0.5 contracción, a -0.5 contracción con cambio de dirección y si es mayor de 1 es una expansión; V_p es el peor vértice del *Simplex* evaluado [110,143]. A continuación en la **Tabla 20**, se muestran las 14 combinaciones de los cuatro factores más importantes (vértices), las tres respuestas obtenidas y las combinaciones lineales de éstas.

Tabla 20. Resultados de la optimización mediante la metodología *Simplex*.

Vértice N°	Simplex N°	Vértices retenidos	D*, min	F*, kg/h	P*, MPa	H*, K	R**, %	CA**, $\mu\text{mol Trolox/mg}$ de extracto	CTF**, g/L de Ácido gálico	Respuesta***
1			75	2.40	40.0	316	1.8	1.77±0.04	630±20	70.4
2			90	2.40	40.0	316	1.6	1.44±0.03	602±46	54.1
3			82.5	2.82	40.0	316	2.0	1.79±0.03	618±48	72.1
4			82.5	2.53	43.3	316	1.9	1.29±0.05	553±20	46.9
5	1		82.5	2.53	40.8	321	2.0	1.47±0.03	571±10	56.9
6	2	1,2,3,5	82.5	2.53	37.1	318	1.5	1.35±0.03	578±10	47.7
7	3	1,2,3,5	82.5	2.53	46.3	315	1.6	1.81±0.05	638±7	70.7
8	4	1,3,5,7	71.3	2.76	43.6	318	1.5	1.93±0.02	622±4	73.1
9	5	1,3,7,8	73.1	2.70	44.1	312	1.7	1.75±0.03	699±10	73.5
10	6	3,7,8,9	78.5	2.85	45.3	315	1.6	1.86±0.02	664±18	75.0
11	7	3,8,9,10	73.3	2.89	41.7	315	1.7	1.930±0.006	668±6	78.8
12	8	8,9,10,11	65.6	2.80	47.3	313	1.7	2.42±0.03	753±2	103.4
13	9	9,10,11,12	74.0	2.89	45.6	310	1.7	2.15±0.03	719±17	90.6
14	10	10,11,12,13	71.7	3.44	48.4	319	1.8	2.20±0.03	724±6	93.9

*D: Tiempo dinámico; F: Flujo; P: Presión; H: Temperatura de separación

**R: Rendimiento; CA: Capacidad antirradicalaria; CTF: Contenido total de fenoles

***Combinación lineal $Y=(0.3*R)+(0.4*CA)+(0.3*CTF)$

La optimización comenzó con el cálculo del *Simplex* inicial, en el cual, el vértice N° 1 se estableció en la mitad del dominio experimental para cada una de las variables, e.g. para el tiempo dinámico fue de 75 min que es el punto medio entre 30 y 120 min. Los tamaños de paso, T_p , fueron de 15 min, 0.48 kg/h, 4 Mpa y 6 K, para el tiempo dinámico, el flujo, la presión de extracción y la temperatura de separación, respectivamente. Luego, se realizó una reflexión para hallar el vértice 6, pero como éste resultó en una respuesta más baja que todos los anteriores vértices, se decidió aplicar una expansión ($b=2$), que dio como resultado el vértice 7. Para determinar el vértice 8, se procedió con una reflexión, se prosiguió con el mismo movimiento hasta el vértice 10. Debido a que las respuestas de los vértices 8, 9 y 10 fueron las más altas obtenidas, se decidió hacer una contracción ($b=0.5$), para hallar el vértice 11 y como su respuesta fue superior a las de los demás se regresó a las reflexiones ($b=1$). Se obtuvo la respuesta del vértice 12, considerablemente más alta que la del 11, se halló el vértice 13 con una respuesta más baja, finalmente se realizó una expansión ($b=4$), obteniéndose de nuevo una respuesta baja. Se optó por detener la optimización con 14 vértices y comprobar las respuestas del vértice 12 mediante la validación, que consiste en variar el nivel de cada factor dejando los demás fijos, y realizando una réplica del supuesto óptimo.

Un análisis de la **Tabla 20** sugiere que los 14 vértices se pueden agrupar según las respuestas obtenidas:

- $46.9 \leq Y \leq 56.9$, en este grupo coexisten los vértices 2,4,5 y 6.
- $70.4 \leq Y \leq 78.8$, este grupo lo conforman los vértices 1,3,7,8,9,10 y 11.
- $90.6 \leq Y \leq 103.4$, este grupo se hallan los vértices 12,13 y 14.

El primer grupo presentó tiempos y flujos entre 82.5 y 90 min, y 2.40 y 2.52 kg/h, respectivamente; de otro lado, la presión y la temperatura de separación no mostraron homogeneidad. En el segundo se encontraron experimentos de condiciones no muy homogéneas para las cuatro variables, sin embargo en

términos generales, los niveles del tiempo dinámico y el flujo fueron intermedios, aunque algunos se solaparon con los del primer y tercer grupo. El tercer grupo presentó niveles de tiempo dinámico entre 65.6 y 74.0 min, flujos entre 2.82 y 3.42 kg/h y presiones entre 45.7 y 48.4 MPa.

El tiempo dinámico fue el factor que más influyó en los resultados obtenidos, porque los tres grupos se pueden separar claramente por intervalos de tiempos, esto reforzó los resultados obtenidos de la gráfica de distribución normal y el ANOVA (ver **Sección 4.3.2**). El tiempo dinámico afectó posiblemente la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles debido a que tiempos de extracción prolongados hacen que otros componentes de mayor peso molecular sin actividad se solubilizan, por el agotamiento de los más solubles o fácilmente accesibles en la matriz vegetal [62,63]. Algunos de estos componentes son ácidos grasos libres, sus ésteres derivados y fitoesteroles o triterpenos. En el trabajo de Glisic y colaboradores [63], se demostró que con tiempos de extracción desde 22 a 90 min la selectividad en la extracción de los diterpenos fenólicos decayó respecto a las ceras, ésteres derivados de ácidos grasos y triterpenos, este comportamiento se volvió más notorio a medida que la presión de extracción se aumentó de 10 a 20 MPa.

El tiempo dinámico establecido como el óptimo, 65.6 min, presumiblemente corresponde al primer periodo de extracción (véase **Sección 4.3.2**) según algunas investigaciones [3,5,86]; periodo en el cual, se aíslan los componentes fácilmente extraíbles a una razón constante, lo que hace pensar que los componentes antioxidantes, ácido carnósico, ácido ursólico y carnosato de metilo no fueron retenidos fuertemente por la matriz vegetal o ubicados en órganos internos de las hojas y tallos. Además, el tamaño de partícula elegido, 0.50-1.00 mm, pudo favorecer la extracción de estos componentes, como se pone de manifiesto en el trabajo de Favati y colaboradores [144], los cuales extrajeron aceite fijo a partir de semillas de onagra (*Oenothera biennis*) con un tamaño de partícula de 0.355 mm,

observando que el 95% del aceite fue extraído durante el primer periodo (razón constante y rápida), sin presentarse el segundo (decaimiento de la razón de extracción), ni el tercer periodo de extracción (periodo dominado por la difusión, razón de extracción muy lenta pero constante).

De acuerdo con los resultados obtenidos los flujos mayores de 2.76 kg/h mejoraron la respuesta, debido a que más moléculas por unidad de volumen entraron en el extractor, dicho incremento propicia que se den más interacciones CO₂-Solutos, aumentando la capacidad de solvatación[95,145]; pero se observó que durante los experimentos correspondientes a los vértices 13 y 14 los valores de la respuesta decrecieron, probablemente, porquea flujos mayores,c.a. 2.8 kg/h, el tiempo de contacto entre el solvente y los solutos no fue el suficiente [75,95]. De otro lado, cuando se llevo a cabo la extracción con flujos menores de 2.52 kg/h, las respuestas de los tres observables fueron las más bajas (Vértices 2,4,5 y 6). Langa y colaboradores [106] reportaron que la variación del flujo desde 0.72 a 1.32 kg/h en un portamuestra de un 1 L de capacidad, no tuvo un efecto significativo en el rendimiento del extracto obtenido a partir de salvia, pero el rendimiento de 1.9% se alcanzó más rápido operando a 1.32 kg/h. En la investigación de Papamichail y colaboradores [97], se demostró que aunque un flujo mayor (3 kg/h), resultó en un aumento del rendimiento de aceite a partir de semillas de apio cuando se graficó contra el tiempo de extracción dinámico (50 a 100 min), no se obtuvieron los mismos resultados cuando se graficó el rendimiento contra el consumo de CO₂,puesto que resultó ser más eficiente el flujo menor (1.1 kg/h).Un argumento para dicho comportamiento es que los flujos altos beneficiaron la extracción de los solutos fácilmente extraíbles o ubicados en la superficie de la partícula de material vegetal, mientras que los flujos bajos permitieron un mayor tiempo para la difusión del CO₂a través de la matriz vegetal y así pudieron ser aislados los componentes más fuertemente retenidos en la parte interna del material vegetal [3,5,93].

En la **Ecuación 9 (Sección 4.3.2)**, se determinó que para obtener un rendimiento del 4.0 %, -tomando las hojas y tallos de romero como referencia [68]- el flujo debía ser de 1.6 kg/h, no obstante, el nivel óptimo del flujo encontrado en esta investigación fue de 2.8 kg/h, que es alto si se compara con varias de las publicaciones disponibles [57-63,68]. Puesto que el rendimiento varió poco en la optimización, de 1.5 a 2.0 %, no se pudo comprobar dicha relación, teniendo en cuenta también que la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles, tuvieron mayor influencia en el direccionamiento del *Simplex*.

Al incrementar la presión, se aumenta la densidad del fluido, y por lo tanto habrá más moléculas de CO₂ por unidad de volumen disponibles para interactuar con las moléculas de los solutos [10]. Se ha aislado y detectado carnosol y ácido carnósico a partir de romero a 15 MPa [59], pero las cantidades de estos componentes y otros mejoraron al aplicar presiones de más de 30 Mpa [57-59,63]. Las presiones mayores de 45.6 MPa, en la mayoría de los casos, favorecieron la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles, pues estas respuestas fueron las mayores obtenidas, 2.15-2.40 μmol Trolox/ g de extracto y 7.19-7.53 g de ácido gálico/g de extracto de, respectivamente; probablemente por el aumento del ácido carnósico, carnosato de metilo y ácido ursólico en los extractos. En los reportes sobre las extracciones con CO₂-SF a partir de salvia se encontró que el aumento de presión desde 11.5 a 35 MPa [57] y de 50 a 100 MPa [71] mejoró la capacidad antirradicalaria de los extractos hasta valores equiparables que los del BHA.

Con la cuarta variable en cuestión no hubo homogeneidad alguna, pero según el experimento correspondiente al vértice 12, la respuesta se favorece con temperaturas de separación bajas, 313 K, debido a la menor degradación en el colector de los componentes termolábiles.

Las investigaciones disponibles en las cuales se combinaron la extracción con fluido supercrítico y la optimización mediante la metodología *Simplex* son escasas. Dentro de las publicaciones analizadas se destacan la de Ramos y colaboradores [145], quienes optimizaron la extracción de café, y utilizaron como respuesta la similitud del aroma de los extractos con la de la bebida caliente, la cual, fue evaluada por un panel de personas especializadas. Las variables que tuvieron en cuenta fueron la densidad, el tiempo dinámico de extracción y el flujo; en la densidad están implícitas la presión y la temperatura, en el presente trabajo, se tuvo en cuenta cada variable por separado, debido a que hay distintas combinaciones de estas variables que resultan en la misma densidad, e.g. tanto con 323 K y 40 Mpa, como con 343 K y 54.8 MPa se obtienen densidades de 924 kg/m³. Debido a que los panelistas tuvieron dificultades para discernir entre los experimentos que conformaron el último *Simplex*, después de 19 vértices se detuvo la búsqueda. El óptimo fue escogido con base en el menor consumo de solvente. En la **Tabla 21** se muestran los límites experimentales y los niveles óptimos de las variables.

Tabla 21. Dominio experimental y niveles óptimos de las variables en la SFE de extractos de café.

Variable	Nivel menor	Nivel mayor	Nivel óptimo
Densidad, g/mL	0.25	0.85	0.5
Flujo, mL/min	0.50	2.0	1.8
Tiempo, min	1		1.42

La densidad del fluido no fue la más alta posible, como una consecuencia de que los componentes de interés en el aroma del café no son moléculas de pesos moleculares elevados e.g. pirazinas, furanos y guayacol. Además, los componentes estuvieron fácilmente disponibles para al CO₂, puesto que la matriz se componía de 3 mL de la bebida impregnados en lana de algodón previamente tratada con CO₂-SF, por esta razón el flujo fue alto, muy cercano al nivel mayor.

Teniendo en cuenta que los componentes estuvieron fácilmente disponibles y que el flujo de solvente fue alto, se necesitó de un periodo breve de tiempo para lograr extraer los componentes de interés. Lo discutido anteriormente presenta cierta similitud con la presente investigación: se encontraron niveles de flujo altos (2.8 kg/h) y tiempos de extracción cortos (65.6 min); lo cual podría ser una prueba de la disponibilidad de los antioxidantes para el solvente supercrítico en las hojas, tallos y flores de salvia molidos entre 0.50 y 1.00 mm.

En la investigación de Lancas y colaboradores[147], por medio de un diseño factorial fraccionado se determinó que las variables de mayor influencia en el rendimiento de aceite a partir de la semillas de soya (*Glycine max*) con C₅H₁₂-SF, son en orden de importancia: la presión de extracción, el tiempo dinámico y el tamaño de partícula. La temperatura tuvo un efecto despreciable en la respuesta. En la optimización *Simplex*, el tamaño de partícula no se tuvo en cuenta debido a la dificultad de obtener tamaños con los niveles calculados por el algoritmo *Simplex*. Esta fue una de las razones de no tenerla en cuenta en la investigación de la SFE de antioxidantes a partir de salvia, además de otros inconvenientes como el tiempo empleado en la caracterización de tamaño (tamizaje) y la limitada disponibilidad de material vegetal. Luego de 14 experimentos se determinó el óptimo con niveles cercanos a los límites experimentales superiores: presión, 11 MPa; tiempo dinámico, 26 min. Las mejores respuestas fueron obtenidas con los vértices 5, 11 y 14, pero debido a que el 5 se retuvo durante 9 *Simplex* fue escogido como el mejor. En el presente trabajo, la respuesta del vértice 12 fue notablemente más alta que las demás (vértices 13 y 14), por lo tanto ésta no se tuvo que escoger con base en otros criterios. Una causa importante para lo anterior, es que la respuesta fue conformada por tres observables, pues como se puede constatar en la **Tabla 20**, el rendimiento por sí solo no hubiese sido una buena elección como respuesta.

La misma metodología también se ha utilizado con éxito en la SFE de contaminantes a partir de suelos o matrices simuladas. Maio y colaboradores[148],

extrajeron clorobencenos y hexaclorociclohexanos del suelo contaminado. La investigación preliminar constó de un diseño factorial fraccionado 2^{4-1} , con el cual se determinó la influencia del tiempo dinámico de extracción, la temperatura, la presión y la proporción de modificador, para mejorar la eficiencia de extracción de los contaminantes. Mediante el método *Simplex* encontraron que la presión debía ser de 38.5 Mpa y el tiempo de 78 min, cuyos dominios experimentales fueron 20-45 Mpa y 15-45 min. El nivel óptimo del tiempo de extracción estuvo afuera del dominio experimental inicial, pero los autores buscaron que la recuperación de los analitos fuera del 95%, por lo tanto variaron ese parámetro. En el presente trabajo tal cambio no hubiera sido aceptable, debido al gasto excesivo de solvente con tiempos de extracción mayores de 120 min. Jo y Tang [149], emplearon un cartucho de extracción en fase sólida (SPE), para retener hidrocarburos poliaromáticos, (PAHs), que fueron extraídos con CO_2 -SF. En la primera etapa se llevó a cabo un experimento 2^3 , con el cual se evaluó la importancia de la presión, temperatura y tiempo de extracción. Luego se optimizaron el tiempo y la presión por la metodología *Simplex*. En estos trabajos, mediante réplicas, se verificaron los vértices óptimos y los resultados se compararon con técnicas convencionales, concluyéndose que la SFE, presenta porcentajes de recuperación superiores a las convencionales, con la ventaja de que produce menos residuos contaminantes.

La metodología *Simplex* en combinación con los diseños factoriales es una buena herramienta para encontrar las mejores condiciones en la extracción de metabolitos secundarios, pues no utiliza modelos que algunas veces son difíciles de comprobar, y no se requieren demasiados experimentos, sobre todo, cuando se consideran más de tres variables. La mayoría de artículos disponibles que han optimizado la SFE con CO_2 de metabolitos secundarios de origen vegetal, han aplicado la metodología de las superficies de respuesta, y no han utilizado más de 3 variables. En la **Tabla 22** se muestra un listado de dichas publicaciones y sus características principales.

Tabla 22. Estudios de optimización de la SFE de algunas matrices vegetales mediante la metodología de superficie de respuesta.

Autor y [Ref.]	Matriz vegetal	Factores evaluados	Observable	Factores importantes en orden
Dahn, <i>et.al.</i> [150]	Raíces de vetiver	Presión, temperatura y tiempo dinámico	Rendimiento de extracción	1. Presión* 2. Temperatura 3. Tiempo
Huang, <i>et.al</i> [151]	Pasta de tomate	Presión, temperatura y tiempo dinámico	Rendimiento de licopeno	1. Tiempo* 2. Presión* 3. Temperatura
Gelmez, <i>et al.</i> [152]	Germen de trigo tostado	Presión, temperatura y tiempo dinámico	Rendimiento de extracción, actividad antioxidante y contenido total de fenoles (por separado)	1. Presión* 2. Tiempo* 3. Temperatura*
Sonsuzer, <i>et.al.</i> [153]	Hojas <i>T. spicata</i>	Temperatura, presión y tiempo	Cantidad de monoterpenos oxigenados	1. Temperatura* 2. Tiempo 3. Presión
Liu, <i>et.al.</i> [154]	Rizomas de <i>C. yanhusuo</i>	Co-solvente, tiempo dinámico, temperatura y presión.	Cantidad de tetrahidro palmatina	1. Temperatura* 2. Tiempo 3. Co-solvente 4. Presión
Liu, <i>et.al.</i> [155]	Semillas de <i>P. edulis</i>	Temperatura, presión y tiempo	Rendimiento de extracción	1. Tiempo* 2. Presión* 3. Tiempo*
Kassama, <i>et.al</i> [156]	Cascara de tomate	Temperatura, presión, porcentaje de co-solvente	Cantidad de licopeno	1. Temperatura* 2. Presión* 3. Co-solvente (%)

*Efecto significativo al 95 % de confianza ($p \leq 0.05$)

Tabla 22. Continuación

Autor y [Ref.]	Matriz vegetal	Factores evaluados	Observable	Factores importantes en orden
Nyam, <i>et.al.</i> [145]	Semillas de <i>H. sabdariffa</i>	Presión, temperatura y flujo	Rendimiento de extracto	1. Flujo* 2. Temperatura* 3. Presión*
Nuralaini, <i>et.al.</i> [157]	Rizomas de <i>Z. zerumbet</i>	Temperatura, presión y cantidad de CO ₂	Cantidad de zerumbona	1. Cantidad de CO ₂ * 2. Temperatura* 3. Presión*
Oliveira, <i>et.al.</i> [80]	Frutos de <i>E. uniflora</i>	Presión y temperatura	Intensidad de sabor y olor de los extractos	1. Temperatura* 2. Presión
Safaralie, <i>et.al.</i> [158]	Raíces de <i>V. officinalis</i>	Temperatura, presión, tiempo dinámico y cantidad de co-solvente	Cantidad de ácido valerénico y sus derivados	1. Presión* 2. Tiempo* 3. Co-solvente* 4. Temperatura*

*Efecto significativo al 95 % de confianza ($p \leq 0.05$)

Las variables independientes de mayor consideración son la presión, la temperatura y el tiempo, en menor medida el co-solvente y el flujo se tienen en cuenta. En la mayoría de los casos las respuestas son el rendimiento de extracción y la cantidad de analitos. También se encuentran como respuestas las propiedades organolépticas, la actividad antioxidante y el contenido total de fenoles. En ningún trabajo considerado en la **Tabla 22** se optó por combinar las respuestas, en cambio, se construyeron modelos para cada respuesta por separado, lo cual resulta ser una ventaja de las superficies de respuesta. La presión de extracción, gracias a la gran influencia en las propiedades solventes de los fluidos supercrítico, resultó ser la variable que más afecta las extracciones SFE a partir de la mayoría de matrices consideradas. El tiempo dinámico de extracción, que para la SFE a partir de salvia fue la variable más importante, en todos los trabajos que se consideraron no fue importante.

4.3.6. Cantidad de antioxidantes en los extractos de la optimización. Al igual que la actividad antirradicalaria, las cantidades de los componentes fenólicos cuantificados fue más alta en la optimización de la SFE a partir de salvia, con respecto al diseño experimental. En la **Tabla 23**, se presentan las cantidades de los componentes cuantificados mediante HPLC-DAD.

Tabla 23. Cuantificación de los diterpenos y triterpenos encontrados en los extractos obtenidos de los vértices del *Simplex*.

Vértice simplex	Concentración, mg/g de extracto \pm s (n=2)		
	Ácido carnósico	Ácido ursólico	Carnosato de metilo
1	48.0 \pm 0.7	64.5 \pm 0.2	92 \pm 1
2	43.2 \pm 0.4	64.0 \pm 0.2	85 \pm 2
3	44.3 \pm 0.6	64 \pm 1	87 \pm 2
4	39.2 \pm 0.8	60.9 \pm 0.6	88 \pm 1
5	43.8 \pm 0.4	64.2 \pm 0.6	86.5 \pm 0.8
6	42.1 \pm 0.5	62.7 \pm 0.1	84 \pm 1
7	48.0 \pm 0.8	64.8 \pm 0.7	94 \pm 1
8	42 \pm 1	63.5 \pm 0.7	84 \pm 2
9	45.7 \pm 0.2	63.9 \pm 0.3	88.1 \pm 0.2
10	51 \pm 1	66.3 \pm 0.8	95 \pm 2
11	46.8 \pm 0.3	66.8 \pm 0.6	93.1 \pm 0.4
12*	57 \pm 1	68.9 \pm 0.8	99 \pm 2
13	50 \pm 2	62.7 \pm 0.3	95 \pm 1
14	50.2 \pm 0.9	64.9 \pm 0.2	97 \pm 1

De la misma manera que en la cuantificación realizada a los extractos obtenidos del diseño experimental (Ver **Tabla 16**), el componente más abundante fue el carnosato de metilo, y las cantidades de ácido ursólico (AUR) fueron las que presentaron menos variación. Todas las cantidades mayores de 53 mg/kg, y 94 mg/kg para el ácido carnósico y carnosato de metilo (ACA y CME), respectivamente, superaron la concentración más alta en los extractos obtenidos del diseño experimental (Experimento 32, Véase **Tabla 16, Sección 4.3.3**). Aunque la concentración de ACA en el extracto obtenido del vértice 12, mejoró con

respecto al diseño, no igualó lo reportado [57,137,138]. Si la capacidad antirradicalaria en la optimización fue mayor, es porque el ACA y el CME también fueron aislados en mayor cantidad, pues son considerados los componentes que presentan las actividades más altas entre los antioxidantes de la salvia y romero [113,111,124]. De otro lado, la concentración de AUR no presentó valores mayores que los del diseño experimental: 69 contra 72 mg/kg. Las correlaciones, r , de la capacidad antirradicalaria con el ACA y CME fueron de 0.849 y 0.708, que son ligeramente más altas que en el diseño experimental; y entre los diterpenos fue de 0.898 un poco menor que la del diseño.

4.3.7. Comparación de la cantidad de volátiles entre el HS y la fracción metanólica de los extractos. La medición de la cantidad de volátiles en algunos de los extractos obtenidos de la optimización, se realizó mediante dos procedimientos. El primero se realizó haciendo una extracción metanólica de los componentes polares en los extractos, y la segunda sometiendo a extracción el espacio de cabeza de los mismos (HS) en una fibra de PDMS/DVB. Para la selección de la fibra SPME y la temperatura de trabajo, se llevaron a cabo pruebas preliminares, las cuales son mostradas en el **Anexo B**, como guía se tuvo en cuenta la metodología consignada en el trabajo de Carrillo y Tena, con algunas modificaciones [159]. La cuantificación se realizó en dos cromatógrafos, equipados con columnas apolar (extractos metanólicos) y polar (extracto HS). Una razón para la utilización de las dos fases estacionarias diferentes fue tener una perspectiva más amplia de la composición, pues se pueden presentar coeluciones que son resueltas con la *f.e* adicional. El monitoreo del espacio de cabeza de los extractos reviste una importancia práctica y es el hecho de que la composición química de su fragancia será la misma cuando los extractos vayan a incorporarse en productos cosméticos y que percibirá el consumidor. A continuación en la **Figura 33**, se muestran los cromatogramas obtenidos del análisis de los extractos obtenidos mediante los dos procedimientos.

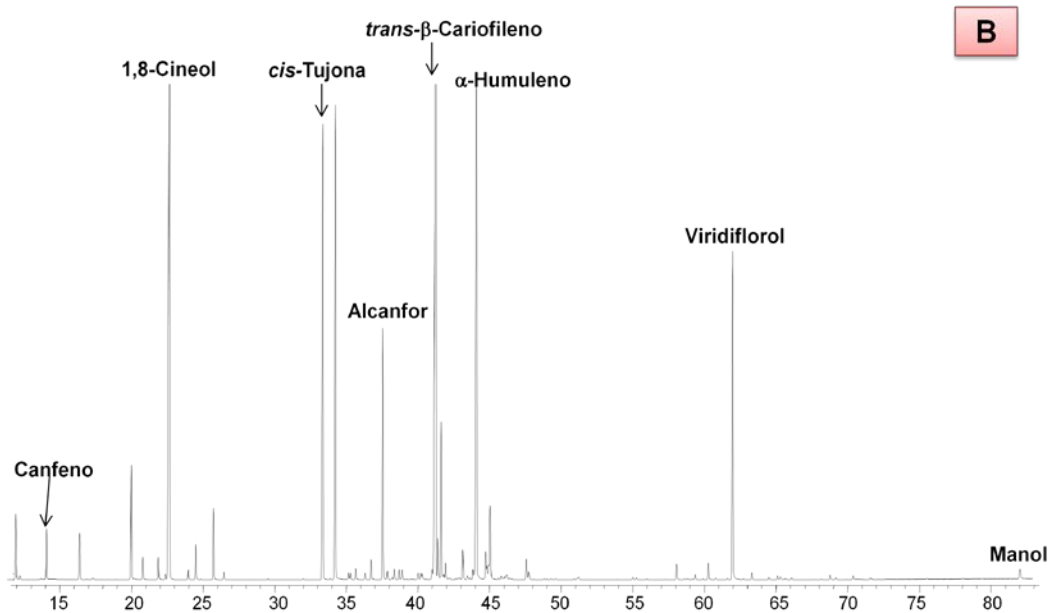
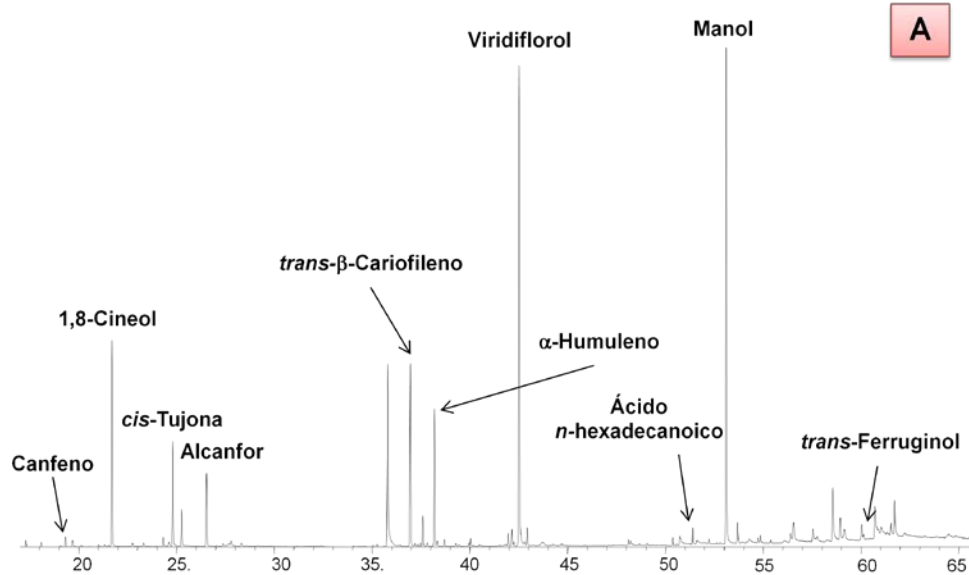


Figura 33.Perfiles cromatográficos de A. Extracto metanólico de volátiles y semivolátiles obtenido del vértice 12, GC-FID, columna DB-5 (60 m), *split* 1:30; B. Volátiles aislados mediante HS-SPME, GC-MS, columna DB-WAX (60 m), *split* 1:30.

Tabla 24. Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de salvia obtenidos a partir de la optimización y sometidos a extracción con metanol.

N° Pico	Compuesto	I _k (DB-5) ^a	Cantidad relativa, %±σ (n=3)				
			Vértice 1	Vértice 6	Vértice 9	Vértice 12	Vértice 14
2	α-Pineno	942	1.04±0.01	0.42±0.4	0.53±0.01	0.42±0.04	0.78±0.08
3	Canfeno	957	0.613±0.003	0.28±0.02	0.32±0.01	0.26±0.02	0.46±0.04
8	1,8-Cineol*	1039	11.2±0.1	6.4±0.6	7.0±0.2	5.7±0.5	8.1±0.8
9	γ-Terpineno	1066	0.24±0.02	0.12±0.01	tr ^b	0.12±0.02	0.17±0.02
11	<i>cis</i> -Tujona*	1113	4.04±0.03	2.1±0.2	2.14±0.07	1.9±0.1	2.7±0.2
12	<i>trans</i> -Tujona	1125	2.75±0.05	1.5±0.1	1.43±0.06	1.6±0.1	2.2±0.02
13	Alcanfor	1157	3.31±0.04	2.3±0.2	2.23±0.07	1.9±0.2	2.5±0.2
19	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1443	6.86±0.09	4.4±0.4	4.2±0.1	3.8±0.3	4.8±0.4
23	Aromadendreno	1462	0.94±0.03	0.64±0.06	0.69±0.03	0.51±0.04	0.64±0.04
25	α-Humuleno*	1477	4.8±0.1	3.2±0.4	3.0±0.1	2.7±0.2	3.5±0.3
31	Espatuleno	1601	0.33±0.03	0.27±0.02	0.30±0.02	0.19±0.01	0.24±0.03
32	Óxido de cariofileno	1610	0.38±0.05	0.26±0.02	0.30±0.02	0.25±0.02	0.32±0.04
33	Viridiflorol	1620	13.2±0.3	11±1	11.0±0.3	8.4±0.8	10.2±0.9
35	Epóxido de humuleno II	1638	0.51±0.07	0.34±0.04	0.39±0.07	0.33±0.02	0.44±0.07
39	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	1968	1.4±0.1	1.03±0.03	1.2±0.1	1.0±0.2	1.3±0.1
42	Manol	2094	29.47±0.04	27±2	28±1	20±1	24±0.2
46	<i>trans</i> -Ferruginol	2361	0.28±0.02	0.4±0.1	0.4±0.1	0.46±0.06	0.4±0.1
48	β-Sitoesterol	2843	tr	1.6±0.1	2.56±0.04	2.5±0.2	3.4±0.3
Compuestos reconocidos e identificados, %			87.0	71.5	74.0	60.7	72.6
Hidrocarburos monoterpénicos			3.6	1.3	1.4	1.4	2.7
Monoterpenos oxigenados			21.8	12.7	13.1	11.5	15.9
Hidrocarburos sesquiterpénicos			14.9	9.8	9.3	8.2	10.5
Sesquiterpenos oxigenados			14.4	11.6	12	9.2	11.2
Diterpenos			29.7	27.3	28.1	20.7	24.0
Triterpenos			0	1.8	2.6	2.5	3.4
Ácidos grasos y ésteres derivados			2.3	3.8	4.7	4.3	2.8
Ceras			0.3	3.1	2.9	3.4	2.2

^a Índice de retención calculado con base en los tiempos de retención obtenidos en una columna DB-5 (f.e. apolar).

^b Compuesto detectado a nivel de trazas (<1.0%).)

* Identificado por comparación con los índices de retención y espectros de masas obtenidos de patrones de referencia certificados.

Los compuestos resaltados se especifican en la **Figura 33**.

Tabla 25. Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de salvia obtenidos a partir de la optimización y monitoreados mediante HS-SPME.

N° Pico	Compuesto	I _R (DB-WAX)	Cantidad relativa, %±σ (n=3)				
			Vértice 1	Vértice 6	Vértice 9	Vértice 12	Vértice 14
1	α-Pineno	1024	0.66±0.05	1.25±0.04	1.4±0.1	1.21±0.05	1.83±0.09
3	Canfeno	1074	0.43±0.02	0.87±0.03	0.94±0.09	0.71±0.05	1.29±0.05
5	β-Mirceno	1151	0.94±0.04	1.47±0.03	2.7±0.2	2.02±0.08	2.87±0.07
9	1,8-Cineol*	1212	13.1±0.5	14.9±0.8	18.3±0.9	17.7±0.9	18.6±0.3
11	γ-Terpineno	1242	0.522±0.009	0.56±0.01	0.88±0.02	0.61±0.01	0.77±0.04
12	p-Cimeno	1270	0.41±0.01	0.78±0.04	1.60±0.05	1.22±0.05	1.50±0.06
14	cis-Tujona*	1402	11.0±0.3	8.02±0.09	12.1±0.5	9.9±0.5	9.63±0.07
15	trans-Tujona	1421	4.2±0.1	7.31±0.05	9.8±0.6	10.4±0.5	9.91±0.07
21	Alcanfor	1498	5.3±0.1	4.15±0.03	4.4±0.3	4.7±0.3	4.5±0.1
30	trans-β-Cariofileno	1602	23.1±0.7	22.04±0.04	15±1	18±1	14.0±0.4
32	Aromadendreno	1610	2.9±0.1	3.5±0.2	3.0±0.3	2.4±0.2	2.1±0.1
38	α-Humuleno*	1673	15.3±0.4	15.6±0.1	12.3±0.2	12.5±0.6	14.5±0.7
39	γ-Muruleno	1698	0.96±0.02	0.600±0.001	0.46±0.04	0.47±0.05	0.63±0.05
49	Óxido de cariofileno	2008	0.57±0.03	0.311±0.006	0.34±0.02	0.37±0.03	0.34±0.04
53	Espatuleno	2137	0.17±0.01	0.17±0.01	0.142±0.004	0.15±0.01	0.13±0.02
52	Viridiflorol	2112	7.8±0.3	7.20±0.04	6.0±0.2	7.1±0.3	6.28±0.05
53	Espatuleno	2137	0.17±0.01	0.17±0.01	0.142±0.004	0.15±0.01	0.13±0.02
58	Manol	2510	0.37±0.01	0.332±0.008	0.25±0.01	0.31±0.01	0.28±0.03
Compuestos reconocidos e identificados, %			99.8	99.3	99.9	99.7	99.8
Hidrocarburos monoterpénicos			4.7	6.8	10.6	7.9	11.7
Monoterpenos oxigenados			37.3	31.2	47.4	46.0	45.3
Hidrocarburos sesquiterpénicos			48.6	47.0	34.7	37.5	35.5
Sesquiterpenos oxigenados			8.9	8.0	6.8	8.0	7.1
Diterpenos			0.4	0.3	0.2	0.3	0.3

^a Índice de retención calculado con base en los tiempos de retención obtenidos en una columna DB-WAX (f.e. polar).

* Identificado por comparación con los índices de retención y espectros de masas obtenidos de patrones de referencia certificados. Los compuestos resaltados se especifican en la **Figura 33**.

En la **Figura 33**, no solamente se notan las diferencias en el orden de elución de los componentes, sino también, las intensidades de los picos correspondientes a un mismo compuesto. Varios de los terpenos más volátiles que se aislaron con la fibra no fueron detectados en la fracción de extracto tratada con metanol e.g. limoneno, β -felandreno, trans- β -ocimeno, terpinoleno, entre otros. Estos contrastes se deben principalmente a la extracción metanólica, pues de esta manera se eliminaron algunos componentes o disminuyeron sus cantidades, producto de las diferencias de polaridad entre los terpenos y el solvente. También, los detectores empleados para la obtención de los dos cromatogramas pudieron influir en dichas diferencias (FID y MSD), pues los factores de respuesta son diferentes. Dos razones fueron las que influyeron en la aplicación del tratamiento con metanol: (1) Eliminar en lo posible ácidos grasos y ceras que son compuestos de peso molecular alto y pueden disminuir la vida útil de la columna cromatográfica impregnando la fase estacionaria, y (2) Debido a que el procedimiento para la medición de la capacidad antirradicalaria se llevó a cabo en metanol (método hidrofílico), se buscó saber cuáles componentes volátiles y semivolátiles pudieron influir (en menor medida) en la actividad de los extractos. Algunos monoterpenos como la *cis*-tujona, *trans*-tujona y α -terpineol, y diterpenos como el manol y *trans*-ferruginol, también tienen influencia en la capacidad antirradicalaria del AE de salvia [63,103]. En las **Tablas 24** y **25**, se resaltan mejor dichas diferencias, el manol que fue el componente mayoritario en el primer caso es uno de los componentes de menor cantidad relativa en el segundo, lo cual no reforzó la hipótesis sobre el quimiotipo manol colombiano, aunque el tiempo de exposición del HS a la fibra SPME no favoreció la extracción de dicho componente. Las familias de componentes de menor volatilidad como ácidos grasos, ésteres, ceras y triterpenos no se detectaron por HS-SPME. En términos generales, de la **Tabla 24**, se nota que en el vértice 1 están las cantidades relativas más altas de volátiles, mientras que en el vértice 12 las más bajas, este mismo comportamiento se aprecia en la **Tabla 25a** partir de la elución de los componentes

sesquiterpénicos. En la **Figura 34** se muestran las comparaciones de las cuantificaciones de cada metodología para tres de los componentes mayoritarios.

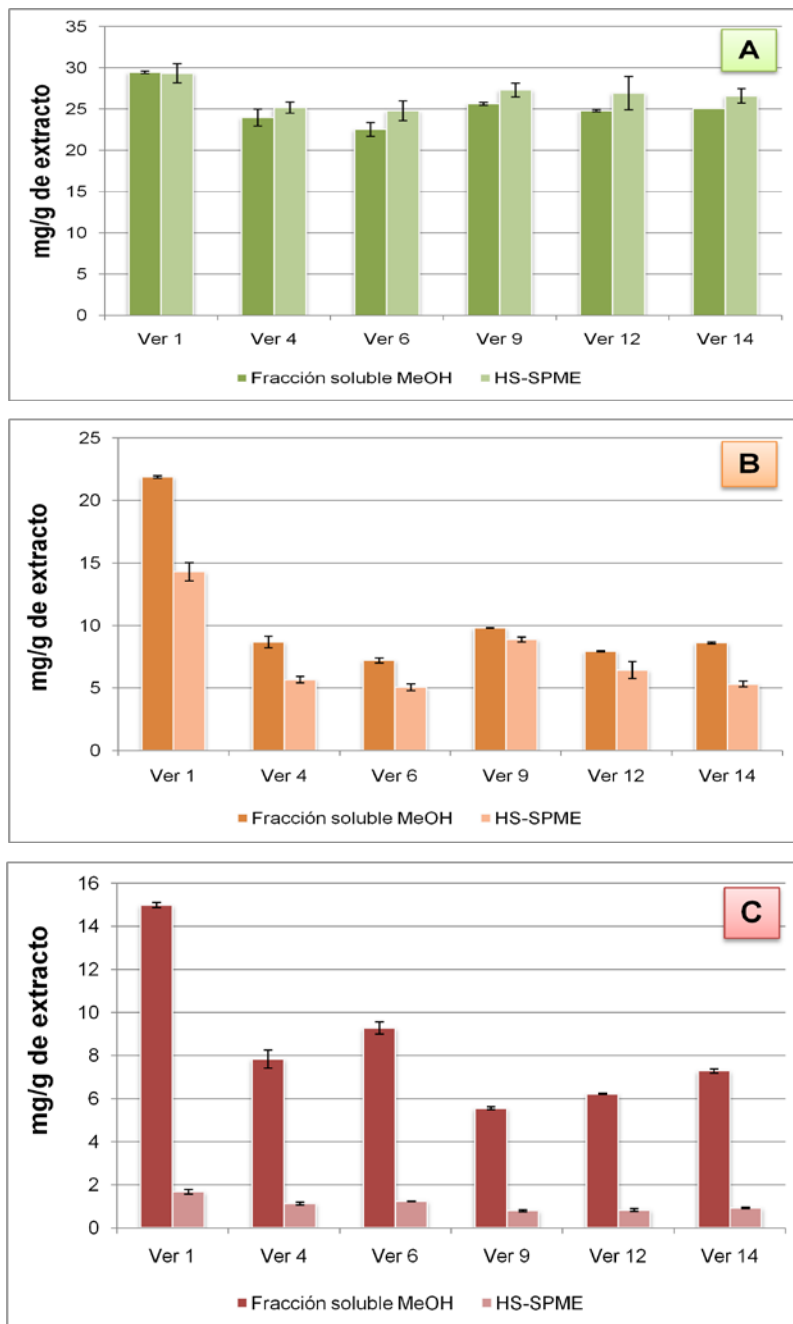


Figura 34. Comparación de la cantidades de A. 1,8-Cineol; B. *cis*-Tujona y C. α -Humuleno, determinadas mediante dos metodologías diferentes.

Las curvas de calibración se muestran en el **Anexo A2**. En general los errores de la metodología HS-SPME-GC-MS son mayores, una causa de ello, es que la preparación de la muestra depende de un número mayor de variables. A medida que la volatilidad de los compuestos disminuye, sus cantidades aumentan en las fracciones metanólicas. Para el 1,8-cineol, las cantidades tanto en el espacio de cabeza como en la fracción metanólica son equivalentes, mientras que la cantidad de α -humuleno en ésta última, es muy superior que la cantidad del espacio de cabeza, esto se debe a que el tiempo de exposición de la fibra en el espacio de cabeza no favoreció la adsorción de los sesquiterpenos en el recubrimiento de PDMS/DVB. El tiempo de exposición de la fibra empleado (50 min), se debió a que en los recubrimientos donde actúa la adsorción como mecanismo principal, los equilibrios se alcanzan en tiempos muy prolongados [160]. Un antecedente en las diferencias entre las inyecciones directas de muestras y la desorción del espacio de cabeza por medio de una fibra de SPME (PDMS/DVB), se pone de manifiesto en el trabajo de Cuy y Merlo [161], en el cual se detectaron 74 componentes mediante inyección directa de un perfume, mientras que por SPME sólo 44, de éstos, 12 no fueron detectados mediante el primer procedimiento. Todos los componentes detectados por inyección directa se detectaron en el espacio de cabeza. El componente mayoritario por inyección directa fue el *cis*-dihidrojasmonato de metilo (22.8%) y por SPME fue el limoneno (24.0%) [161]. En la presente investigación, mediante SPME se detectaron 58 componentes, el componente mayoritario fue el *trans*- β -cariofileno; en la fracción metanólica 88 compuestos y el compuesto mayoritario fue el manol.

4.3.8. Verificación del vértice óptimo. Luego de haber encontrado una respuesta superior a todas las demás (Vértice 12), se procedió a comprobar que efectivamente esta combinación de niveles de los factores fue la más efectiva en la obtención de la mejor respuesta. El efecto sobre la respuesta cuando un factor se varía mientras los otros se mantienen en sus niveles óptimos se puede analizar por turnos para cada factor. Este procedimiento puede ser utilizado para verificar

la optimización. También indica a qué nivel son importantes para cada factor las desviaciones con respecto del nivel óptimo: cuanto más acusado es el pico de respuesta en la región del óptimo más crítica es la variación en el nivel del factor [26,143]. Vale la pena anotar que luego de un seguimiento a las presiones, temperaturas y flujo durante las pruebas preliminares, las pruebas de secado y de tamaño de partícula, se hallaron las variaciones de estas variables producidas por el equipo, las cuales fueron: presión de extracción +0.4 MPa, -0.3 MPa; temperatura de separación +3 K, -3 K; presión de separación +0.3 MPa, -0.2 MPa; y flujo +0.00 kg/h, -0.06 kg/h. Teniendo en cuenta lo anterior, los tamaños de paso y las diferencias en los niveles de los vértices, debieron ser mayores que estos valores. En la **Tabla 26**, se muestran las respuestas al variar de a uno los factores, así mismo el resultado al realizar dos réplicas de las condiciones del vértice 12.

Tabla 26. Resultados de la verificación del punto óptimo en la SFE de salvia.

Código	D, min	F, kg/h	P, Mpa	H, K	R, %	CA, $\mu\text{mol Trolox}^{\circ}/\text{mg extracto}$	CTF, mg A.G./g de extracto	Combinación de respuestas
D▲	80.6	2.82	47.3	313	2.1	1.92±0.03	66.8±0.3	81.9
D▼	50.6	2.82	47.3	313	1.8	2.10±0.02	71.4±0.4	89.3
F▲	65.6	3.30	47.3	313	1.7	2.00±0.01	68.9±0.1	82.7
F▼	65.6	2.34	47.3	313	1.5	1.80±0.02	55.1±0.2	63.7
P▲	65.6	2.80	50.0	313	1.9	2.05±0.04	72.3±0.2	89.0
P▼	65.6	2.80	43.3	313	1.8	1.49±0.03	63.0±0.3	59.3
H▲	65.6	2.80	47.3	319	1.7	1.91±0.02	66.8±0.3	77.6
H▼	65.6	2.80	47.3	307	1.9	2.11±0.01	72.1±0.1	91.1
OPT-I	65.6	2.80	47.3	313	1.8	2.40±0.01	74.0±0.2	100.9
OPT-II	65.6	2.80	47.3	313	1.9	2.47±0.01	74.7±0.3	101.5

P: Presión de extracción; F: Flujo del fluido; D: Tiempo dinámico; H: Temperatura de separación; R: Rendimiento; CA: Capacidad antirradicalaria; CTF: Contenido total de fenoles; ▼ y ▲: Variación por debajo y por encima, respectivamente, del valor óptimo del factor.

Ninguna respuesta de las variaciones de cada factor resultó ser mayor que las del vértice 12, por lo tanto, se puede afirmar que la combinación de factores encontradas en la optimización efectivamente conduce a la mejor respuesta, además las respuestas de las dos replicas (OPT I y II), confirman el resultado obtenido anteriormente. El error entre las respuestas de las tres réplicas del

óptimo (0.000137) fue un orden de magnitud menor que el error de los duplicados de las pruebas de secado y tamaño de partícula (0.00144). Los factores que producen los picos de respuesta (en una gráfica si las demás variables se dejan constantes) más y menos acusados en las dos direcciones son el flujo y el tiempo dinámico, respectivamente. Lo anterior se contrapone a lo encontrado en el análisis de la varianza del diseño factorial y a los resultados de la optimización, puesto que el factor que da lugar al pico menos acusado, revela que el cambio en dicho factor no produce grandes cambios en la respuesta, una razón para esta oposición es la diferencia entre los rangos de observación, ya que en el caso de la validación, es más estrecho que en el diseño factorial y la optimización. Al aumentar el tiempo dinámico la respuesta disminuye de la misma manera que en la optimización, pero no en el diseño. Al incrementar el flujo y la presión se obtienen respuestas más altas, de la misma manera que en el diseño y el *Simplex*, y finalmente, si la temperatura de separación se disminuye la respuesta aumenta.

4.3.9. Comparación de las respuestas entre el óptimo y los extractos etanólicos. La decisión de emplear etanol como solvente de comparación con la extracción SFE de antioxidantes, se debió a que éste junto con el agua, son los únicos solventes reconocidos como seguros para la salud humana. No se utilizaron proporciones de agua en el etanol para la extracción, debido a que no se contaba con un sistema de eliminación de agua como un liofilizador, y cualquier método adicional hubiese implicado el uso de otro solvente adicional. A los dos extractos etanólicos obtenidos no fue posible retirarles completamente la coloración verdosa, aunque con el tratamiento con carbón activado descrita en el **Numeral 3.4.2.**, perdieron un poco de este color. El rendimiento fue superior al de los extractos SFE, aunque la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles fue menor. La respuesta final no fue estadísticamente diferente de la de los extractos SFE. En la **Figura 35**, se expone la diferencia entre las tres respuestas individuales y la combinación lineal de estas.

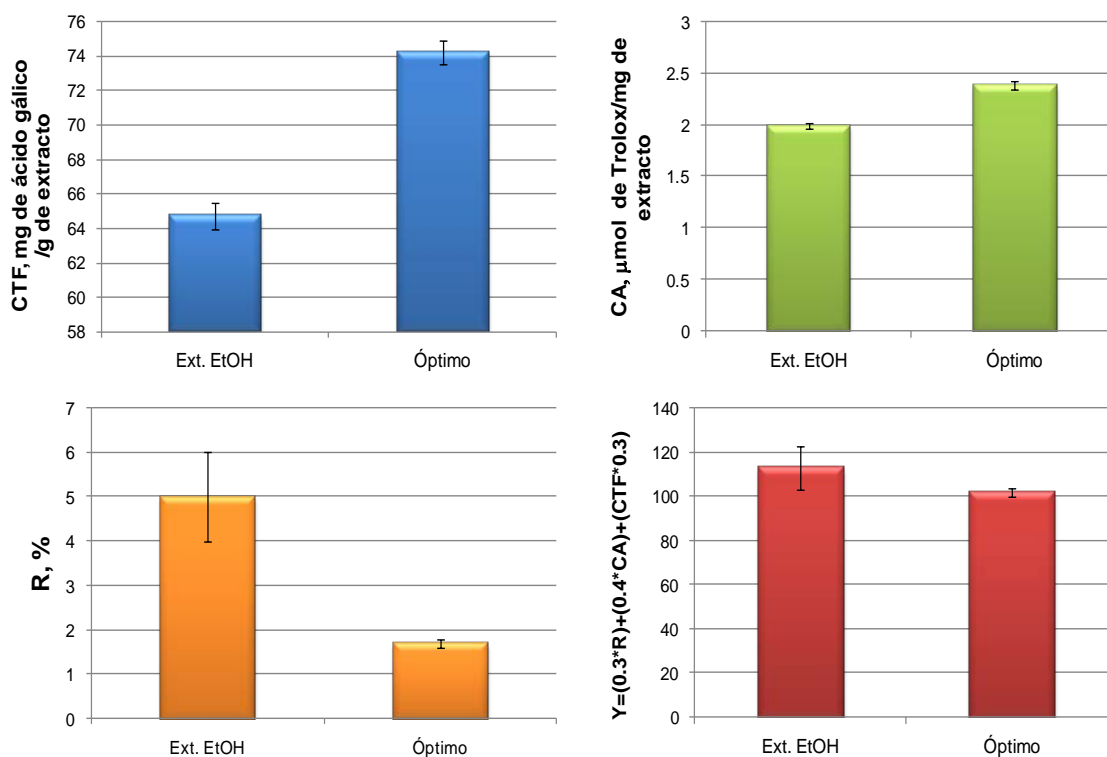


Figura 35. Comparación de las respuestas en dos tipos de extracción de antioxidantes a partir de salvia.

Los valores más bajos para la capacidad antirradicalaria y el contenido de fenoles se debieron a que los extractos etanólicos presentaron un contenido alto de clorofilas que pudieron afectar la actividad. El uso de etanol en combinación con agua (70:10), hubiese sido positivo para la capacidad antirradicalaria; según el trabajo de Durling y colaboradores [32], cuando se empleó esta relación de etanol-agua el contenido de ácido rosmarínico en el extracto fue del 70%, mientras que cuando se usó etanol puro, el contenido decreció a menos del 10%, de otro lado, las cantidades de ácido carnósico y sus derivados en el extracto con etanol al 99.8%, fueron las más altas encontradas (70%), mientras que en el extracto etanol-agua (70:30) fueron del 55%. En la presente investigación no fue detectado el ácido rosmarínico mediante ninguno de los dos procedimientos de extracción (**Figura 36**).

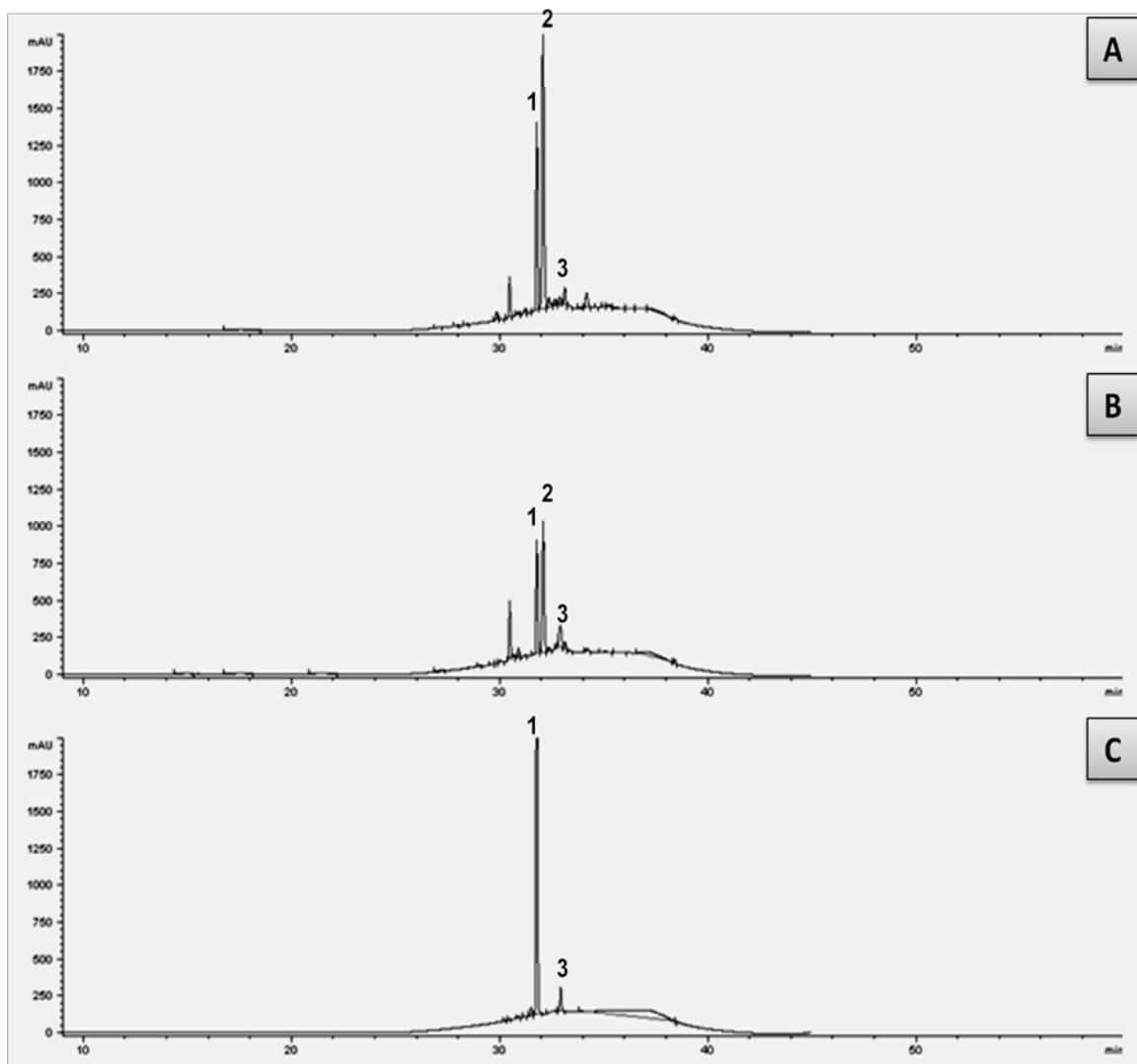


Figura 36. Perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPLC-DAD de: A. Extracto SFE (óptimo), B. Extracto obtenido etanol, C. Patrones de los ácidos carnósico (1) y ursólico (3). Fase móvil conformada por 80 % metanol y 20% agua (0.1% ácido ortofosfórico). Los números de cada compuesto se muestran en la **Tabla 27**.

Los valores del contenido total de fenoles para el óptimo, 74.6 mg ácido gálico/g de extracto, y del extracto etanólico 64.7 mg ácido gálico/g de extracto, superan los obtenidos por Grzegorzcyk y colaboradores [138], 42 mg ácido gálico/g de extracto, los cuales midieron dicha propiedad en extractos metanólicos. Pero si se

expresa el contenido total de fenoles como mg de ácido galico/g de material vegetal, el óptimo y el extracto etanólico presentan valores de 1.3 y 3.2 respectivamente, resultaron ser más bajo y alto que en el reporte de Zheng y Wang 2.8, quienes obtuvieron extractos acuosos de salvia [118].

La comparación de dos extractos comerciales de salvia [21], mostró que el extracto con etanol presentó como compuesto mayoritario (entre los componentes reconocidos) el ácido rosmarínico, 4.9 % y CME, 0.24 %; y en el extracto supercrítico se obtuvo ACA, 0.41 % y CME, 0.92%, sin presencia del ácido rosmarínico. El poder antioxidante de los dos extractos no fue estadísticamente diferente. En la extracción SFE de antioxidantes a partir de hojas de *R. officinalis* [69], se encontró que el ácido carnósico se extrajo en más del doble (35.7 mg/g) de la cantidad del extracto metanólico (15.9 mg/g).

Tabla 27. Cantidades de los componentes detectados y reconocidos mediante HPLC-DAD.

Extracto	Concentración, mg/g de extracto \pm s		
	(1) Ácido carnósico	(3) Ácido ursólico	(2) Carnosato de metilo
SFE (Óptimo) (n=3)	54 \pm 3	65.3 \pm 0.6	97 \pm 2
Etanólico (n=2)	33.5 \pm 2	297 \pm 8	43.6 \pm 0.7

Al igual que en la **Figura 35**, la **Tabla 27** muestra que los coeficientes de variación en las determinaciones realizadas tienen coeficientes de variación menores del 10 %, lo cual hace que las réplicas realizadas en el equipo utilizado sean aceptables según las buenas prácticas en el laboratorio. Las cantidades de ACA y CME fueron mayores en los extractos SFE que en los extractos obtenidos con etanol, llegando inclusive a ser el doble, reforzando lo encontrado en las investigaciones

comentadas anteriormente [21,69]. Pero la cantidad de AUR fue más alta en el extracto etanólico (5.0 mg/g de MV), y además mayor que en los estudios tratados en la **Sección 4.3.3.**[30,139],(0.39-1.30 mg/g de MV). Teniendo en cuenta que los diterpenos fenólicos ACA y CME, son de los componentes con las mejores características antioxidantes, hay congruencia entre las cantidades de estos compuestos en los extractos y los resultados de la capacidad antirradicalaria.

4.4.OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON CO₂-SF DE ANTIOXIDANTES DE TOMILLO

El procedimiento de optimización de *T. vulgaris* se realizó bajo la misma metodología empleada para *S. officinalis*. Se tuvieron en cuenta los mismos factores, pero su importancia en la combinación de respuestas no fue la misma, como se muestra a continuación.

4.4.1. Resultados del diseño experimental factorial fraccionado.En el diseño experimental, los experimentos se llevaron a cabo en orden aleatorio para eliminar el error sistemático. Cada día se realizaron dos experimentos, para un total de 16 días. Las mediciones de la CA y el CTF se realizaron después que todos los experimentos concluyeron, debido a la disponibilidad de los equipos.

En la **Tabla 28** se muestran las tres respuestas obtenidas a partir del diseño factorial empleado. El nivel alto de (cuando la letra t aparece en el código) la temperatura tuvo una influencia positiva en los resultados de la CA, CTF e inclusive del rendimiento. Lo anterior no se esperaba pues como se había comentado, las temperaturas altas (>40 C) hacen que algunos compuestos antioxidantes se degraden [2-5]. La temperatura de 80 °C mejoró la recuperación de los componentes antioxidantes pues la volatilidad aumentó, y se aislaron más fácilmente por el CO₂ [2].

Tabla 28. Resultados obtenidos a partir del diseño factorial fraccionado 2^{7-2} para tomillo.

N° Experimento	Código*	R, %	CA, μmol de Trolox®/ mg de extracto	CTF, mg de ácido gálico/ g de extracto	Combinación de respuestas, Y
1	gh	0.2	0.93±0.05	61.7±0.9	35.2
2	p	0.3	1.19±0.03	66.8±0.3	47.1
3	t	0.2	1.37±0.02	59±1	45.8
4	ptgh	0.4	1.64±0.03	62.7±0.2	59.1
5	f	0.5	1.03±0.03	34.2±0.5	22.9
6	pfgh	0.5	1.16±0.01	42.1±0.4	32.1
7	tfgh	0.5	1.52±0.01	66.2±0.3	59.0
8	ptf	0.8	1.51±0.01	68±2	64.5
9	dh	0.5	1.08±0.04	45.9±0.4	32.8
10	pdg	1.0	1.13±0.03	54.5±0.6	47.2
11	tdg	1.6	1.52±0.02	69.3±0.9	77.8
12	ptdh	0.9	1.88±0.03	68.5±0.7	77.3
13	fdg	0.3	1.4±0.3	45.9±0.4	40.3
14	pfdh	0.5	1.38±0.02	54.4±0.5	46.9
15	tfdh	0.9	1.14±0.02	39.9±0.3	36.6
16	ptfdg	2.0	1.50±0.05	53.7±0.2	72.8
17	eg	0.3	1.27±0.03	37.0±0.3	29.2
18	peh	0.2	0.53±0.03	27.6±1	0.13
19	teh	0.3	0.77±0.03	58.2±1	29.4
20	pteg	1.3	1.14±0.02	65.0±0.9	59.5
21	feh	0.3	0.67±0.04	32.8±0.9	9.1
22	pfeh	0.8	0.89±0.04	53.1±0.6	36.5
23	tfg	1.3	0.91±0.04	36.7±0.3	33.1
24	ptfeh	1.1	1.44±0.02	52.8±0.3	50.8
25	de	0.5	0.97±0.03	31.1±0.5	19.1
26	pdegh	0.9	1.06±0.04	48±2	39.2
27	tdegh	1.2	1.34±0.04	65.9±0.8	63.9
28	ptde	1.1	1.75±0.08	65.9±1	74.5
29	fedgh	0.5	1.05±0.08	37.3±0.4	25.8
30	pfde	0.6	1.08±0.02	41.0±0.9	30.6
31	tfde	1.4	1.25±0.01	57.8±0.8	59.7
32	ptfdegh	1.9	1.93±0.01	67.2±0.3	92.2

*p: Presión de extracción; t: Temperatura de extracción; f: Flujo del fluido; d: Tiempo dinámico; e: Tiempo estático; g: Presión de separación; h: Temperatura de separación.

De los 15 experimentos que dieron capacidades antirradicalarias que sobrepasaron la mediana, 13 coinciden con los que cumplieron esta misma

condición para el contenido total de fenoles, por lo cual se esperaba que las dos propiedades hubiesen tenido una buena correlación. Sin embargo el coeficiente de correlación entre la CA y CTF no fue bueno $r=0.674$, por las mismas razones expuestas en la **Sección 4.3.1**, aunque este valor fue un poco más alto que en el caso de salvia. Así mismo, los otros dos coeficientes de correlación, entre estas dos propiedades y el rendimiento mostraron valores mayores que para salvia.

En el trabajo de Dapkevicius y colaboradores [162], el rendimiento de extracto SFE fue del 0.6%, bajo una presión y temperatura de extracción de 30 MPa y 313 K, respectivamente. Se emplearon tiempos de extracción de 5 y 25 min para el estático y dinámico, respectivamente. Esta extracción se puede comparar con el experimento 17, que tuvo las siguientes condiciones: presión de extracción, 30 MPa; temperatura de extracción, 313 K; tiempo dinámico, 30 min; y tiempo estático de 30 min. En el reporte de la literatura el rendimiento fue del doble respecto al del experimento 17, aunque en este último el tiempo estático fue 10 veces mayor. Las causas de ello se debieron a que las partes de la planta empleadas fueron diferentes, pues Dapkevicius y colaboradores, utilizaron hojas e inflorescencias solamente, también a que emplearon un secado a temperatura ambiente y utilizaron un colector con solvente en una trampa fría a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ lo que redujo las pérdidas de volátiles. La actividad antioxidante de los extractos SFE, fueron mejores que las de otros tipos de extractos como hidrodestilación, extractos en acetona y agua-metanol [162]. Proestos y colaboradores [31] obtuvieron extractos en etanol-agua después de realizar una hidrólisis al material vegetal; la medición del contenido de fenoles resultó ser de 19,8 mg de ácido gálico/g de extracto, que es muy inferior al más alto obtenido del diseño experimental del presente trabajo que fue 69.3 mg de ácido gálico/g de extracto. Algunas de las razones que pueden causar estas diferencias son: el tipo de material vegetal, distintas polaridades de los solventes de extracción, la degradación de los fenoles después de hidrolizar y las polaridades de los solventes de extracción.

4.4.2. Análisis de factores. A continuación en la **Figura 37**, se observan los factores y las combinaciones de segundo nivel entre ellos, que se alinearon y no lo hicieron en la gráfica de probabilidad normal. Los factores que produjeron cambios en la respuesta mayores al error aleatorio son: la temperatura de extracción, tiempo dinámico, presiones de extracción y separación y tiempo estático de extracción, pero ninguna interacción entre ellos mostró este comportamiento. Este tipo de gráfico fue tomado como el primer filtro para tener en cuenta los factores que se emplearon en la optimización.

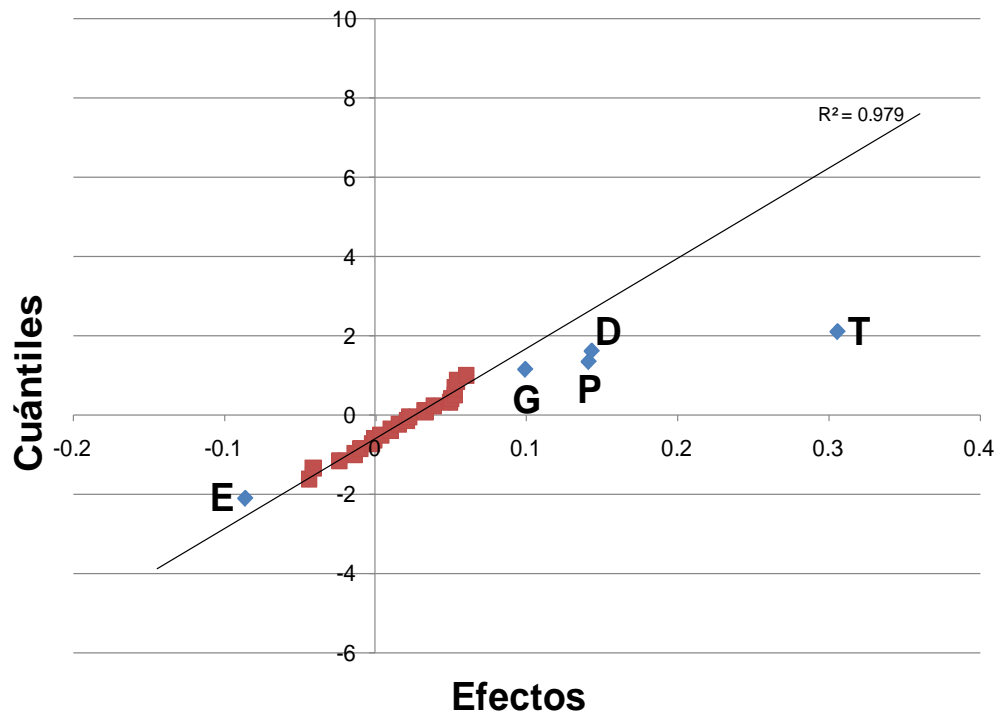


Figura 37. Gráfica de probabilidad normal para los efectos de primer y segundo orden en la respuesta combinada del rendimiento, la capacidad antirradicalaria y el contenido de fenoles (T: Temperatura de extracción; D: Tiempo dinámico; P: Presión; G: Presión de separación; E: Tiempo estático).

Según el análisis de varianza del diseño, no solamente los cinco factores enunciados anteriormente influyeron en la respuesta, también lo hicieron la

temperatura en el colector y 8 interacciones de segundo orden entre estos 5 factores más el flujo, pero para descartar el mayor número de factores, se empleó el gráfico de distribución normal como discriminador y el ANOVA como confirmatorio. Las sumas de cuadrados de los factores tenidos en cuenta en la **Tabla 29** y las interacciones entre estos representan más del 91 % de la variabilidad de la combinación de respuestas.

Tabla 29. Análisis de la varianza para los efectos significativos según el gráfico de distribución normal.

Factor	Suma de cuadrados	F	F _{1/5}	Pr>F
E	0.05923	34.44		2.04E-03
G	0.07854	45.66		1.08E-03
P	0.15900	92.12		2.06E-04
D	0.16360	95.45	6.61	1.93E-04
T	0.74690	434.3		4.71E-06
Error	0.00172			

T: Temperatura de extracción; D: Tiempo dinámico; P: Presión; G: Presión de separación; E: Tiempo estático

En la gráfica del comportamiento de la respuesta con respecto a los efectos más importantes (**Figura 38**), son dos los indicadores de la magnitud de su influencia: (1) El rango de valores de respuesta (eje Y) abarcados por la línea recta y (2) La pendiente de esta línea. La temperatura de extracción es la variable que presenta en mayor grado estas dos características. La temperatura influye de tres maneras en la respuesta: aumenta la densidad del fluido, incrementa la volatilidad de los componentes y puede llegar a degradarlos [2,5]. Este factor influyó de manera positiva, lo cual significa, que aumentó la volatilidad de componentes antioxidantes sin degradarlos. Aunque este comportamiento es representado por la línea recta entre dos puntos (313 y 353 K) solamente, no se sabe si hay mínimos o máximos en este rango.

El tiempo dinámico influyó positivamente pues una mayor cantidad de CO₂ entró en contacto con la matriz vegetal, es decir, la relación masa de CO₂/masa de MV, aumentó y por lo tanto la capacidad de extracción. En el estudio de García y colaboradores [64] se realizaron experimentos para determinar el tiempo de extracción necesario para alcanzar el máximo rendimiento a partir de hojas secas de tomillo, con el mismo equipo utilizado en la presente investigación y concluyeron que fueron necesarios 240 min para alcanzar de manera constante el 3.0 % de rendimiento. En páginas anteriores se ha puesto de manifiesto que un tiempo mayor de 120 min hubiese acarreado costos que no se hubiesen podido asumir teniendo en cuenta las características de la investigación que ya se había planeado. En el trabajo citado se obtuvieron los extractos a partir de hojas solamente, lo cual hace, que los rendimientos aumenten notoriamente teniendo en cuenta que la mayoría de masa en una planta de *T. vulgaris* está representada por sus tallos. La presión incrementó la densidad haciendo más eficiente la solvatación de aquellos componentes con características antioxidantes, y por lo tanto, la capacidad antirradicalaria de los extractos. La presión de separación posiblemente mejoró la precipitación de aquellos componentes antioxidantes en las paredes del colector, a expensas de la solvatación de componentes de bajo peso molecular como monoterpenos, que se pudieron evacuar junto al CO₂ por el venteo.

Cuando se pasó del nivel inferior al superior en las variables graficadas, mejoró la respuesta. Los resultados obtenidos para la presión y temperatura de extracción y el tiempo dinámico están de acuerdo con los resultados de Dawidowicz y colaboradores [163]. No obstante para el tiempo estático, que no aparece en la figura, el aumento de 0 a 30 min afectó negativamente la respuesta. Si se toma cada observable individualmente para el tiempo estático, el rendimiento se benefició, pero no así la capacidad antirradicalaria y el contenido de fenoles. Una razón para dicho comportamiento es la solvatación de componentes de mayor peso molecular como ceras o ácidos grasos sin actividad antioxidante.

La extracción de los metabolitos del tomillo a diferencia de la de salvia, no dependió del flujo, posiblemente porque los componentes en la matriz vegetal estuvieron fácilmente disponibles para el solvente, esto produce que el equilibrio entre la cantidad de metabolitos retenidos y disueltos se alcance rápidamente durante la primera etapa de extracción [105]. Por su parte la temperatura de separación no degradó los componentes con actividad ni mejoró su recuperación sobre las paredes del colector. Se optimizaron los factores listados en la **Tabla 29** y los dos factores restantes se fijaron en: flujo, 2.4 kg/h; y temperatura en el colector, 303 K.

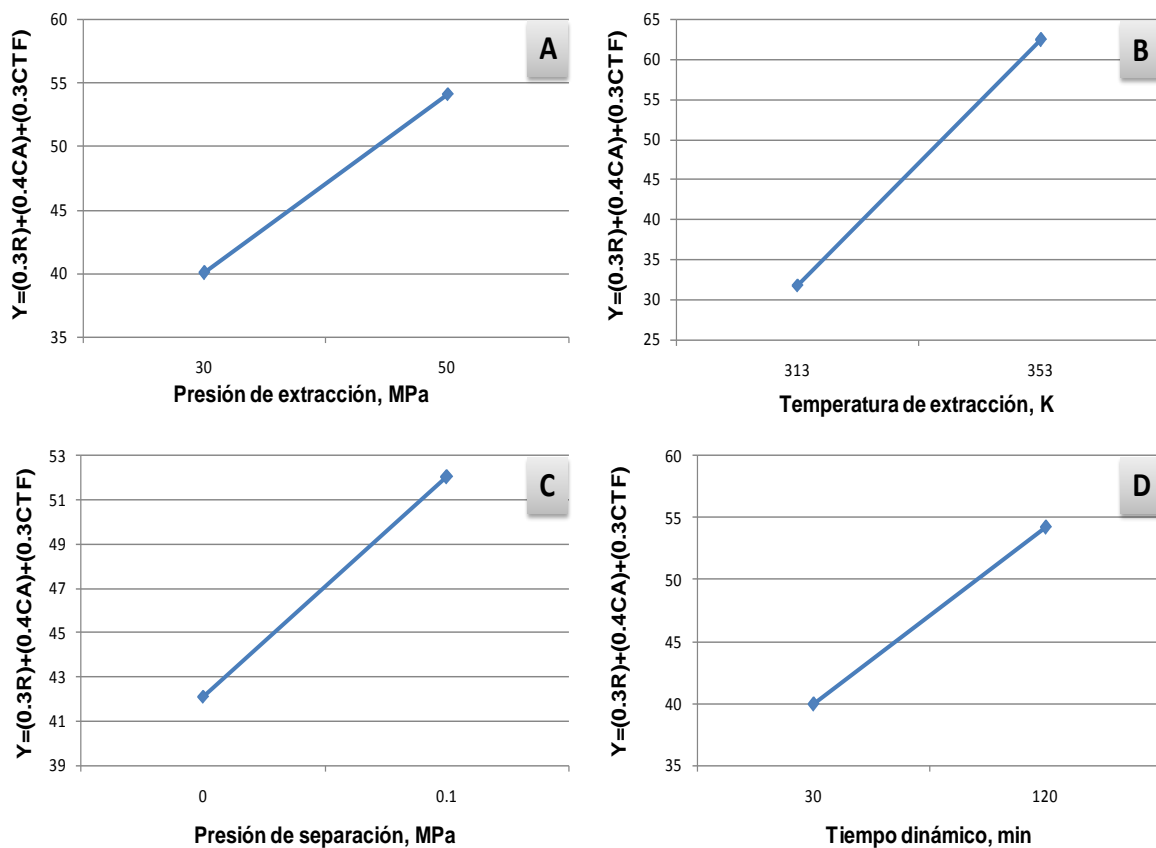


Figura 38. Comportamiento de la respuesta con respecto a: A. Presión de extracción; B. Temperatura de extracción; C. Presión de separación y D. Tiempo dinámico.

4.4.3. Composición volátil y semi-volátil de la fracción soluble en metanol de los extractos SFE. En la **Figura 39** se muestra la corriente iónica total (TIC) reconstruida, obtenida por GC-MS después de la extracción SFE, la precipitación en metanol y descarte de los componentes más pesados y apolares del extracto. Fueron reconocidos 31 componentes en cantidades relativas <0.1 %, que en promedio fueron cerca del 55 % de las señales detectadas. Una gran parte de los picos no fueron reconocidos debido a las coeluciones y a su baja intensidad, la mayoría de estos componentes se ubicaron en la región comprendida entre los sesquiterpenos ($t_R > 37$ min) y los triterpenos ($t_R = 57$ min). Posiblemente estos componentes pudieron ser de tipo fenólico, lo cual puede ser intuido por los valores del contenido total de fenoles. Estos componentes no se reconocieron mediante HPLC-DAD, pues ninguno coincidió con los 11 componentes fenólicos de referencia. Los componentes reconocidos se detallan en la **Tabla 30**, y cada extracto se analizó por triplicado.

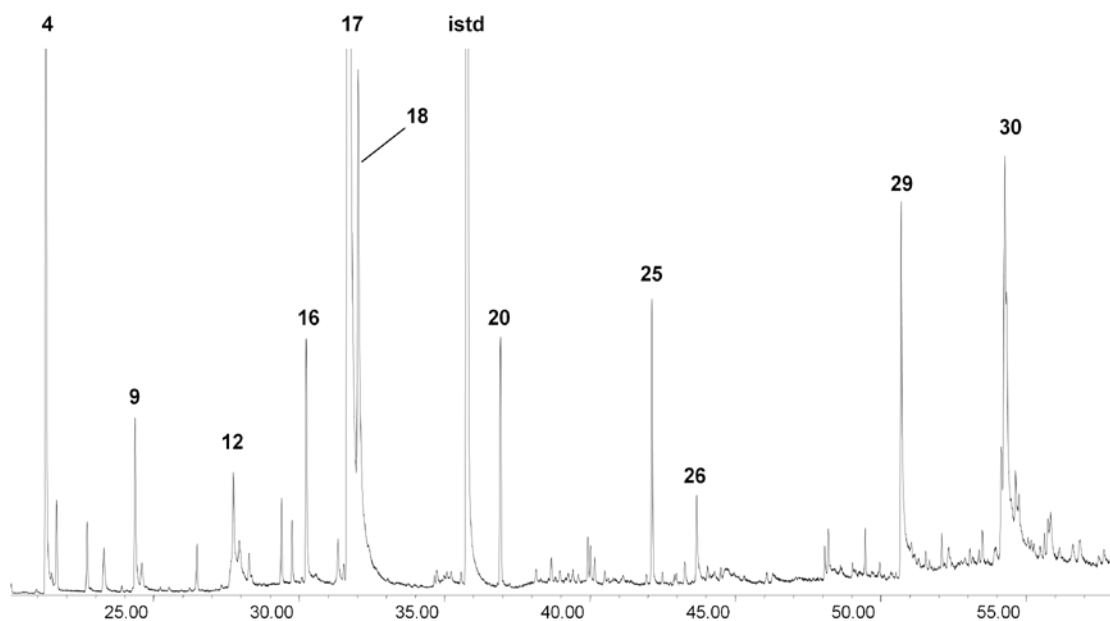


Figura 39. Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS de los volátiles y semivolátiles de la fracción metanólica del extracto SFE de *Thymus vulgaris*. Columna DB-5MS (60 m), Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).

Tabla 30. Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en las fracciones metanolicas de los extractos SFE de tomillo obtenidos a partir del diseño 2⁷⁻².

Nº Pico	Compuesto	I _R ^a	Cantidad relativa, %±σ (n=3)						
			Experimento 1	Experimento 19	Experimento 23	Experimento 24	Experimento 27	Experimento 28	Experimento 32
1	α-Pineno	942	0.13±0.01	tr	tr	tr	0.185±0.007	tr	tr
2	Canfeno	958	0.14±0.01	tr	tr	tr	0.16±0.01	tr	tr
3	α-Terpineno	1023	0.254±0.006	tr	tr	tr	0.24±0.02	tr	tr
4	<i>p</i> -Cimeno*	1031	9.29±0.08	3.4±0.3	6.3±0.1	0.87±0.04	6.5±0.2	1.17±0.03	1.16±0.01
5	β-Felandreno	1036	0.336±0.008	0.21±0.02	0.42±0.03	tr	0.50±0.03	tr	tr
6	1,8-Cineol*	1040	0.86±0.04	0.34±0.03	0.55±0.03	0.261±0.004	0.58±0.06	0.36±0.04	0.27±0.03
7	γ-Terpineno	1066	0.67±0.02	0.31±0.02	0.57±0.01	0.29±0.03	0.62±0.06	0.12±0.02	0.21±0.02
9	Linalol	1101	1.23±0.02	0.79±0.06	0.65±0.02	0.52±0.04	0.60±0.04	0.57±0.01	tr
11	Alcanfor	1157	0.33±0.01	tr	0.21±0.01	tr	tr	tr	tr
12	Borneol	1178	0.99±0.05	0.47±0.05	0.64±0.02	0.461±0.004	0.54±0.02	0.23±0.03	0.30±0.03
13	4-Terpineol	1187	0.53±0.04	0.24±0.03	0.31±0.02	tr	0.30±0.03	0.12±0.02	0.161±0.008
14	Éter metílico de timilo	1238	0.41±0.02	0.12±0.02	0.22±0.02	tr	0.20±0.01	tr	tr
15	Éter metílico de carvacrilo	1248	0.319±0.009	0.11±0.01	0.24±0.02	tr	tr	tr	tr
16	Timoquinona	1256	1.70±0.08	1.10±0.05	0.65±0.07	0.11±0.01	0.23±0.03	0.45±0.04	0.41±0.04
17	Timol*	1293	20.4±0.1	8.2±0.3	17.9±0.2	10.1±0.5	18.0±0.5	17.3±0.1	12.4±0.7
18	Carvacrol	1304	4.6±0.4	2.4±0.2	4.3±0.2	2.5±0.3	4.9±0.5	5.0±0.1	3.47±0.05
19	α-Copaeno	1387	0.228±0.006	tr	tr	tr	tr	tr	tr
20	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1443	1.56±0.02	0.35±0.01	0.85±0.01	0.37±0.03	0.87±0.03	1.06±0.01	0.43±0.01
21	α-Humuleno*	1456	1.89±0.01	1.5±0.1	2.0±0.2	1.99±0.09	1.7±0.2	1.7±0.2	1.90±0.08
22	γ-Cadineno	1535	0.244±0.003	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	δ-Cadineno	1541	0.24±0.02	tr	0.17±0.02	tr	tr	tr	tr
24	<i>trans</i> -Calameneno	1564	0.98±0.08	0.38±0.03	tr	tr	0.94±0.02	0.661±0.009	0.51±0.05

Tabla 30, continuación.

25	Óxido de cariofileno	1610	0.956±0.008	0.30±0.02	0.56±0.05	0.41±0.03	tr	0.47±0.03	0.40±0.03
26	<i>epi</i> - α -Cadinol	1664	0.71±0.05	0.487±0.003	0.509±0.009	tr	0.48±0.07	0.626±0.004	0.59±0.07
27	Cadaleno	1696	tr	tr	0.38±0.07	0.59±0.03	0.40±0.05	0.43±0.07	0.41±0.05
28	Neofitadieno	1843	0.77±0.03	1.1±0.04	0.78±0.01	0.929±0.008	1.32±0.09	1.30±0.06	1.66±0.01
29	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	1960	5.3±0.6	13.4±0.1	9.9±0.5	10.7±0.3	10.7±0.3	8.93±0.09	12.6±0.5
30	<i>cis,cis</i> -9,12-Ácido octadecanoico	2143	8.2±0.3	11.4±0.4	10.35±0.06	10.7±0.4	10.8±0.1	9.2±0.3	11.6±0.6
31	3-Picenona**	2236	1.76±0.07	2.27±0.02	2.3±0.6	2.0±0.2	1.46±0.03	1.9±0.2	0.43±0.03
33	Estigmast-4-en-3-ona**	3237	1.7±0.2	4.9±0.4	3.5±0.2	7.0±0.3	0.94±0.03	2.77±0.03	6.7±0.7
Compuestos reconocidos e identificados, %			66.7	53.8	64.3	49.8	63.2	54.4	55.6
Hidrocarburos monoterpénicos			10.8	3.9	7.3	1.2	8.2	1.3	1.4
Monoterpenos oxigenados			31.4	13.8	25.7	13.9	25.3	24.0	17.0
Hidrocarburos sesquiterpénicos			5.1	2.2	3.4	3.0	3.9	3.9	3.3
Sesquiterpenos oxigenados			1.7	0.8	1.1	0.4	0.5	1.1	1.0
Triterpenos			3.5	7.2	5.8	9.0	2.4	4.7	7.1
Ácidos grasos y ésteres derivados			13.5	24.8	20.3	21.4	21.5	18.1	24.2
Ceras			0.8	1.1	0.8	0.9	1.3	1.3	1.7

^a Índice de retención calculado con base en los tiempos de retención obtenidos en una columna DB-5MS (f.e. Apolar).

* Identificado por comparación con los índices de retención y espectros de masas obtenidos de patrones de referencia certificados.

** Reconocidos tentativamente.

tr: trazas

Se destacan las diferencias entre los experimentos 1 y 32, pues estos representaron condiciones que para todos los factores más importantes fueron opuestas (Ver **Tabla 28**). Las concentraciones de componentes de mayor peso molecular fueron más abundantes en el extracto 32. Los extractos 19 y 24 exhibieron bajas cantidades de los componentes más volátiles, debido a que la combinación de altas temperaturas en la extracción y separación se pudieron generar pérdidas por el venteo. Los componentes mayoritarios en todas las composiciones mostradas fueron el timol y *p*-cimeno, cuyas cantidades fueron desde 8 hasta 20 % y desde 3 hasta el 9 %, respectivamente. En la **Tabla 31** se compara la composición de los extractos SFE de tomillo de diferentes orígenes geográficos.

Las extracciones enunciadas en la tabla anterior fueron llevadas a cabo bajo presiones entre los 10 y 30 MPa; flujos entre 0.2 Kg/h y 4.0 Kg/h y tiempos de extracción de 25 hasta 300 min; la temperatura fue la misma en todos los casos, 40 °C, y la cantidad de material vegetal empleada abarcó el rango de 0.55 y 550 g. Sólo en dos de los extractos fue detectado el compuesto timoquinona, un compuesto que presenta características antioxidantes similares a las del timol [105,164], del cual deriva su estructura química, además posee propiedades anticancerígenas [105]. No se puede relacionar directamente la composición con las condiciones empleadas en las diferentes investigaciones e.g. las extracciones de Díaz [65] y Grosso [105] se realizaron a 10 MPa, 40 °C y 1.3 kg/h, aun así hay claras diferencias en las cantidades relativas de timol y carvacrol, las cuales pueden ser atribuidas a la diferencia en los tiempos de dinámicos extracción 25 min y 60 min, respectivamente, y al origen geográfico de las plantas o a que son quimiotipos. La investigación de García y colaboradores [64] se realizó en un equipo idéntico al utilizado en la presente investigación, pero contó con dos separadores para fraccionar el extracto por peso molecular y así obtener los componentes de interés con bajo contenido de ceras, ácidos grasos y triterpenos.

Tabla 31. Comparación de las cantidades relativas de los componentes volátiles y semi-volátiles mayoritarios en los extractos de tomillo.

Compuesto	Cantidad relativa, %					
	Zekovic, et.al (Serbia)	Garcia, et.al(España)	Diaz, et.al/ (España)	Grosso, et.al. (España)	Ivanovic, et al(Serbia)	Este trabajo (Colombia)
p-Cimeno	N.M	1.8	8.5	10.0	N.M.	9.3
Timoquinona	N.D.	N.D.	N.D.	2.6	0.7	1.7
Timol	20.0	77.1	60.9	40.8	42.5	20.4
Carvacrol	0.5	4.8	8.9	3.1	2.5	4.6
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1.0	1.6	0.9	1.1	N.M.	1.6
α -Humuleno	N.M.	N.M.	N.D.	0.1	N.M.	1.9

N.D. No detectado
N.M. No es mencionado

4.4.4. Búsqueda de los niveles óptimos de los factores más relevantes.

Según el análisis que se realizó al diseño experimental factorial fraccionado, los factores que se van a optimizar para obtener mejores respuestas son en orden de relevancia: temperatura de extracción, tiempo dinámico, presión de extracción, presión de separación y tiempo estático. Durante el proceso de optimización se pudo comprobar que la variable presión en el colector, fue difícil de mantener constante, debido que el venteo se taponaba con CO₂ sólido, lo cual, causó que el colector se sobre presionara. En la **Tabla 32** se muestran las 16 corridas experimentales con los tres observables y la combinación de respuestas que condicionó el avance del *Simplex*.

De igual manera que en la optimización de los extractos de salvia, el vértice 1 se fijó en el valor medio del dominio experimental de cada variable en cuestión. Los tamaños de paso fueron los siguientes: 8 K, 15 min, 4 MPa, 0.2 MPa y 6 min para la temperatura de extracción, tiempo dinámico, presión de extracción, presión de separación y tiempo estático, respectivamente.

El primer *Simplex* se calculó aplicando la **Ecuación 10**. Para hallar el vértice se realizó una expansión por 2 con lo cual se obtuvo una respuesta superior a las anteriores. El vértice 8 fue el producto de una nueva expansión, para hallar el vértice 9 la expansión se realizó por 3. Con los vértices 10 y 11 se volvió a una reflexión normal, pero el último resultó en una violación de los límites de temperatura de extracción. El vértice 12 fue una contracción por 0.5 puesto que los valores de respuesta fueron menores, el 13 una reflexión negativa por -0.5 pues se obtuvo una respuesta mayor que en los dos casos anteriores. Luego el 14, 15 y 16 fueron expansión por 2 y contracciones por -2 y -1.5, respectivamente, sin encontrar respuestas mayores que las del vértice 9. Entonces se decidió detener la optimización y tomar la respuesta de vértice 9 como la mejor.

Tabla 32. Resultados de la optimización mediante la metodología *Simplex* para la SFE a partir de tomillo.

Vértice N°	Simplex N°	Vértices retenidos	T*, K	D*, min	P*, MPa	G*, MPa	E*, min	R**, %	CA**, $\mu\text{mol de Trolox /mg de extracto}$	CTF**, mg de Ácido gálico /g de extracto	Respuesta***
1			333	75	40.0	0.5	15.0	1.7	1.39±0.06	51.1±1	63.1
2			340	75	40.0	0.5	15.0	1.5	1.47±0.07	64.5±0.9	71.3
3			337	88	40.0	0.5	15.0	1.7	1.56±0.03	62.4±1	75.9
4			337	79.3	42.9	0.5	15.0	1.7	1.73±0.01	67.8±0.5	85.4
5			337	79.3	40.7	0.7	15.0	1.5	1.482±0.008	60.0±0.8	75.6
6	1		337	79.3	40.7	0.6	19.7	1.1	1.52±0.04	61.7±1	64.9
7	2	2,3,4,5,6	346	90.5	42.6	0.7	17.8	2.0	1.79±0.03	66.9±0.5	88.2
8	3	2,3,4,5,7	345	89.9	42.5	0.7	16.1	2.0	1.87±0.03	67.2±2	90.6
9	4	2,3,4,7,8	353	100.3	44.3	0.5	18.2	1.9	1.98±0.04	71.3±2	97.4
10	5	3,4,7,8,9	347	104.2	44.8	0.5	17.8	2.0	1.723±0.009	62.1±0.7	85.2
11	6	4,7,8,9,10	355	90.4	41.7	0.5	16.0	V.L.	V.L.	V.L.	V.L.
12	7	4,7,8,9,10	350	90.4	41.7	0.5	16.0	2.0	1.54±0.07	61.7±2	80.3
13	8	4,7,8,9,10	348	91.6	42.6	0.5	16.5	1.9	1.67±0.04	65.7±1	84.6
14	9	4,7,8,9,10	341	95.2	45.1	0.5	18.0	1.8	1.53±0.05	53.7±0.7	70.1
15	10	4,7,8,9,10	337	97.7	46.8	0.4	19.0	1.5	1.513±0.06	50.7±2	63.3
16	11	4,7,8,9,10	332	100.1	48.6	0.4	20.0	1.9	1.75±0.04	60.2±2	83.1

*T: Temperatura de extracción; D: Tiempo dinámico; P: Presión; G: Presión de separación; E: Tiempo estático

**R: Rendimiento; CA: Capacidad antioxidante; CTF: Contenido total de fenoles

***Combinación lineal $Y=(0.3*R)+(0.4*CA)+(0.3*CTF)$

Los experimentos en esta optimización no pudieron ser agrupados tan claramente (como en el caso de salvia) de acuerdo con los rangos de ninguna variable. La mayor aproximación la dio la temperatura de extracción, pues en términos generales se puede afirmar que los experimentos en donde las temperaturas fueron mayores de 345 K, se alcanzaron las mejores respuestas, mientras que con temperaturas menores de 341 K se obtuvieron las más bajas.

Si se comparan los valores obtenidos de los tres observables en el diseño experimental contra los de la optimización, en ésta se logró obtener valores significativamente más altos para la capacidad antirradicalaria y el contenido de fenoles, pero sus diferencias no fueron notables como en el caso de salvia. La capacidad antirradicalaria de los extractos de tomillo al igual que los de salvia, no mostró superioridad frente a la del antioxidante de referencia que fue el BHA, más aun, mostraron ser muy inferiores: 1.98 ± 0.04 μmol de Trolox®/mg de extracto de tomillo, contra 6.5 ± 0.2 μmol de Trolox®/mg de BHA. En el trabajo Babovic y colaboradores [57] para alcanzar el 100% de inhibición del radical DPPH se necesitó del doble de la cantidad de extracto SFE (35 MPa, 373 K, 0.3 kg/h y 249 min) que la del BHA. Dapkevicius y colaboradores [162] también compararon la capacidad antirradicalaria del extracto SFE (30 MPa, 313 K, 1.3 kg/h, 240 min) frente al BHT, resultando ser menor en un 37 %. Grosso y colaboradores [105] demostraron que la capacidad de protección del aceite esencial de tomillo no tuvo ningún efecto en la oxidación del aceite de girasol comparado con un control, mientras que el extracto SFE incrementó dicha protección en un 30 %. Dos cosas se deducen de lo dicho anteriormente: (1) Los extractos obtenidos en la presente investigación no muestran la capacidad antirradicalaria esperada y (2) Los volátiles timol, timoquinona y carvacrol posiblemente no influyeron positivamente en la capacidad antirradicalaria. En este trabajo no se pudo demostrar la presencia de flavonoides como apigenina y luteolina, ácidos cinámicos como el caféico, ni diterpenos fenólicos como el ácido carnósico [30,31]. Las condiciones dadas por el experimento del vértice 9 fueron las mejores para la extracción SFE a partir de los

tallos, las hojas e inflorescencias de la especie *Thymus vulgaris*, las cuales serán verificadas más adelante.

4.4.5. Comparación de la cantidad de volátiles entre el HS y la fracción metanólica de los extractos. Los perfiles cromatográficos obtenidos a partir del extracto en el vértice 9 se muestran en la **Figura 40**. Estos perfiles fueron el resultado de distintas formas de preparación de la muestra y sistemas cromatográficos diferentes, lo cual hace que la posición de los picos y sus áreas cambien significativamente. En las **Tablas 33** y **34** se muestran los componentes reconocidos en cada una de las metodologías de análisis.

El procedimiento de fraccionar el extracto en metanol fue relevante porque los componentes de esta fracción formaron parte de los análisis de la capacidad antirradicalaria y el contenido total de fenoles. El análisis realizado mediante HS-SPME tiene una importancia práctica pues estos componentes serán percibidos en los productos en donde vayan a ser adicionados los extractos, además la temperatura de exposición de la fibra fue cercana a la temperatura del cuerpo humano.

Las cantidades relativas de los principales componentes volátiles e.g. timol y *p*-cimeno fueron mayores en el espacio de cabeza, mientras que en el extracto solubilizado en metanol se detectaron otros componentes como ceras y ácidos grasos, los cuales presentan baja volatilidad. Otra característica es que las cantidades relativas de algunos compuestos como el *p*-cimeno en los extractos obtenidos de los vértices mostrados en la tabla, guardan relación en las dos técnicas, e.g. los vértices 1 y 9 presentan las cantidades más alta y baja para este componente tanto en la fracción metanólica como en el HS. En el caso de otros componentes como el timol esto no se presentó.

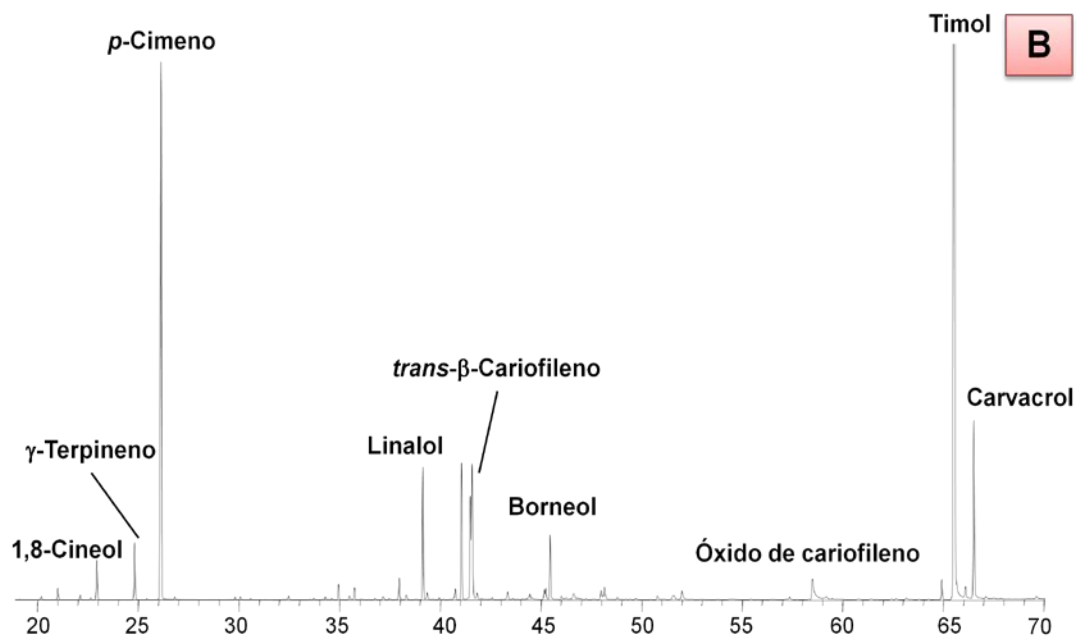
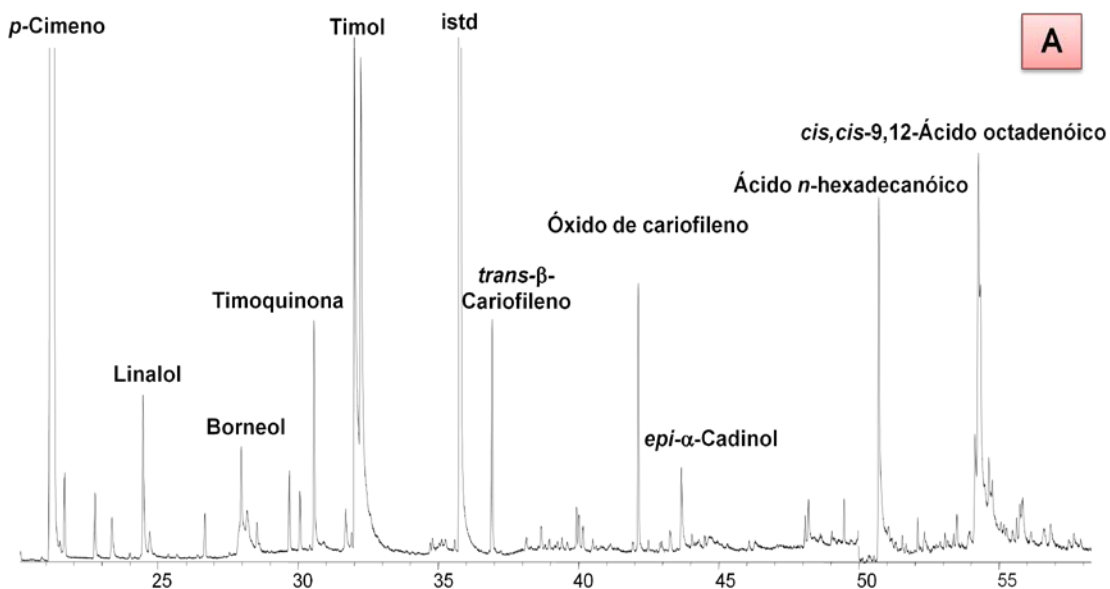


Figura 40. Perfiles cromatográficos de **A.** Extracto metanólico de volátiles y semivolátiles obtenido del vértice 9, GC-FID, columna DB-5 (60 m), *split* 1:30; **B.** Volátiles aislados mediante HS-SPME, GC-MS, columna DB-WAX (60 m), *Split*(1:30).

Tabla 33. Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de tomillo obtenidos a partir de la optimización y sometidos a extracción con metanol.

N° Pico	Compuesto	I _R ^a	Cantidad relativa, %±σ (n=3)				
			Vértice 1	Vértice 4	Vértice 7	Vértice 9	Vértice 14
3	<i>p</i> -Cimeno*	1031	16.8±0.4	11.6±0.1	7.73±0.04	2.92±0.03	9.84±0.06
6	1,8-Cineol*	1040	1.68±0.05	1.05±0.03	0.83±0.03	0.50±0.03	1.00±0.04
9	Linalol	1101	0.234±0.009	1.21±0.02	0.268±0.007	1.09±0.02	1.11±0.01
12	Borneol	1177	1.54±0.02	1.58±0.04	1.13±0.02	1.57±0.04	1.54±0.05
13	4-Terpineol	1187	0.122±0.006	0.538±0.004	tr ^b	0.49±0.02	0.45±0.02
14	Éter metílico de timilo	1238	tr ^b	0.42±0.01	tr ^b	0.382±0.003	0.42±0.02
15	Timoquinona	1256	1.69±0.03	1.90±0.01	tr ^b	2.54±0.06	1.48±0.02
17	Timol*	1292	34.1±0.4	30.4±0.2	25.2±0.4	30.3±0.4	28.8±0.2
18	Carvacrol	1303	7.1±0.3	4.57±0.02	4.803±0.008	4.6±0.2	4.4±0.2
20	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1442	1.44±0.03	1.72±0.06	1.02±0.02	1.94±0.03	1.50±0.07
19	α-Humuleno*	1456	4.2±0.5	3.4±0.1	3.6±0.3	2.78±0.05	3.3±0.2
25	Óxido de cariofileno	1609	0.93±0.01	1.08±0.01	0.58±0.04	1.81±0.07	0.95±0.03
26	<i>epi</i> -α-Cadinol	1663	0.57±0.03	0.430±0.003	0.66±0.02	0.56±0.02	0.65±0.05
28	Neofitadieno	1843	0.154±0.007	0.82±0.03	0.95±0.07	0.76±0.07	0.65±0.02
29	Ácido <i>n</i> -hexanoico	1961	5.9±0.4	4.03±0.07	7.6±0.3	4.45±0.05	5.70±0.07
30	<i>cis,cis</i> -9,12-Ácido octadecanoico	2143	5.81±0.02	4.48±0.06	6.86±0.05	5.59±0.03	7.10±0.01
31	3-Picenona	2235	tr ^b	1.17±0.06	1.12±0.09	0.72±0.02	0.58±0.06
33	Estigmast-4-en-3-ona	3237	tr ^b	4.69±0.06	9.0±0.5	2.76±0.06	4.6±0.1
Compuestos reconocidos e identificados, %			80.0	78.5	71,6	67	76.4
Hidrocarburos monoterpénicos			12.8	8.3	7.4	3.3	8.2
Monoterpenos oxigenados			43.5	37.7	27.0	35.2	33.3
Hidrocarburos sesquiterpénicos			5.9	4.5	5.3	3.9	4.9
Sesquiterpenos oxigenados			1.9	1.9	1.0	1.1	1.5
Triterpenos			0	5.8	7.1	4.1	5.7
Ácidos grasos y ésteres derivados			14.8	19.3	22.2	18.1	21.5
Ceras			1.1	1.0	1.6	1.3	1.3

^a Índice de retención calculado con base en los tiempos de retención obtenidos en una columna DB-5 (f.e. apolar).

^b Compuesto detectado a nivel de trazas (<1.0%).

* Identificado por comparación con los índices de retención y espectros de masas obtenidos de patrones de referencia certificados. Los compuestos resaltados se especifican en la **Figura 39**.

Tabla 34. Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes encontrados en los extractos SFE de tomillo obtenidos a partir de la optimización y monitoreados mediante HS-SPME.

N° Pico	Compuesto	I _R ^a	Cantidad relativa, %±σ (n=3)				
			Vértice 1	Vértice 4	Vértice 7	Vértice 9	Vértice 14
6	δ-2-Careno	1161	0.55±0.01	0.54±0.05	0.46±0.04	0.25±0.03	0.49±0.02
9	1,8-Cineol*	1212	1.58±0.02	1.43±0.05	1.36±0.05	1.1±0.1	1.5±0.1
10	γ-Terpineno	1242	2.37±0.09	2.3±0.2	2.0±0.2	1.1±0.1	2.5±0.2
11	p-Cimeno*	1270	30±1	26±2	26.3±0.2	11±0.1	24.9±0.8
16	trans-Hidrato de sabineno	1463	0.26±0.02	0.284±0.004	0.24±0.02	0.31±0.06	0.38±0.03
18	Alcanfor	1498	0.61±0.01	0.53±0.02	0.63±0.02	0.77±0.09	0.54±0.02
20	Linalol	1543	2.6±0.08	2.7±0.1	3.08±0.02	3.5±0.3	2.7±0.1
24	Éter metílico de timilo	1591	2.4±0.1	3.0±0.2	3.9±0.2	3.4±0.1	2.6±0.1
27	trans-β-Cariofileno	1601	2.75±0.08	5.2±0.6	3.5±0.3	5.7±0.4	3.71±0.08
30	α-Humuleno*	1674	0.11±0.02	0.23±0.03	0.22±0.02	0.25±0.02	0.17±0.01
33	Borneol	1711	1.60±0.06	1.6±0.1	1.38±0.06	2.7±0.2	1.68±0.05
42	p-Cimen-8-ol+Acetato de timilo	1863	0.29±0.03	0.34±0.03	0.33±0.02	0.57±0.05	0.36±0.05
44	Óxido de carifileno	2008	0.9±0.2	1.5±0.2	1.78±0.09	2.7±0.2	1.21±0.02
47	epi-α-Cadinol	2122	tr ^b	tr ^b	tr ^b	0.141±0.009	tr ^b
49	Timol*	2177	42±1	40±1	41±1	48±1	44±1
51	Carvacrol	2204	4.5±0.08	4.8±0.3	4.4±0.2	7.6±0.4	4.6±0.2
54	Sesquiterpeno oxigenado C ₁₅ H ₂₂ O (N.R.)	2307	0.11±0.01	0.18±0.02	0.190±0.006	0.25±0.02	0.16±0.01
Compuestos reconocidos e identificados, %			97.9	97.5	96.9	97.3	95.2
Hidrocarburos monoterpénicos			34.7	30.4	29.8	28.9	12.4
Monoterpenos oxigenados			59.4	59.1	61.6	62.7	73.8
Hidrocarburos sesquiterpénicos			3.9	8.1	5.5	5.6	9.0
Sesquiterpenos oxigenados			1.0	1.7	2.1	1.4	3.2

^a Índice de retención calculado con base en los tiempos de retención obtenidos en una columna DB-WAX (f.e. polar).

^b Compuesto detectado a nivel de trazas (<1.0%).)

* Identificado por comparación con los índices de retención y espectros de masas obtenidos de patrones de referencia certificados.

Los compuestos resaltados se especifican en la **Figura 39**.

En algunas investigaciones como las de Grosso y colaboradores [105], y García y colaboradores [64], se realizaron extracciones SFE a partir de *T. vulgaris* y se evaluaron distintas condiciones de presión, flujo y temperatura con el objetivo de buscar extractos ricos en compuestos volátiles y se concluyó que las condiciones más adecuadas fueron las de presiones y temperaturas más bajas (10 MPa y 313 K). En las dos tablas anteriores se comprueba que a condiciones más bajas de estas dos variables, es decir las del vértice 1, las cantidades de dichos componentes fueron las mayores. En la presente investigación fue deseable que los extractos tuvieran la menor cantidad de volátiles a expensas de aumentar las cantidades de componentes de peso molecular más elevado con actividad y disminuir la fragancia de los mismos.

En la **Figura 41**, se muestra un gráfico comparativo de las cuantificaciones del timol y *p*-cimeno mediante estandarización interna. Las cantidades en el espacio de cabeza resultaron ser menores que en las fracciones de los extractos fraccionados con metanol, lo cual, pudo ser producto del insuficiente tiempo de exposición de la fibra, y de la diferencia entre los sistemas que contenían la matriz de la curva de calibración (agua-metanol) y los extractos (agua-demás componentes del extracto) en el caso del análisis por HS-SPME. Para el análisis del HS de los extractos también se empleó la fibra de PDMS/DVB, en la cual, actúa el mecanismo de absorción por lo cual el equilibrio se alcanza en tiempos muy prolongados [160].

Se pudo apreciar que en algunos casos las diferencias en las concentraciones no fueron estadísticamente significativas e.g. Vértices 7, 9 y 14 para el *p*-cimeno. También se puede suponer que en la fracción soluble en metanol se recuperó una alta cantidad de volátiles, es decir, hubo pequeñas pérdidas de estos componentes en el precipitado insoluble, puesto que las cantidades encontradas mediante esta metodología son equiparables a las del espacio de cabeza.

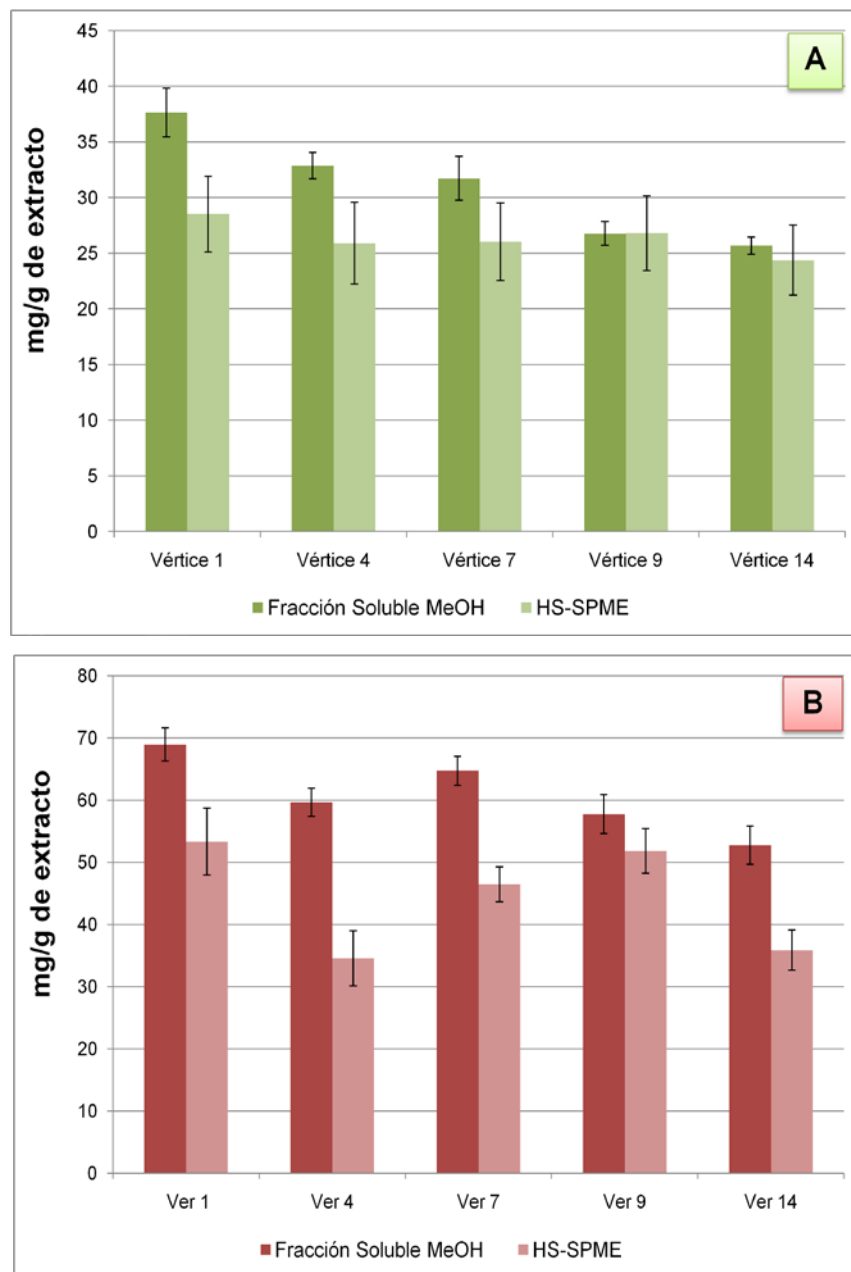


Figura 41. Comparación de la cantidades de A. *p*-Cimeno; y B. Timol determinadas mediante dos metodologías diferentes.

4.4.6. Verificación del vértice óptimo. En la **Tabla 35** se muestran las respuestas obtenidas después de comprobar los niveles de las variables del vértice 9. No se realizó la verificación del nivel de la presión en el colector por la fluctuación de su magnitud en el equipo y su estrecho rango.

Tabla 35. Resultados de la verificación del punto óptimo en la SFE de tomillo.

Código	T, K	D, min	P, Mpa	E, min	R, %	CA, $\mu\text{mol Trolox}^{\circledR}/\text{mg}$ extracto	CTF, mg A.G./g de extracto	Combinación de respuestas
T▼	345	100.3	44.3	18.2	1.7	1.83±0.06	614±12	83.1
D▲	353	115.3	44.3	18.2	2.1	1.93±0.08	703±8	98.3
D▼	353	85.3	44.3	18.2	1.2	1.92±0.04	689±5	83.2
P▲	353	100.3	48.3	18.2	1.7	1.81±0.09	623±6	83.2
P▼	353	100.3	40.3	18.2	1.4	1.65±0.04	580±11	71.1
E▲	353	100.3	44.3	24.2	1.8	1.91±0.03	698±5	92.8
E▼	353	100.3	44.3	12.2	1.5	1.65±0.02	613±7	74.9
OPT-I	353	100.3	44.3	18.2	1.8	1.95±0.06	720±8	96.9
OPT-II	353	100.3	44.3	18.2	1.8	1.91±0.07	712±11	93.7

T: Temperatura de extracción; D: Tiempo dinámico P: Presión de extracción; E: Tiempo estático; R: Rendimiento; CA: Capacidad antirradicalaria; CTF: Contenido total de fenoles; ▼ y ▲: Variación por debajo y por encima, respectivamente, del valor óptimo del factor.

Cuando se comprobó el valor superior para el tiempo dinámico se obtuvo una respuesta mayor que la del óptimo debido al aumento del rendimiento de extracción, pues la CA y el CTF no sobrepasaron los del óptimo; las variaciones para este factor no fueron significativamente diferentes, es decir que si se representa en un grafico 2D (Tiempo dinámico Vs. Respuesta), esta variación no sería un pico acusado. Para la presión de extracción y el tiempo estático cada variación resultó en variaciones significativas de la respuesta, pero no fueron mayores que las del valor del óptimo. Una vez más el error entre las réplicas del óptimo presenta errores aceptables *i.e.* 96±2; además no presentó una variación significativa con la variación por encima del tiempo dinámico 98.3. Se concluye por tanto que los niveles de las variables en el vértice 9 son las que conducen al valor más alto de la combinación lineal de observables. Las réplicas de estas condiciones también lo demuestran.

4.4.7. Comparación de las respuestas del óptimo con las del extracto etanólico. Se comparó la efectividad del procedimiento de optimización SFE frente a un método tradicional de extracción y con las respuestas obtenidas se realizaron las graficas de la **Figura 42**.

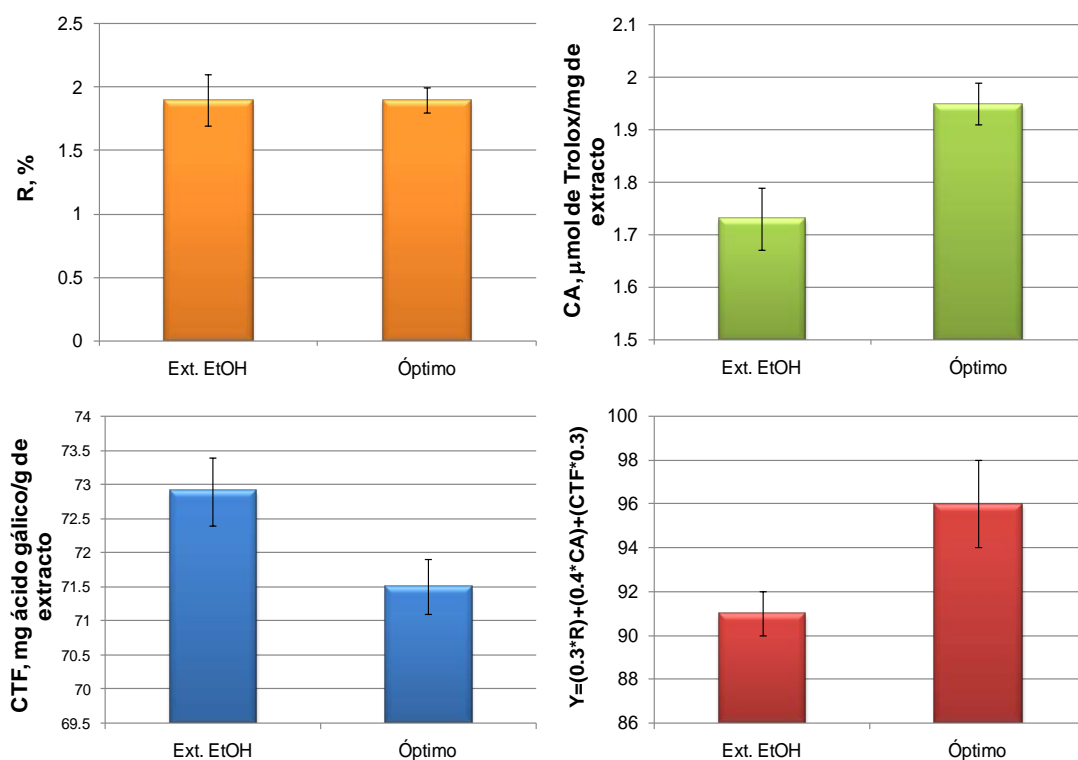


Figura 42. Comparación de las respuestas para dos modos de extracción en tomillo.

El rendimiento del extracto etanólico no resultó superior al SFE como se esperaba según lo experimentado con salvia, además no presentó coloración verdosa, fue marrón. La CA y CTF no se relacionaron, es decir, la respuesta para la CA fue mayor para el extracto SFE y el CTF para el extracto etanólico. Posiblemente esta diferencia se debió a que algunos componentes presentes en el extracto etanólico dieron respuesta al ensayo de *Folin-Ciocalteu* e.g. aminos y sacáridos [112]. Los resultados obtenidos se relacionan con la investigación de Daepkevicius y

colaboradores [162], puesto que el extracto SFE de tomillo obtenido a 30 MPa, 313K y 30 min, resultó con más actividad que el extracto en solventes polares (metanol-agua 50:50 a 60 °C). Los autores explican que en el extracto SFE se aislaron los ácidos rosmarínico (baja cantidad) y carnosico (alta cantidad), y los derivados del último ácido (altas cantidades), mientras que en la extracción con metanol-agua se recuperó muy baja cantidad de ácido carnósico y sus derivados, y una alta concentración de ácido rosmarínico que no compensó la actividad. Chizzola y colaboradores [165], concluyeron que los extractos obtenidos a partir de mezclas de etanol-agua entre 60:40 y 71:25 presentan valores más altos de capacidad antirradicalaria que el aceite esencial y los extractos obtenidos de mezclas de etanol:agua de 96:4.

5. CONCLUSIONES

- Los tratamientos post-cosecha más adecuados para conservar la capacidad antirradicalaria determinada mediante la metodología ORAC de los extractos de salvia y tomillo fueron: tamaño de partícula de 0.50-1.00 mm y secado en horno a 40 °C.
- Las variables de la SFE que más influyeron en la combinación lineal de respuestas, según los gráficos probabilidad normal y el análisis de la varianza, en el caso de salvia fueron: el tiempo dinámico (D), el flujo (F), la presión de extracción (P) y la temperatura en el colector (H); en el del tomillo: la temperatura de extracción (T), tiempo dinámico (D), la presión de extracción (P), presión en el colector (G) y tiempo estático (E). Para la salvia todas las variables afectaron positivamente la respuesta con la excepción de H, de otro lado la única variable que en la SFE del tomillo afectó negativamente la respuesta fue E.
- Las condiciones óptimas para la extracción con CO₂ en estado supercrítico que se determinaron según la metodología de optimización *Simplex* fueron: Salvia: D= 65.6 min, F= 2.80 kg/h, P= 47.3 MPa y H= 313 K; Tomillo: T= 353 K, D= 100.3 min, P= 44.3 MPa, G= 0.5 MPa y E= 18.2 min. Los factores que no tuvieron una influencia significativa en la respuesta se fijaron en los valores medios del dominio experimental. Con las anteriores condiciones se alcanzaron rendimientos de 1.7 y 1.9 %, capacidades antirradicalarias de 2.42 y 1.98 μmol de Trolox®/mg de extracto y contenidos de fenoles de 75.3 y 71.3 mg de ácido gálico /g de extracto, para salvia y tomillo, respectivamente.
- Se detectaron y cuantificaron tres compuestos (de 11 empleados en el método cromatográfico) antioxidantes en los extractos obtenidos a partir de

salvia mediante HPLC-DAD, a saber: ácido carnósico (ACA= 16.4-57.0 mg/g de extracto), ursólico (AUR= 46-72.2 mg/g de extracto) y carnosato de metilo (CME= 41-99 mg/g de extracto). En los extractos de tomillo no fue posible comprobar la existencia de ninguno de los compuestos utilizados como referencia.

➤ En los extractos de salvia la fracción metanólica del extracto presentó cantidades altas de monoterpenos oxigenados (11-22%) y diterpenos (21-30%). Los componentes mayoritarios fueron 1,8-cineol (5-14%), viridiflorol (7-14%) y manol (20-30%). Esta misma fracción del extracto de tomillo se caracterizó por contener monoterpenos oxigenados (27-44%) y ácidos grasos y ésteres derivados (15-22%). Los compuestos mayoritarios fueron *p*-cimeno (2-16%), timol (8-34%) y carvacrol (2-7%).

➤ La composición del espacio de cabeza de los extractos SFE de salvia se caracterizó por monoterpenos oxigenados (31-47%) y sesquiterpenos oxigenados (35-49%). Los componentes mayoritarios fueron 1,8-cineol (13-19%), *trans*- β -cariofileno (15-23%) y α -humuleno (12-16%). En el tomillo fueron preponderantes los hidrocarburos monoterpenicos (12-35%) y los monoterpenos oxigenados (59-74%). Los compuestos mayoritarios fueron los mismos que para la fracción metanólica de los extractos SFE, *p*-cimeno (11-30%), timol (40-48%) y carvacrol (4-8%).

➤ Las verificaciones de las condiciones óptimas de la extracción SFE de salvia y tomillo, ratificaron que los vértices encontrados como los mejores en el proceso de optimización, dieron las respuestas más altas dentro del dominio experimental escogido. Estas fueron de 1,9%, 2.47 μ mol de Trolox®/mg de extracto y 74.7 para la salvia y de 1.9 %, 1.98 μ mol de Trolox®/mg de extracto y 71.3 mg de ácido gálico/g de extracto para el tomillo.

➤ La comparación de la combinación de respuestas entre el extracto de la maceración con etanol y el extracto SFE para salvia no tuvo diferencias estadísticamente significativas: 113 ± 10 y 102 ± 2 , respectivamente, no ocurrió lo mismo en los extractos del tomillo, para la maceración en etanol 91 ± 1 contra el óptimo de la extracción SFE 96 ± 2 .

BIBLIOGRAFÍA

1. SKOOG, D., HOLLER, F. y NIEMAN, T. Principios de análisis instrumental. McGraw-Hill/Interamericana de España: Madrid, España. **2001**, p. 831.
2. MARTÍNEZ, J. L. (Ed). Fluid Extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC: Boca Ratón, EE.UU. **2008**, p.p. 1-100; 215-336.
3. DÍAZ-REINOSO, B., MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H., and PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, p.p. 2441-2469.
4. SHI, J. (Ed.). Functional food ingredients and nutraceuticals processing technologies. CRC Press LLC: Boca Raton, EE.UU. **2007**, p.p. 3-20.
5. MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. CRC Press LLC: Boca Raton, EE.UU. **2000**, p.p. 3-75; 135-246.
6. SUN, Y. (Ed.). Supercritical fluid technology in materials science and engineering: Synthesis, properties and applications. Marcel Dekker Inc: New York, EE.UU. **2002**. p.p. 1-3.
7. LUQUE DE CASTRO, M., VALCÁRCEL, M. y TENA, M. T. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Ed. Reverté S.A.: Barcelona, España. **1993**, p.p. 1-375.
8. REICHARDT, C. Solvents and solvent effects in organic chemistry. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, Alemania. **2003**, p.p. 93-94.
9. ATKINS, P. and De PAULA J. Atkins' Physical Chemistry. Oxford University Press: Oxford, Reino Unido. **2006**, p.p. 745-748.
10. McHUGH, M. and KRUKONIS, V. Supercritical fluid extraction, principles and practice. Butterworth-Heinemann: Newton, EE.UU. **1994**, p.p. 1-26; 85-134; 325-326.

11. ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P., PATSALIDES, E., McDONALD, S., and ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.*, **2002**, 127, p.p. 183-198.
12. TAFURT, G. Estudios teórico y experimental para la evaluar la relación actividad antioxidante-estructura de anilinas sintéticas y la alquilación intramolecular de Friedel-Crafts de *orto*-alil-N-benzilanilinas. Tesis Doctoral, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2008**, p.p. 10-13.
13. FRANKEL, E. and MEYER, A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, 80, p.p. 1925-1941.
14. PRIOR, R., WU, X. and SCHAICH, K. Standarization methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, p. p. 4290-4302.
15. RICE-EVANS, C., MILLER, N. and PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, **1997**, 2(4), p.p. 152-159.
16. PÉREZ, G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, **2003**, 22, p.p. 48-57.
17. PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, p.p.1035-1042.
18. SINGLETON, V. and ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1965**, 16, p.p. 144-158.
19. NIESSEN, W. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC: Boca Ratón, EE.UU. **2006**, p.p 3, 423-425.
20. HARJO, C., WIBOWO, C. and NG, K. Development of natural product manufacturing processes, Phytochemicals. *Internat. J. Chem. Electronic.* **2004**, 82, p.p. 1010-1028.
21. CUVELIER, M-E., RICHARD, E. and BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1996**, 73, p.p. 645-652.

22. KRANL, K., SCHLESIER, K., BITSCH, R., HERMANN, H., ROHE, M., and BÖHM, V. Comparing antioxidative food additives and secondary plant products-use of different assays. *Food Chem.* **2005**, 93, p.p. 171-175.
23. DENISOV, E. T. and AFANAS´EV, I. B. (Eds). Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. **2005**, Ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.p.p. 465-488, 599-603, 675-695.
24. GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E. and FERRO-LUZZI, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.*, **1995**, 18, p.p. 29-36.
25. KUEHL, R. O. Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. International Thomson Editores S.A de C.V: México D.F., México. **2001**, p.p. 423-453.
26. MILLER, J.C. y MILLER, J. N. Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson Educación S. A.: Madrid, España. **2002**, p.p. 200-213.
27. BOX, G., HUNTER, W. and HUNTER, J. Statistics for experimenters, an introduction to design, data analysis, and model building. John Wiley & Sons, Inc.: New York, EE.UU. **1978**, p.p. 374-404.
28. FONT QUER. P. Plantas medicinales, El Dioscórides renovado. Ed. Labor S.A.: Madrid, España, **1993**, p.p. 398, 412.
29. Ministerio de la Protección Social. Vademécum colombiano de plantas medicinales. Imprenta Nacional de Colombia: Bogotá, D.C., Colombia. **2008**, p.p. 182,183,190,191.
30. USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Phytochemical and Ethnobotanical Databases. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, EE.UU, **2003**. Disponible en www.ars-grin.gov/duke/. Consultada el 30 de octubre de 2010.
31. PROESTOS, C., CHORIANOPOULOS, N., NYCHAS, G., and KOMAITIS, M. RP-HPLC Analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, p.p. 1190-1195.

32. DURLING, N., CATCHPOLE, O., GREY, J., WEBBY, R., MITCHELL, K., FOO, Y., and PERRY, N. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chem*, **2007**, 101, p.p. 1417-1424.
33. LU, Y. and FOO, Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*), *Food Chem.*, **2001**, 75, p.p. 197–202.
34. LU, Y. and FOO, Y. Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, p.p. 8223-8225.
35. WANG, M., LI, J., RANGARAJAN, M., SHAO, Y., LAVOIE, E., HUANG, T., and HO, C. Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46 p.p. 4869–4873.
36. STASHENKO, E., PUERTAS, M., and COMBARIZA, M. Volatile by secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr.*, **1996**, 752, p.p. 223–232.
37. RAVEENDRAN, P., IKUSHIMA, Y., and WALLEN, S. Polar attributes of supercritical carbon dioxide. *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, p.p. 478-475.
38. LEEKE, G., SANTOS, R., and KING, M. Vapor-liquid equilibria for the carbon dioxide + carvacrol system at elevated pressures. *J. Chem. Eng. Data*, **2001**, 46, p.p. 541-545.
39. MUKHOPADHYAY, M. and DE, S. Fluid phase behavior of close molecular weight fine chemicals with supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data*, **1995**, 40, p.p. 909-913.
40. JOUYBAN, A., CHAN, H., and FOSTER, N. Mathematical representation of solute solubility in supercritical carbon dioxide using empirical expressions. *J. Supercrit. Fluids*, **2002**, 24, p.p. 19-35.
41. LUCIEN, F. and FOSTER, N. Solubilities of mixed hydroxybenzoic acid isomers in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data*, **1998**, 43, p.p. 726-731.

42. KRUKONIS, V. and KURNIK, R. Solubility of solid aromatic isomers in carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data*, **1985**, 30, p.p 247-249.
43. MURGA, R., SANZ, M., BELTRÁN, S., and CABEZAS, J. Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, **2002**, 23, p.p 113-121.
44. CHEN, J. and TSAI, F. Solubilities of methoxybenzoic acid isomers in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilib*, **1995**, 176, p.p 189-200.
45. CORTESI, A., KIKIC, I., ALESSI, P., TURTOI, G., and GARNIER, S. Effect of chemical structure on the solubility of antioxidants in supercritical carbon dioxide: experimental data and correlation. *J. Supercrit. Fluids*, **1999**, 14, p.p.139-144.
46. MURGA, R., SANZ, M., BELTRÁN, S., and CABEZAS, J. Solubility of three hydroxycinnamic acids in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, **2003**, 27, p.p 239-245.
47. BELTRÁN, S., SANZ, M., SANTAMARÍA, B., MURGA, R., and SALAZAR, G. Recovery of antioxidants from grape products by using supercritical fluids and membrane technology. *EJEAFC*, **2008**, 7, p.p. 3270-3278.
48. SOVOVÁ, H. Solubility of ferulic acid in supercritical carbon dioxide with ethanol as cosolvent. *J. Chem. Eng. Data*, **2001**, 46, p.p. 1255-1257.
49. MURGA, R., SANZ, M., BELTRÁN, S., and CABEZAS, J. Solubility of syringic and vanillic acids in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data* **2004**, 49, p.p. 779-782.
50. UCHIYAMA, H., MISHIMA, K., OKA, S., EZAWA, M., TAKAI, M., IDE, T., and PARK, P. Solubilities of flavon and 3-hydroxyflavon in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data*, **1997**, 42, p.p. 570-573.
51. RAMÍREZ, P., FORNARI, T., SEÑORANS, F., IBÁÑEZ, E., and REGLERO, G. Isolation of phenolic antioxidant compounds by SCF. *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 35, p.p. 128-132.

52. LUCIEN, F. and FOSTER, N. Influence of matrix composition on the solubility of hydroxybenzoic acid isomers in supercritical carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1996**, 35, p.p. 4686-4699.
53. JOHNSTON, K., BARRY, S., READ, N., and HOLCOMB, T. Separation of isomers using retrograde crystallization from supercritical fluids. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1987**, 26, p.p. 2372-2376.
54. CHÁFER, A., FORNARI, T., BERNA, A., IBÁÑEZ, E., and REGLERO, G. Solubility of solid carnosic acid in supercritical CO₂ with ethanol as a co-solvent. *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, p.p. 323-329.
55. SMELCEROVIC, A., LEPOJEVIC, Z., and DJORDJEVIC, S. Sub- and supercritical CO₂-extraction of *Hypericum perforatum* L. *Chem. Eng. Technol.*, **2004**, 27, p.p. 1327-1329.
56. BENSEBIA, O., BARTH, D., BENSEBIA, B., and DAHMANI, A. Supercritical CO₂ extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modelling. *J. Supercrit. Fluids*, **2009**, 49, p.p. 161-166.
57. BABOVIC, N., DJILAS, S., JADRANIN, M., VAJS, V., IVANOVIC, PETROVIC, J., and ZIZOVIC, I. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innov. Food Emerging Technol.*, **2010**, 11, p.p. 98-107.
58. IBÁÑEZ, E., OCA, A., MURGA, G., LÓPEZ, S., TABERA, J. and REGLERA, G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, p.p. 1400-1404.
59. CAVERO, S., JAIME, L., MARTÍN P. A., SEÑORÁNS J., REGLERO, G. and IBÁÑEZ, E. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Eur. Food Res. Technol.*, **2005**, 221 p.p. 478-486.
60. REVERCHON, E. and TADDEO, R. Extraction of Sage oil by supercritical CO₂: influence of some process parameters. *J. Supercrit. Fluids*, **1995**, 8, p.p. 302-309.

61. GLISIC, S., RISTIC, M., and SKALA, D. The combined extraction of sage (*Salvia officinalis* L.): Ultrasound followed by supercritical CO₂ extraction. *Ultrasonics Sonochem*, 2011, 18, p.p. 318-326.
62. ALEKSOVSKI, S.A. and SOVOVÁ, H. Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. *J. Supercrit. Fluids*, **2007**, 40, p.p. 239–245.
63. GLISIC, S., IVANOVIC, J., RISTIC, M., and SKALA, D. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *J. Supercrit. Fluids*, **2010**, 52, p.p. 62-70.
64. GARCÍA, M., VICENTE, G., REGLERO, G., and FORNARI, T. Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography. *J. Supercrit. Fluids*, **2011**, 55, p.p. 949-954.
65. DÍAZ, C., DÍAZ, J., SÁNCHEZ, E., and PÉREZ, S. Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, p.p. 5385-5389.
66. ZEKOVIC, Z., LEPOJEVIC, Z., and VUJIC, D. Supercritical extraction of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Chromatographia*, **2000**, 51, p.p. 175-179.
67. GENENA, K., HENSE, H., SMÂNIA, A., and DE SOUZA, S. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciencia Technol. Alimen.*, **2008**, 28, p.p. 463-469.
68. CARVALHO, R., MOURA, L., ROSA, P., and MEIRELES, A. Supercritical fluid extraction of rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition and antioxidant activity. *J. Supercrit. Fluids.*, **2005**, 35, p.p. 197-204.
69. TENA, M., VALCÁRCEL, M., HIDALGO, P., and UBERA, J. Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: Comparison with liquid solvent sonication. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, p.p. 521-526.

70. HIDALGO, P., UBERA, J., TENA, M., and VALCÁRCEL, M. Determination of the carnosic acid content in wild and cultivated *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, p.p.2624-2627.
71. UY, N. FRAKMAN, G. and EVANS, D. A. Labiatae derived antioxidant composition. European Patent EP0454097, **1991**.
72. NGUYEN, U., FRAKMAN, G., and EVANS, D. Process for extracting antioxidants from Labiatae herbs. United States Patent US5017397, **1991**.
73. RIZVI, S. (Ed). Supercritical fluid processing of food and biomaterials. Blackie Academic & Professional: Glasgow, Reino Unido. **1994**, p.p. 103-113.
74. STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J., RUIZ, C., ARIAS, G., DURÁN, C., SALGAR, W., and CALA, M. *Lippia origanoides* differentiation based on essential oil, GC-MS, and principal component analysis. *J. Sep. Sci.*, **2009**, 33, p.p. 93-103.
75. POURMORTAZAVI, S. and HAJIMIRSADEGHI, S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1163, p.p. 2-24.
76. VÁGI, E., RAPA VI, E., HADOLIN, M., VÁSÁRHELYINÉ, K., BALÁZS, A., BLÁZOVICS, A., and SIMÁNDI, B. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, p.p. 17-21.
77. SCALIA, S., GIUFFREDA, L., and PALLADO, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, 21, p.p. 549-558.
78. SHI, J., LE-MAGUER, M., KAKUDA, Y., LIPTAY, A., and NIEKAMP, F. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. *Food Res. Internat.*, **1999**, 32, p.p. 15-21.
79. QUITAIN, A. T., KATOH, S., and MORIYOSHI, T. Isolation of antimicrobials and antioxidants from Moso-Bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) by supercritical CO₂ extraction and subsequent hydrothermal treatment of the residues. *Ind. Eng Chem. Res.*, **2004**, 43, p.p. 1056-1060.

80. OLIVEIRA, A., KAMIMURA, E., and RABI, J. Response surface analysis of extract yield and flavour intensity of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) obtained by supercritical carbon dioxide extraction. *IFSET*, **2009**, 10, p.p. 189-194.
81. IVANOVIĆ, J., DILAS, S., JADRANIN, M., VAJS, V., BABOVIĆ, N., PETROVIĆ, S., and ŽIŽOVIĆ, I. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Serb. Chem. Soc.*, **2009**, 7, p.p. 717-732.
82. SUBRA, P., CASTELLANI, S., KSIBI, H., and GARROBOS, H. Contribution to the determination of the solubility of β -carotene in supercritical carbon dioxide and nitrous oxide: experimental data and modeling. *Fluid Phase Equilib.*, **1997**, 131, p.p. 269-286.
83. MATTEA, F., MARTÍN, A., and COCERO, M. Carotenoid processing with supercritical fluids. *J. Food Eng.*, **2009**, 93, p.p. 255-265.
84. DE LA FUENTE, J., OYARZÚN, B., QUEZADA, N., and DEL VALLE, J. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilib.*, **2006**, 247, p.p. 90-95.
85. TOPAL, U., SASAKI, M., GOTO, M., and HAYAKAWA, K. Extraction of Lycopene from Tomato Skin with Supercritical Carbon Dioxide: Effect of Operating Conditions and Solubility Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, p.p. 5604-5610.
86. ZANCAN, C., MARQUES, M., PETENATE, A. J., and MEIRELES, A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: A study of the antioxidant action of the extracts. *J. Supercrit. Fluids*, **2002**, 24, p.p. 57-76.
87. HAMBURGUER, M., BAUMANN, D., and ADLER, S. Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants-effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochem. Anal.*, **2004**, 15, p.p. 46-54.
88. MURGA, R., RUÍZ, R., BELTRÁN, S., and CABEZAS, L. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical

mixtures of carbon dioxide and alcohol. *J. Agric. Food Chem.*,**2000**, 48, p.p. 3408-3412.

89. KAMANGERPOUR, A., ASHRAF-KHORASSANI, M., TAYLOR, T., MCNAIR, H., and CHORIDA, L. Supercritical fluid chromatography of polyphenolic compounds in grape seed extract. *Chromatographia*,**2002**, 55, p.p. 417-421.

90. BRAGA, M., LEAL, P., CARVALHO, J., and MEIRELES, A. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. *J. Agric. Food Chem.*,**2003**, 51, p.p. 6604-6611.

91. HERRERO, M., PLAZA, M., CIFUENTES, A., and IBÁÑEZ, E. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid. *J. Chromatogr. A*,**2010**, 1217, p.p. 2512-2520.

92. LOULI, V., FOLAS, G., VOUTSAS, E., and MAGOULAS, K. Extraction of parsley seed oil by supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids*,**2004**, 30, p.p. 163-174.

93. SABIO, E., LOZANO, M., DE ESPINOSA, V., MENDES, R., PEREIRA, A., PALAVRA, A., and COELHO, J. Lycopene and β -carotene extraction from tomato processing waste using supercritical CO₂. *Ind. Eng. Chem. Res.*,**2003**, 42, p.p. 6641-6646.

94. KAISER, C., RÖMPP, H., and SCHMIDT, P. Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile flowers extraction efficiency, stability, and in/line inclusion of chamomile/carbon dioxide extract in α -cyclodextrin. *Phytochem. Anal.*,**2004**, 15, p.p. 249-256.

95. PEREIRA, C. and MEIRELES, A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food Bioprocess. Technol*, **2010**, 3, p.p. 340-372.

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

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

98. BAUMANN, D., ADLER, S., GRÜNER, S., OTTO, F., WEINREICH, B., and HAMBURGER, M. Supercritical carbon dioxide extraction of marigold at high pressures: Comparison of analytical and pilot-scale extraction. *Phytochem. Anal.*, **2004**, 15, p.p. 226-230.
99. BANDONI, A. (Ed). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Red de Editoriales Universitarias: La Plata, Argentina. **2000**, p.p. 120-136.
100. GÓMEZ, G. A. Análisis de la composición química y de la actividad biológica de los aceites esenciales de 2 quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., en función de las condiciones de extracción y secado de la planta. Tesis de Grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2007**, p.p 79-80; 88-98; 110-119.
101. STAHL-BISKUP, E. and SÁEZ, F. (Ed). Thyme the genus *Thymus*. Taylor and Francis Group LLC: Londres, Reino Unido. **2002**, p.p. 321-367.
102. KINTZIOS, S. E. (Ed.). Sage the genus *Sage*. Taylor and Francis Group LLC: Amsterdam, Holanda. **2000**, p.p. 93-108.
103. HAMROUNI, I., BETTAIEB, I., SRITI, J., ZOHRA, F., LIMAM, F. and MARZOUK, B. Drying sage (*Salvia officinalis* L.) plants and its effects on content, chemical composition, and radical scavenging activity of the essential oil. *Food Bioprocess. Technol.* **2011**, DOI 10.1007/s11947-011-0661-0.
104. DÍAZ, M. C., PEREZ, M. S., GONZÁLEZ, M. A. and CABEZUDO, M. D. Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, p.p. 1265-1269.
105. GROSSO, C., FUGUEIREDO, A. C., BURILLO, J., MAINAR, A. M., URIETA, J. S., BARROSO, J. G., COELHO, J. A. and PALAVRA, A. M. Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: Comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *J. Sep. Sci.* **2010**, 33, p.p. 2211-2218.

106. LANGA, E., DELLA PORTA, G., PALAVRA, A. M. and MAINAR, A. M. Supercritical fluid extraction of Spanish sage essential oil: optimization of the process parameters and modelling. *J. Supercrit. Fluids*.**2009**, 49, p.p. 174-181.
107. CATCHPOLE, O. J. and GREY, J. B. Near critical extraction of sage, celery and coriander seed. *J. Supercrit. Fluids*.**1996**, 9, p.p. 273-279.
108. TZIA, C and LIADAKIS, G. Extraction optimization in food engineering. Macel Decker Inc.: New York EE.UU. **2003**, p.p. 56-92.
109. REYES, J. A. y PATIÑO, J.G. Comparación de los metabolitos secundarios volátiles de dos especies de *Ocimum sp.*(Labiatae), en función el método de su extracción y estudio de las actividades antioxidante, citotóxica y antifúngica. Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2007**, p.p. 109-115; 135-141.
110. ARMSTRONG, N. A. Pharmaceutical experimental design and interpretation. Taylor and Francis Group LLC: Boca Raton, EE.UU. **2006**, p.p. 177-183.
111. PETER, K. V. (Ed.). Handbook of herbs and spices, volume 1. CRC Press LLC: Boca Raton, EE.UU. **2000**, p.p. 269-275.
112. TABART, J., KEVERS, C., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J. O. and DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various test. *Food Chem*.**2009**, 113, p.p. 1226-1233.
113. WELLWOOD, C. and COLE, R. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. *J. of Agric. Food Chem*. **2004**, 52, p.p. 6101-6107.
114. DJARMATI, Z., JANKOV, R., SCHWIRTLICH, E., DJULINAC, B. and DJORDJEVIC. High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO₂ extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.***1991**, 68, p.p. 731-734.
115. MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P. and VAN BEEK. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*.**2004**, 85, p.p. 231-237.

116. CELIKTAS, O., BEDIR, E. and SUKAN, F. In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chem.***2007**, 101, p.p. 1457-1464.
117. MARIUTTI, L. R., PIZARRO G., BRAGAGNOLO, N. and ZERLOTTI, A. Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. *Brazilian Archives Biol. Tech.***2008**, 51, p.p. 1125-1235.
118. ZHENG, W. and WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.***2001**, 49, p.p. 5165-5170.
119. SILVA, E. M., SOUZA, J. N. S, ROGEZ, H., REES, J. F. and LORONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem.***2007**, 101, p.p. 1012-1018.
120. DUDONNE, S., VITRAC, X., COUTIERE, P., WOILLEZ, M. and MERILLON, J. M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plants extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, p.p. 1768-1774.
121. SINGLETON, V. L. and ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.***1965**, 16, p.p. 144-158.
122. SHAN, B., CAI, Y. Z., SUN, M. and CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, p.p. 7749-7759.
123. CUVELIER, M. E., BERSET, C. and RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Agric. Food Chem.***1994**, 42, p.p. 665-669.
124. THORSEN, M. A. and HILDEBRANT, K. S. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts, aspects of accurate quantification. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 995, p.p. 119-125.
125. MONTGOMERY, D. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Limusa, S.A.: México D.F., México. **2004**, p.p. 303-349.

126. CUI, Y. and ANG, C. Y. Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of phloroglucinols in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 20, p.p. 2755-2759.
127. MACHMUDAH, S., SHIRAMIZU, Y., GOTO, M., SASAKI, M. and HIROSE, T. Extraction of *Nigella sativa* L. using supercritical CO₂: A study of antioxidant activity of the extract. *Sep. Sci. Technol.* **2005**, 40, p.p. 1267-1275.
128. DAUKSAS, E., VENSKUTONIS, P. R., POVILAITYTE V. and SIVIK, B. Rapid screening of antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extracts obtained by supercritical carbon dioxide at different extraction conditions. *Nahrung/Food.* **2001**, 45, p.p. 338-341.
129. SIMÁNDI, B., OSZAGYÁN, M., LEMBERKOVICS, É., KÉRY, Á., KASZÁCS, J., THYRION, F. and MÁTYÁS, T. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. *Food Res. Int.* **1998**, 31, p.p. 723-728.
130. AREIAS, F., VALENTAO, P., ANDRADE, P. B., FERRERES, F. and SEABRA, R. M. Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural factors. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, p.p. 6081-6084.
131. LINDBER, H. and BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* **1995**, 6, p.p. 271-277.
132. SCHWARTZ, K and TERNES, W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Z. LebensmittelUntersuch Forsch.* **1992**, 195, p.p.99–103.
133. MUNNÉ-BOSCH, S., MUELLER, M., SHCWARZ, K. and ALEGRE, L. Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. *J. Plant. Phisyol.* **2001**, 158, p.p. 1431-1437.
134. MUNNÉ-BOSCH, S., ALEGRE, L. and SCHWARZ, K. The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis* L. under Mediterranean climate. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, 210, p.p. 263-267.
135. SEÑORÁNS, F. J., IBAÑEZ, E., CAVERO, S., TABERA, J. and REGLERO. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *J. Chromatogr. A.* **2000**, 870, p.p. 491-499.

136. OLLANKETO, M., PELTOKETO, A., HARTONEN, K., HILTUNEN, R. and RIEKKOLA, M. L. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activities of the extracts. *Eur. Food Res. Technol.***2002**, 215, p.p. 158-163.
137. BASKAN, S., ÖZTEKIN, N. and ERIM, B. Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. *Food Chem.***2007**, 101, p.p. 1748-1752.
138. GRZEGORCZYK, A., MATKOWSKI, A. and WYSOKINSKA, H. Antioxidant activities of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chem.***2007**, 104, p.p. 536-541.
139. BOLTA, Z., BARICEVIC, D., BOHANEK, B. and ANDRENSEK, S. A preliminary investigation of ursólico acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.***2000**, 62, p.p. 57-63.
140. TOPU, G. Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J. Nat. Prod.***2006**, 69, p.p. 482-487.
141. ERKAN, N., AYRANCI, G. and AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.***2008**, 110, p.p. 76-82.
142. NELDER, J. A., and MEAD, R. A. A simplex method for function minimization. *Comput. J.* **1965**, 7, p.p. 308-313.
143. SPENDLEY, W., HEXT, G. R., and HIMSWORTH, F. R. Sequential application of simplex designs in optimization and evolutionary operation. *Technometrics.***1962**, 4, p.p. 441-461.
144. FAVATI, F., KING, J. W., and MAZZANTI, M. Supercritical carbon dioxide extraction of evening primrose oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.***1991**, 68, p.p. 422-427.
145. NYAM, K. L., TAN, C. P., LAI, O. M., LONG, K., and CHE MAN, Y. B. Optimization of supercritical fluid extraction of phytoesterol from roselle seeds with a central composite design model. *Food Bioprod. Processing.***2010**, 88, p.p. 239-246.

146. RAMOS, E., VALERO, E., IBAÑEZ, E., REGLERO, G., and TABERA, J. Obtention of a brewed coffee aroma extract by optimized supercritical CO₂-based process. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, p.p. 4011-1016.
147. LANCAS, F. MM., QUEIROZ, M. E. C., SILVA, I. C. E. Simplex optimization of extraction of soybean oil by supercritical pentane. *Chromatoraphia*.**1995**, 40, p.p. 421-424.
148. MAIO, G., VON HOLST, C., WENCLAWIAK, B. W., and DARSKUS, R. Supercritical fluid extraction of some chlorinated benzenes and ciclohexanes from soil: Opmization with fractional factorial design and simplex. *Anal. Chem.* **1997**, 69, p.p. 601-606.
149. JO, J. S., and TANG, P. H. Optimization of supercritical fluid extraction of environmental pollutants from a liquid-solid extraction cartridge. *J. Chromatogr. Sci.* **1992**, 30, p.p. 344-350.
150. DANH, L.T., MAMMUCARI, R., TRUONG, P., and FOSTER, N. Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil. *Chem. Eng. J.* **2009**, 155, p.p. 617-626.
151. HUANG, W., LI, Z., NIU, H., LI, D., and ZHANG, J. Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology. *J. Food Eng.***2008**, 89, p.p. 208-302.
152. GELMEZ, N., KINCAL, N. S., and YENER, M. E. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. *J. Supercrit. Fluids.* **2009**, 48, p.p. 217-224.
153. SONSUZER, S., SAHIN, S., and YILMAZ, L. Optimization of supercritical CO₂ extraction of *Thymbra spicata* oil. *J. Supercrit. Fluids.* **2004**, 30, p.p. 189-199.
154. LIU, B., SHEN, B., GUO, F., AND CHANG, Y. Optimization of supercritical fluid extraction of *dl*-tetrahydropalmatine from rhizome of *Corydalis yanhusuo* W.T.Wang with orthogonal array design. *Sep. Purificat. Technol.***2008**, 64, p.p. 242-246.

155. LIU, L., YANG, F., ZHANG, C., JI, H., HONG, P., and DENG, C. Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil by response surface methodology. *J. Supercrit. Fluids.* **2009**, 48, p.p. 9-14.
156. KASSAMA, L. S. SHI, J., AND MITTAL, G. S. Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. *Sep. Purific. Technol.* **2008**, 60, p.p. 278-284.
157. NIK NORULAINI, N. A., ANUAR, O., OMAR, A. K. M., ALKARKHI, A.F.M., SETIANTO, W. B., FATEHAH, M.O., SAHENA, F., ZAIDUL, I.S.M. Optimization of SC-CO₂ extraction of zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L) Smith. *Food Chem.* **2009**, 114, p.p. 702-705.
158. SAFARALIE, A., FATEMI, S., SALIMI, A. Experimental design on supercritical extraction of essential oil from valerian roots and study of optimal conditions. *Food Bioprod. Process.* **2009**
159. CARRILLO J. D., and TENA, M. T. Determination of volatile compounds in antioxidant rosemary extracts by multiple headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Flavour Fragr. J.* **2006**, 21, p.p. 626-633.
160. MUÑOZ, A. Determinación de los coeficientes de reparto y las constantes de equilibrio. Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2005**, p.p. 15-25.
161. CUY, A. J. y MERLO S. Y. Estudio de la evaporación de un perfume aplicado sobre la piel en función el tiempo empleando HS-SPME/GC-MSD. Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2004**, p.p. 60-87.
162. DAPKEVICIUS, A., VENSKUTONIS, R., VAN BEEK, T. A. and LINSSEN, J. P. H. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.*, **1998**, 77, p.p. 140-146.

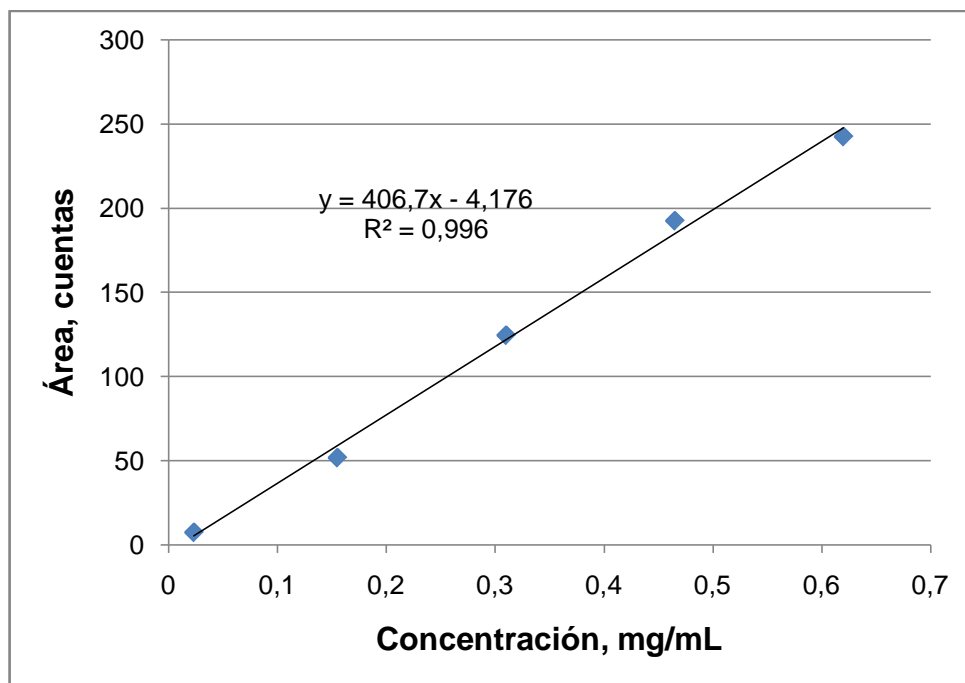
163. DAWIDOWICZ, A., RADO, E., WIANOWSKA, D., MARDAROWICZ, M., and GAWDZIK, J. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta*, **2008**, 76, p.p. 878-884.
164. IVANOVIC, J., ZIZOVIC, I., RISTIC, M., STAMENIC, M. and SKALA, D. The analysis of simultaneous clove/oregano and clove/thyme supercritical extraction. *J. Supercrit. Fluids.*, **2011**, 55, p.p. 983-991.
165. CHIZZOLA, R., MICHITSCH, H., and FRANZ, C. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, p.p. 6897-6904.

ANEXOS

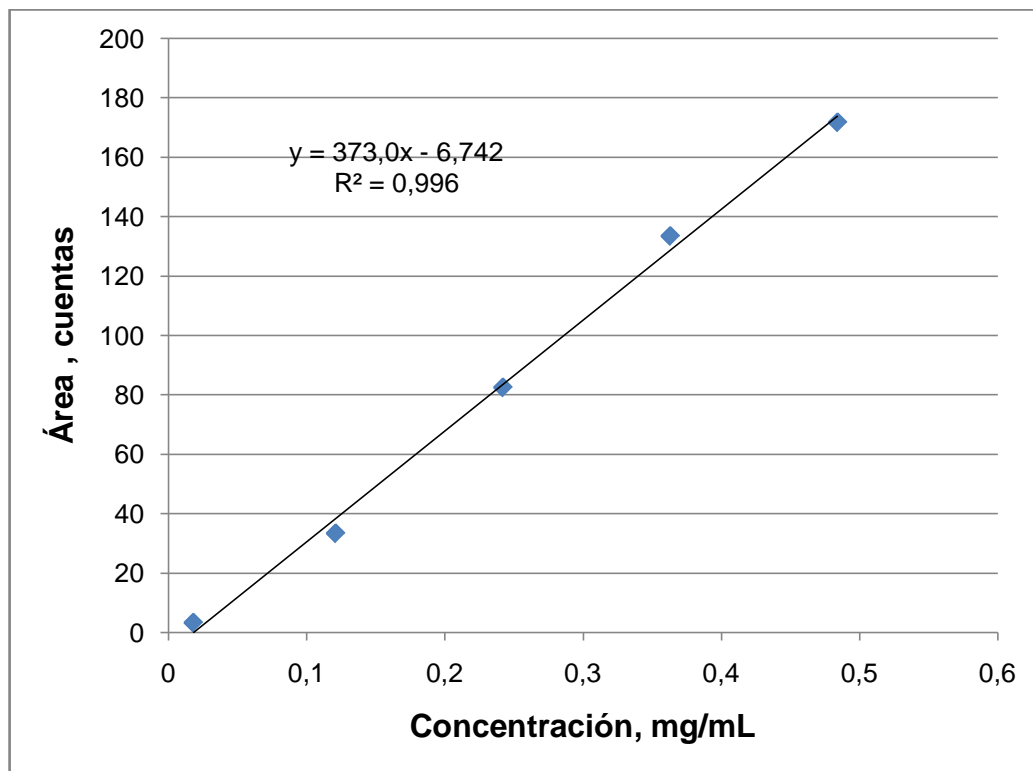
ANEXO A. Curvas de calibración.

ANEXO A1. Curvas de calibración de compuestos volátiles mediante GC-FID.

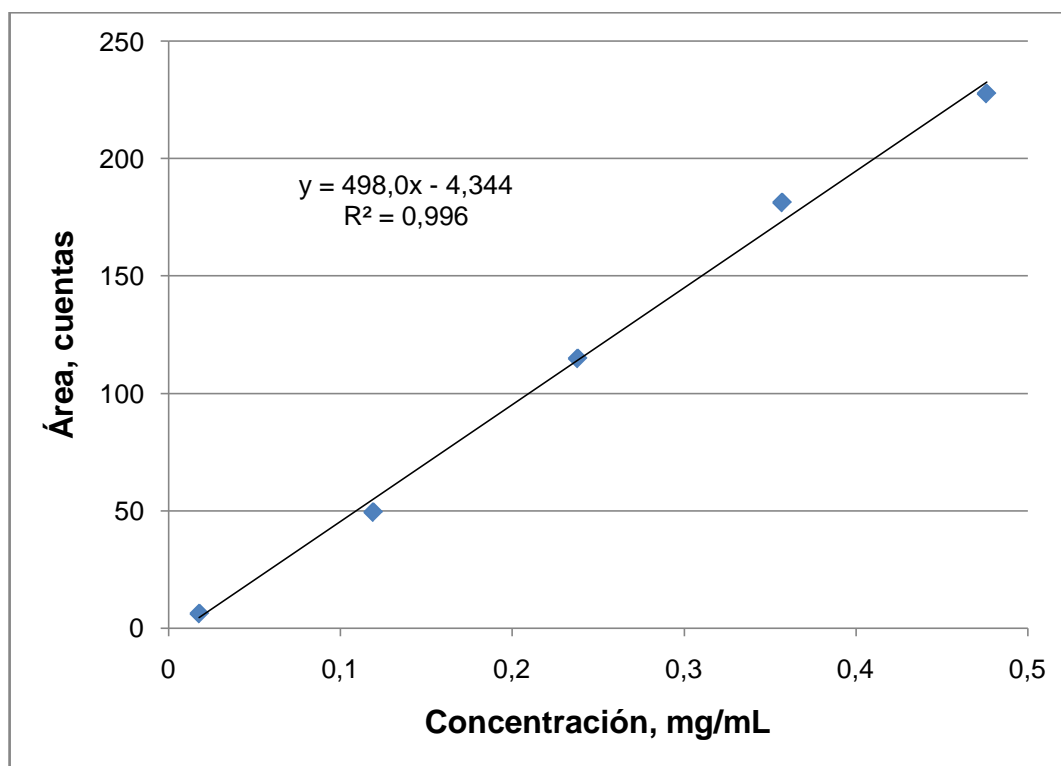
Datos curva de calibración 1,8-cineol	
Concentración, mg/mL	Área, cuentas
0.0232	7.41
0.155	51.78
0.310	124.58
0.465	192.60
0.620	242.61



Datos curva de calibración <i>cis</i> -tujona	
Concentración, mg/mL	Área, cuentas
0.0181	3.23
0.121	33.33
0.242	82.51
0.363	133.53
0.484	171.84

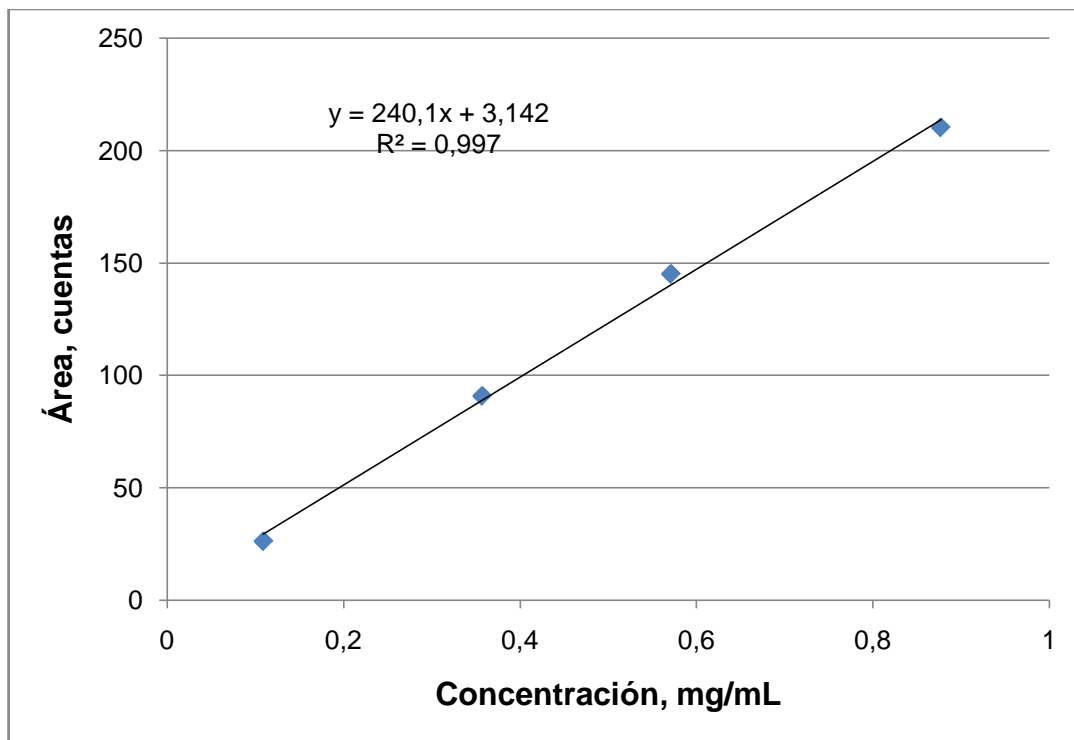


Datos curva de calibración α -humuleno	
Concentración, mg/mL	Área, cuentas
0.0178	6.31
0.119	49.50
0.238	114.94
0.357	181.34
0.476	227.72

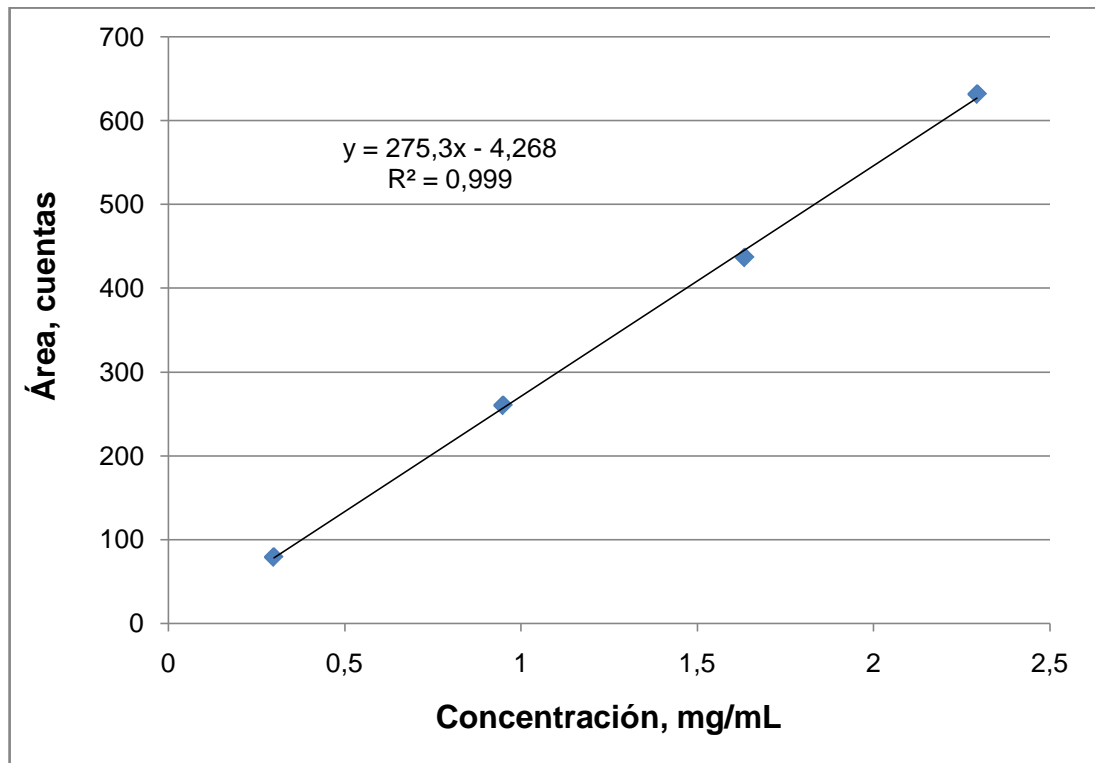


Datos curva de calibración p-cimeno

Concentración, mg/mL	Área, cuentas
26.12	0.109
90.78	0.357
145.07	0.571
210.26	0.877

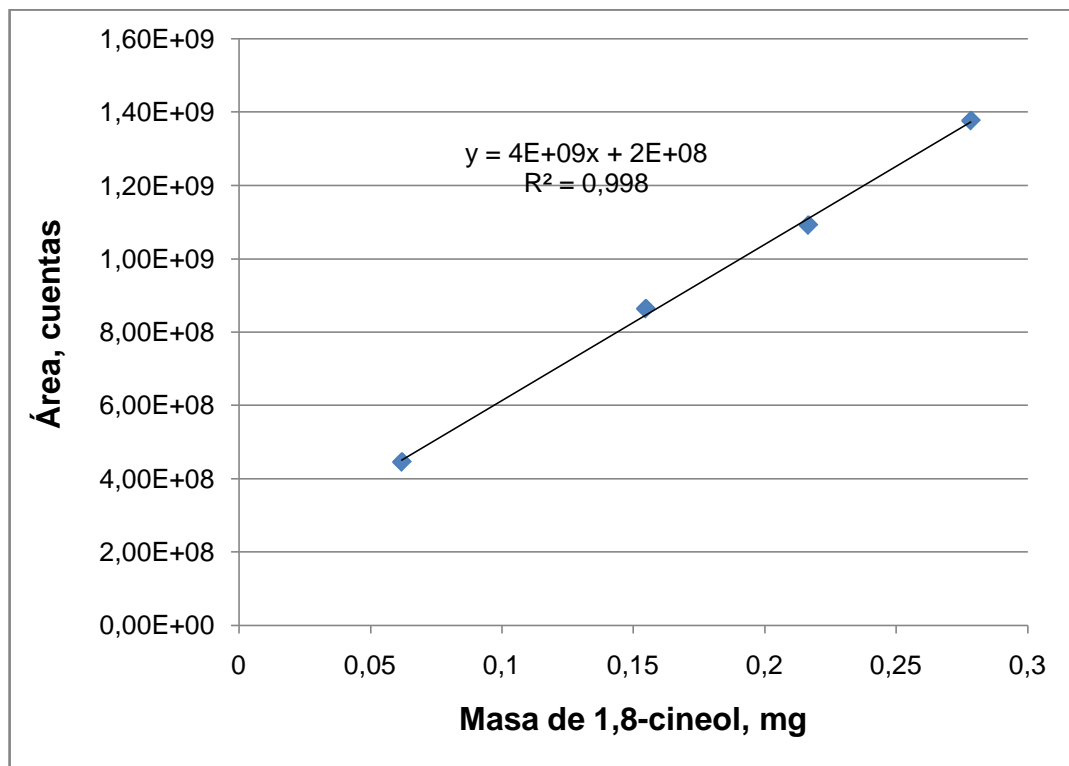


Datos curva de calibración timol	
Concentración, mg/mL	Área, cuentas
0.299	78.87
0.949	260.09
1.634	436.74
2.293	631.89

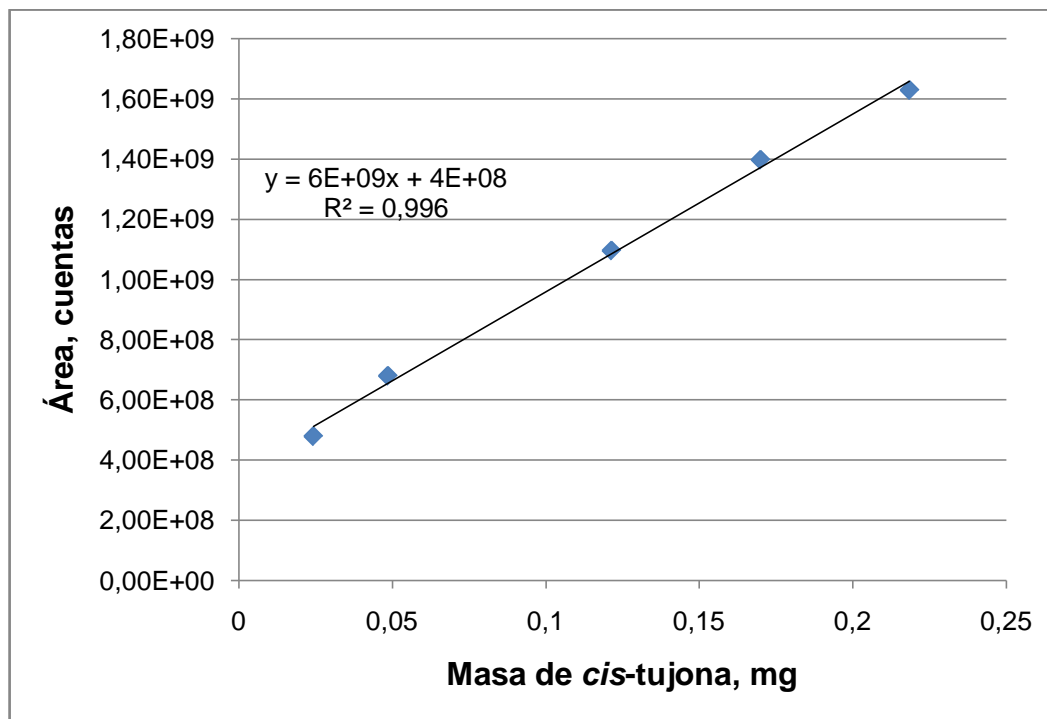


ANEXO A2. Curvas de calibración de compuestos volátiles mediante HS-SPME/GC-MSD.

Datos curva de calibración 1,8-cineol	
Masa, mg	Área, cuentas
0.0619	4.45E+08
0.155	8.64E+08
0.217	1.09E+09
0.278	1.38E+09

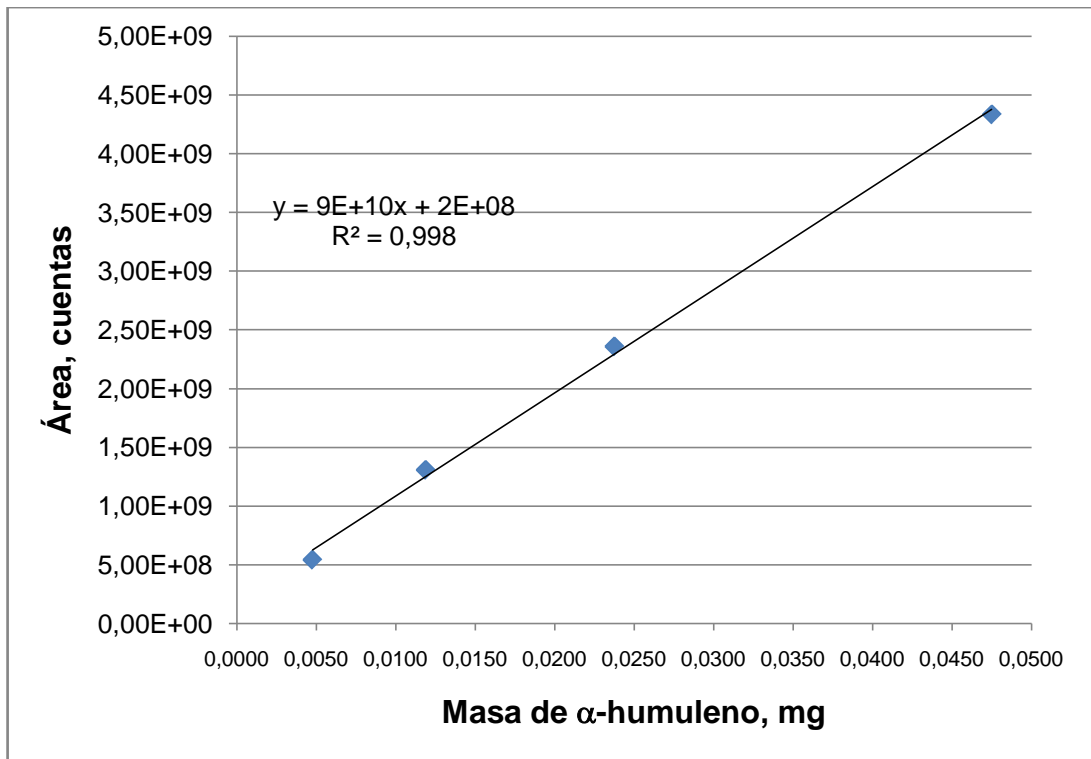


Datos curva de calibración <i>cis</i> -tujona	
Masa, mg	Área, cuentas
0.0243	4.79E+08
0.0485	6.80E+08
0.121	1.10E+09
0.170	1.40E+09
0.218	1.63E+09



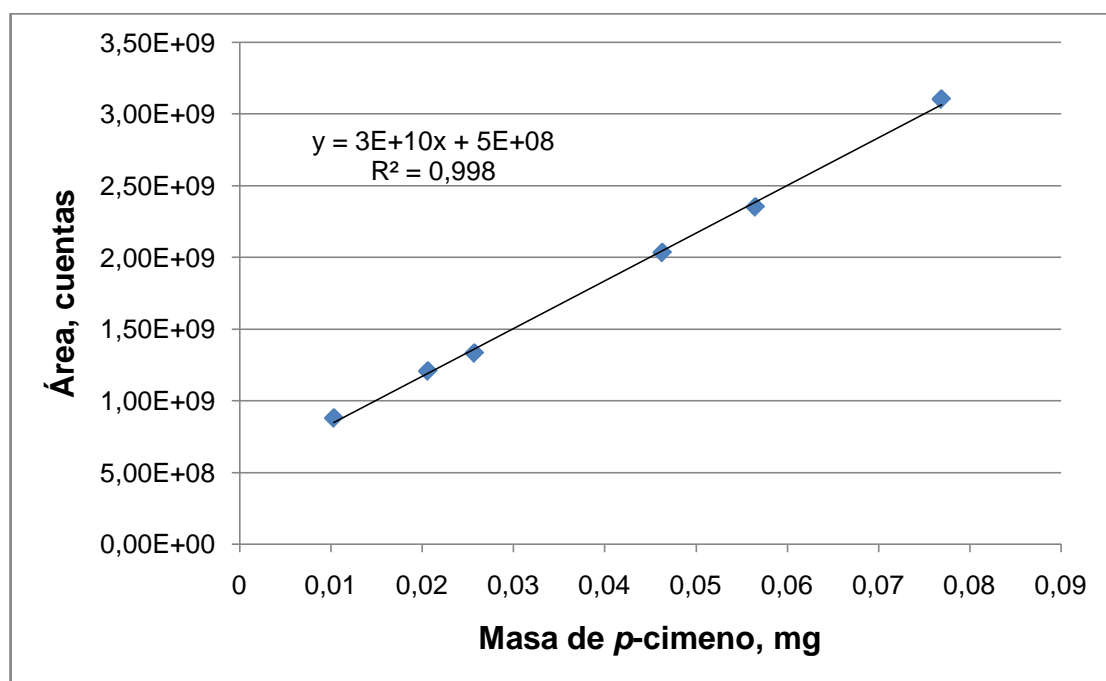
Datos curva de calibración α -humuleno

Masa, mg	Área, cuentas
0.00475	5.45E+08
0.0119	1.31E+09
0.0237	2.36E+09
0.0475	4.34E+09

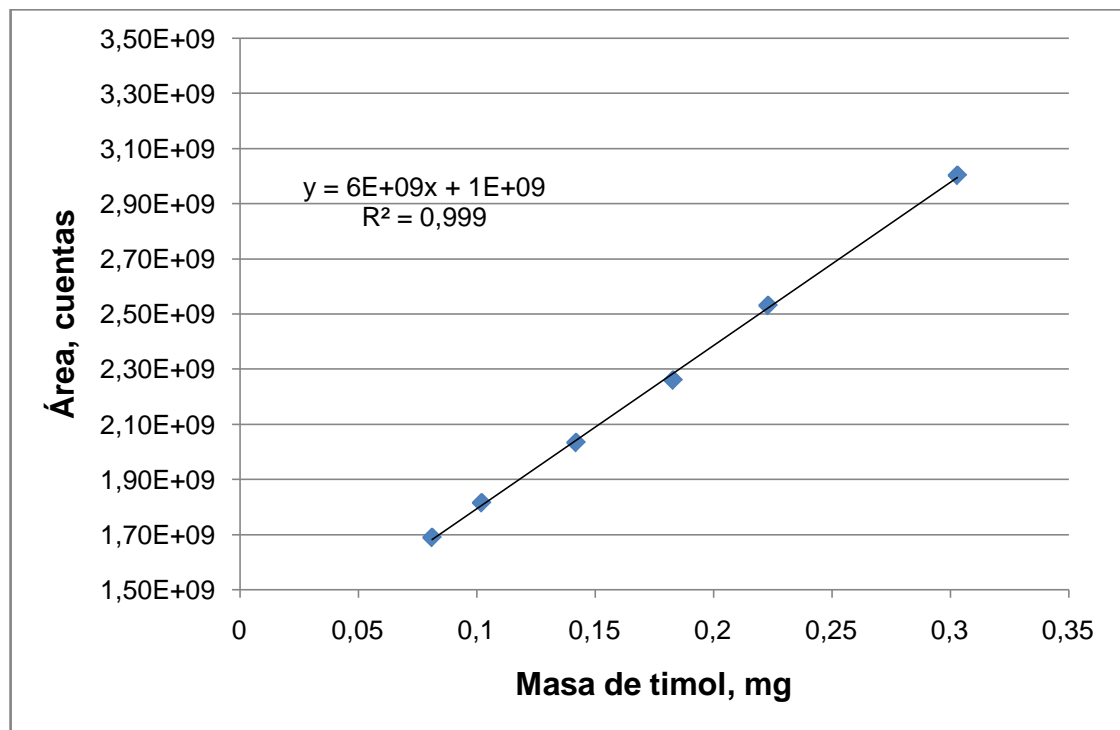


Datos curva de calibración p-cimeno

Masa, mg	Área, cuentas
0.0103	8.80E+08
0.0206	1.21E+09
0.0257	1.33E+09
0.0463	2.03E+09
0.0565	2.35E+09
0.0769	3.11E+09

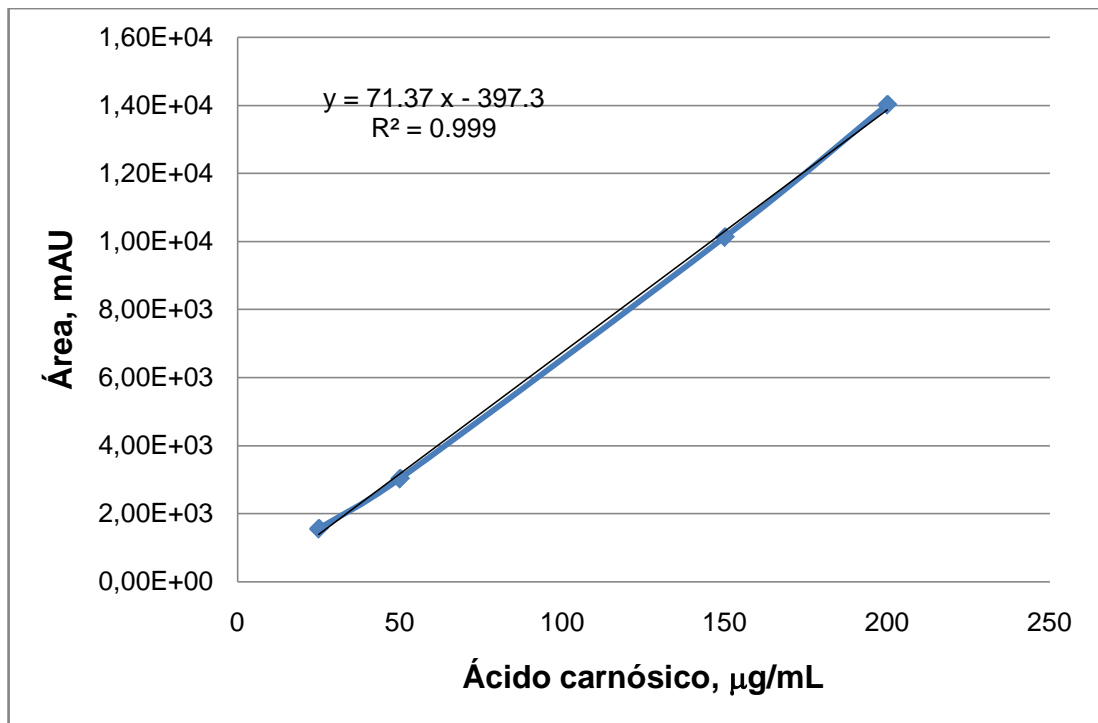


Datos curva de calibración timol	
Masa, mg	Área, cuentas
0.081	1.69E+09
0.102	1.82E+09
0.142	2.04E+09
0.183	2.26E+09
0.223	2.53E+09
0.303	3.00E+09

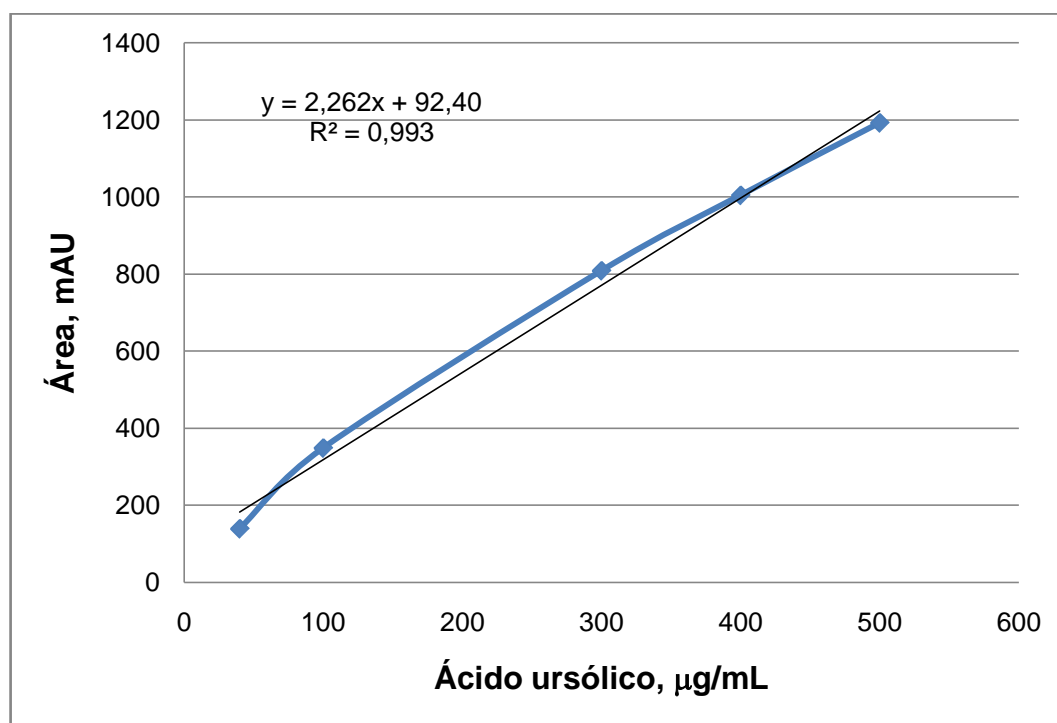


ANEXO A3. Curvas de calibración de los ácidos carnósico y ursólico mediante HPLC-DAD

Datos curva de calibración ácido carnósico	
Concentración, $\mu\text{g/mL}$	Área, mAU
25	1559
50	3030
150	10132.3
200	14025

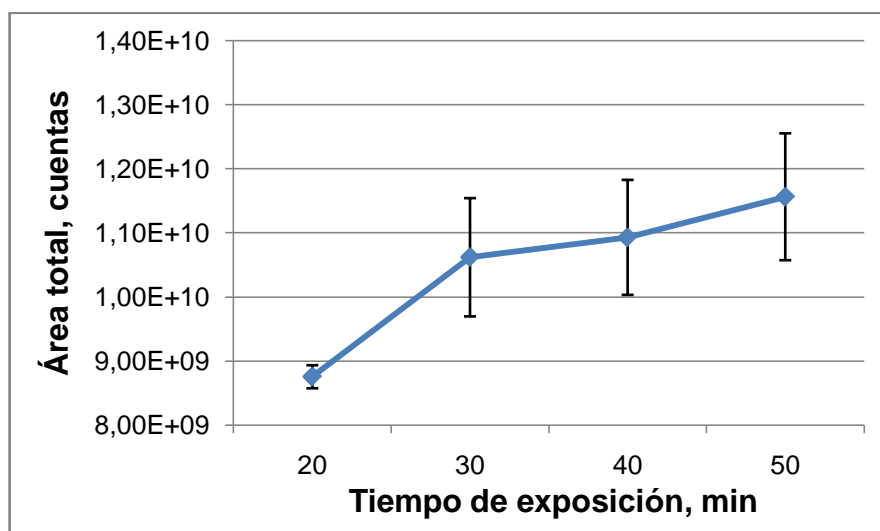
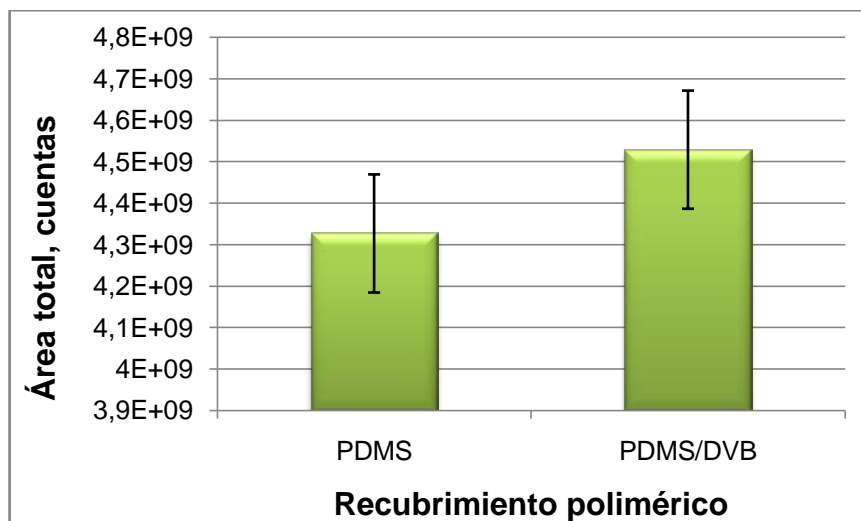


Datos curva de calibración ácido ursólico	
Concentración, $\mu\text{g/mL}$	Área, mAU
40	139
100	349
300	809
400	1005
500	1192.8



ANEXO B. Selección de recubrimiento de fibra y tiempo de equilibrio para la extracción de volátiles mediante HS-SPME. Para la escogencia de la fibra se empleó: Temperatura 40 °C, Tiempo de exposición 30 min; GC-MS, Columna DB-5MS (60 m); Desorción 250 °C (10 min).

Anexo B1. *Salvia officinalis*.



ANEXO B2. *Thymus vulgaris*

