

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



# Procedimientos de cromatografía supercrítica para la obtención de productos alimentarios funcionales



**Pilar Ramírez Calvo**

Universidad Autónoma de Madrid

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)

**Madrid, 2006**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

**Procedimientos de cromatografía supercrítica para la  
obtención de productos alimentarios funcionales**

Memoria presentada por:

**Pilar Ramírez Calvo**

Para optar al grado de

**DOCTORA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Guillermo Reglero Rada

Dra. Elena Ibáñez Ezequiel

Sección Departamental Ciencias de la Alimentación, UAM  
Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC

GUILLERMO REGLERO RADA, CATEDRÁTICO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y ELENA IBÁÑEZ EZEQUIEL, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL CSIC

CERTIFICAN,

Que la presente Memoria titulada "Procedimientos de cromatografía supercrítica para la obtención de productos alimentarios funcionales" que presenta Pilar Ramírez Calvo, Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección en la Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Autónoma de Madrid y en el Departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC.

Y para que conste firmamos el presente certificado a 10 de Octubre de 2006.

Dr. Guillermo Reglero Rada

Dra. Elena Ibáñez Ezequiel

## Agradecimientos

Un trabajo como este lleva tiempo y enseña mucho, no sólo a nivel profesional y técnico sino también a crecer como persona. Por eso, desde estas líneas más personales, me gustaría recordar a todas esas personas (espero que no se me olvide nadie) que me han ayudado a que este trabajo sea una realidad y que yo sea como persona algo más de lo que era al principio de este trabajo.

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director, Dr. Guillermo Reglero, el haberme apoyado y aconsejado en los momentos más importantes de mi carrera profesional. Por darme la oportunidad de aprender en el laboratorio de alimentos y de seguir encontrando un hueco tras mi periodo doctoral. Gracias por confiar en mi.

Gracias sinceras a mi codirectora, la Dra. Elena Ibáñez. Porque sin ella sin duda que este trabajo no habría salido adelante de manera tan completa (en todos los sentidos) y tan fácil. Por ayudarme y apoyarme siempre, aun cuando eso supone dejar parte de su tiempo en familia para sacar adelante esta tesis.

Al Dr. Javier Tabera por esa gran acogida que hace sentirse tan bien a su lado. Por sus consejos, por compartir su sabiduría de vida conmigo y por su amistad.

A la Dra. Laura Jaime. Por todos los momentos que hemos vivido juntas. Por su cariño, por su gran capacidad de trabajo y por aportar su granito de arena en lo que soy ahora.

A una de mis mejores amigas, la Dra. Sofía Cavero, por compartir conmigo la gran persona que es, no sólo a nivel profesional sino, sobre todo, a nivel personal. Por ser una gran amiga en todo momento y por cogerme de las manos en los momentos adecuados.

Al que empezó siendo un compañero de trabajo, Santiago Pérez, y en la actualidad es una de las mejores personas que tengo a mi lado. Gracias, Santi, por el pasado, por el presente y por todo lo que nos queda por compartir.

Al futuro doctor, Jose Mendiola. Por su ayuda en todo momento, en la cercanía y en la distancia de km. Por aportar siempre un detalle de calidad humana cuando las cosas se ponen difíciles.

A todo el grupo del Área de Tecnología de los alimentos de la Autónoma: Mónica, Tiziana, Cristina, Susana, Luis, Carlos, Javier, Chesco... Por los momentos que he pasado a vuestro lado y por todo lo que he aprendido de vosotros.

Al grupo de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales, con los que he compartido parte del tiempo de este trabajo. Por los ratos de cafés, comidas, cañas y laboratorio. Por hacer que durante mi estancia allí no me haya sentido sola y por toda la ayuda que, de diversas maneras, me habéis prestado. Sois muchos (afortunadamente para mí), así que espero que entendáis que no poner vuestros nombres no os hace menos especiales. Gracias al Dr. Alejandro Cifuentes, por ser un gran "jefe en la sombra" cuando lo he necesitado.

A todo el grupo del Departamento de Química-Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid por su cálida acogida, por su inestimable ayuda y por tratarme como a una más del grupo.

I also want to include people from my stay in Hamburg. It was a short period of time but very intensive for me. Thank you, Monika for your invaluable help from that moment to the present time. Thank you: Edgar, Leandro, Vikrant and Susana, for your international friendship. I hope I will see you in Spain, Germany, India or Brasil!

A mis nuevos compañeros de trabajo de Solutex. Gracias por todo lo que estoy viviendo a vuestro lado: Laura (ide verdad que algún día la tesis se acaba!), Oliver, Verónica, Ana y Miki. En especial, gracias al Dr. Fernando Moreno por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto y por todo lo que estoy aprendiendo gracias a él del mundo empresarial.

A mis amigos y amigas. Por todo lo que aportáis a mi vida sin saberlo, por enseñarme cada día y por aguantarme en mi lucha por acabar esta tesis. Gracias a cada uno por seguir siendo especiales: Carlos, Paloma, Ino, Eva, Cris, Carmina, Mónica, Pilar, Elena, Carmen, Laura, Miriam, Jorge, Sandra, Vero, Ángela, Anita, y el resto que os deis por aludidos (que no menos importantes).

A los que más me conocen y me "aguantan". Gracias a mis hermanos y mis cuñados por escucharme y por echarme siempre un cable. Por estar siempre detrás de mi, de manera imperceptible hasta que lo necesito, y por aceptarme como soy. Y gracias a esas sonrisas y cariños que son mis sobrinos. A Juan, Alicia, Hugo, Clara, Laura, Mónica y el que está por venir, por ser tan especiales para mi y por recordarme cuales son las cosas importantes de esta vida.

Muy especial, a mis padres. Por estar en cada momento de mi vida, por escucharme y decirme su opinión en todo momento, por confiar en mi y por tener gran culpa de ser quien soy.

Me gustaría dedicar este trabajo, por último, a esas personas con las que he compartido momentos muy buenos pero que no lo tienen tan fácil. Para que sepan apreciar que las cosas que merecen la pena hay que trabajarlas y por ayudarme a mantener la "llamita" encendida aun en el agobio mayor.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>12</b>
<b>1.) PRESENTACIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>2.) OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.) ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LAS TÉCNICAS</b> .....	<b>28</b>
3.1.) LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS EN LA TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS MODERNA.....	28
3.1.1.) ANTECEDENTES.....	28
3.1.2.) LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS EN LA QUÍMICA VERDE .....	34
3.1.3.) SFE: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES.....	38
3.2.) LA CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	44
3.2.1.) DEFINICIÓN.....	44
3.2.2.) FASE MÓVIL, POLARIDAD Y SOLUBILIDAD.....	46
3.2.3.) FASES ESTACIONARIAS.....	50
3.2.4.) TIPOS DE COLUMNAS .....	55
3.2.5.) LA CROMATOGRAFÍA SUPERCRÍTICA PREPARATIVA.....	56
3.2.5.1.) Definición y variables cromatográficas.....	56
3.2.5.2.) Equipos y procesos.....	57
3.2.6.) APLICACIONES.....	62
3.2.6.1.) Grasas, Aceites y otros lípidos .....	63
3.2.6.2.) Vitaminas .....	66
3.2.6.3.) Productos naturales obtenidos de plantas.....	66
<b>4.) FUENTES NATURALES DE INTERÉS PARA LA OBTENCIÓN DE INGREDIENTES ALIMENTARIOS FUNCIONALES</b> .....	<b>69</b>
4.1.) ROMERO.....	69
4.1.1.) DESCRIPCIÓN, CULTIVO Y PROPIEDADES.....	69
4.1.2.) COMPOSICIÓN Y FUNCIONALIDADES .....	70
4.1.2.1.) Extracto antioxidante .....	70
4.1.2.2.) Aceite esencial .....	73
4.2.) ACEITES VEGETALES.....	75
4.2.1.) TIPOS DE ACEITES VEGETALES .....	75
4.2.2.) COMPUESTOS MINORITARIOS DE INTERÉS.....	77
<b>5.) MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>85</b>

5.1.) MUESTRAS Y REACTIVOS.....	85
5.1.1.) MUESTRAS.....	85
5.1.1.1.) Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> , L.).....	85
5.1.1.2.) Aceites vegetales.....	86
5.1.1.3.) Material para el desarrollo de las columnas analíticas y preparativas ..	86
5.1.1.4.) Fluido Supercrítico empleado en SFE y SFC.....	88
5.1.2.) REACTIVOS.....	88
5.1.2.1.) Disolventes.....	88
5.1.2.2.) Patrones.....	88
5.1.2.3.) Reactivos para el análisis de la actividad funcional in vitro .....	89
5.2.) CARACTERIZACIÓN DE COLUMNAS.....	90
5.2.1.) MEDIDA DE EFICACIA .....	90
5.2.2.) MEDIDA DE ACTIVIDAD SUPERFICIAL.....	91
5.3.) EXTRACCIÓN DE ROMERO MEDIANTE SFE A ESCALA ANALÍTICA ..	92
5.4.) DESCRIPCIÓN DE EQUIPOS .....	96
5.4.1.) CROMATÓGRAFO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS A ESCALA ANALÍTICA (SFC) .....	96
5.4.2.) EQUIPOS PREPARATIVOS.....	99
5.4.2.1.) Equipo de PS-SFC (Universidad Autónoma de Madrid, España).....	99
5.4.2.2.) Equipo de PS-SFC (Facultad de Ciencias, U. Valladolid, España) ...	104
5.4.3.) CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES .....	106
5.4.3.1.) Equipos y métodos empleados en la caracterización por Cromatografía de Gases .....	106
5.4.3.2.) Equipos y Métodos empleados para la caracterización por HPLC ....	107
5.5.) MEDIDAS DE ACTIVIDAD FUNCIONAL.....	108
5.5.1.) ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	108
5.5.2.) ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	110
<b>6.) RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>112</b>
6.1.) DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE COLUMNAS CON RELLENOS “AD HOC” IMPREGNADOS.....	112
6.1.1.) DESACTIVACIÓN DEI TUBO DE ACERO INOXIDABLE .....	113
6.1.2.) IMPREGNACIÓN DE RELLENOS.....	114
6.1.3.) LLENADO Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS COLUMNAS RELLENAS IMPREGNADAS .....	115
6.1.3.1.) Columnas analíticas .....	115
6.1.3.2.) Columnas preparativas.....	116



6.1.4.) <i>CARACTERIZACIÓN DE COLUMNAS RELLENAS IMPREGNADAS...</i>	119
6.1.4.1.) Columnas analíticas .....	119
6.1.4.2.) Columnas preparativas .....	137
6.2.) AISLAMIENTO DE SUSTANCIAS NATURALES MEDIANTE SFC .....	140
6.2.1.) <i>EXTRACTOS DE ACEITES VEGETALES</i> .....	140
6.2.1.1.) Separación de extractos de aceites vegetales a escala analítica: Antecedentes y elección de fase estacionaria .....	140
6.2.1.2.) Condiciones experimentales para el análisis de extractos a escala preparativa .....	146
6.2.1.3.) Aislamiento e identificación de compuestos funcionales a partir de aceites vegetales mediante PS-SFC.....	150
6.2.2.) <i>EXTRACTOS DE ROMERO</i> .....	159
6.2.2.1.) Estudio de la solubilidad del ácido carnósico en CO <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> con modificador. Estudio teórico y modelado experimental.....	159
6.2.2.2.) Ácido carnósico y fase estacionaria. Condiciones experimentales para el análisis de extractos a escala analítica.....	165
6.2.2.3.) Fraccionamiento de extractos supercríticos de romero en columna comercial tipo Diol mediante PS-SFC. Actividad antioxidante y antimicrobiana de las fracciones. ....	185
6.2.2.4.) Fraccionamiento de extractos supercríticos de romero en columna rellena con partículas de sílice impregnadas con fase estacionaria SE-54. Actividad antioxidante y antimicrobiana de las fracciones.....	200
6.2.2.5.) Comparación de columnas .....	217
<b>7.) RESUMEN DE RESULTADOS .....</b>	<b>219</b>
<b>8.) SUMMARY OF RESULTS.....</b>	<b>222</b>
<b>9.) CONCLUSIONES.....</b>	<b>225</b>
<b>10.) CONCLUSIONS .....</b>	<b>227</b>
<b>11.) BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>229</b>
<b>ANEXO I. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>256</b>
<b>ANEXO II. RELACIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS DE LA TESIS DOCTORAL.....</b>	<b>262</b>

## RESUMEN

En esta Memoria se presentan los resultados más relevantes obtenidos en el desarrollo de procesos de fraccionamiento y purificación, mediante cromatografía supercrítica (SFC), de ingredientes alimentarios funcionales a partir de fuentes naturales.

La Memoria recoge el diseño y caracterización de nuevas columnas para cromatografía supercrítica, así como la optimización de los mecanismos de separación que permiten la obtención de ingredientes funcionales naturales a partir de aceites vegetales y plantas. Así, se han desarrollado rellenos con partículas impregnadas de fases estacionarias de distinta polaridad y métodos específicos para el relleno de las columnas, tanto analíticas como preparativas para su empleo en SFC. Además, se ha llevado a cabo la puesta a punto de estas columnas para abordar estudios de fraccionamiento y enriquecimiento de compuestos biológicamente activos a partir de matrices de muy diversa naturaleza.

Se han estudiado también los mecanismos y variables del proceso de separación a escala analítica y preparativa, para obtener la necesaria capacidad de resolución que permita la separación, fraccionamiento y posterior recogida y purificación de los compuestos naturales de interés. Se han incluido estudios teóricos de modelado termodinámico y experimentales de optimización de las condiciones de separación.

En la Memoria se recoge, finalmente, el procedimiento seguido para la obtención de ingredientes funcionales naturales a partir de aceites vegetales y plantas, aplicando las columnas y mecanismos diseñados y optimizados.

En primer lugar se ha estudiado el aislamiento e identificación de compuestos funcionales (escualeno, ésteres de esterol, esteroides libres,

tocoferoles) a partir de aceites vegetales mediante PS-SFC en columna rellena con partículas impregnadas de fase polar (Carbowax 20M). Y en segundo lugar, el fraccionamiento de extractos supercríticos de romero mediante PS-SFC en columna con partículas impregnadas de fase SE-54 para la obtención de ingredientes funcionales con actividades antioxidante y antimicrobiana.

Este estudio pone de manifiesto el interés de la cromatografía de fluidos supercríticos a escala preparativa como técnica medioambientalmente limpia para el desarrollo de procedimientos de obtención de productos alimentarios funcionales.

## **SUMMARY**

In the present work, the most relevant results obtained for the development of functional food ingredients from natural sources based on supercritical fluid chromatography (SFC) are presented.

The present study includes the design and characterization of new columns for SFC and the optimization of the separation mechanism to obtain functional natural ingredients from vegetable oils and aromatic plants.

With regard to the design of new columns, silica particles coated with different stationary phases and specific methods to pack the particles at both, analytical and preparative scale, have been developed. Moreover, these columns have been used to set up fractionation and enrichment processes of functional active ingredients from different sources.

The mechanisms and variables of the separation processes have been studied, firstly at analytical scale and later at preparative scale to obtain the needed resolution capacity to make possible the separation, fractionation and purification of the functional compounds. In this work, theoretical studies of thermodynamic modelling and experimental studies to optimize the separation processes have been carried out.

Finally, in this work the procedure to achieve the functional ingredients from oils and aromatic plants are presented based on the columns and mechanism designed and optimised.

First of all, we developed a process to isolate and identify functional compounds (squalene, sterol esters, free sterols and tocopherols) from vegetable oils by PS-SFC in a column packed with particles coated with Carbowax 20M

stationary phase. And secondly, we focused our studies in the fractionation of supercritical rosemary extracts based on PS-SFC in a column packed with particles coated with SE-54 as stationary phase to obtain functional ingredients with antioxidant and antimicrobial activities.

The present study demonstrates the interest of SFC at preparative scale as an environmentally friendly process to obtain natural food ingredients with specific functionalities.

## 1.) PRESENTACIÓN

Los alimentos funcionales (Juárez y col., 2005) constituyen un auténtico "fenómeno" cuyo alcance trasciende el ámbito de la investigación, ya que tiene unas claras repercusiones económicas y se ha convertido en objeto de controversia entre la población. Aunque este fenómeno tuvo su origen en el mundo de la ciencia, rápidamente despertó un gran interés en la industria alimentaria, que vio en él nuevas oportunidades competitivas. Finalmente, con amplia atención de los medios de comunicación, ha llegado a los consumidores.

El ámbito de los alimentos funcionales tiene estructura triangular y se constituye por las interacciones entre los investigadores científicos, los industriales y los consumidores (Figura 1).



Figura 1: El triángulo de los alimentos funcionales.

El triángulo debe mantenerse en equilibrio, siendo el agente aglutinante las Administraciones Públicas porque promueven la investigación y regulan la producción y comercialización de los alimentos funcionales.

Cuando se trata de la relación entre la alimentación y la salud hay que ser muy honestos. Debe priorizarse la contribución a la calidad de vida y a la seguridad de la población por delante del interés científico y económico. Por ello, lo primero que hay que plantearse acerca de los alimentos funcionales es si los necesitamos. Algunos especialistas en Nutrición sostienen que una dieta adecuada es suficiente para mantener un buen estado de salud. Sin embargo, desde hace casi tres décadas hay en la comunidad científica un profundo interés por diseñar alimentos que contribuyan sensiblemente, y de modo específico, a mejorar la salud de quienes los consuman. A comienzos de los años 80 el Gobierno Japonés estimuló el estudio de alimentos que denominó FOSHU (*Foods for Specific use of Health*). En la segunda mitad de los años 90 la Comisión Europea promovió la Acción Concertada FUFOSE (*Functional Food Science in Europe*) para estimular el estudio científico de los alimentos funcionales. De este proyecto surgió un primer concepto de alimento funcional para Europa. Se propuso que, para ser denominado así, hay que demostrar que el alimento en cuestión posee efectos que van más allá del valor nutritivo y que mejora el estado de salud o reduce el riesgo de contraer enfermedades (Diplock y col., 1999).

En el V Programa Marco de Investigación de la UE se inició el denominado PASSCLAIM (*Process of the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods*) que, en buena medida, servirá de base del Reglamento sobre las alegaciones de salud de los alimentos funcionales, en la actualidad a debate entre el Parlamento y la Comisión Europeos y que regulará la comercialización de estos productos en un futuro inmediato.

La presencia de alimentos funcionales en el mercado español es relativamente reciente, pero ya ha tenido lugar la toma de posiciones. El debate de las dos posturas (a favor y en contra) está en "la calle", en la prensa y en los programas de televisión.

Los alimentos funcionales representan la vía para hacer llegar a la salud de la población, a través de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos, los avances en Biología Molecular y Biomedicina que se están produciendo en los últimos años y aquellos que, previsiblemente de extraordinaria importancia, se producirán en los próximos. Desde este punto de vista, los alimentos funcionales son probablemente la herramienta más importante que tendrá la Ciencia de la Nutrición en el futuro, una vez que se haya avanzado suficientemente en las bases sobre las que debe apoyarse su diseño.

A nivel internacional, la investigación sobre los alimentos funcionales ha aumentado en intensidad muy sensiblemente en los últimos años. La base de datos *Food Science and Technology Abstracts* recoge entre 1969 y 2005 un total de 2231 artículos de investigación alimentaria que contienen, entre sus palabras clave, "functional" y "health". De ellos, 1669 (el 74,8%) son posteriores al año 2000. Del diagrama de la Figura 2 se puede deducir que la actividad investigadora sobre alimentos funcionales está creciendo continuamente.

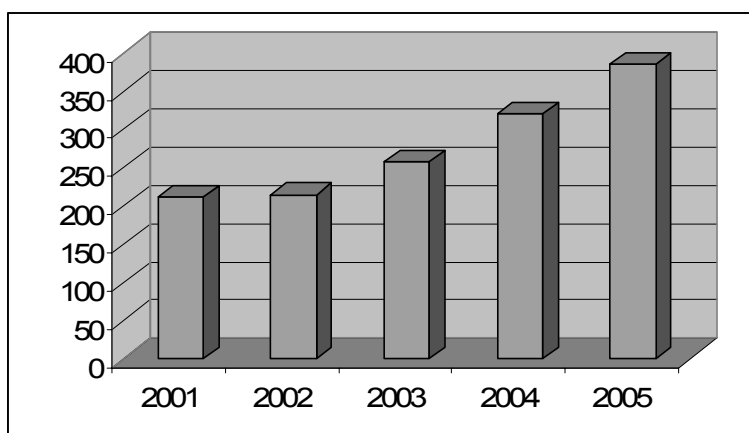


Figura 2: Número de publicaciones obtenidas en la búsqueda de las palabras clave "functional" y "health" en la base de datos *Food Science and Technology Abstracts* años 2001 a 2005.

Los alimentos funcionales son, obviamente, alimentos saludables ya que contribuyen a mejorar el estado de salud de la población. Pero son un tipo concreto



de alimentos saludables, diferente de aquellos a los que se atribuye un efecto beneficioso por su contenido natural en uno o varios compuestos con actividad biológica positiva. La diferencia está en que los alimentos funcionales se diseñan con un propósito concreto. Por ello, aun habiendo voces que defienden que el aceite de oliva o las frutas, por ejemplo, son alimentos funcionales, la comunidad científica internacional comienza a distinguir con nitidez los alimentos naturales saludables (*healthy foods*) de los alimentos funcionales (*functional foods*). Ambos tipos tienen un enorme interés nutricional y deben ser objeto de investigación para aprovechar sus beneficios. Pero, aunque confluyan a menudo los procedimientos de estudio de sus efectos, existe una diferencia fundamental entre ambos: los alimentos funcionales se diseñan *ex profeso* y los alimentos saludables no se diseñan. Se trata de obtenerlos con la mayor calidad y valor nutritivo posibles, pero no se diseñan.

El diseño de los alimentos funcionales debe tener en cuenta las bases de la Nutrición. El uso de alimentos funcionales debe realizarse sin alterar los parámetros de la Nutrición y de la Dietética de modo que sirvan para reforzar los planteamientos tradicionales de estas disciplinas hacia el mantenimiento de la salud mediante una correcta alimentación.

La fisiología humana reúne una infinidad de procesos bioquímicos de carácter multifactorial. La ciencia va avanzando en el estudio de dichos procesos y de los factores que los regulan o que influyen en su desarrollo. Es la suma de numerosas investigaciones realizadas en todo el mundo a lo largo de los años lo que va creando el conocimiento del funcionamiento del cuerpo humano. Queda mucho por saber, por eso, no siempre se conoce por completo, a nivel molecular, cuál es el mecanismo de actuación de un determinado producto cuyos beneficios para la salud están comprobados por observación y/o por intervención dietéticas.

En la mayoría de los casos, la acción de los compuestos funcionales de interés alimentario se conoce por estudios epidemiológicos que establecen asociaciones más o menos fuertes entre la ingesta de estas sustancias y la prevención y/o mejora de ciertas enfermedades. Sin embargo, no todos los estudios de este tipo ofrecen resultados suficientemente concluyentes. También la medicina naturista y las tradiciones orientales han aportado ideas para la utilización de ciertas sustancias como ingredientes alimentarios funcionales, que sin embargo no han sido objeto de investigación dentro de la matriz a la que se incorporan.

En los últimos años, los estudios de actividad biológica y biodisponibilidad de los productos funcionales se han basado en investigaciones *in vitro*, seguidas de experimentos con animales y de ensayos de intervención dietética en humanos. Este tipo de estudios constituye un avance importante, aunque aún es insuficiente.

El diseño riguroso de alimentos funcionales requiere conocer a nivel molecular los mecanismos de la actividad biológica de sus componentes y las bases de las enfermedades a las que se dirigen. En la actualidad ya se dan las dos circunstancias que permiten realizar los estudios necesarios para ello: la secuenciación del genoma humano, que ha abierto la posibilidad de conocer la función biológica de los genes (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) y el desarrollo de las herramientas científicas de Biología Molecular requeridas para abordar las investigaciones (Martí y col., 2005).

La Nutrigenómica y la Nutrigenética tienen como objetivo descifrar los mecanismos moleculares de los efectos de los nutrientes en la salud y por tanto, las bases de la actividad biológica de los ingredientes funcionales (Kaput y Rodríguez, 2004). Es previsible que en poco tiempo comiencen a cambiar algunos de los criterios nutricionales que se emplean en la actualidad. Por ejemplo, ya hace tiempo que se puso en duda que una dieta muy baja en grasas se pueda asociar con

claridad con la mejora del perfil lipídico del plasma (Dreon y col., 1999), siendo los factores genéticos los que regulan la susceptibilidad a determinados perfiles de lipoproteínas plasmáticas (Ordovas y Corella, 2004).

En todo caso hay que ser cautelosos ya que a veces un mismo producto puede tener efectos contrapuestos. Por ejemplo los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que poseen claros efectos saludables, también pueden incrementar el estrés oxidativo si no se usan adecuadamente; los fitosteroles reducen la absorción de colesterol pero también de algunas vitaminas; los polifenoles parecen tener actividades antioxidantes, entre otras, pero interfieren en la biosíntesis de algunas hormonas; las isoflavonas pueden provocar retrasos en la maduración sexual de los niños; la promoción del consumo de frutas y hortalizas puede contribuir a aumentar la ingesta de plaguicidas; etc.

Por ello, la pauta principal que debe seguirse en el diseño de alimentos funcionales es aumentar lo máximo posible la relación beneficio/riesgo. Pero obviamente actuando simultáneamente sobre ambos: tratando de aumentar al máximo el beneficio y reduciendo al mínimo el riesgo.

#### Estrategias para aumentar el beneficio:

Buscar un efecto fisiológico amplio. Por ejemplo los antioxidantes (Demmig-Adams y Adams, 2002) y los ácidos grasos poliinsaturados (Jump, 2004) que se ingieren a través de la dieta pueden ejercer múltiples efectos a través de su influencia en la regulación de los procesos de transcripción génica.

Asegurar que existe biodisponibilidad. Para ello se pueden hacer test *in vitro* y seleccionar los ingredientes para luego pasar a los ensayos con animales y finalmente ensayos clínicos.

Comprobar mediante análisis químico que los ingredientes funcionales se mantienen durante el procesado y la conservación y mediante análisis funcional *in vitro*, que además se mantiene la actividad biológica perseguida.

#### Estrategias para reducir el riesgo:

Utilizar como ingredientes funcionales productos "familiares" en alimentación. Es decir, productos que se encuentren de forma natural en alimentos de uso habitual (Ibáñez y col., 2003), que se obtengan a partir de aquellos por procedimientos de transformación suave (Torres y col., 2003), o productos de actividades alimentarias conocidas, obtenidos de fuentes naturales (Jaime y col., 2005).

Añadir los ingredientes funcionales en las dosis mínimas efectivas. Algunos productos habitualmente empleados en el diseño de alimentos funcionales, como los tocoferoles, pueden tener efectos desfavorables a partir de una cierta cantidad (Meagher y col., 2001).

Realizar una caracterización exhaustiva con el fin de conocer si hay transformaciones químicas indeseadas o detectar la presencia de residuos o contaminantes (Mendiola y col., 2005). Puesto que muchos ingredientes funcionales son extractos, la posibilidad de concentrar productos tóxicos con el producto principal debe ser descartada.

Llevar a cabo estudios de toxicidad (Anadon y Martínez-Larranaga, 1990) a dosis superiores a las empleadas con el fin de garantizar la ausencia de efectos negativos.

### Los ingredientes funcionales

Para desarrollar un alimento funcional hay que enriquecerlo a propósito en uno o varios compuestos con actividad biológica conocida que no están presentes de forma natural en el alimento, o no lo están en cantidad suficiente, buscando un efecto fisiológico más o menos amplio para la mejora del estado de salud o para la prevención de enfermedades. Posteriormente hay que estudiar la incidencia del procesado y de la conservación en la actividad biológica del producto y sostener mediante evidencias científicas sus alegaciones de salud.

Para obtener alimentos funcionales se parte de alimentos conocidos que se enriquecen con los ingredientes funcionales. Éstos deben ser naturales. Los alimentos que en sus etiquetas proclaman "sin aditivos artificiales" o *All Natural* son cada vez más apreciados por los consumidores. Además, el alto nivel cultural de la población actual lleva asociado el conocimiento y temor por el efecto que los residuos de plaguicidas y los contaminantes ambientales pueden tener en la salud si son ingeridos con los alimentos. También preocupa que la propia producción de alimentos pueda ser causa de deterioro medioambiental. Por ello, son objeto de interés creciente las tecnologías que no provocan un impacto ambiental negativo y que permiten obtener productos alimentarios naturales, limpios y seguros.

### La tecnología de fluidos supercríticos

Una tecnología que no puede considerarse nueva, ya que está desarrollada desde hace 30 años, pero que resulta especialmente adecuada a los objetivos modernos de la Tecnología de los Alimentos, es la que se basa en el empleo de Fluidos Supercríticos (FS). Por su versatilidad, selectividad, bajo impacto medioambiental y posibilidad de procesado en condiciones suaves de temperatura y no alterantes químicamente, cabría pensar que su uso está muy extendido. Sin embargo no es así. Los altos costes de inversión y operación que tradicionalmente

se le han atribuido, no siempre con fundamento, han frenado su implantación en la industria alimentaria.

El poder de disolución de los fluidos supercríticos se conoce desde hace más de cien años (Hannay y Hogart, 1879). Sin embargo, su uso en procesos industriales de extracción es todavía escaso, ya que hasta el momento se ha utilizado preferentemente la extracción con disolventes líquidos. No obstante, desde hace algunos años se observa un creciente interés por la tecnología de los FS ya que proporciona productos de una calidad muy alta, exentos de residuos de disolventes, en procesos eficientes de bajo o nulo impacto ambiental.

La tecnología de FS es un conjunto de técnicas de aislamiento por contacto en equilibrio que se basan en las propiedades físico-químicas, intermedias entre líquidos y gases, que adquieren algunas sustancias cuando se les somete a presiones y temperaturas superiores a las de su punto crítico. En estas condiciones, algunos gases poseen poder de solvatación (propiedad típica de los líquidos) y pueden ser utilizados como disolventes, manteniendo las ventajas que proporcionan sus altos coeficientes de difusión y bajas viscosidades (propiedades típicas de los gases) en lo que se refiere a transferencia de materia y, por tanto, penetrabilidad en las matrices y velocidad de extracción. En distintas condiciones de presión y temperatura el fluido supercrítico adquiere diferentes densidades y, por tanto, es posible optimizar la selectividad de la extracción variando ambos parámetros, sin necesidad de cambiar el fluido. Una vez concluido el proceso no es necesario aplicar calor para eliminar el disolvente. Basta con reducir la presión para el que fluido pase de supercrítico a gas y se elimine espontáneamente. Una posibilidad muy interesante es realizar la descompresión por etapas. De esta forma se consigue una reducción en cascada de la densidad y un fraccionamiento del extracto.

El gas que por sus características es más adecuado para la extracción de productos alimentarios es el  $CO_2$ . Por su temperatura crítica ( $T_c = 31.1\text{ }^\circ C$ ) es apto

para la extracción a bajas temperaturas. Su presión crítica ( $P_c = 72.0$  bar) permite alcanzar las propiedades supercríticas a costes energéticos moderados y con instalaciones asequibles. Además, en las condiciones del punto crítico su densidad es relativamente alta ( $\rho_c = 0.47$ ), por tanto, lo es su poder disolvente. Además no es oxidante, ni tóxico, es barato y está admitido como un disolvente seguro (GRAS) para buenas prácticas de elaboración (GMP). Tiene limitaciones en cuanto a la extracción de compuestos polares, pero este inconveniente puede resolverse añadiendo etanol, que también es GRAS, y en proporciones muy bajas (del orden del 5%) no origina problemas de residuos de disolventes, ni de vertidos y tampoco de manejo.

### Procesos alimentarios basados en los FS

La extracción supercrítica es una alternativa ventajosa a la extracción con disolventes para la obtención de ingredientes alimentarios ya que opera en condiciones suaves y no oxidantes, permitiendo obtener productos de alta calidad, con sus propiedades naturales intactas y exentos de residuos de disolventes. Destaca el caso de los antioxidantes, que generalmente se pueden fraccionar en el mismo proceso de extracción supercrítica dando lugar a productos de funcionalidades diferentes. Se han realizado numerosas aplicaciones para la extracción de plantas labiadas (romero, tomillo, orégano, salvia, etc.) (Nguyen y col., 1994). En estos casos se obtiene una oleorresina fácilmente fraccionable en dos productos: un aceite esencial, generalmente con funcionalidades aromática y antimicrobiana, y un antioxidante. Es bien conocido que los antioxidantes naturales obtenidos por SFE poseen una actividad mayor que los extraídos con disolventes. Djarmati y colaboradores (Djarmati y col., 1991) demostraron que los extractos antioxidantes de salvia obtenidos por extracción con  $CO_2$  supercrítico eran más eficaces que el BHT.

Junto con los antioxidantes, el procesado de productos lipídicos es probablemente el campo de aplicación más ventajoso de la tecnología de FS. Existen diversos antecedentes de procesos de obtención de aceites vegetales, pero el aspecto más interesante del procesado de lípidos es probablemente el aislamiento y purificación de lípidos funcionales (Hurtado-Benavides y col., 2004; Señoráns e Ibáñez, 2002).

Los FS sirven también para el aislamiento y concentración de otros productos alimentarios. Permite extraer selectivamente de una matriz una sustancia concreta, o un grupo reducido de sustancias, alterando mínimamente las características de aquella. En este sentido, se ha aplicado con éxito en diversos procesos de descafeinación del café y del té, en la extracción de teobromina del cacao, en la extracción de grasas de huevos, productos lácteos y aperitivos fritos y en la desalcoholización de sidra y otras bebidas alcohólicas. Los alimentos tratados mantienen prácticamente intactas sus propiedades originales.

### Estrategias de procesado con fluidos supercríticos

Las aplicaciones de la tecnología de FS al procesado de alimentos abarcan tanto a productos sólidos como líquidos.

En el caso de sólidos, la materia prima se coloca en un recipiente resistente a la presión (en las aplicaciones alimentarias se suele operar con  $CO_2$  entre 100 y 300 Bar) y con el correspondiente control de temperatura (generalmente entre  $40^\circ C$  y  $70^\circ C$ ). La preparación de la muestra (molienda, tamizado, deshidratación, etc.) debe ser objeto de cuidadoso estudio ya que tienen una importante repercusión en la calidad de los productos (Ibáñez y col., 1999 (a)).

A través del material a extraer se hace circular el  $CO_2$  supercrítico mezclado, en su caso, con el modificador. La separación del extracto y el



extractante se lleva a cabo por reducción de la densidad de éste (descompresión, aumento de la temperatura o ambos) en varias etapas, lo que permite realizar precipitaciones en cascada de productos de características diferentes.

La extracción supercrítica de líquidos se lleva a cabo en continuo por el procedimiento de extracción en contracorriente en columna. El extractante y la materia prima líquida se introducen en puntos opuestos de la columna y se hacen circular en contracorriente en condiciones adecuadas. El fraccionamiento se lleva a cabo de forma idéntica a la extracción de sólidos.

En los dos casos anteriores tiene lugar un fraccionamiento por reducción en etapas de la densidad. Este fraccionamiento es insuficiente cuando las sustancias a separar son muy similares y no pueden obtenerse con alta pureza productos concretos. En estos casos, la cromatografía supercrítica preparativa (PS-SFC) ofrece más posibilidades de separación, llegando incluso a la obtención de productos puros. La cromatografía supercrítica preparativa es una prolongación de la cromatografía supercrítica (SFC) con columnas rellenas (Berger y Perrut, 1990). En realidad, la posibilidad de utilizar la SFC con fines preparativos fue propuesta hace muchos años (Klesper y col., 1962). Junto con Klesper y colaboradores, Jentoft y Gouw fueron los pioneros de la PS-SFC (Jentoft y Gouw, 1970).

Anteriormente a la aparición de la PS-SFC la técnica de fraccionamiento fino más empleada era la cromatografía de líquidos de alta eficacia a escala preparativa (PS-HPLC), técnica que continua siendo aplicada en la actualidad a multitud de separaciones con fines preparativos.

El interés de la PS-SFC en relación con la PS-HPLC se basa en la facilidad de recuperar los compuestos aislados mediante una simple descompresión en la que se elimina espontáneamente la fase móvil. Además, la posibilidad de obtener

productos exentos de disolventes y su carácter limpio y no contaminante potencian el interés de la PS-SFC.

## **2.) OBJETIVOS**

El objetivo de esta Tesis Doctoral es contribuir a la tecnología de obtención de productos para el diseño de alimentos funcionales, mediante el desarrollo de procedimientos limpios de aislamiento y concentración de compuestos de alta pureza a partir de fuentes naturales.

Concretamente se pretende realizar aportaciones relativas al uso de la cromatografía supercrítica para la producción de ingredientes alimentarios funcionales a partir de plantas y de aceites comestibles.

Para alcanzar este objetivo general el trabajo se ha estructurado en torno a los siguientes objetivos parciales:

1. Diseñar y caracterizar nuevas columnas para cromatografía supercrítica preparativa.
2. Optimizar los mecanismos de la separación para obtener la necesaria capacidad de resolución.
3. Desarrollar procesos de obtención de ingredientes funcionales naturales a partir de aceite vegetales y plantas, aplicando las columnas y mecanismos diseñados y optimizados.

### 3.) ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LAS TÉCNICAS

#### 3.1.) LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS EN LA TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS MODERNA

##### 3.1.1.) ANTECEDENTES

Un fluido supercrítico (FS) es aquella sustancia que se encuentra a presiones y temperaturas superiores a las de su punto crítico. El diagrama de fases que se presenta en la Figura 3 indica la posición relativa de un FS con respecto a la fase gas, la líquida y la sólida de una sustancia pura, en función de la temperatura y la presión.

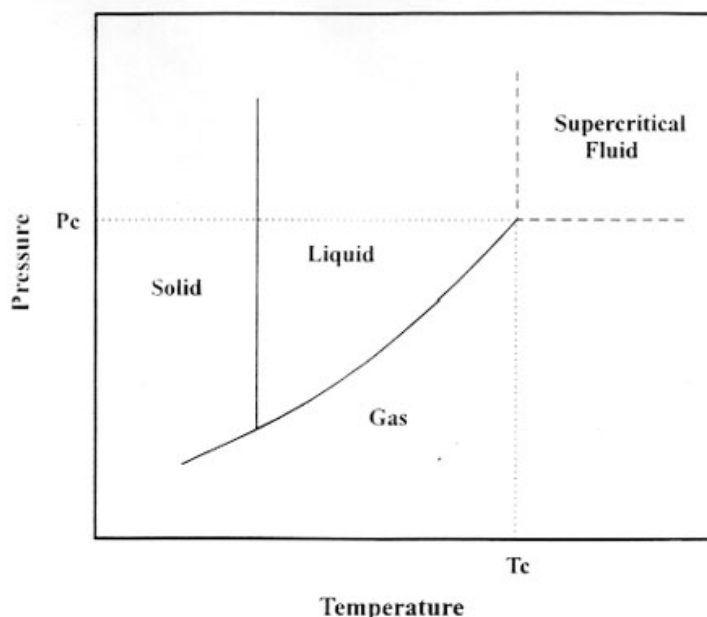


Figura 3: Diagrama de fases de un compuesto puro.

La temperatura crítica ( $T_c$ ) y la presión crítica ( $P_c$ ) definen el punto crítico de una sustancia. Por encima de ese punto, la sustancia no es un líquido ni un gas propiamente dicho, pero posee propiedades de ambos.

En la Tabla 1 se presenta el valor medio de estas propiedades para gases, fluidos supercríticos y líquidos (Saito y col., 1994).

Tabla 1: Comparación en orden de magnitud de las propiedades físicas de los líquidos, gases y fluidos supercríticos.

Fase	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Difusividad (cm <sup>2</sup> /s)	Viscosidad (g/cm s)
Gas (1 bar, 25°C)	0,6 - 2 × 10 <sup>-3</sup>	1 - 4 × 10 <sup>-1</sup>	1 - 3 × 10 <sup>-4</sup>
Fluido Supercrítico	0,3 - 0,8	0,1 - 4 × 10 <sup>-3</sup>	1 - 3 × 10 <sup>-4</sup>
Líquido (1 bar, 25°C)	0,6 - 1,6	0,2 - 2 × 10 <sup>-5</sup>	0,2 - 3 × 10 <sup>-2</sup>

Los FS tienen, por tanto, un rango de densidades mayor que los gases, que además puede ser ajustado variando la presión y la temperatura para aproximarlos lo más posible a la solubilidad de los solutos a extraer o separar. Poseen también un coeficiente de difusividad superior al de los líquidos, y una viscosidad próxima a la de los gases.

Por su importancia sobre los procesos con fluidos supercríticos, a continuación se revisa con más detalle cada una de las propiedades comentadas.

En primer lugar la **densidad** de un fluido supercrítico depende ampliamente de la presión y la temperatura a la que se encuentre el fluido, pero, como ya se ha comentado, su valor está próximo a los valores típicos de los líquidos. Esta es la razón por la que los fluidos supercríticos tienen buenas propiedades disolventes: su densidad (y por tanto, su poder disolvente) puede modificarse y ajustarse en función de los solutos de interés. Se debe tener en cuenta, además, que en las proximidades del punto crítico, el cambio en la densidad ocurre de forma rápida en un intervalo de presión pequeño, por lo que se hace difícil de controlar.

El control del poder de solvatación de un fluido supercrítico mediante la variación de su densidad es una propiedad que se deriva del parámetro de solubilidad de Hildebrand ( $\delta$ ), el cual será tratado con más detalle en el punto 3.2.2 de la introducción general de SFC. La diferencia existente entre los parámetros de solubilidad del fluido supercrítico y del soluto de interés establece su solubilización, de modo que cuanto menor sea esa diferencia, mayor es la solubilidad. Por otro lado, parece claro que en condiciones isotermas, a mayor presión, mayor será la densidad y, por tanto, el poder de solvatación del fluido supercrítico. En cambio, las variaciones de la solubilidad con el aumento de la temperatura en condiciones isocráticas dependen de si se producen a presiones moderadas o altas. En el primer caso, el factor más importante que gobierna el comportamiento de la solubilidad es el descenso de la densidad del fluido producido por el aumento de temperatura, lo que se traduce en un descenso de la solubilidad. En cambio, en condiciones de presión altas, la solubilidad aumenta con el aumento de temperatura debido a que la presión de vapor del soluto es quien gobierna el efecto global (Brunner, 2005).

El comportamiento de la densidad, así como otras funciones termodinámicas que dependen de la presión y la temperatura, puede ser también modelada mediante ecuaciones de estado, siendo la más empleada en el campo de los fluidos supercríticos la ecuación de Peng - Robinson (Peng y Robinson, 1976).

Los fluidos supercríticos tienen valores de **coeficientes de difusión** intermedios entre los que presentan los líquidos y gases. Debido a que los coeficientes de difusión en fluidos supercríticos son mayores que en líquidos, la transferencia de materia en un fluido supercrítico es más favorable. Y, puesto que las difusividades de los solutos en los fluidos supercríticos son un orden de magnitud más altas ( $10^{-4}$  frente a  $10^{-5}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ ) y las viscosidades de éstos un orden de magnitud más bajas ( $10^{-4}$  frente a  $10^{-3}$   $\text{N}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) que las de los disolventes líquidos, sus características de transferencia de materia son mucho mejores que

las de los líquidos. Como se verá más adelante, esto tiene consecuencias importantes tanto para los procesos de SFE como para las separaciones en SFC. En general, la difusividad en  $\text{CO}_2$  supercrítico aumenta con la temperatura y disminuye con la presión (Mukhopadhyay, 2000).

En lo referente a la **viscosidad**, los valores en la región supercrítica están entre los que presentan los estados líquido y gaseoso, lo que les proporciona unas características hidrodinámicas más favorables si se comparan con los líquidos. En general, en condiciones isotermas la viscosidad de un fluido supercrítico aumenta con la presión, y disminuye al incrementar la temperatura hasta alcanzar un mínimo, al igual que ocurre con los líquidos (Mac Hugh y Krukoniš, 1986), tras el que vuelve a aumentar con la temperatura, como en el caso de los gases a temperaturas reducidas altas (Brunner G., 1994). Aunque la viscosidad aumenta rápidamente en la región crítica, su valor es un orden de magnitud inferior que el de los disolventes líquidos orgánicos, incluso a altas presiones (300-400 bar) (De Fillipi y col., 1980).

Por otra parte, la baja **tensión superficial** de los fluidos supercríticos permite una alta penetrabilidad de los mismos a través de sólidos porosos y lechos empaquetados. Estas características son importantes tanto desde el punto de vista de la extracción como de la cromatografía supercrítica.

#### Grupos de sustancias según sus parámetros "críticos"

En la Tabla 2 se presenta una lista de los valores de algunas de las propiedades en el punto crítico de posibles sustancias puras usadas como fluidos supercríticos. Se presentan los datos de Temperatura ( $T_c$ ), Presión ( $p_c$ ) y Densidad ( $\rho_c$ ) críticas, así como el parámetro de Solubilidad ( $\delta_c$ ) calculado a través de la temperatura y presión reducidas ( $T_R = T/T_c$  y  $p_R = p/p_c$ ). El interés de este último parámetro se debe a que su valor proporciona una medida de la polaridad y el poder de elución del eluyente (Schoenmarkers y Uunk, 1987).

Tabla 2: Propiedades físicas de algunas sustancias usadas como fluidos SC.

Fase móvil	T <sub>c</sub> (°C)	P <sub>c</sub> (bar)	ρ <sub>c</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	δ <sub>c</sub> (cal <sup>-1/2</sup> cm <sup>-3/2</sup> )
Helio	-268.00	2.24	0.070	1.0
Hidrógeno	-240.00	12.80	0.031	2.6
Neón	-229.00	27.20	0.484	4.2
Nitrógeno	-147.00	33.50	0.313	4.7
Metano	-82.00	45.41	0.169	--
Kriptón	-63.70	54.30	0.919	5.9
Eteno	9.20	49.70	0.217	5.8
Xenón	16.60	57.60	1.113	6.1
<b>Dióxido de Carbono</b>	<b>31.05</b>	<b>72.90</b>	<b>0.466</b>	<b>7.5</b>
Etano	32.20	48.20	0.203	5.8
Óxido Nitroso	36.40	71.50	0.452	7.2
Azufre	45.50	37.10	0.738	5.5
Amoníaco	132.40	111.30	0.235	9.3
n-Buteno	134.90	36.00	0.221	5.2
n-Butano	152.00	37,50	0.228	5.3
Dietil éter	193.50	35.90	0.265	5.4
n-Pentano	196.50	33.30	0.237	5.1
n-Hexano	234.20	29.30	0.233	4.9
2-Propanol	235.10	47.00	0.273	7.4
Metanol	239.40	79.90	0.272	8.9
Acetona	235.00	46.39	0.279	--
Etanol	241.00	60.61	0.276	--
Tetrahidrofurano	267.00	51.20	0.322	6.2
Acetonitrilo	274.80	47.70	0.253	6.3
Agua	374.10	217.60	0.322	13.5



En la Tabla 2 se han diferenciado tres grupos en función de sus propiedades, el primero de ellos se refiere a sustancias que, como el He, poseen una  $T_c$  inferior a  $0^\circ\text{C}$  y no tienen poder de solvatación. En segundo lugar, se encuentran las sustancias más comúnmente utilizadas ya que es posible alcanzar densidades elevadas trabajando a temperaturas próximas al punto crítico (sus  $T_c$  varían entre 0 y  $200^\circ\text{C}$ ), utilizando presiones relativamente moderadas. El tercer grupo incluye aquellas sustancias que tienen una  $T_c$  superior a  $200^\circ\text{C}$  y se emplean habitualmente en Cromatografía de Líquidos (LC).

#### CO<sub>2</sub> y uso de modificadores

Pero, como ya se ha comentado, de todas las sustancias que se muestran en la Tabla 2, el dióxido de carbono es el más utilizado por varias razones: tiene una presión crítica moderada ( $P_c = 72,90$  bar) y una baja temperatura crítica ( $T_c = 31,05^\circ\text{C}$ ), lo que hace que sea un fluido adecuado para el tratamiento de muestras con compuestos termolábiles; posee un alto poder disolvente (dentro de las sustancias del segundo grupo anteriormente citado sólo es superada por el amoníaco); no es tóxico; no causa problemas medioambientales; no es inflamable y es relativamente barato. Sin embargo, su polaridad en muchos casos es insuficiente para la extracción y análisis de solutos muy polares, por lo que a veces es necesario el uso de modificadores (Schoenmakers y Uunk, 1987).

Un modificador es un solvente orgánico que se añade al fluido supercrítico en pequeña cantidad (hasta un 10% v/v) con el fin de aumentar la polaridad del mismo. Existe una gran variedad de modificadores, incluyendo tetrahidrofurano, dimetil sulfóxido, hexanol, propan-2-ol, 2-metoxietanol, agua, ácido fórmico y otros, aunque los más habituales son: etanol, acetona y metanol (Smith, 1999 y Petersen, 1990). En la industria alimentaria únicamente está permitido el etanol.

### 3.1.2.) LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS EN LA QUÍMICA VERDE

La química verde puede definirse como el diseño de productos o procesos que reduzcan o eliminen el uso o la producción de sustancias peligrosas, para prevenir la contaminación. Es decir, la concepción actual sobre el desarrollo químico sostenible es que no puede realizarse a expensas del medio ambiente, sino por medio de la búsqueda de nuevas tecnologías o procesos que provean a la sociedad de los productos que se demandan de una manera medioambientalmente responsable. Un ejemplo muy claro es la creciente restricción en el uso de disolventes orgánicos impuesto por las legislaciones de los diferentes países, lo que obliga a la tecnología a avanzar en la búsqueda de alternativas tecnológicas, nuevas materias primas o nuevos procesos productivos.

Poco después de haberse aprobado la Ley de Prevención de la contaminación de 1990, la Oficina de prevención de la contaminación y sustancias tóxicas de la EPA (Environmental Protection Agency) empezó a explorar la idea de desarrollar productos y procesos químicos nuevos o mejorar los existentes para disminuir el peligro sobre la salud humana y el medio ambiente. En 1991, esta Oficina puso en marcha el programa modelo de subvenciones a la investigación "Rutas sintéticas alternativas para la prevención de la contaminación". Este programa proporcionó, por primera vez, subvenciones para proyectos de investigación que incluyesen la prevención de la contaminación en la síntesis de sustancias químicas. Desde entonces, el Programa de Química Verde ha forjado colaboraciones con numerosos socios para promover la prevención de la contaminación a través de la química verde.

Por otro lado, desde hace unos años también ha existido una creciente demanda de los consumidores por productos y procesos más naturales, libres de residuos y contaminantes, hasta el punto de dar una mayor valoración positiva e incluso pagar un precio más alto por aquellos productos producidos bajo normas

"bio" o denominación "ecológico". Además, existe también una demanda creciente en el ámbito alimentario por aquellos productos que contengan algún componente que pueda mejorar el estado de salud. Por tanto, desde el punto de vista del consumidor, los nuevos alimentos, la seguridad alimentaria y las tecnologías emergentes de elaboración se abren paso.

Desde su concepción en 1991, la química verde ha crecido a nivel internacional con un enfoque especial en la química. Se han creado organismos, redes, instituciones, revistas y programas educativos relacionados con el tema. Por ejemplo, en Estados Unidos se creó el "U.S. Green Chemistry Program", que ha sido la base para la mayoría de las iniciativas relacionadas con la química verde. En diversos países europeos se han creado instituciones especiales para llevar a cabo programas especializados en química verde; en el Reino Unido, por ejemplo, se han establecido programas de investigación y docencia de química verde y la Royal Society of Chemistry lanzó en 1999 la revista de investigación "Green Chemistry"; en Italia se ha creado un consorcio multiuniversitario (INCA) donde la química verde es uno de los temas centrales; en Japón se ha creado también una red de química verde y sostenible (GSCN) y en Australia el Centro de Química Verde de la Monash University para el desarrollo de la investigación y la docencia en este campo ([www.epa.gov/greenchemistry](http://www.epa.gov/greenchemistry)).

En España, desde el Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, se ha creado recientemente la Plataforma tecnológica española de química sostenible, que fue presentada en Julio de 2005 y está comenzando su andadura en el presente año, como espejo de la plataforma europea "SusChem" (de Sustainable Chemistry). Esta plataforma surge como respuesta a la necesidad de reunir empresas, organismos de investigación, organismos de financiación y autoridades competentes para establecer una visión común, definir una agenda estratégica y desarrollar un plan de implementación con objetivos concretos de desarrollo en las

tres subplataformas de trabajo: reacciones y procesos químicos, biotecnología industrial y tecnología de materiales y nanotecnología ([www.feique.org](http://www.feique.org)).

Desde esta perspectiva nueva de química sostenible basada en procesos y tecnologías que reduzcan o eliminen el uso de sustancias peligrosas es donde los fluidos supercríticos surgen como una de las alternativas más potentes de desarrollo, investigación e innovación productiva, no sólo en el ámbito académico, sino también en el industrial.

Fundamentalmente, existen dos razones por las que las tecnologías que emplean fluidos supercríticos están siendo consideradas de gran interés dentro de la estrategia de la química verde:

Por un lado, el uso de los fluidos supercríticos en extracción y cromatografía elimina (o minimiza) el uso de disolventes orgánicos, que es una de las áreas prioritarias de actuación dentro de la Plataforma de química sostenible.

Por otro lado, el empleo del  $\text{CO}_2$  como fluido supercrítico confiere una serie de ventajas adicionales: es inocuo y se considera GRAS o seguro (frente a la gran toxicidad que presentan la mayoría de los disolventes orgánicos empleados), no contamina, no es inflamable, es relativamente económico puesto que es un recurso abundante en la atmósfera y se puede considerar renovable, es fácil de reciclar, lo que lo hace atractivo para implantar a nivel industrial los procesos productivos, y no supone un problema medioambiental de gestión de residuos.

Pero el atractivo del uso de los fluidos supercríticos en la química verde no se restringe únicamente a su uso en extracción y cromatografía. En la actualidad, una de las áreas que se está desarrollando con mayor éxito dentro de la aplicación de los fluidos supercríticos es el de las reacciones químicas. En este sentido se puede enmarcar las reacciones de síntesis y oxidación en fluidos supercríticos

como tecnología alternativa para reemplazar los procesos convencionales a baja/media presión que utilizan compuestos peligrosos por otros que operen a presiones y temperaturas próximas o por encima del punto crítico y con materias primas sin peligro alguno de toxicidad. En este punto se pueden citar los trabajos del grupo de la Dra. M<sup>a</sup> José Cocero, de la Universidad de Valladolid sobre reacciones de síntesis y reciclado químico en H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> supercrítico (Piñero R., y col., 2005 y Piñero y col., 2006).

### 3.1.3.) SFE: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES

#### Definición.

La **extracción con fluidos supercríticos** (SFE) es una técnica de separación de solutos de una matriz sólida o líquida que utiliza como agente extractante un fluido a temperaturas y presiones mayores que las de su punto crítico para extraer rápida y selectivamente algunos compuestos químicos.

#### Fundamentos de SFE.

El proceso de extracción dinámico de un analito que está inmerso en una matriz se puede dividir en cuatro *etapas*: penetración del fluido supercrítico en la matriz de muestra; disolución reversible del analito en el fluido; difusión del analito disuelto desde el interior de la matriz; y liberación total del analito por solvatación de la matriz (Turner y col., 2001)

La cinética del proceso anterior viene determinada por tres tipos de factores:

*Variables de la muestra:* como el estado (sólido, líquido o semilíquido), la naturaleza, el grado de humedad o el tamaño de partícula o poro.

*Factores de control de la operación:* presión, temperatura, densidad y tipo de fluido, caudal, tiempo de extracción y uso de modificadores.

*Otras variables:* agitación de la materia prima, extracción fraccionada, diseño del extractor, separación en cascada, etc.

Todo ello condiciona la velocidad de transferencia de materia en la interfase superficial, lo que unido a la solubilidad de los analitos en el fluido supercrítico, determina en gran medida las características del proceso de extracción.

### Propiedades de los fluidos supercríticos en SFE.

Las propiedades físicas de los fluidos supercríticos, ya comentadas en el punto 3.1.1 y que son aprovechadas en la extracción mediante SFE, son las siguientes (Sihvonen y col., 1999):

**Elevado coeficiente de difusión** (frente a los líquidos), que favorece la transferencia de materia. Esta propiedad depende de la presión y la temperatura (disminuye al aumentar la presión y aumenta con el aumento en temperatura).

**Baja viscosidad** (frente a los líquidos), que favorece también la transferencia de masa, reduciendo los tiempos de extracción y mejorando la eficacia. También es dependiente de la presión y la temperatura (aumenta al aumentar la presión y disminuye al aumentar la temperatura).

**Tensión superficial baja**, que permite la rápida penetración a través de los poros de las matrices heterogéneas, mejorando la eficacia de extracción.

**Solubilidad controlada** por las condiciones de presión y temperatura, que mejora la selectividad de la extracción.

### Ventajas del empleo de SFE frente a otras técnicas de extracción.

Las ventajas de la SFE frente a las técnicas convencionales de extracción con disolventes líquidos como la extracción Soxhlet y la extracción ultrasónica, son consecuencias de las propiedades, ya comentadas, de los fluidos supercríticos:

- Posibilidad de trabajar a bajas temperaturas.
- Protección contra el oxígeno y minimización de riesgos de oxidación de la muestra.
- Prevención de la formación de artefactos producidos por reacción química.

- Fácil control de las condiciones de extracción mediante cambio de presión y/o temperatura, lo que implica un fácil ajuste de la selectividad.

- Rapidez de extracción.

- Reducción o supresión completa de las etapas de concentración del extracto.

- Cuando se trabaja con CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico, posibilidad de recirculación posterior.

### APLICACIONES

Como se ha mencionado en la presentación de esta Memoria, las aplicaciones de la extracción con fluidos supercríticos en los alimentos son variadas y de gran relevancia por multitud de razones, entre ellas por su rapidez en el análisis de alimentos y por su desarrollo a nivel industrial. Debido a que el dióxido de carbono no deja residuos, el procesamiento con FS está encontrando su lugar en la industria de los alimentos (Chester y col., 1996).

Cabe destacar la revisión de Mukhopadhyay sobre las aplicaciones de la extracción con fluidos supercríticos empleadas en la industria alimentaria, con una gran variedad de procesos: la descafeinación de café y té, la extracción del lúpulo, la extracción del aceite esencial de especias, la extracción de aceites vegetales de semillas y granos, la extracción de aromas y fragancias vegetales, la extracción de plantas medicinales, la desodorización de aceites y grasas, la estabilización de zumos de frutas, extracción del colesterol de la yema de huevo y tejidos animales, la extracción de colorantes y antioxidantes de diversas plantas, entre otras (Mukhopadhyay, 2000), y también la reciente revisión de Herrero y colaboradores sobre extracción de ingredientes funcionales (Herrero y col., 2006).

Además, Del Valle y Aguilera realizaron, en 1999, una extensa revisión del estado de la técnica en la industria de alimentos que aún tiene vigencia en la



actualidad, destacando como aplicaciones comerciales de la extracción supercrítica la extracción de saborizantes naturales, la extracción de lúpulo de la cerveza, la extracción y fraccionamiento de grasas y aceites, la extracción de ingredientes naturales como colorantes, antioxidantes y otros compuestos bioactivos y la descafeinación de café (Del Valle y Aguilera, 1999).

En cuanto a la aplicación industrial de la SFE, en la actualidad existen plantas comerciales de extracción con fluidos supercríticos en Alemania (Flavex), Francia (Pfizer), Gran Bretaña (Universal Flavors), Suiza (Givaudan-Roure), India (SMS Natural Products), Corea (IL WA), España (Solutex), etc. Son plantas que en general poseen extractores de 100-500 L, que operan en modo discontinuo o continuo, y que trabajan con diferentes materias primas.

Entre las distintas aplicaciones de la SFE en tecnología de alimentos, se comenta a continuación dos de ellas por su relevancia con el tema objeto de esta memoria: la extracción de grasas, aceites y otros lípidos y de productos naturales de plantas.

### ***Grasas, Aceites y otros lípidos***

El uso de SFE para la extracción de lípidos de distintos alimentos ha sido una de las primeras aplicaciones desarrolladas. Muchas de ellas están relacionadas con aceites de diversas procedencias (soja, maíz, girasol y palma entre otros), de los que se extraen ácidos grasos libres, diacilgliceroles, y otros componentes minoritarios que permiten su caracterización química, muchas veces necesaria para la determinación del origen. Además, se puede proceder a la eliminación simultánea de los triacilgliceroles durante la extracción o fraccionamiento de los lípidos para evitar interferencias en la concentración posterior de los compuestos de interés.

De esta manera se puede llevar a cabo el fraccionamiento de ciertos compuestos y la concentración de analitos de interés como los ácidos grasos  $\omega$ -3, tocoferoles, esteroides y otros. Otros estudios tienen que ver con la correlación de los valores de peróxidos (indicadores de la degradación del aceite) con el aumento de concentración de algunos volátiles (Chester y col., 1996 y Lesellier, 2001).

### ***Productos naturales obtenidos de plantas***

Es la aplicación más amplia y que más desarrollo ha tenido en los últimos años. De hecho, existen multitud de patentes para la descafeinización del café y té, la extracción de especias y para el procesamiento del lúpulo, entre otras (Sihvonen y col., 1999).

En la Tabla 3 (Rozzi y Singh, 2002) se muestran algunas de las aplicaciones más recientes para la extracción con fluidos supercríticos de compuestos de plantas:

Tabla 3: Aplicaciones SFE en plantas.

MUESTRA	ANALITO/S DE INTERÉS	ANÁLISIS
<i>Bixa orellana</i> , L.	Bixina (colorante)	HPLC
Pimienta negra	Aceite esencial	GC-FID
Zanahoria	Carotenos	HPLC
Camomila	Flavonoides	GC-MS
Clavo	Aceite esencial	GC-MS
Semillas de Cilantro	Aceite esencial	GC-FID
Semillas de Hinojo	Aceite de hinojo	GC-MS
Pomelo	Limoneno y terpenos	GC-FID
Semillas de Uva	Polifenoles	GC-FID, HPLC
Lavanda	Aceite esencial	GC-MS
Cebolla	Aceite esencial	GC-FID
Hojas de Menta	Aceite esencial	GC-MS
Aceite de oliva	Tocoferoles, Compuestos fenólicos	SFC-FID
Orégano	Aceite esencial	GC-FID
Romero	Aceite esencial, Antioxidantes	GC-MS
Salvia	Aceite esencial, Antioxidantes	GC-MS
Anís	Aceite esencial	GC-MS

Algunas de estas aplicaciones ponen de manifiesto las ventajas de esta técnica de extracción frente a los métodos convencionales (Soxhlet, destilación a vacío o maceración, por ejemplo) en cuanto al menor tiempo empleado, las condiciones más suaves de la extracción y los mayores rendimientos de los analitos extraídos (Scalia y col., 1999; Díaz-Maroto y col., 2002).

## 3.2.) LA CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

### 3.2.1.) DEFINICIÓN

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) es un tipo de cromatografía (método físico de separación basado en la interacción de un analito que está en una fase móvil, con una fase estacionaria) en la que la fase móvil es un fluido supercrítico.

La SFC se concibió como alternativa al empleo de la cromatografía de gases (GC), que aunque es rápida y altamente eficaz necesita que los compuestos de la muestra sean volátiles; y de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) que, pese a su gran uso y aplicaciones, tiene ciertas limitaciones como los elevados tiempos de análisis para muestras complejas debido a su escasa difusividad y la ausencia de un detector simple, universal y sensible. Surgió así la SFC con el objetivo inicial de obtener una alta resolución a bajas temperaturas y en un corto tiempo de análisis. Posteriormente se han observado otras ventajas relativas a la universalidad de la detección, la posibilidad de utilizar columnas de muy distinta configuración y la compatibilidad para el acoplamiento directo con técnicas de aislamiento y concentración.

Aunque el "estado crítico" fue descrito por Andrews en 1869, la idea de utilizar un fluido supercrítico como fase móvil en cromatografía se atribuye a Lovelock y fue formulada en 1958 durante su estancia en la Universidad de Yale. Las primeras experiencias las llevaron a cabo Klesper, Corwin y Turner en 1962. Diez años más tarde, en 1972, Gouw y Jentoft publicaban una revisión de varios trabajos que empleaban la "cromatografía con gases densos" y ponían de manifiesto el gran potencial de esta técnica para analizar una gran variedad de compuestos que no podían ser separados mediante GC (Gouw y Jentoft, 1972). Esta revisión precedió, sin embargo, al gran desarrollo de la HPLC en fase inversa, que eclipsó en

gran parte el desarrollo de esta nueva técnica de separación. El primer equipo comercial de SFC fue desarrollado por Hewlett-Packard en 1983 e iba acompañado de unas hojas de aplicaciones que ya describían la separación de compuestos de matrices naturales, incluyendo compuestos termolábiles (Smith, 1999).

Comparada con otras técnicas cromatográficas, en la SFC existe una mayor cantidad de parámetros que influyen en la separación y sobre los que se puede actuar, como son: la fase móvil y estacionaria, la temperatura, la presión y la densidad de la fase móvil que a su vez permiten la optimización de los siguientes parámetros cromatográficos: retención, selectividad y resolución.

La densidad de la fase móvil es el principal parámetro en la SFC, pudiendo ajustarse mediante cambios en la presión o en la temperatura del proceso para optimizar la separación o reducir el tiempo de análisis. La temperatura suele ser usada como parámetro secundario para mejorar la resolución de manera que a densidad constante los análisis son más cortos a altas temperaturas y a presión constante los tiempos de análisis son menores cuando las temperaturas están por debajo o son muy superiores a la temperatura crítica de la fase móvil.

La SFC presenta una serie de ventajas sobre las técnicas cromatográficas convencionales (GC y HPLC). Comparada con HPLC, la cromatografía de fluidos supercríticos proporciona separaciones rápidas sin emplear disolventes orgánicos. En la SFC generalmente se emplea dióxido de carbono ( $CO_2$ ) como fase móvil, el cual se obtiene como subproducto de otras reacciones químicas y procesos fermentativos, o directamente de la atmósfera, con lo cual no contribuye a contaminar el medio ambiente. Además, las separaciones en SFC son más rápidas que las obtenidas por HPLC debido a que los coeficientes de difusión de los solutos en el fluido supercrítico son del orden de diez veces superiores a los de los líquidos (y cerca de tres veces inferiores a los de los gases). Esto tiene como resultado una disminución en la resistencia a la transferencia de materia en la columna,

permitiendo una más rápida y mejor resolución en la separación. Existen trabajos (Erni, 1990 y Liu y col., 1992) en los que se señalan las ventajas que ofrece la aplicación industrial de la SFC sobre la HPLC, particularmente, y como se ha comentado, debido a la baja viscosidad y alta difusión que poseen los fluidos supercríticos frente a los disolventes líquidos.

Es en el campo de la industria farmacéutica donde la SFC analítica ha tenido un mayor desarrollo, llegando a complementar a técnicas como la HPLC en fase inversa ya que, como señalan Chester y Pinkston, ambas técnicas se solapan en su aplicabilidad para muchas de las separaciones farmacéuticas, presentando la SFC la ventaja adicional de proporcionar separaciones en aproximadamente un tercio del tiempo empleado en HPLC en fase inversa (Chester y Pinkston, 2002). Comparada con la GC, la SFC capilar proporciona una mayor resolución a temperaturas mucho más bajas que las empleadas en GC, lo que da lugar a análisis en cortos periodos de tiempo de compuestos termolábiles.

Además, debido a la baja viscosidad de los fluidos supercríticos es posible el acoplamiento entre columnas, con lo que se alcanzaría un alto número de platos teóricos (Berger y Wilson, 1993). También es posible el acoplamiento de columnas con diferentes fases estacionarias, lo que permitiría el fraccionamiento de mezclas complejas las cuales serían imposibles de separar con las fases estacionarias empleadas individualmente (Sandra y col., 1998).

### 3.2.2.) FASE MÓVIL, POLARIDAD Y SOLUBILIDAD

Algunas de las sustancias que se han utilizado en SFC como fases móviles (Tabla 2, capítulo 3.1.1) son: *hidrocarburos* (como el metano o el pentano), aunque su poder de solvatación es limitado y sus  $T_c$  muy elevadas; *amoníaco*, aunque parece ser demasiado agresivo para las partículas de sílice que contienen las columnas; *xenón*, apropiado para SFC acoplado a un detector de infrarrojos con

transformada de Fourier; *óxido nítrico*, con una gran fuerza solvente tanto para extracción como para cromatografía y parece tener bastante interés en la separación de aminas; *agua subcrítica*, cuyo interés va en aumento en los últimos años; y otros como el dimetiléter (Smith, 1999 y Petersen, 1990).

#### Polaridad del CO<sub>2</sub> y uso de modificadores

Como ya se comentó con anterioridad, debido a las múltiples ventajas que presenta, el CO<sub>2</sub> es el fluido supercrítico más utilizado aunque su polaridad en muchos casos es insuficiente para el análisis de solutos muy polares, por lo que a veces es necesario el uso de modificadores (Schoenmakers y Uunk, 1987).

La influencia del modificar sobre la retención depende de la naturaleza del sustrato, la fase estacionaria, y del propio modificador. En procesos con columnas capilares, la influencia del modificador en la fuerza de elución es proporcional a su concentración. Por el contrario, en columnas rellenas, pequeñas cantidades de modificador pueden tener efectos dramáticos en la separación, sobre todo para compuestos polares.

En columnas con rellenos en base a sílice existen grupos silanol residuales libres, responsables de la retención de los solutos polares. Las moléculas de los modificadores polares, incluso a muy bajas concentraciones, recubren los grupos silanol dando como resultado una fase estacionaria más uniforme en términos de polaridad al eliminar estos puntos activos de la fase estacionaria en forma de "end capping" (Lee y Markides, 1990). Cuanto más polar sea el modificador, más éxito tendrá al competir con los solutos por los puntos activos de la columna, eliminándose el mecanismo de retención de los solutos en la columna cromatográfica. Varios grupos han investigado los efectos de algunos de estos modificadores en columnas rellenas, en cuanto a los parámetros cromatográficos (Ibáñez y col., 1995 (a) y Zou y col., 2000).

### Solubilidad y Retención

Para solubilizar un soluto, el parámetro de solubilidad de éste y del disolvente deben ser similares. Una de las características más interesantes de los fluidos supercríticos es que su solubilidad puede modificarse de forma sencilla variando las condiciones de presión y temperatura (es decir, modificando la densidad), de manera que se aproxime lo más posible a la solubilidad del compuesto a separar. Este hecho se expresa matemáticamente en la siguiente ecuación, introducida por Hildebrand y Scott en 1958:

$$\delta_{SFC} = 1,25 P_c^{\frac{1}{2}} [\rho_{r,g}/\rho_{r,l}]$$

Donde  $\delta_{SFC}$  es el parámetro de solubilidad (que indica el poder de elución de la fase móvil),  $P_c$  es la presión crítica,  $\rho_{r,g}$  es la densidad reducida del FS y  $\rho_{r,l}$  es la densidad reducida del eluyente a compresión infinita.

De esta manera, un aumento de *presión* (a temperatura constante) produce un incremento de solubilidad del compuesto en el FS. El poder de solvatación (o solubilidad) es, de hecho, una de las grandes diferencias entre la GC y SFC. La densidad influye tanto en el poder de solvatación como en los coeficientes de difusión. En general, a bajas densidades de la fase móvil (ej. 0.2 g/mL), un fluido supercrítico es más parecido a un gas, con bajo poder de solvatación y coeficientes de difusión relativamente elevados. A altas densidades (ej. 0.7 - 1.0 g/mL), un fluido supercrítico es más parecido a un líquido, con un alto poder de solvatación y bajos coeficientes de difusión. En SFC, el principal mecanismo para llevar a cabo la optimización de la separación cromatográfica es una programación de presión (o densidad). Con una programación positiva de presión, el poder de solvatación aumenta a medida que aumenta la densidad, pero al mismo tiempo los coeficientes de difusión disminuyen, lo que da lugar a pérdidas de eficacia.



El efecto de la *temperatura* es algo más complejo. Para muchos compuestos, cuando se aumenta la temperatura desde el ambiente, se produce un aumento de la solubilidad, pero al llegar a la  $T_c$  la densidad del FS disminuye al aumentar la temperatura, por lo que la solubilidad de los analitos disminuye. Pero también al aumentar la temperatura se produce un incremento en la presión de vapor del analito, lo que aumenta su solubilidad en el FS. Estos dos hechos son los que explican el comportamiento de cada compuesto. A partir de la temperatura a la que se obtiene la máxima retención, el efecto del aumento de volatilidad predomina sobre el de disminución de la densidad, por lo que el efecto finalmente observado es un aumento en la solubilidad. Este efecto es más significativo cuanto más volátil es el compuesto (Leyendeker, 1986 y Lou y col., 1997).

De esta manera, y modificando estos dos parámetros a lo largo del desarrollo cromatográfico, se pueden conseguir gradientes de densidad para optimizar la separación de los compuestos de la muestra con un aumento en la eficacia. Este efecto ha sido utilizado por varios grupos para la separación de vitaminas, tocoferoles y carotenoides (Ibáñez y col., 1995 (b) y Turner y col., 2001).

Otro parámetro también relacionado con la solubilidad es la retención. Desde los inicios de la investigación en FS se han diseñado sistemas en SFC para el estudio de la interacción de la fase móvil y los solutos, proponiendo modelos termodinámicos o estadísticos teóricos que ajusten los resultados experimentales. Por ejemplo, Smith, 1999 sugiere que el modelo para explicar la retención de una serie homóloga de cetonas en una columna de sílice unida a diol puede ser una combinación de interacciones polares en fase normal y el efecto de volatilidad, cuya contribución se incrementa con la longitud de la cadena (Smith, 1999). Otros autores sugieren que las principales interacciones que controlan la retención cuando se usa dióxido de carbono puro son las hidrofóbicas, aunque también se presta atención a las interacciones entre grupos polares (Chester y col., 1996). El

problema fundamental que se extrae de ellos es que todos esos estudios están realizados empleando un rango limitado de analitos, por lo que los resultados de la modelización de la retención no se puede extrapolar para otro tipo de compuestos. En un intento por explicar de forma sistemática la retención de los solutos con diferentes grupos funcionales, varios autores sugieren el empleo del parámetro de solubilidad de Fedors (Fedors, 1974) como guía para el cálculo de la solubilidad y la retención de los analitos en el fluido supercrítico (Favati y col., 1988; Galia y col., 2002 y Smith, 1999)

Muy recientemente se ha publicado una extensa y completa revisión sobre la determinación de propiedades termodinámicas, como la solubilidad, el coeficiente de partición o las interacciones con distintas fases estacionarias, que aportan nuevos datos e incluso diversas fuentes de información sobre modelos termodinámicos o datos de equilibrio de fase que pueden ayudar a mejorar la optimización de cualquiera de los sistemas de separación mediante SFC (Roth, 2004).

### 3.2.3.) FASES ESTACIONARIAS

Otra manera interesante de cambiar las propiedades del sistema cromatográfico para analizar compuestos polares sin usar modificadores es ajustar la polaridad de la fase estacionaria utilizando como fase móvil CO<sub>2</sub> puro, puesto que se ha demostrado que las fases de las columnas pueden ser fácil y ampliamente adaptadas en SFC (Chester y col., 1996). Esta interacción es más importante cuanto más altas son las temperaturas y presiones utilizadas (Lou y col., 1997).

En columnas capilares, las fases estacionarias empleadas en SFC son polímeros del tipo de los que se utilizan en GC. Las fases líquidas más comunes son metil-, octil-, fenil- y cianopropil-polisiloxanos, así como las fases de la serie Carbowax (polietilenglicoles).

La estabilidad química y física de los polisiloxanos, acompañado de la buena flexibilidad que ofrece el enlace Si-O, favorece la movilidad de las cadenas poliméricas permitiendo una rápida difusión de las moléculas del soluto dentro y fuera de la fase estacionaria, lo cual hace ideal su empleo como fases estacionarias. Además, los polisiloxanos se pueden sustituir con un amplio rango de grupos químicos para conseguir interacciones selectivas con diferentes tipos de muestras. Los dimetilpolisiloxanos y los n-alkil polisiloxanos sustituidos se emplean cuando se requieren selectividades basadas en interacciones por dispersión (Raynor y col., 1999). Las columnas con fase estacionaria polimetilsiloxano son muy utilizadas en la separación de compuestos de naturaleza apolar, incluyendo hidrocarburos, surfactantes no iónicos y aditivos poliméricos.

Snyder y colaboradores utilizaron la SFC capilar con detección FID acoplada a espectrometría de masas (MS) para el análisis de mezclas de tocoferoles. Estos autores estudiaron y compararon, en términos de selectividad, diferentes fases estacionarias: metilpolisiloxano, 50% n-octilmetilpolisiloxano, 5%-fenilmetilpolisiloxano y polietilenglicol (Carbowax 20M), obteniendo en la columna con recubrimiento 50% n-octilmetilpolisiloxano una mejor resolución en la separación de los isómeros alfa, beta, delta y gamma tocoferol (Snyder y col., 1993).

Ibáñez y colaboradores evaluaron en términos de eficacia, actividad superficial y selectividad, la influencia que dos tipos de rellenos, uno apolar (95% metil-,5%fenilsilicona) y otro polar (polietilenglicol -Carbowax 20M- a diferentes porcentajes: 3, 10, 15 y 20%), en columnas capilares rellenas tenían en la separación de una mezcla de isómeros de tocoferoles por SFC. Con la fase estacionaria no polar, los análogos  $\beta$ - y  $\gamma$ -tocoferol, ambos de idéntico peso molecular, no pudieron ser separados. Esto es debido a que la separación por SFC de compuestos lipídicos con columnas apolares se basa en el peso molecular o en la longitud de cadena, por lo que, teniendo los análogos  $\beta$ - y  $\gamma$ -tocoferol el mismo peso

molecular y estructura muy similar, difiriendo sólo en la posición de un grupo metilo, su separación resulta imposible. Al emplear la fase Carbowax 20M sí se obtuvo la separación de los diferentes isómeros de tocoferol, aunque los autores señalan que un incremento por encima del 20% en el recubrimiento de polietilenglicol da lugar a un descenso en la resolución y en la eficacia (Ibañez y col., 1999 b).

Las columnas rellenas utilizan rellenos porosos de sílice o de alúmina y rellenos peliculares de sílice para el análisis de solutos apolares o moderadamente polares. Para la separación de compuestos polares son más recomendables los rellenos de sílice químicamente modificada: fases orgánicas monomoleculares (octil, octadecil, ciano, amino, diol) ligadas a la superficie de sílice (Turner y col., 2001).

Una consideración importante es que las fases estacionarias en SFC deben ser insolubles en la fase móvil o estar firmemente entrecruzadas y enlazadas a la pared interna de la columna. Esto es debido al elevado poder de solvatación que presentan los FS, que pueden provocar la disolución de la fase estacionaria y su arrastre fuera de la columna. Evidentemente, la inmovilización de la fase estacionaria no debe disminuir excesivamente la difusividad de los solutos. Un elevado entrecruzamiento genera estructuras rígidas que reducen drásticamente la eficacia de la columna. Por tanto, debe alcanzarse un compromiso entre la estabilidad (entrecruzamiento fuerte) y la eficacia (entrecruzamiento débil) (Lee y Markides, 1986).

Uno de los procedimientos para lograr la inmovilización de la fase estacionaria consiste en introducir en la columna un iniciador de radicales libres para producir un entrecruzamiento del polímero. Entre los iniciadores de radicales libres más empleados destacan el azo-t-butano (Kong y col., 1984), el peróxido de dicumilo (Markides y col., 1983) y la radiación gamma (Schomburg y col., 1982).

El fluido supercrítico utilizado influye en la estabilidad química de la columna. Fases del tipo polisiloxano son poco solubles en dióxido de carbono y muy solubles en n-pentano y amoníaco. Las fases estacionarias tipo polietilenglicol de elevado peso molecular no se extraen con CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas y se pueden utilizar sin entrecruzar (Lee y Markides, 1990).

El mayor problema que presentan las partículas de sílice es su elevada actividad superficial para el análisis de compuestos polares. Este tipo de solutos sufren adsorciones reversibles que se traducen en picos asimétricos ("tailing"). El problema se solventa de varias maneras: utilizando un modificador orgánico que sea capaz de competir con las moléculas del soluto polar por los puntos activos de la superficie de la sílice (ver punto 3.2.2); desarrollando nuevos métodos de desactivación, como la utilización de polímeros químicamente ligados a las partículas de sílice y a los que posteriormente se aplica un método de entrecruzamiento que bloquea los grupos silanol responsables de la adsorción de los solutos polares (Ibáñez y Señorans, 2000); y empleando nuevos materiales de relleno.

Otras fases estacionarias que también se emplean en la actualidad y que cubren un amplio rango de polaridad para el análisis de compuestos por SFC utilizando CO<sub>2</sub> puro son:

#### Fases estacionarias quirales

Se han utilizado fases muy diversas entre las que se encuentran: glicopéptidos macrocíclicos para separar más de 100 compuestos quirales como  $\beta$ -bloqueantes o analgésicos (Liu y col., 2002), polidimetilsiloxanos unidos a  $\beta$  y  $\gamma$ -ciclodextrinas, Chirasil-DEX (para separar hexobarbital), polisiloxanos y polietilenglicol con derivados de benzoilcelulosa, Chirasil-Niquel y Chirasil-Zinc, fases basadas en tirosina para separar isómeros de sustancias farmacéuticas

(Chester y col., 1996 y Chester y Pinkston, 2002) y fases basadas en celulosa y amilosa del tipo Chiracel y Chiralpak (Toribio y col., 2003; Maftouh y col., 2005).

#### Fases estacionarias basadas en Sílice

Cristales líquidos poliméricos: Se usan para separaciones selectivas por tamaño. En SFC, incluso sin inmovilización previa, usando CO<sub>2</sub> puro se ha conseguido analizar compuestos polares, como los esteroides. También se han desarrollado cristales líquidos de polisiloxanos recubiertos sobre partículas de sílice para la separación de vitaminas liposolubles (Ibáñez y Señorans, 2000).

Partículas de sílice recubiertas de polímeros, que necesitan de la previa desactivación de las partículas mediante alguno de los procesos siguientes: reacción con reactivos sililados mono o poliméricos; recubrimiento con polímeros y entrecruzamiento o desactivación y recubrimiento simultáneos.

#### Nuevos materiales

Se utilizan como soporte de fases poliméricas alúmina, zirconio y titanio por su estabilidad química, su poder de separación y sus posibilidades en el desarrollo cromatográfico (West y col., 2005; Paproski y col., 2005). También se han utilizado partículas de poliestiren-divinilbenceno y cristales de proteínas entrecruzadas (Ibáñez y Señorans, 2000).

Más recientemente se están explorando otras posibles fases estacionarias que permitan variaciones en el diseño de separaciones complejas, como el uso de fases monolíticas que permiten el acoplamiento de más de 6 columnas para la separación de isómeros cis/trans del  $\beta$ -caroteno (Lesellier y col., 2003).

### 3.2.4.) TIPOS DE COLUMNAS

Como en otras técnicas cromatográficas, en SFC la columna es la parte fundamental del sistema. La intervención de la instrumentación consiste básicamente en proporcionar el entorno adecuado de operación y minimizar la contribución de los efectos extracolumna al proceso cromatográfico, de forma que la separación dependa exclusivamente de las interacciones entre la fase móvil, la fase estacionaria y las moléculas del soluto.

En el diseño de una columna existen dos tipos de consideraciones importantes: unas geométricas y otras químicas. Las primeras incluyen parámetros tales como el diámetro de partícula ( $d_p$ ), el diámetro de columna ( $d_c$ ), el espesor de película de fase ( $d_f$ ), la porosidad ( $\epsilon$ ), y la longitud de la columna ( $L$ ) que condicionan la eficacia, la caída de presión, la capacidad de carga y el tiempo de análisis. Las químicas, que afectan a la selectividad del sistema, se refieren a la actividad superficial de la columna, y a la naturaleza y estabilidad de la fase estacionaria.

El desarrollo de la SFC ha seguido dos líneas según la columna empleada: SFC con **columnas rellenas** y SFC con **columnas capilares abiertas**. Las primeras son del tipo de las habitualmente empleadas en HPLC ( $d_c = 1-4,6$  mm. y  $d_p = 3-10$   $\mu\text{m}$ .). Operan con grandes caídas de presión por unidad de longitud y plato teórico. Las capilares ( $d_c = 50-100$   $\mu\text{m}$ .), impregnadas con las fases líquidas típicas de GC, muestran un gran poder de separación y una alta permeabilidad. En contra tienen el elevado tiempo de análisis y las dificultades de introducción de muestra (Schoenmakers, 1988; Smith, 1999; Turner y col., 2001).

El número de platos teóricos por unidad longitud es aproximadamente idéntico cuando el diámetro interno de las columnas capilares es igual al de las partículas de las columnas rellenas. Al ser más pequeño el diámetro de las partículas (3-10  $\mu\text{m}$  en vez de 50  $\mu\text{m}$ , que es el diámetro más común en columnas

capilares), el resultado es que las columnas rellenas tienen mayor número de platos por unidad de longitud (Petersen, 1990).

Pero también han despertado un cierto interés las **columnas capilares rellenas**, desarrolladas para tener una mayor versatilidad que las anteriores. La configuración de estas columnas consiste en un tubo de diámetro inferior a 1 mm y soporte sólido, monocapa o impregnado con polímeros, de 5-10  $\mu\text{m}$  (De Weerd y col., 1990). Columnas de este tipo tienen un número de platos teóricos suficiente con longitudes de columna pequeños (de 10 a 30 cm) lo que se traduce en una reducción del tiempo de análisis (Petersen, 1990).

### 3.2.5.) LA CROMATOGRAFÍA SUPERCRÍTICA PREPARATIVA

#### **3.2.5.1.) Definición y variables cromatográficas**

Como ya se ha comentado en la presentación, la cromatografía supercrítica preparativa (PS-SFC) es una prolongación de la cromatografía supercrítica con columnas rellenas (Berger y Perrut, 1990). Actualmente, la técnica que más se utiliza a escala preparativa es la cromatografía de líquidos de alta eficacia preparativa (PS-HPLC) (Esaki y col., 1998; Smith y col., 1998) aunque la PS-SFC ofrece numerosas ventajas entre las que destacan: la facilidad de recuperar los compuestos aislados mediante una simple descompresión en la que se elimina espontáneamente la fase móvil (Coleman y col., 1999) y la rapidez de la separación (Chester y Pinkston, 2002). Por tanto, la posibilidad de obtener productos exentos de disolventes y su carácter limpio y no contaminante potencian el interés de la PS-SFC que ya ha sido objeto de atención en aplicaciones en tecnología de los alimentos (Chester y Pinkston, 2002; Saito y col., 1994; Saito y Yamaguchi, 1990; Taylor y King, 2002; Yamaguchi y Saito, 1990 y Yuen y col., 1996).



No obstante, es necesario realizar algunas consideraciones cuando se compara la cromatografía de líquidos de alta eficacia con la cromatografía con fluidos supercríticos: cuando la cromatografía se lleva a cabo con una fase líquida, el eluyente es incompresible, el flujo volumétrico a través de la columna es constante, y el fenómeno de adsorción no se ve afectado por la presión. Consecuentemente, una caída de presión no tiene influencia en la separación cromatográfica. Estas premisas no son aplicables en cromatografía gaseosa o supercrítica. En SFC una caída de presión, además de la compresibilidad propia de los fluidos supercríticos, da lugar a variaciones significativas del flujo volumétrico a través de la columna. En oposición a los líquidos, la viscosidad de los fluidos supercríticos se ve afectada por la presión (y, por lo tanto, no puede ser considerada constante a lo largo de la columna). Esta viscosidad puede ser calculada mediante la ecuación de Reid, Prausnitz y Poling (Reid y col., 1987). El modelado de la caída de presión no es tan fácil de realizar como para fluidos incompresibles (líquidos) o gases perfectos puesto que los fluidos supercríticos son compresibles y no ideales y la presión local afecta a la velocidad del fluido (a un flujo másico dado) así como a la viscosidad. Partiendo de esta premisa, se puede emplear un procedimiento simple para obtener una estimación de la caída de presión a partir de la información de la presión a la salida de la columna, que es conocida, de la velocidad de la fase móvil y de la viscosidad.

Otra consideración importante referida a la PS-SFC es la solubilidad de los compuestos en los fluidos supercríticos, la cual se ve afectada por el peso específico y la temperatura.

### **3.2.5.2.) Equipos y procesos**

La mayoría de aplicaciones de la PS-SFC se han llevado a cabo con  $\text{CO}_2$  como eluyente debido, como ya se ha visto, a sus buenas propiedades como fluido supercrítico. En el caso de la separación de compuestos polares, es necesario

aumentar el poder solvente del  $\text{CO}_2$  añadiendo uno o más co-solventes o modificadores (por ej., alcohol o agua). Un proceso de PS-SFC se basa siempre, sea cual sea el eluyente o fase móvil, en los siguientes pasos (Nicoud y col., 1999):

1. Inyección periódica de muestra en el flujo continuo del eluyente.
2. Separación cromatográfica basada en las interacciones de los compuestos de la muestra con el eluyente y la fase estacionaria de la columna.
3. Detección a la salida de la columna y recogida de las fracciones.
4. Separación de los compuestos fraccionados del eluyente.
5. Purificación y recirculación del eluyente cuando sea económicamente necesario (ej. producción a gran escala).

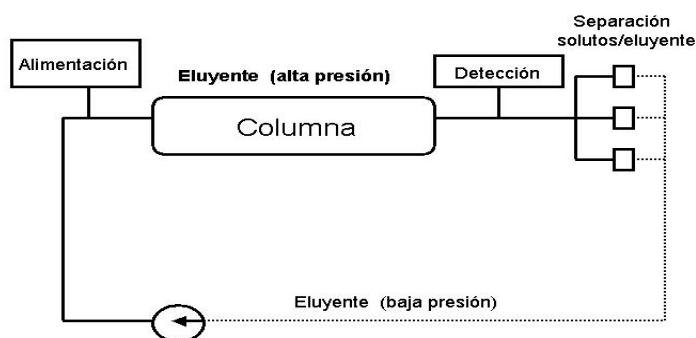


Figura 4: Diagrama de flujo básico en un proceso de PS-SFC (Nicoud y col., 1999).

Dependiendo de la aplicación, el sistema puede ser más o menos sensible a la eficacia de la columna. Cuando sean necesarios un determinado número de platos teóricos (para llevar a cabo separaciones complejas) se debe prestar especial atención al diseño de la columna. Para diámetros internos mayores de 20 mm, la mayoría de columnas empleadas en experimentos de PS-SFC son las mismas que las empleadas en cromatografía de líquidos.

Se ha demostrado (Doguet y col., 1991) que, para columnas de grandes diámetros, los volúmenes muertos pueden dar lugar a disminuciones en la eficacia a las pocas horas de uso, por lo que se necesitan, en el desarrollo de columnas, técnicas de compresión de la fase estacionaria más eficaces que eviten la formación de volúmenes muertos.

Se pueden considerar cuatro técnicas, similares a las empleadas en HPLC preparativa: compresión radial, compresión estática axial, compresión dinámica axial, y expansión anular. Una extensa y completa revisión de los métodos de empaquetado de columnas a nivel preparativo se encuentra en Dingenen, 1998. En la página web de la empresa MODcol existe además información detallada de los requisitos especiales para columnas preparativas en SFC ([www.modcol.com](http://www.modcol.com)).

Debido a problemas técnicos, la compresión radial no puede ser aplicada a la SFC y la técnica de compresión estática ha demostrado dar pobres resultados. La técnica de compresión dinámica axial se ha mostrado como la mejor: columnas diseñadas con esta técnica dan una eficacia óptima de 5800 platos teóricos para lechos de 10 cm de longitud (Fuchs y col., 1992). Se ha probado con éxito otra técnica intermedia entre la compresión dinámica axial y la compresión estática que consiste en empaquetar una columna equipada con un pistón siguiendo un método clásico, tras lo cual el lecho es comprimido mediante la aplicación de un flujo elevado de  $CO_2$  durante el tiempo aproximado de una hora (Nicoud y col., 1999).

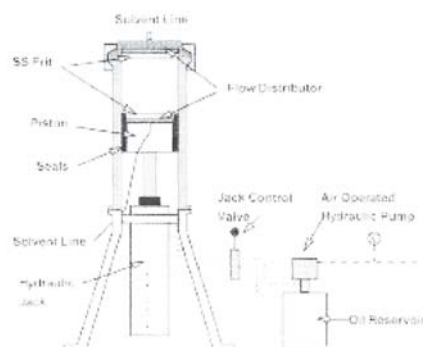


Figura 5: Esquema del sistema de compresión dinámica axial (Dingenen, 1998).

En general, la cantidad de materia procesada puede variar de unos gramos a pocos kilogramos de la sustancia mediante un incremento del diámetro de la columna de 0.01 a 0.1 m. El tamaño de partícula para grandes columnas es de 0.05 mm, es decir, un orden de magnitud con respecto a los tamaños empleados en SFC analítica (Mukhopadhyay, 2000).

La Tabla 4 muestra las diferentes escalas de producción que se pueden obtener en función del diámetro de columna empleado (Jusforgues y Shaimi, 1998):

Tabla 4: Escalas de producción (Jusforgues y Shaimi, 1998).

Diámetro de columna (mm)	Inyección (gr/h)	Capacidad (ton/año)	Flujo CO <sub>2</sub> (kg/h)
100	60	0.5	100-200
200	240	2	400-800
300	540	4.5	900-1800
500	1500	12.5	2500-5000

En lo concerniente a la separación de los compuestos fraccionados del eluyente, la recogida de las fracciones debe de ser extremadamente eficiente, necesitándose para ello separadores ciclónicos que separen la mezcla en forma de niebla de las dos fases, resultante de la etapa de despresurización. Este diseño permite la recuperación de los productos a presión atmosférica tras descompresión en uno o varios separadores. Además, los ciclones pueden estar calentados mediante camisas que aporten la entalpía necesaria para la vaporización del eluyente.

Cualquiera que sea la eficacia en la separación de la fracción eluida y el eluyente, siempre que se quiera realizar una recirculación del CO<sub>2</sub>, es necesario un paso de purificación del eluyente previo a su recirculación al sistema, lo cual puede hacerse mediante percolación a través de un lecho de carbón activo.

## Procesos

Dentro de la PS-SFC se puede distinguir tres tipos de procesos: Elución, Multicolumna y Adsorción-Desorción.

En cuanto a los procesos de **elución**, se pueden distinguir dos tipos en función de la cantidad de producto:

- Cuando se requieren pequeñas cantidades de producto puro ( $10^{-3}$  - 1 g), se usan equipos a pequeña escala, con detección no destructiva y dispositivos de recogida de fracciones capaces de separar los compuestos de interés del eluyente.

- PS-SFC a gran escala para elevadas cantidades de producto (gr): requiere de la recirculación del eluyente tras la recogida de fracciones y la separación del eluyente/producto. El primer proceso mencionado fue patentado en el año 1982 por Perrut (Perrut, 1982).

En cuanto a los procesos **multicolumna**, existen, desde hace unos años, aplicaciones muy prometedoras en cuanto al proceso SMB (del inglés "Simulated Moving Bed"), que permite la separación continua de mezclas en dos corrientes y que por su importancia en la presente memoria será tratado con más atención en el siguiente apartado.

En cuanto a los procesos de **adsorción-desorción**, se puede considerar la Cromatografía Frontal como el ejemplo fundamental. Las propiedades físico-químicas características de los fluidos supercríticos se adaptan perfectamente a la cromatografía en modo frontal, y particularmente al proceso de desorción, ya que se puede realizar un fraccionamiento de las especies adsorbidas modificando el poder de elución de la fase móvil, propiedad que no poseen los disolventes líquidos.

Otra ventaja es el hecho de que el  $CO_2$  permite una regeneración segura y "no tóxica" del adsorbente, lo que le permite ser empleado en aplicaciones

relacionadas con productos comestibles. Sin embargo, presenta la desventaja del requerimiento de altas presiones a lo largo del sistema, incluyendo los recipientes donde está contenido el lecho adsorbente, los cuales pueden llegar a ser muy voluminosos.

### 3.2.6.) APLICACIONES

Como ocurre con todas las técnicas nuevas, es necesario, para su implantación generalizada, demostrar que las aplicaciones de los métodos desarrollados son mejores (en eficacia, selectividad, rapidez o coste) que las técnicas en uso. De esta manera es más fácil que sean aceptadas con éxito por parte de la comunidad científica (Smith, 1999). A continuación, se presentan las áreas en las que más impacto ha tenido la cromatografía de fluidos supercríticos por ofrecer ventajas frente a la cromatografía de gases o de líquidos. Una reciente revisión de las últimas aplicaciones en SFC se puede consultar en Chester y Pinskton, 2004.

Es necesario tener en cuenta que la investigación aplicada no se ha realizado únicamente sobre la purificación de compuestos de interés, sino que también se ha ido desarrollando la tecnología con el objeto de proveer a la comunidad científica de equipos más potentes y adaptados a las necesidades emergentes según el campo de aplicación. Por ejemplo, Kosah describió la elución de compuestos por un disolvente supercrítico en varios tipos de fases estacionarias (naturales, minerales y poliméricas), y discutió los aspectos técnicos y económicos para la implantación del proceso a escala piloto (Kosah, 1988). También, Alkio y colaboradores adaptaron una unidad de extracción transformándola en una unidad de cromatografía supercrítica preparativa con columnas de un volumen de 0.3 a 2 L, usando  $CO_2$  como fase móvil a caudales superiores a 8 Kg/h (Alkio y col., 1988).

Otros ejemplos en el campo de los sistemas SFC comerciales son el equipo presentado en *Filtration and Separation* (1997) para el fraccionamiento de compuestos quirales, drogas, productos naturales, esteroides y triglicéridos y el sistema SFC comercial para la purificación y separación de productos de reacción química presentado por Olson y colaboradores (Olson y col., 2002).

Por otro lado, el número creciente de patentes en el campo de las aplicaciones de la SFC industrial (Perrut, 1984; Brunner y Reichmann, 1998; Kleimann y Finley, 1991) asegura la consolidación de esta técnica en la moderna química verde.

### **3.2.6.1.) Grasas, Aceites y otros lípidos**

Las ventajas de la SFC para la caracterización de lípidos procedentes de alimentos hacen que sea una buena alternativa frente a otras técnicas para el análisis de componentes de grasas y aceites, por lo que existen multitud de métodos que han sido revisados recientemente (Lesellier, 2001 y Señoráns e Ibáñez, 2002). Entre ellos se incluyen la separación y análisis de esteres metílicos de ácidos grasos y ácidos grasos libres que sirven para determinar el origen y el tipo de aceite y para evaluar su calidad a lo largo del procesado; la extracción y análisis de los lípidos insaponificables de elevado peso molecular y estructuras complejas; y la determinación de componentes minoritarios de los aceites de gran valor como esteroides, tocoferoles y carotenoides (Ibáñez y col, 2000 (b)).

A escala analítica, se han descrito separaciones con los tres tipos de columnas anteriormente mencionadas: capilares abiertas, capilares rellenas y rellenas; con fases de sílice modificadas con distintos radicales y fases de la serie Carbowax (polietilenglicoles) como fases estacionarias más utilizadas. Parece que el uso de modificadores se da exclusivamente en las columnas rellenas, lo que hace prescindir del uso de gradientes de presión (Lesellier, 2001).

A escala preparativa, existen multitud de aplicaciones, entre las que destacan:

Taylor y King, en el año 2002, desarrollaron un proceso de acoplamiento SFE/SFC a escala preparativa para la extracción y purificación de esteroides libres y ésteres de fitosterol a partir del salvado de maíz. Los autores sugieren que el proceso puede ser empleado a nivel industrial para la producción de alimentos funcionales (Taylor y King, 2002).

Otro ejemplo de acoplamiento entre SFE y SFC es el desarrollado por Taylor para la extracción y fraccionamiento de fosfolípidos en copos de soja. La muestra fue desgrasada con  $CO_2$  puro y, a continuación, se extrajeron los fosfolípidos con etanol. Este extracto fue fraccionado mediante PS-SFC en una columna de alúmina, empleando un gradiente de etanol/agua (9:1) en  $CO_2$  (Taylor y col., 2000).

Por otro lado, Osseo y colaboradores estudiaron el fraccionamiento continuo de un aceite de cacahuete en una columna empaquetada y  $CO_2$ , demostrando que esta tecnología puede ser efectiva para la separación de compuestos de aceites según su polaridad y su peso molecular, consiguiendo la recuperación selectiva de compuestos poliméricos, triglicéridos y compuestos de bajo peso molecular (Sesti-Osseo y col., 2003).

Yuen-May-Choo y colaboradores emplearon un método para la purificación de carotenoides a partir de aceite de palma mediante SFC preparativa (Yuen y col., 1996).

La separación de los isómeros del tocoferol mediante SFC también se ha estudiado, a escala analítica, empleando una columna de sílice y  $CO_2$  con alcohol, (Johansen y Brunner, 2003). Estos mismos autores también desarrollaron un



método eficaz para la separación de una mezcla de tocoferoles y tocotrienoles empleando una columna Kromasil (30 mm ID, 450 mm longitud máxima) y  $CO_2$  modificado con isopropanol como fase móvil (Johannsen y col., 2004).

El aceite de pescado es un ejemplo muy documentado de la PS-SFC y se ha empleado para la producción de nutracéuticos y alimentos funcionales desde principios de los 90. Alkio y colaboradores estudiaron la viabilidad económica de la producción de concentrados de los ácidos docosahexanoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA), procedentes de aceites trans-esterificados de atún (Alkio y col., 2000). El ácido docosahexanoico se obtuvo con una pureza superior al 95 % (w/w), empleando  $CO_2$  como fase móvil a 65 °C y 145 bar, con una columna de sílice en fase inversa del tipo octadecil-silano. El éster de DHA y el éster de EPA pueden ser producidos simultáneamente con purezas de 90 y 50 % (w/w), respectivamente. Los autores estimaron que para producir 1000 kg de concentrado de DHA y 410 kg de concentrado de EPA por año, se requieren 160 kg de fase estacionaria y 2.6 toneladas/h de  $CO_2$  en recirculación. El coste operacional sería de 550 dólares americanos por kg de ésteres concentrados de DHA y EPA. Yamaguchi y colaboradores desarrollaron una fase estacionaria nueva, basada en el empleo de una fase recubierta con plata, para la purificación de éster de ácido docosahexanoico (DHA-E) procedente de aceite de pescado mediante SFC a escala piloto, obteniendo purezas de hasta un 95% (Yamaguchi y col., 1999). Pettinello y colaboradores desarrollaron un procedimiento de SFC preparativa para enriquecer el contenido en éster etílico de ácido eicosapentaenoico de una mezcla, con un contenido de partida de un 68%, a un 93% (Pettinello y col., 2000).

En cuanto a los procesos de adsorción-desorción, destacan los trabajos de McLachan sobre el tratamiento de grasas y aceites (McLachan y Catchpole, 1991) para la eliminación selectiva de colesterol de una mezcla, con  $CO_2$ . Los autores describen un proceso para separar esteroides de muestras lipídicas (por ejemplo, colesterol de grasa de manteca) disolviendo la mezcla en un fluido a alta presión de

manera que, al hacerla pasar por un material adsorbente, los esteroides quedan retenidos de manera selectiva en el adsorbente, obteniéndose una mezcla grasa libre de esteroides una vez eliminado el fluido supercrítico.

### 3.2.6.2.) Vitaminas

El uso de los FS en el análisis de vitaminas es una alternativa al uso de los disolventes orgánicos por dos razones fundamentales: la ausencia de atmósfera de oxígeno que provocaría su descomposición por oxidación y el uso de temperaturas moderadas que evita su destrucción por calor.

Aprovechando estas ventajas, se ha conseguido separar con una buena resolución vitaminas hidrosolubles (polares) con la ayuda de modificadores (Pyo, 2000). También se ha conseguido la separación de tocoferoles (vitamina E) y carotenoides (provitamina A) a través de la optimización de la fase estacionaria elegida y sin el empleo de modificadores (Ibáñez y col., 1999 (b); Ibáñez y col., 1998).

Existen diversos métodos de análisis y separación de vitaminas por SFC que han sido recientemente revisados y que abarcan la mayoría de variables descritas hasta ahora en cuanto a tipos de columnas, control de la densidad, uso de distintas fases, etc. (Turner y col., 2001).

### 3.2.6.3.) Productos naturales obtenidos de plantas

Existen muchos métodos que utilizan los fluidos supercríticos (de forma aislada o mediante el acoplamiento SFE-SFC) para la caracterización de productos naturales obtenidos de diversas de plantas como: *Artemisia annua*, L.; *Valeriana officinalis*, *Sinapis alba* L., *Atropa belladonna* L., plantas de la familia *Brassicacea*,

planta de la mostaza, semillas de uva y otras (Chester y Pinkston, 2002; Kamangerpour y col., 2002 y Kohler y col., 1997).

Los compuestos que se extraen y separan de estas fuentes suelen tener actividades funcionales interesantes como actividad antioxidante, antitumoral, antibacteriana, insecticida, etc. Dos de los estudios pioneros en este campo fueron la separación de tocoferoles de germen de trigo y el aislamiento de cafeína de café y te (Sugiyama y col., 1985 y Saito y Yamaguchi, 1990). En la actualidad, las ventajas que ofrece esta técnica hacen que algunos de estos procesos se estén llevando a cabo a escala preparativa (Chester y Pinkston, 2002 y Smith, 1999).

Yamaguchi y Saito, en el año 1990, fraccionaron el aceite de la cáscara de limón en diferentes tipos de compuestos (hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, ésteres y otros) mediante cromatografía supercrítica a escala semipreparativa en columna con gel de sílice (Yamaguchi y Saito, 1990). Los mismos autores aislaron tocoferoles del aceite de salvado de trigo mediante SFC semipreparativa, empleando dos columnas de 250 x 10 mm de diámetro interno rellenas de gel de sílice de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, consiguiendo unos niveles de pureza de  $\alpha$  y  $\beta$  tocoferol de 85 y 70 % respectivamente (Saito y Yamaguchi, 1990).

Buskov y colaboradores estudiaron el compuesto glucobrassicina y sus análogos (de potencial actividad anticancerígena), procedentes de las plantas de la familia Brassicaceae, mediante SFC a escala preparativa (Buskov y col., 2000 (a)); de manera similar purificaron la sinalbina de la planta *Sinapis alba L.* (Buskov y col., 2000 (b)).

Basados en procesos de adsorción-desorción destacan los trabajos de deterpenación de aceites esenciales de cítricos (Cully y col., 1990; Knez y col., 1991) por desodorización on-line de aceites vegetales extraídos de semillas con  $\text{CO}_2$  supercrítico, mediante un procedimiento de percolación de la mezcla

$CO_2$ /extracto en un lecho adsorbente (carbón activo y resinas TENAX y XAD), donde la capacidad de adsorción fue descrita en función de las condiciones de operación (presión y temperatura).

## 4.) FUENTES NATURALES DE INTERÉS PARA LA OBTENCIÓN DE INGREDIENTES ALIMENTARIOS FUNCIONALES

### 4.1.) ROMERO

#### 4.1.1.) DESCRIPCIÓN, CULTIVO Y PROPIEDADES

El romero (*Rosmarinus officinalis*, L.) es una planta medicinal de la familia de las labiadas, a la que también pertenecen la menta, el tomillo, el orégano, la lavanda y la salvia, entre otras.

#### Descripción

El romero es un arbusto de tallos leñosos y hoja perenne que alcanza de 0,5 a 1 m. de altura, aunque puede llegar a los dos metros. Las hojas tienen forma lineal, con una longitud de 2 a 3 cm. y unos 3 mm. de anchura. El haz de las hojas es verde intenso y el reverso es blanco a causa de un espeso tomento que lo recubre. Tanto el cáliz como la corola son bilabiados. Ésta posee un color azul pálido con manchas violáceas alargadas y un fuerte olor aromático.

#### Cultivo

El romero se cultiva como planta ornamental en jardines mediterráneos, pero sobre todo como planta aromática y alimentaria. Requiere ubicación cálida y soleada, resguardada en los lugares de clima más frío, suelo bien drenado, de tipo calcáreo y ligero. En España, se puede encontrar en la mayor parte de Cataluña, en Aragón y Navarra, Castilla la Mancha, Valencia, Murcia, Andalucía, Extremadura y las Islas Baleares (Lunardi, 1988).

La composición de los extractos y del aceite esencial de cualquier planta depende primero de la especie y la variedad de planta que se trate, pero también

de las condiciones de su crecimiento, de la época en que se recolecte y del tipo de proceso que lleve tras su recolección. Todos estos factores influyen en las características organolépticas del aceite esencial y de los extractos. En el romero, por ejemplo, se han llevado a cabo estudios para determinar la máxima concentración de diterpenos fenólicos en función de la temperatura, la radiación solar, la estación del año y el contenido en agua de la hoja (Munné-Bosch y col., 2000).

### Propiedades

Tradicionalmente se ha considerado al romero como: antiespasmódico, antiséptico, diurético, hipotensor, antirreumático y anticatarral, entre otras propiedades.

## 4.1.2.) COMPOSICIÓN Y FUNCIONALIDADES

La extracción y fraccionamiento de la oleorresina de las hojas de romero mediante SFE permite la obtención de dos fracciones o extractos de funcionalidades distintas, tal y como se ha descrito en resultados previos de nuestro grupo de investigación (Ibáñez y col., 2000 (a) y Señoráns y col., 2000). A continuación se comentará por separado las dos fracciones de interés en la presente memoria, el extracto antioxidante y el correspondiente al aceite esencial.

### **4.1.2.1.) Extracto antioxidante**

Las propiedades antioxidantes de las especias se conocen desde comienzos de los años 50 (Chipault y col., 1952). En 1955 se descubrió que el romero era una de las que poseían esta actividad en mayor medida (Rac y Ostric-Matijasevic, 1955). Los compuestos responsables de la misma están bien determinados. En 1966 se aisló el carnosol (Brieskorn y col., 1966) y se atribuyeron a este diterpeno fenólico las propiedades antioxidantes de la planta. Su estructura y la del ácido

carnósico fueron confirmadas en 1982 (Wu y col., 1982) y en ese mismo año se identificaron el rosmanol y el ácido rosmarínico (Inatani y col., 1982). A continuación el rosmadial (Inatani y col., 1983), el epirosmanol e isorosmanol (Nakatani y Inatani, 1984) el rosmaridifenol y la rosmariquinona (Houlinan y col., 1985). Además de los anteriores compuestos, se sabe que las hojas de romero contienen también flavonoides con actividad antioxidante (Okamura y col., 1994). La estructura química de algunos de estos compuestos se presenta en la Figura 6.

En términos generales, a nivel individual la mayor actividad antioxidante corresponde al ácido carnósico, seguido del carnosol, ácido rosmarínico, rosmanol y rosmadial (Cuvelier y col., 1996). Debido a su importancia, en los últimos años se han publicado nuevos métodos de análisis más precisos para este tipo de compuestos (Herrero y col., 2005; Thorsen y col., 2003).

El carnosol es el componente que generalmente se ha detectado como mayoritario, llegando a suponer muchas veces el 90% de los extractos. En realidad procede, junto con otros compuestos fenólicos encontrados en el romero, de la oxidación del ácido carnósico durante las operaciones de extracción. Debido a su importancia, muchos trabajos se han centrado en su estudio, tanto a nivel bioquímico como de sus propiedades funcionales (Luxenburger, 2003; Santos-Gomes y col., 2002; Moujir y col., 1993; Offord y col., 1997).

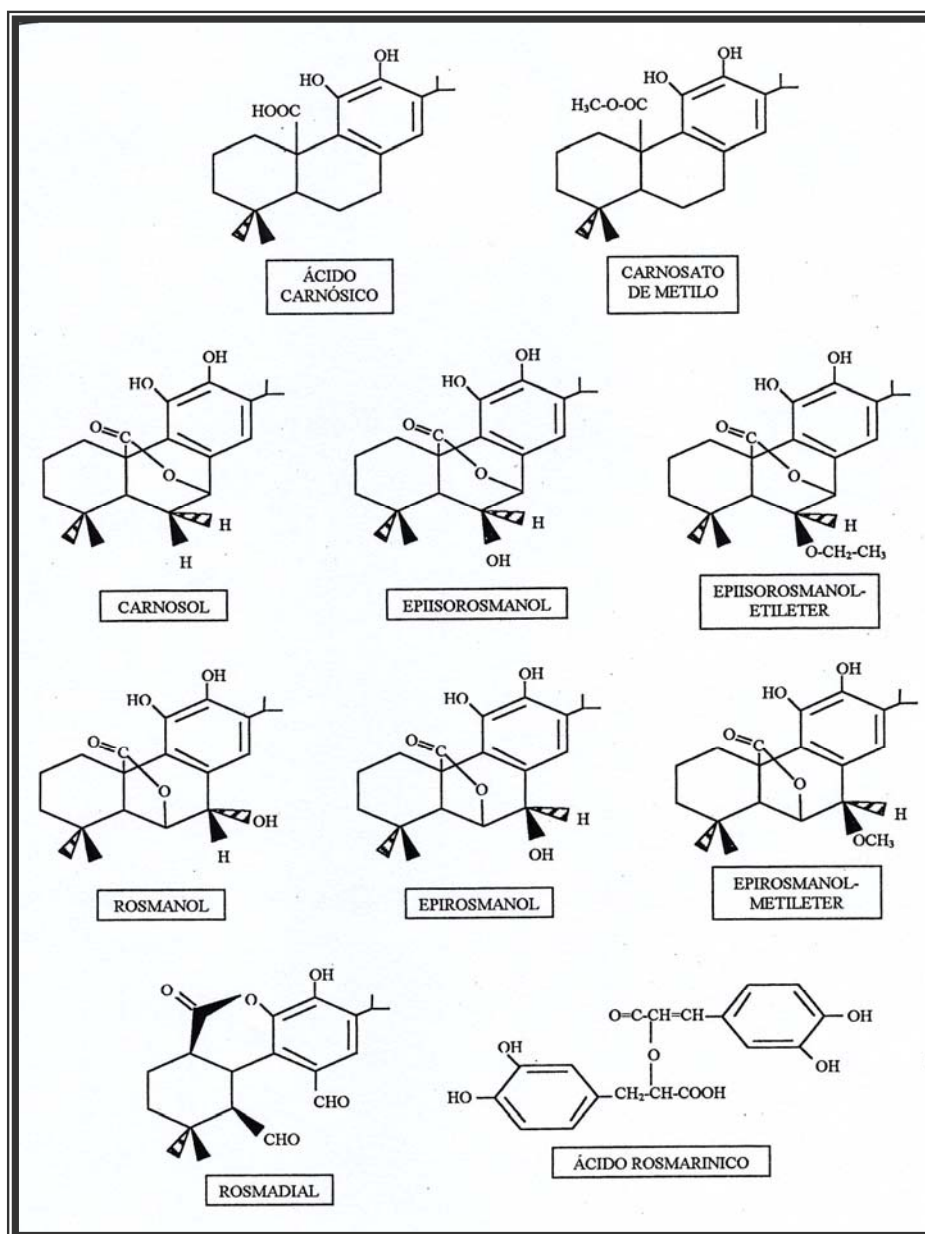


Figura 6: Estructuras químicas de algunas de los compuestos más interesantes del romero.

Los diterpenos fenólicos del romero actúan como antioxidantes primarios (Basaga y col., 1997) y también tienen efectos sinérgicos con otras sustancias. Además, se ha demostrado que estos productos tienen una actividad similar a la superóxido dismutasa (Seok y col., 1995) y efectos sinérgicos con las enzimas glutatión reductasa y NADPH-quinona reductasa, regenerándolas y aumentando el



efecto bloqueante de radicales libres que ejercen. A estas sinergias con las mencionadas enzimas se atribuyen los efectos protectores ante agentes cancerígenos en pulmón, hígado y estómago que se han puesto de manifiesto en ratones (Singletary y Rokusek, 1997). De hecho, el mecanismo de acción del carnosol en los cánceres de piel y pulmón ha sido descrito recientemente (Huang y col., 2005).

Además de todas estas características asociadas al poder antioxidante, más recientemente se ha comenzado a estudiar su potencialidad como agentes antibacterianos (Oluwatuyi y col., 2004; Pandit y col., 1994).

Muy recientemente, para el ácido carnósico y el carnosol de extractos metánolicos de Salvia, también se ha estudiado su actividad sobre la lipasa pancreática para reducir los niveles de triglicéridos en ratones alimentados con dietas ricas en grasas, de manera que se apunta su posible funcionalidad sobre el metabolismo del colesterol y las grasas (Ninomiya y col., 2004). Trabajos muy recientes aplican esta funcionalidad sobre diversos productos alimentarios (Ponce y col., 2004; Frutos y col., 2005).

#### **4.1.2.2.) Aceite esencial**

Es bien conocido que el aceite esencial de romero es un producto de alto valor, apreciado por sus propiedades como aromatizante de uso alimentario (Noverjaque, 1997) y no alimentario (perfumes y cosméticos). Tiene también utilidad, conocida desde hace muchos años (Rao y Rao, 1971) como conservante, principalmente por sus propiedades antimicrobianas. Hace ya tiempo que se demostró que inhibe el crecimiento y la producción de aflatoxinas de *Aspergillus parasiticus* (Tiwari y col., 1983) y otros hongos patógenos (Thomson y Cannon, 1986), así como de diversas levaduras (Laencina y col., 1985) y bacterias (Chaibi y col., 1997; Abutbul y col., 2004). Trabajos muy recientes aplican esta funcionalidad

sobre diversos productos alimentarios (Estévez y col., 2006; Moreira y col., 2005; Fernández-López y col., 2005).

Son muchos los trabajos que se han realizado sobre el análisis del aceite esencial de romero mediante GC-MS. Recientemente se ha completado el conocimiento de la composición del romero español en un trabajo exhaustivo de Guillén y col., 1996, de la Universidad del País Vasco. En términos generales los aceites esenciales de romero pueden contener cerca de 300 compuestos, pero más de la mitad de ellos están a niveles inferiores a ppb (partes por billón). A niveles de ppm (partes por millón) se han identificado unos 100 y en concentraciones superiores hay unos 50. Los componentes mayoritarios son hidrocarburos terpénicos como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, canfeno; carbonilos monoterpénicos como alcanfor y verbenona; éteres terpénicos como 1,8-cineol; alcoholes monoterpénicos como borneol,  $\alpha$ -terpineol y linalol; hidrocarburos sesquiterpénicos como cariofileno; ésteres monoterpénicos como acetato de bornilo; compuestos aromáticos como eugenol; y compuestos alifáticos como 1-octen-3-ol.

Lógicamente, en las proporciones en que estén presentes los anteriores compuestos dependen las propiedades funcionales del aceite esencial, es decir, su aroma y su actividad antimicrobiana. La composición de los aceites esenciales de romero es variable en función de diversos factores. Se conocen tres quimiotipos: el tipo eucaliptol, común en Italia, Marruecos y Túnez; el tipo alcanfor-borneol común en España y el tipo pineno-verbenona del sur de Francia y Argelia.

La composición de los aceites esenciales también depende, como es lógico, de los procedimientos utilizados para su extracción. Ello se debe tanto a la selectividad de los métodos, como a la degradación de algunos de los componentes, que puede tener lugar según sean las condiciones de dicha extracción. La tecnología de fluidos supercríticos proporciona buenos resultados en la extracción del aceite esencial del romero. Se sabe que, cuando se extrae mediante SFE, el aroma del

aceite esencial muestra una mayor similitud con el propio de las hojas de las que se ha partido, que cuando se extrae por hidroddestilación (Reverchon y Senatore, 1992). También se ha puesto de manifiesto que el procesado supercrítico del romero es sensible al contenido en humedad de la materia prima y que el tamaño de partícula es importante para obtener una alta eficacia en el procesado (Reverchon y col., 1992). Con la tecnología de fluidos supercríticos se puede obtener un aceite esencial de muy alta calidad si la molienda previa se realiza en frío para no degradar los compuestos terpénicos que contiene y el procedimiento de secado aplicado se realiza en condiciones en las que el deterioro de los componentes del aceite esencial sea mínima (Ibáñez y col., 1999 (a)).

#### 4.2.) ACEITES VEGETALES

Los aceites vegetales son alimentos ricos en compuestos lipídicos que se encuentran en forma líquida a temperatura ambiente (a diferencia con las grasas animales que son sólidas). Pueden proceder de diversas partes de la planta, como el fruto (oliva y palma, por ejemplo), la semilla (soja, girasol y coco) o el germen (en los cereales como maíz y trigo).

Por su importancia en varios capítulos del presente documento, se prestará atención a la definición de los principales tipos de aceites vegetales y sobre todo, a los compuestos minoritarios que contienen, puesto que su aislamiento será uno de los objetivos de la presente tesis.

##### 4.2.1.) TIPOS DE ACEITES VEGETALES

En cuanto al consumo humano de aceites vegetales, el aceite de soja representa la mayor proporción con un 27% del total, seguido de los aceites de palma (20%), colza (15%) y girasol (12%). El aceite de oliva, de gran importancia en

los países mediterráneos, sólo representa el 3% del consumo humano, siendo su porcentaje similar al aceite de maíz (Luchetti, 2003).

El **aceite de soja** se ha hecho un lugar en productos tan variados como la margarina, salsas para ensaladas y aceites para cocinar. La soja es la fuente natural más rica en fibra alimentaria. Durante su procesado, la semilla de soja se limpia, se rompe y se descascarilla y se prensa en copos. Esto rompe las células para permitir una extracción eficiente del aceite. Después de extraer el aceite de soja, el resto de los copos se puede procesar en una serie de productos de soja comestibles, o utilizarse para fabricar alimento proteico para piensos animales.

De los frutos de la **palma de aceite** se extraen dos tipos de aceite: el aceite de palma extraído de la pulpa o mesocarpio y el denominado aceite de palmiste, obtenido de la almendra, el cual deja un residuo denominado torta de almendra o de palmiste, de gran valor para la elaboración de alimentos concentrados para animales. La palma africana es originaria del Golfo de Guinea (África occidental). Dentro de los cultivos de semillas oleaginosas es el que produce mayor cantidad de aceite por hectárea. La producción mundial de aceite de palma se calcula en más de 3.000 millones de toneladas métricas. Los principales países productores son: Malasia, Nigeria, Indonesia, Zaire, Costa de Marfil, y otros países africanos y sudamericanos. (<http://www.fedepalma.org> y <http://www.elchao.com/palma.htm>)

El **aceite de oliva** es el que se obtiene por prensado de la aceituna, que es el fruto del olivo (*Olea europea sativa*). Durante muchos años el aceite se ha extraído de las aceitunas exclusivamente por presión en las tradicionales almazaras, aunque ahora se obtiene básicamente por sistemas basados en la centrifugación. Para su elaboración, se utilizan exclusivamente procedimientos mecánicos: presión y centrifugación. El sistema clásico es el de presión, en el que la pasta procedente de las aceitunas molidas se bate y se reparte en capachos para someterla a presión en

las prensas hidráulicas. En una almazara moderna la pasta batida se centrifuga en un decánter, o centrífuga de eje horizontal, para obtener tres fases (aceite, alpechín y orujo). En los últimos años se está asistiendo a un cambio tecnológico en el sistema continuo de centrifugación, al obtener del decánter sólo dos fases.

El aceite de oliva se distingue del resto de aceites por las siguientes características: contiene un alto porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) y un bajo porcentaje de ácidos grasos saturados. Además, tiene una gran variedad o diversidad de componentes minoritarios algunos de ellos en concentración relativamente alta.

#### 4.2.2.) COMPUESTOS MINORITARIOS DE INTERÉS

Los compuestos minoritarios de los aceites vegetales se encuentran dentro de la fracción insaponificable, que incluye compuestos tan variados como esteroides, hidrocarburos y alcoholes grasos.

En la Tabla 5 se presenta la composición de la fracción insaponificable de algunos aceites vegetales (Kiritsakis, 1992).

Tabla 5: Composición de la fracción insaponificable de algunos aceites vegetales (%).

Aceite	Escualeno	Esteroides	Alcoholes terpénicos	Alcoholes alifáticos	Hidrocarburos
Oliva	32 - 50	20 - 30	20 - 26	0.5	2.8 - 3.5
Linaza	1.0 - 3.9	34.5 - 52	29 - 30	2.5 - 5.9	3.7 - 14.0
Soja	2.5	58.4	23.2	4.9	3.8
Colza	4.3	63.6	9.2	7.2	8.7
Maiz	2.2	81.3	6.7	5.0	1.4

A continuación se presenta una descripción de los principales componentes minoritarios de los aceites vegetales y sus principales efectos sobre la salud descritos en la bibliografía:

### Escualeno:

El escualeno (2, 6, 10, 15, 19, 23 - Hexametil - 2, 6, 10, 14, 18, 22 - tetracosahexaeno) es un hidrocarburo insaturado, ( $C_{30} H_{50}$ ) triterpeno con 6 enlaces dobles y es un producto intermedio de la ruta biosintética del colesterol. Su estructura molecular se indica en la Figura 7.

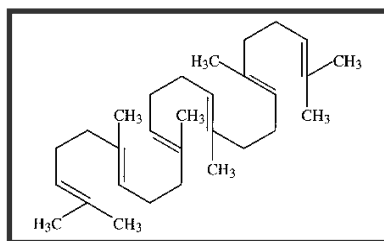


Figura 7: Estructura química del escualeno.

El escualeno es un líquido aceitoso, incoloro y de olor agradable. La principal fuente de escualeno ha sido tradicionalmente el aceite de hígado de ciertas especies de tiburón que viven en los océanos (Catchpole y col., 1997). En un intento por proteger especies marinas en vía de extinción se han propuesto fuentes alternativas de origen vegetal para la producción industrial de escualeno como son los aceites de oliva, maíz, cacahuete, colza, soja y girasol entre otros y los desodorizados obtenidos como subproductos de la refinación de los distintos aceites.

El escualeno se encuentra en el aceite de oliva donde puede representar hasta un 0,7% p/p del aceite total y un 50% de la fracción insaponificable. En la

Tabla 6 se muestran resultados del contenido de escualeno en la fracción insaponificable de algunos aceites vegetales (Owen y col., 2000).

Tabla 6: Contenido de escualeno en distintas matrices.

Aceite	Contenido de escualeno (mg/100g)
Oliva	136 - 708
Linaza	4
Maíz	19 - 36
Soja	7 - 17
Girasol	8 - 19
Algodón	4 - 12
Cacahuete	13 - 49

Existen varios estudios sobre la aplicación de la extracción supercrítica a la recuperación de escualeno de aceites vegetales, por ejemplo: Bondioli y col., (1992) estudiaron la recuperación de escualeno a partir de aceite de oliva lampante y de los destilados desodorizados del aceite de oliva, usando  $CO_2$  supercrítico y Brunner (2000), ha estudiado ampliamente el fraccionamiento de grasas y aceites con  $CO_2$  supercrítico refiriéndose, uno de sus estudios, a la separación de escualeno de tocoferoles y esteroides.

El escualeno tiene importantes aplicaciones en la industria cosmética, farmacéutica y de alimentos. Ha sido usado como bactericida, humectante de la piel, en la fabricación de fármacos, en colorantes orgánicos, en la industria del caucho y en surfactantes. Pero su mayor interés reside en la posibilidad de su empleo para la producción de alimentos funcionales, dado que existen diversos estudios que demuestran su impacto positivo en la salud humana.

Básicamente se destaca su capacidad antioxidante, se dice que este compuesto previene el cáncer, especialmente de colon y páncreas, fortalece el

sistema inmunológico y reduce el nivel de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (colesterol-LDL) considerado perjudicial para la salud.

Los resultados que se han obtenido globalmente con el escualeno revelan que este compuesto ingerido en la dieta posee unos efectos anticarcinogénicos manifiestos, puesto que es un potente inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-COA), impidiendo la farnesilación que promueve la expresión del oncogen ras, asociado a la aparición de diversos tipos de cánceres como son el cáncer de mama, colon, pulmón y páncreas (Van Duuren y col., 1976; Yamaguchi y col., 1985; Rao y col., 1988; Smith y col., 1999; Newmark, 1999; y Smith, 2000).

### **Esteroles:**

Los esteroles vegetales o fitosteroles son constituyentes naturales de aceites de semillas, frutas y extractos naturales. Son análogos del colesterol, pero difieren estructuralmente de él, por la presencia de un grupo metilo o etilo en la posición C-24 o por alguna insaturación, normalmente en la cadena lateral. Hasta el momento se han identificado más de 40 esteroles de origen vegetal.

Los esteroles más comunes en los aceites vegetales son el  $\beta$ -sitosterol, el campesterol y el estigmasterol, como se muestra en la Figura 8. El resto de esteroles están presentes en mínimas cantidades. Los estanoles son esteroles saturados, prácticamente ausentes en las dietas típicas.



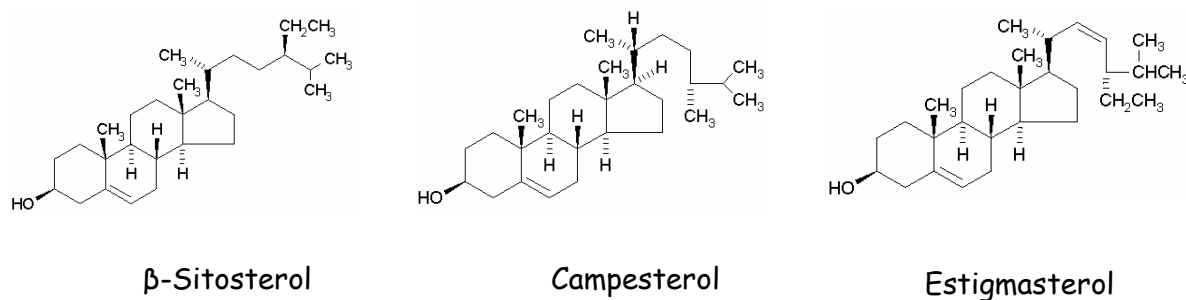


Figura 8: Principales esteroides presentes en los aceites vegetales.

Los esteroides se aíslan normalmente a partir de la fracción insaponificable de los aceites vegetales. El análisis del perfil de esteroides permite la identificación del tipo de aceite, lo que permite detectar posibles adulteraciones e incluso identificar la variedad de aceite y el tratamiento al que ha sido sometido.

La principal fuente industrial de esteroides es el destilado desodorizado obtenido como residuo de la refinación de aceite de soja, de aceite de palma, aceite de girasol, de aceite de oliva y de aceite de pino (subproducto de la producción de pulpa química de madera).

Numerosos estudios demuestran los beneficios que para la salud tienen los esteroides, especialmente el  $\beta$ -sitosterol. La administración de esteroides y estanoles vegetales (y sus ésteres) da lugar a unas concentraciones reducidas de plasma total y de colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (colesterol-LDL) hasta en un 14%, puesto que los esteroides de las plantas no son bien absorbidos por los seres humanos. (Jones, 1997; Law, 2000).

Aunque no se ha establecido el principal mecanismo de acción de los fitosteroides, se cree que pueden influir sobre la solubilización de las micelas de colesterol, haciendo que éste precipite e impidiendo, de esta forma, su absorción.

De manera análoga, los fitoesteroles podrían desplazar al colesterol en las micelas (Child y Kuksis, 1986) aunque también se ha estudiado su influencia sobre la tasa de síntesis y degradación del colesterol (Bober, Akerlund y Bjorkhem, 1989; Heinemann y col., 1991).

Otros estudios tratan sobre los efectos antitumorales de los fitosteroles. Von Holtz y col. (1998), observaron que en comparación con los controles tratados con colesterol, las células cancerosas prostáticas humanas tratadas con  $\beta$ -sitosterol disminuían su crecimiento en un 24%. También el  $\beta$ -sitosterol parece ser eficaz en el tratamiento de enfermedades de la próstata (hiperplasia prostática benigna) (Klippel y col., 1997; Carbin y col., 1990; Wilt y col., 1999), y parece poseer efectos beneficiosos para la salud en relación con la prevención y menor incidencia de cáncer de colon (Awad y col., 1996), cáncer de mama (Awad y col., 2000) y cáncer de estómago (De Stefani y col., 2000).

### **Tocoferoles:**

Los tocoferoles son antioxidantes naturales presentes en los aceites vegetales en 4 formas (isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). Aunque hasta ahora se había asociado la vitamina E al isómero  $\alpha$ -tocoferol, se sabe que existen 8 formas naturales de la vitamina E (Packer y col., 1999). Estas se muestran en la Figura 9.

Los 4 isómeros de los tocoferoles y los 4 isómeros de tocotrienoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), poseen todos cierta actividad antioxidante.

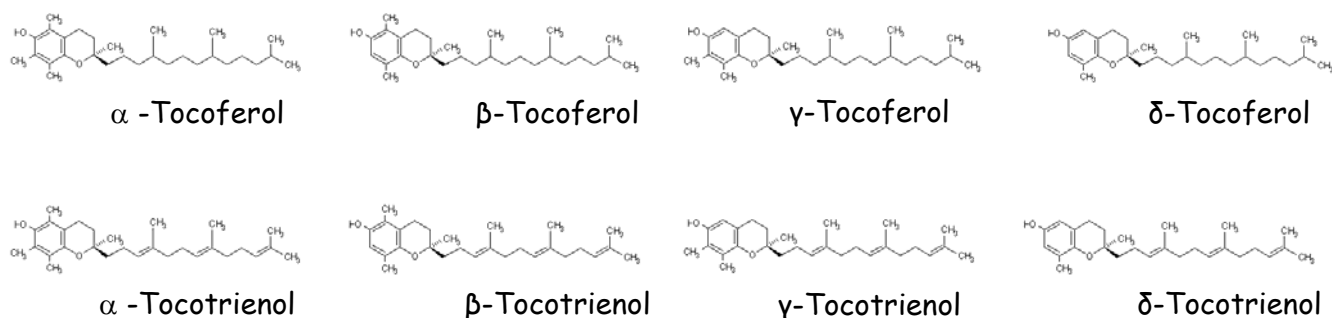


Figura 9: Estructura de los isómeros de tocoferoles y tocotrienoles.

Diversos estudios confirman los beneficios para la salud que puede suponer la incorporación de tocoferoles en la dieta, por ejemplo, en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Block y Langseth, 1994) y de cáncer (Ames, 1983; Draper y Bird, 1984). Por otro lado contribuyen de forma importante en la conservación de los propios alimentos y en la estabilidad de los aceites debido a su acción como defensa primaria de la peroxidación lipídica.

Aparte de su actividad como vitamina E, los tocotrienoles presentan ciertas propiedades fisiológicas que no se observan en los tocoferoles. Se ha descrito que cuando se suministran a través de la alimentación a los animales y a los humanos, los concentrados de tocotrienol presentan el efecto de disminuir el nivel de colesterol (Burger y col., 1984; Qureshi y col., 1991a, b; Tan y col., 1991). Se ha sugerido que la capacidad de los tocotrienoles de reducir el colesterol puede estar mediada por su capacidad de reducir los niveles de actividad de la reductasa hepática *GMH-CoA* (Qureshi y col., 1986). Además, se ha visto que los tocotrienoles influyen sobre ciertos parámetros hemostáticos (Qureshi y col., 1991a) y reducen la incidencia de los tumores inducidos químicamente en ratas (Tan y Chu, 1991; Gould y col., 1991).

Por consideraciones ambientales se ha tratado de emplear la tecnología con fluidos supercríticos para la obtención de tocoferoles a partir de aceites,

destilados y desodorizados (Lee y col., 1991). En este sentido, List y col. (1985), encontraron que la concentración de tocoferoles en un aceite extraído de hojuelas de soja, era mayor cuando se utilizó  $CO_2$  supercrítico que cuando se realizó la extracción con hexano. Ibáñez y col. (2000) (b) realizaron la separación de los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tocoferoles a partir de residuos de la producción de aceite de oliva mediante extracción y cromatografía de fluidos supercríticos. King y col. (1996) extrajeron tocoferoles a partir de polvo de soja con  $CO_2$  supercrítico a 25 Mpa y  $80^\circ C$  obteniendo una recuperación del 60% y un enriquecimiento de 1,83 a 4,33 en el extracto.

## 5.) MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1.) MUESTRAS Y REACTIVOS

#### 5.1.1.) MUESTRAS

##### **5.1.1.1.) Romero (*Rosmarinus officinalis*, L.)**

La materia prima de parte del estudio se ha seleccionado sobre la base de resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Señoráns y col., 2000). La muestra de romero consistió en hojas de *Rosmarinus officinalis*, L. obtenidas de herbolario y procedentes de la región de Murcia (España). Una vez recolectado, el romero se coloca sobre tablas de madera dispuestas en círculo, dejando un espacio hueco en el centro. Sobre esta capa se van disponiendo sucesivas capas de tablas y romero hasta alcanzar una altura de un metro aproximadamente. A continuación, se tapa la parte superior con una tela oscura y se expone al aire y al sol hasta su secado. De esta manera, la cantidad de humedad que posee la muestra es de aproximadamente el 10%. Esta baja humedad favorece una mayor estabilidad frente a reacciones de degradación enzimáticas, así como frente a ataques de insectos u hongos.

Las hojas de romero secas tienen un aspecto de agujas, de color verdoso y poseen una longitud comprendida entre 15 y 25 mm. Una vez en el laboratorio se almacenan protegidas de la luz y a una temperatura inferior a 25° C durante un tiempo nunca superior a un año.

Antes de su extracción, las hojas de romero son sometidas a una molienda en frío. La temperatura a la que se realiza la molienda es importante ya que la ruptura de las paredes de las células vegetales puede favorecer las reacciones de degradación de los compuestos. Para llevar a cabo esta operación, se introducen unos

100 g de hojas en el vaso de un molino comercial al que previamente se le ha habilitado un orificio para la entrada de CO<sub>2</sub> líquido. Este fluido criogénico se introduce en cada lote de molienda cinco segundos antes de accionar las cuchillas y se mantiene durante los 15 segundos de duración de la misma.

Posteriormente se lleva a cabo la separación por tamaños en un tamizador vertical (Orto Alresa, España) equipado con seis tamices de luz comprendida entre 1 mm y 45 µm durante 10 minutos a potencia media. Por exigencias de los equipos se seleccionó el tamaño de partícula comprendido entre 500 y 1000 µm.

Para los análisis con SFC analítica se usaron aquellos extractos procedentes del equipo analítico de SFE y descritos en el punto 5.3 de la presente memoria, mientras que para el estudio de la separación a nivel preparativo, se emplearon extractos obtenidos en una planta piloto de SFE a 150 bar, 40°C y empleando un 7% de etanol como modificador (Señoráns y col., 2000).

#### **5.1.1.2.) Aceites vegetales**

La purificación de los compuestos funcionales y minoritarios de aceites se llevó a cabo a partir de desodorizados de oliva, soja y semillas, no aptos para el consumo humano.

#### **5.1.1.3.) Material para el desarrollo de las columnas analíticas y preparativas**

Se han utilizado los siguientes materiales para la preparación de las columnas rellenas investigadas:

Tubo de acero de 0,5 mm de diámetro interno (Symta Ltda., España), desactivado con disolución de Carbowax 20M al 20%.

Tubo de sílice fundida (Symta Ltda., España) de distintas dimensiones usados como restrictor y "split" (división de flujo).

Tubo de acero de 10 mm de diámetro interno (Symta Ltda., España), para la preparación de las columnas semipreparativas de 25 cm de longitud.

Soporte sólido: Como soporte de la fase estacionaria líquida se han empleado partículas de sílice de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (Hichrom, Reino Unido).

Columna Diol preparativa comercial: Supelcosil PLC-Si, de 250 mm de longitud, 21,2 mm de diámetro interno, y 12  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Fases estacionarias:

Fase SE-54 (1% Vinil, 5% Fenil, 94% metilpolisiloxano) (Supelco, Estados Unidos). Se trata de una fase estacionaria habitualmente usada en GC y en SFC y que se disuelve en  $\text{CO}_2$  en condiciones supercríticas, por lo que su uso en SFC exige su entrecruzamiento previo.

Fase OV-17 (50% Fenil, 50% metilpolisiloxano) (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc., Estados Unidos). Es una fase muy parecida a la anterior, aunque algo más polar debido a la mayor cantidad de grupos fenil que presenta.

Fase Carbowax 20M (Polietilenglicol de elevado peso molecular) (Supelco, Estados Unidos). También se emplea en GC y en SFC pero, a diferencia de la SE-54, diversos estudios han demostrado que es difícilmente extraíble con  $\text{CO}_2$  en condiciones supercríticas, por lo que no requiere de entrecruzamiento cuando se usa en SFC.

Fase Diol (Nucleosil 300-7 OH, Macherey-Nagel, Suiza), para la preparación de la columna analítica correspondiente de polaridad mayor.

#### **5.1.1.4.) Fluido Supercrítico empleado en SFE y SFC**

Se utilizó  $CO_2$  como fluido supercrítico tanto para la extracción como para la cromatografía preparativa (N-48, 99,998% de pureza, suministrado por AL Air Liquide España, S.A., España), así como para la separación cromatográfica analítica (Praxair S.A., España).

#### **5.1.2.) REACTIVOS**

##### **5.1.2.1.) Disolventes**

Como disolventes de las muestras y patrones se utilizan hexano (grado HPLC, SDS, Francia y Panreac Química S.A., Barcelona, España); diclorometano (Lab-Scan, Analytical Sciences, Irlanda); metanol (grado HPLC), adquirido a Lab Scan Analytical Sciences (Dublín, Irlanda); acetona (grado HPLC), adquirida a Lab Scan Analytical Sciences (Dublín, Irlanda) y etanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Los disolventes utilizados para el análisis de fracciones fueron acetonitrilo (grado HPLC), adquirido a Lab Scan Analytical Sciences (Dublín, Irlanda), ácido acético (grado HPLC) de Merck (Schuchardt, Alemania), etanol (96 % de pureza), adquirido a Panreac Química S.A. (Barcelona, España) y agua miliQ, que se obtuvo de un sistema de purificación de agua (Millipore).

##### **5.1.2.2.) Patrones**

Test de Eficacia: se utilizan los alcanos:  $C_{12}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{20}$ ,  $C_{24}$  y  $C_{28}$  (Aldrich Chemical Company, Inc., Estados Unidos).



Test de Polaridad: que incluye una mezcla de ácido benzoico, antraceno, fluoranteno, mentol, 2,3-butanodiol (todos ellos adquiridos a Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 2,6-dimetilanilina y benzoato de metilo (Fluka, Suiza).

Patrones de Romero: ácido Carnósico, 1,8-cineol, borneol, alcanfor (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y verbenona (Fluka, Suiza),

Patrones para la identificación de compuestos de aceites: isómeros de tocoferoles, escualeno, diglicéridos, triglicéridos, ácidos grasos libres, esteroides y esterol ésteres fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Química S.A. (España).

#### **5.1.2.3.) Reactivos para el análisis de la actividad funcional in vitro**

Para el ensayo de actividad frente a radicales libres, DPPH, se utilizó:

El 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) de 95% de pureza (Sigma-Aldrich Química S.A., España).

Espectrofotómetro Shimadzu UV-120-01 (Shimadzu, Kyoto, Japón).

Cubetas desechables de 1 cm x 1 cm x 4,5 cm de Afora (España).

Además de los disolventes incluidos en el apartado 5.1.2.1.

Para la actividad antimicrobiana se utilizaron:

Cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11775 y *Candida albicans* ATCC 60193.

Medios de crecimiento: agar nutritivo, medio de crecimiento Mueller-Hinton y medio de crecimiento Sabourand con dextrosa.

Placas de 96 multipocillos y estufas con control de temperatura.

Antibióticos: Cloranfenicol y Amfotericina (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Otros reactivos: tween-20 y etanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

## 5.2.) CARACTERIZACIÓN DE COLUMNAS

### 5.2.1.) MEDIDA DE EFICACIA

La eficacia se mide por separación de la mezcla de alcanos a presión y temperatura constante. La eficacia esperada depende del procedimiento y el tipo de material de relleno utilizado.

La obtención, en primer lugar, de las distintas velocidades lineales que permiten el ajuste de la curva de Van Deemter (Van Deemter y col., 1956) en SFC exige utilizar distintos restrictores a la salida de la columna. El aumento de la velocidad lineal y, por tanto, del flujo que atraviesa la columna, se obtiene bien al aumentar el diámetro interno del restrictor o al disminuir la longitud del mismo según la *ecuación de Poiseuille*:

$$F = \frac{\pi (P_E - P_S) r^4}{8 L \eta}$$

Donde F es el flujo de fase móvil que atraviesa la columna, r y L el radio y longitud del restrictor capilar. El flujo depende, además, de la presión de trabajo utilizada.

Con objeto de poder trabajar en un intervalo adecuado de velocidades lineales, se probaron distintos diámetro internos de los restrictores de sílice fundida (13 y 25  $\mu\text{m}$ ) y distintas longitudes (10 y 25 cm).

Una vez elegidas las condiciones de operación y realizadas las experiencias programadas en cada caso, se obtienen los siguientes datos:

- El tiempo muerto, utilizando la aproximación de Peterson y Hirsch (Peterson y Hirsch, 1959).
- El factor de capacidad para cada soluto.
- La anchura a media altura para cada uno de los picos.
- La altura equivalente a un plato teórico (H)
- El número de platos teóricos (N)

### 5.2.2.) MEDIDA DE ACTIVIDAD SUPERFICIAL

Cuando se añade un modificador al  $CO_2$  para aumentar su polaridad y fuerza solvente, sus moléculas interaccionan con los puntos activos de la columna, reduciendo así el efecto de la actividad superficial en la separación. Pero cuando se usa  $CO_2$  puro, el riesgo de que exista actividad superficial en la columna aumenta.

Por ello, se estudia la actividad superficial de las columnas mediante la separación de una mezcla de compuestos de diferente polaridad que tienen interacciones específicas y no específicas con ambas, fase móvil y fase estacionaria. Los compuestos de la mezcla son: antraceno y fluoranteno, que son analitos sin interacciones específicas; alcoholes, como el mentol y el 2,3-Butanodiol y aminas como la 2,6-DimetilAnilina, los tres con fuertes interacciones; y ácido benzoico y metil-benzoico que no siempre eluyen, indicando así que algunas de las interacciones aún están presentes.

El factor de asimetría ( $A_s$ ) se calcula como la relación entre los dos segmentos definidos por la paralela, a mitad de altura del pico cromatográfico, a la línea de base y por la vertical en el máximo; tal y como se muestra en la Figura 10:

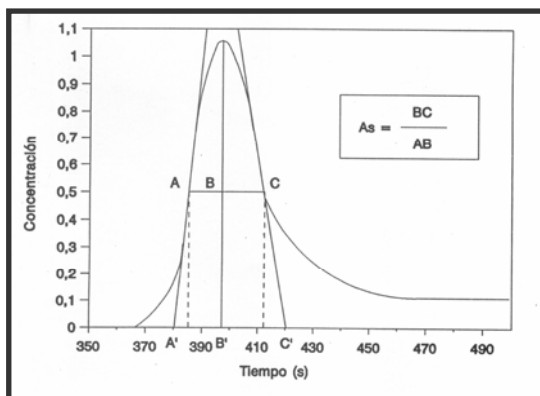


Figura 10: Gráfico que representa la asimetría

Si  $AB > BC$  se observa asimetría en la zona frontal del pico mientras que si  $AB < BC$  la asimetría corresponde a la zona posterior.

### 5.3.) EXTRACCIÓN DE ROMERO MEDIANTE SFE A ESCALA ANALÍTICA

La extracción del romero mediante SFE se lleva a cabo en un Extractor Suprex PrepMaster (Suprex Corp., Estados Unidos). Se introducen 0,85 g. de la muestra de romero molida dentro de la celda de extracción de acero inoxidable (5 ml). El flujo de  $CO_2$  se controla mediante una válvula de aguja que actúa como restrictor a la salida de la celda.

La muestra se extrae usando un procedimiento secuencial que consiste en una primera extracción en condiciones suaves de presión y temperatura, lo que correspondería a la fracción de aceite esencial y en una segunda extracción, correspondiente a la fracción antioxidante, en las condiciones de presión y temperatura más intensas. Para llevar a cabo el proceso se emplea un tiempo de extracción estática de 5 minutos (donde el  $CO_2$  se mantiene sin circular dentro de la celda) y un tiempo de extracción dinámica de 60 minutos (donde se hace circular el  $CO_2$  y se recoge extracto). El método está basado en resultados previos

obtenidos por el grupo de investigación (Ibáñez y col., 1999 (a) y López-Sebastián y col., 1998).

En la Figura 11 se presenta un esquema del proceso SFE:

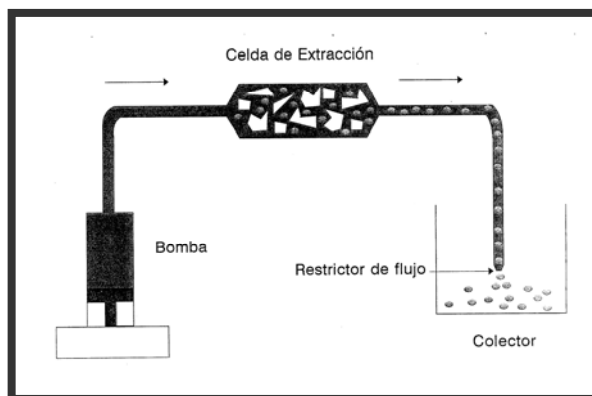


Figura 11: Esquema de un extractor de fluidos supercríticos "off line".

El  $\text{CO}_2$  circula desde la bomba de doble pistón hacia la celda entrando por la parte inferior de la misma. Una vez que la atraviesa (en la fase de extracción dinámica), el fluido supercrítico arrastra la muestra hasta el colector donde, una vez que se alcanzan las condiciones atmosféricas, vuelve a su estado gaseoso quedando la muestra depositada en el vial colector.

En la Figura 12 se presenta la foto del equipo SFE utilizado en el presente trabajo:



Figura 12: Extractor Suprex con fluidos supercríticos SFE.

Una vez obtenidos, los extractos se guardan en ausencia de luz, a temperatura no superior a 5° C y en atmósfera de nitrógeno.

En total se llevan a cabo cuatro tipo de experimentos. Las condiciones seleccionadas se muestran en la Tabla 7. Los tres primeros se eligieron en base a resultados previos obtenidos en una planta piloto de extracción supercrítica ya que proporcionaron los mejores resultados en cuanto a capacidad antioxidante de los extractos (Señoráns y col., 2000). El cuarto experimento representa las condiciones más extremas de presión entre las dos extracciones sucesivas.

Tabla 7: Condiciones de los experimentos de SFE

Descripción de la Extracción		Presión (Bar)	Temp. (°C)
<b>Experimento n° 1</b>	Fracción n° 1	140	40
	Fracción n° 2	300	60
<b>Experimento n° 2</b>	Fracción n° 1	140	50
	Fracción n° 2	350	50
<b>Experimento n° 3</b>	Fracción n° 1	90	40
	Fracción n° 2	250	40
<b>Experimento n° 4</b>	Fracción n° 1	100	40
	Fracción n° 2	400	60

El dispositivo especial sobre el que se recogen los extractos ofrece dos ventajas en comparación a los diseños habituales: la minimización de las pérdidas de extracto y la retención de los compuestos volátiles del aceite esencial de la fracción n° 1. En la Figura 13 se muestra un esquema del diseño del colector de fracciones (Ibáñez y col., 1999 (a)):

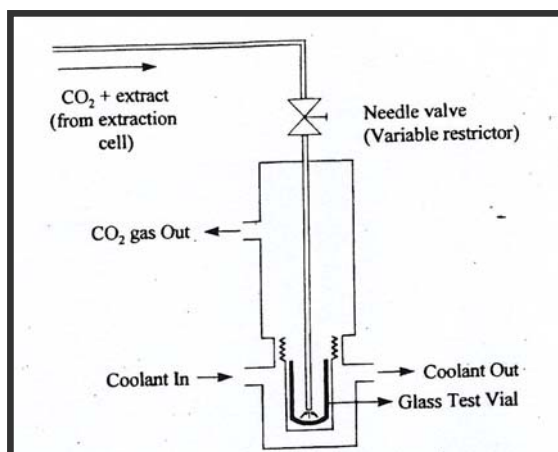


Figura 13: Esquema del dispositivo diseñado para recoger extractos tras SFE.

## 5.4.) DESCRIPCIÓN DE EQUIPOS

### 5.4.1.) CROMATÓGRAFO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS A ESCALA ANALÍTICA (SFC)

Se ha utilizado un cromatógrafo de fluidos supercríticos Carlo-Erba, modelo SFC 3000, equipado con una válvula de inyección, sistema "split/splitless", detector de ionización de llama (FID) y bomba de jeringa (SFC 300 Pump). En la Figura 14 se muestra una esquema del equipo utilizado:

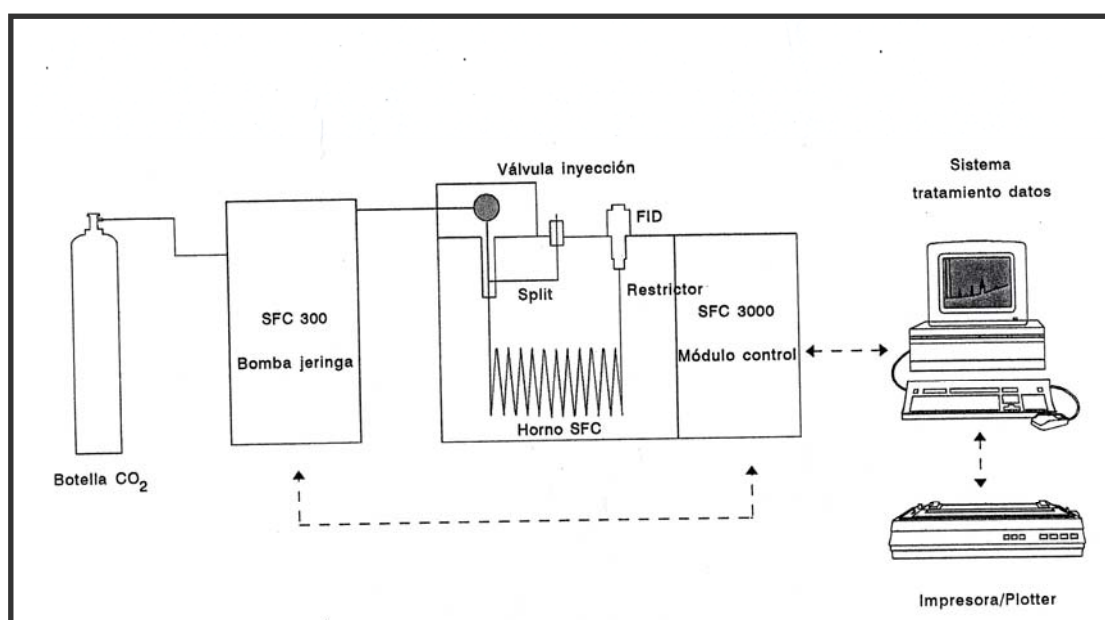


Figura 14: Esquema del cromatógrafo de fluidos supercríticos SFC 3000.

La bomba de jeringa tiene una capacidad de 150 mL y se encuentra termostatazada mediante la circulación externa de una mezcla de agua y monoetilenglicol (50:50) a 0°C. Permite trabajar en un intervalo de presiones entre 10 y 450 bar y proporciona flujos libres de pulsos. Mediante el control de la bomba se pueden realizar programaciones de presión y densidad.



El sistema cromatográfico está equipado con una válvula neumática de alta presión (Vici) que permite controlar el tiempo de inyección entre 30 y 9999 msec. y dispone de un bucle ("loop") interno de 1  $\mu\text{l}$  y de 60 nL. Un tiempo de inyección de 1500 msec. asegura que todo el contenido del bucle entra en el sistema cromatográfico. Para obtener una mayor precisión en el movimiento de la válvula se utilizó nitrógeno en el sistema neumático. El inyector contiene también una línea de división de flujo cuya relación se ajusta utilizando un restrictor capilar de sílice fundida de 13  $\mu\text{m}$  y longitudes comprendidas entre 10 y 20 cm.



Figura 15: Detalle del cromatógrafo SFC 3000.

El horno del cromatógrafo permite controlar la temperatura con gran precisión y exactitud, desde 5-10°C por encima de la temperatura ambiente hasta 500°C y con programaciones de temperatura entre 0°C hasta 49,9°C/min. con una precisión de (+/-) 0,1°C.

Los flujos de aire e hidrógeno del detector de ionización de llama se ajustaron experimentalmente de acuerdo a la presión utilizada, de modo que proporcionaran la mayor respuesta, estableciéndose finalmente una presión de aire igual a 90 kPa y una presión de hidrógeno de 60 kPa.

El sistema está acoplado a un integrador SP-4290 (Spectra-Physics) para la obtención de los cromatogramas y el tratamiento de los datos.

El montaje de la columna en el equipo se lleva a cabo de la siguiente manera: desde el inyector se conecta un tubo de acero de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro interno desactivado con CW-20M que acaba en una unión tipo "T" para permitir la salida del "split" (tubo de sílice fundida de las dimensiones adecuadas). La columna se conecta a la unión en "T" mediante un tubo de 180  $\mu\text{m}$ . de diámetro interno que se protege de las posibles roturas y dentro de un tubo "peek" de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro. A la salida de la columna se coloca el restrictor, para controlar el flujo de la columna, y se conecta directamente con el detector, tal y como se muestra en la Figura 16:

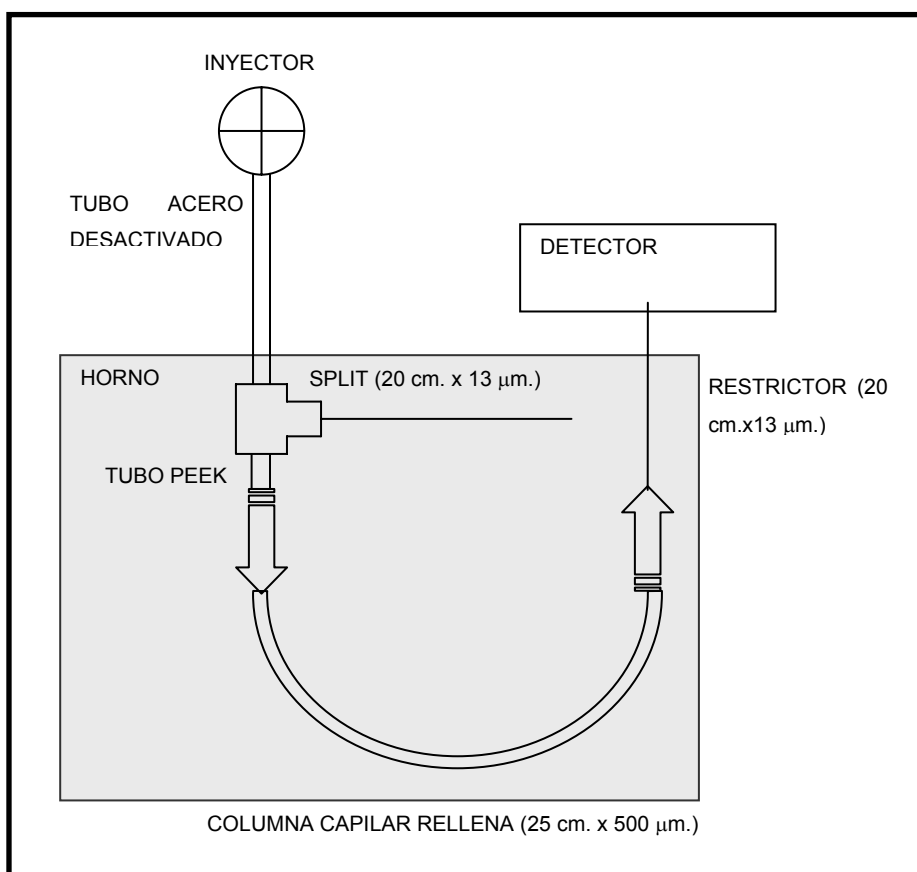


Figura 16: Esquema del montaje de columnas en SFC.

## 5.4.2.) EQUIPOS PREPARATIVOS

### 5.4.2.1.) Equipo de PS-SFC (Universidad Autónoma de Madrid, España)

Los componentes del equipo de cromatografía supercrítica preparativa (modelo SFC-50, de la ingeniería Thar Technologies, Estados Unidos) para llevar a cabo la separación de extractos de romero y aceite de oliva, perteneciente a la Universidad Autónoma de Madrid se muestran en la siguiente Figura:

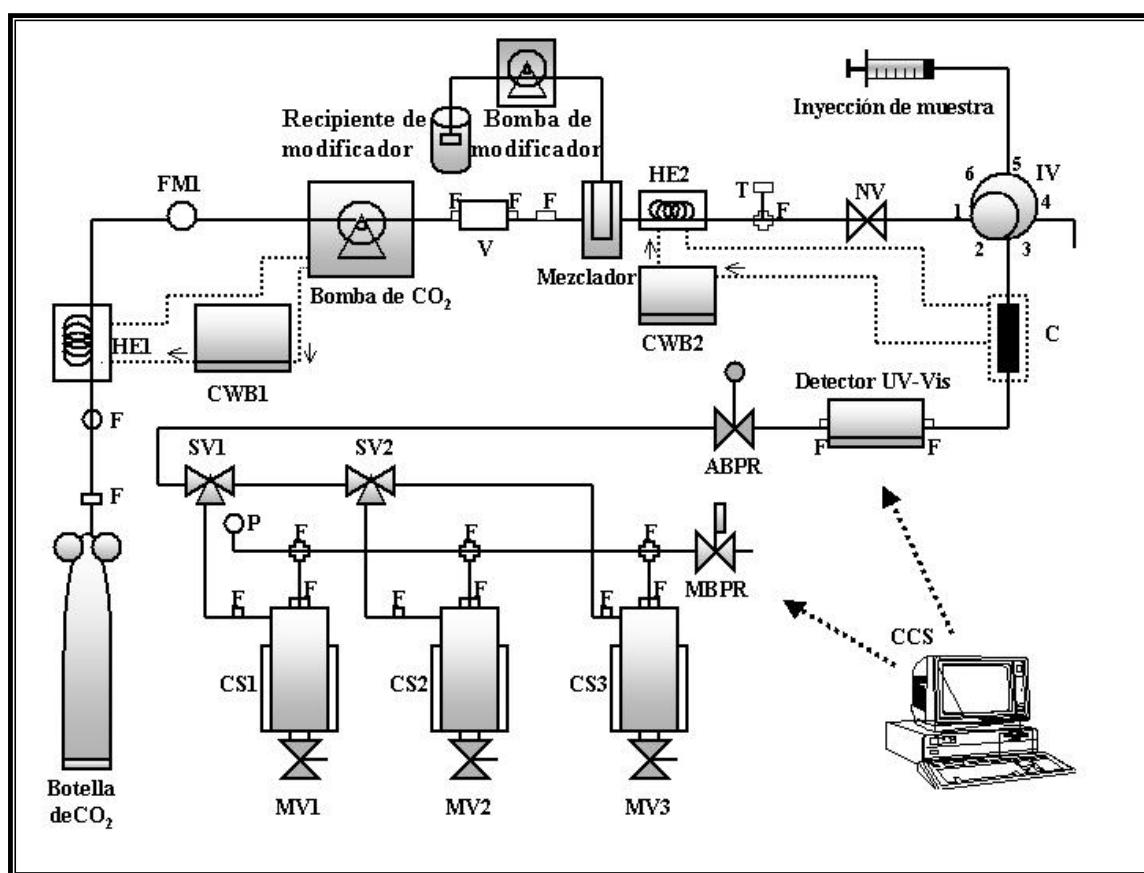


Figura 17: Diagrama del equipo de PS-SFC: HE1: intercambiador de calor; FM1: medidor de flujo másico; CWB1 : baño criogénico; F: filtros; V: amortiguador de pulsos; HE2: intercambiador de calor; CWB2: baño termostatzado; T: termopar; NV: válvula de aguja; IV: válvula de inyección tipo Rheodyne (6 vías); C: Columna; ABPR: Back Pressure Regulator automatizado; SV1 y SV2: válvulas solenoides de baja presión; CS1-3: separadores ciclónicos; MV1-3: válvulas de apertura manual; P: medidor de presión; MBPR: restrictor manual; CCS: sistema de control a través de computadora.

Un sistema de SFC preparativo con columna rellena consiste, principalmente, en un depósito contenedor de la fase móvil, una o varias bombas, un sistema de inyección, una columna dentro de un horno o baño termostaticado, un detector, un sistema de control de la presión y un sistema de recogida de fracciones. En la Figura 18 se muestra una fotografía de la planta piloto empleada.



Figura 18: Planta PS-SFC en la Universidad Autónoma de Madrid.

A continuación se explica detalladamente cada una de las partes del equipo:

Depósitos de fase móvil: El  $\text{CO}_2$  es la fase móvil más usada en SFC. Los depósitos de fase móvil suelen ser botellas o cilindros de dióxido de carbono, equipados con una sonda que permite la salida de la fase líquida del fluido empleado con fase móvil. Por seguridad, las botellas de gases deben estar situadas en un lugar específico para evitar potenciales situaciones de riesgo o peligro.

Bombas de CO<sub>2</sub> y modificador: Las bombas de pistón más empleadas en SFC son del tipo dual, en las que mientras un pistón está impulsado el fluido, el otro está llenando de fluido la cámara de la bomba. De esta forma, el flujo resultante es continuo y (casi) libre de pulsos. La bomba actúa así como un mecanismo de regulación de caudal que permite además mantener la eficacia de la columna.

En la planta de PS-SFC existen dos bombas de pistón duales, capaces de trabajar a alta presión: una refrigerada mediante un baño criogénico que trabaja a 5°C para bombear el dióxido de carbono líquido y otra para el bombeo de modificador. La bomba de CO<sub>2</sub> puede trabajar con flujos entre 2 g/min hasta 50 g/min y presiones de hasta 400 bar. Ambas bombas pueden trabajar con un caudal total máximo de 50 g/min, suma de los caudales de CO<sub>2</sub> y modificador, y poseen un disco de ruptura que actúa como mecanismo de seguridad en el caso de producirse una sobrepresión.

A la salida de la bomba de CO<sub>2</sub> existe un amortiguador de pulsos, que consiste en un cilindro vacío de 75 mL de capacidad. Además existe un mezclador a alta presión que permite la obtención de mezclas homogéneas de los fluidos procedentes de las dos bombas. Este mezclador puede trabajar a presiones de hasta 600 bar y con caudales de hasta 300 mL/min.

Sistema de inyección o introducción de muestra: Consiste en una válvula de inyección del tipo Rheodyne (6 vías) actuada eléctricamente, con un bucle de inyección de 750 µL.

Sistema de control de temperatura de la columna: La columna se calienta por inmersión en un baño de agua termostaticada (J.P. Selecta Termotronic, Barcelona, España) que permite controlar, dentro de un amplio rango de temperaturas, la selectividad del proceso, ya que un cambio en la temperatura provoca una alteración en la densidad de la fase móvil. Con fluidos binarios,

temperaturas cercanas a la temperatura crítica son las más efectivas, mientras que con CO<sub>2</sub> puro, temperaturas elevadas suelen ser más efectivas.

Sistema de detección: el detector más común con columnas rellenas en el UV-vis. Es necesario tener en cuenta dos consideraciones a la hora de elegir una combinación apropiada entre la columna y el mecanismo de detección: que la composición de la fase móvil sea compatible con el principio de detección y que el flujo volumétrico de la columna sea compatible con el volumen de la celda de detección. La planta de PS-SFC utilizada para la realización del presente estudio está equipada con un detector de UV-vis de longitud de onda variable (desde 190 a 380 nm), con una celda de alta presión (hasta 400 bar). La recuperación de los picos se lleva a cabo en base a la medida del detector (absorbancia) a la longitud de onda de trabajo seleccionada.

Sistema de regulación de la presión: La presión en la planta de PS-SFC se controla mediante un restrictor variable o Back Pressure Regulator (BPR), que consiste en una válvula de microregulación automática. Este sistema se programa para mantener una presión fija a la salida de la columna, independientemente del flujo y permite trabajar con presiones de hasta 400 bar y caudales de hasta 100 g/min. Otro aspecto a tener en cuenta es el control de la temperatura en este punto, puesto que se produce una expansión adiabática como consecuencia de la expansión del fluido (por pasar de una presión alta a una intermedia o incluso atmosférica, produciendo un aumento de volumen) lo que puede causar un importante descenso de temperatura. La manera más común de resolver el problema es calentar la BPR a 70-80°C.

Sistema de recogida de fracciones: Consta de dos válvulas solenoides de baja presión y de tres separadores ciclónicos en los que el fluido se introduce de forma tangencial a alta velocidad en la cámara de recogida. Los separadores ciclónicos tienen una capacidad de 200 mL cada uno. El tercer separador puede

actuar como desecho, recogiendo todo lo que pasa por la columna mientras no se de orden de recoger en uno de los otros ciclones. Los tres separadores tienen conexiones rápidas tipo "quick-connect", que se aprietan con la mano ("finger tight") y están calefactados empleando camisas eléctricas. Además, cada uno de ellos cuenta también con una válvula manual de apertura on/off.

En la siguiente Figura se muestra una foto de los separadores ciclónicos de la planta de PS-SFC utilizada:



Figura 19: Sistema de recogida de fracciones de la planta de PS-SFC por medio de separadores ciclónicos.

En la línea de salida del  $CO_2$ , existe un restringidor manual para mantener una presión adecuada en el interior de los separadores ciclónicos. Habitualmente se trabaja con presiones no superiores a 100 bar, siendo la misma presión para todos los separadores.

La planta de Thar Technologies posee un sistema de control por ordenador y un sistema de adquisición de datos diseñado específicamente para programar y controlar diferentes parámetros operacionales. Este sistema, llamado ICM (Instrument Control Modules) está diseñado para la monitorización y el control del

equipo por medio de diferentes paneles. Además, para la adquisición de datos del detector, se dispuso de un sistema adicional de adquisición de datos (Pico Technology Limited), del que se extraen los cromatogramas que se muestran en el apartado correspondiente de Resultados.

#### **5.4.2.2.) Equipo de PS-SFC (Facultad de Ciencias, U. Valladolid, España)**

El esquema del equipo con sus diferentes módulos se muestra en la Figura 20. Consta de un baño termostático modelo Frigomix U de B. Braun (Melsugen, Germany) que se emplea para enfriar a 0°C el cabezal de la bomba de CO<sub>2</sub>; una bala de CO<sub>2</sub> con sonda; dos bombas preparativas modelo PU-1586 de Jasco Corporation (Tokyo, Japan), de las cuales una se emplea para bombear el CO<sub>2</sub> y la otra para suministrar el modificador orgánico; un inyector Wilson 233XL sampling-inyector (Villiers-le-Bel, France), empleado tanto para la inyección como para la recogida de fracciones; un regulador de presión (backpressure regulator modelo BP-1580.81, de Jasco, Tokyo, Japan); un detector UV-Visible modelo HP series 1050 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA); un horno para calentar la columna (Jet-Stream plus, Thermotechnic Products, Langenzersdorf, Austria) y una interfase LC-Net II/ADC.

El equipo posee un sistema de control por ordenador, Borwin, mediante un sistema de adquisición de datos diseñado específicamente para programar y controlar los diferentes parámetros operacionales.



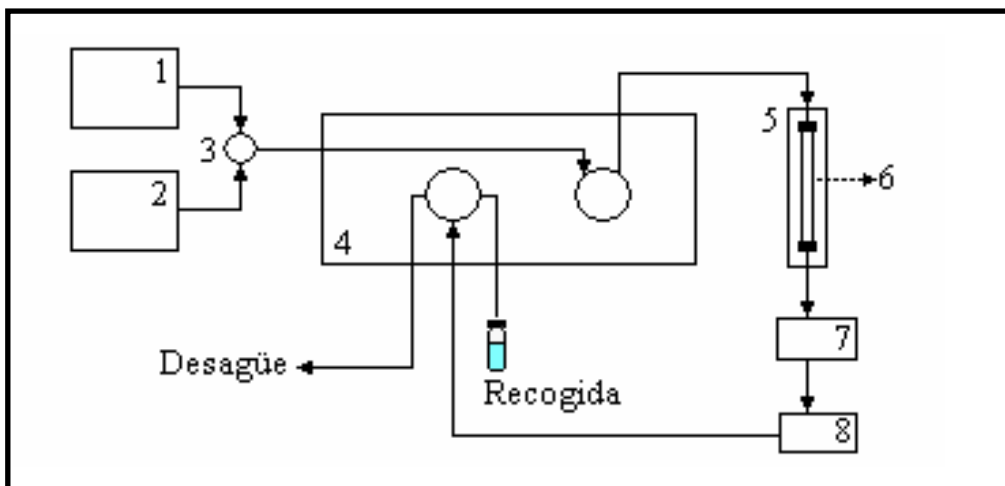


Figura 20: Esquema del PS-SFC de la Universidad de Valladolid. 1.- Bomba del modificador; 2.- Bomba de CO<sub>2</sub>; 3.- mezclador; 4.- Módulo de inyección; 5.- Horno de la columna; 6.- Columna; 7.- Detector; 8.- Restrictor.

En la Figura 21 se muestra una fotografía del equipo utilizado.



Figura 21: Foto del equipo PS-SFC de la U. Valladolid.

En la Figura 22 se muestra un esquema de las válvulas del inyector: la de la derecha se emplea para inyectar la muestra y la de la izquierda para recoger las fracciones. El inyector 233XL dispone además de un software que permite

programar los movimientos de la aguja de recogida de fracciones, controlando el tiempo al que empieza y termina de recoger, el vial en el que debe hacerlo, y el tiempo de permanencia en cada vial.

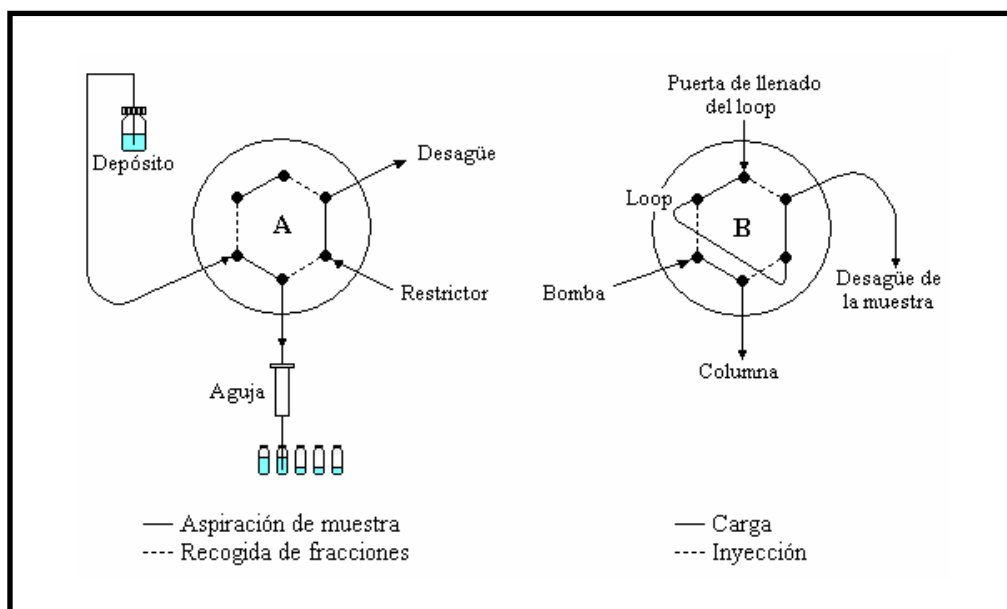


Figura 22: Esquema de las válvulas del inyector Wilson 233XL

### 5.4.3.) CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES

#### 5.4.3.1.) Equipos y métodos empleados en la caracterización por Cromatografía de Gases

El equipo utilizado para la separación e identificación de los compuestos del aceite esencial de romero fue un cromatógrafo de gases Varian 3800 (Varian, Walnut Creek, CA, EEUU) equipado con un inyector split/splitless 1177 (Varian) y un detector de ionización de llama (FID). La adquisición y el procesamiento de los datos se realizó mediante el programa informático Star (Varian). La columna utilizada fue una DB-5 (Agilent Technologies) de 30 m, con 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase. La inyección de la muestra fue de 3  $\mu\text{l}$  con una división de flujo de 10 ml/min. El gas portador fue Helio a 18 psig. La temperatura del inyector fue de 200°C mientras que la separación se realizó en

gradiente de temperatura comenzando en 100°C durante 10 minutos, aumentando posteriormente 5°C/min hasta 250°C, manteniéndola constante durante 10 minutos. Posteriormente se aumentó la temperatura hasta 300°C con un gradiente de 15°C/min. Esta temperatura se mantuvo constante 10 minutos.

El análisis de las fracciones de aceite de palma purificadas (separación de tocoferoles) se realizó en un equipo de GC HP 5890, en columna DB-5 de 30 m. La inyección de la muestra fue de 1 µl con una división de flujo de 1:30. El gas portador fue Nitrógeno a 2 ml/min. La temperatura del inyector fue de 300°C y la del detector de 370°C. La separación se realizó en gradiente de temperatura comenzando en 120°C durante 2 minutos, aumentando posteriormente 20°C/min hasta 240°C, y aumentando hasta 330°C con un gradiente de 5°C/min. Esta temperatura se mantuvo constante 5 minutos.

#### **5.4.3.2.) Equipos y Métodos empleados para la caracterización por HPLC**

Para todos los análisis realizados con el extracto antioxidante se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos HP serie 1100 equipado con un inyector manual con un bucle de inyección de 20 µl. Se eligió una columna Nova Pack C<sub>18</sub> Waters (Dublín, Irlanda) de 150 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 3,5 µm. La fase móvil utilizada en la separación consistió en una mezcla de solventes A (acetonitrilo con 1% de ácido acético) y B (agua con 1% de ácido acético). Se varió la composición de la fase móvil de acuerdo con un gradiente de 40 minutos, comenzando por un 50% de B durante 5 minutos, 30% de B a los 15 minutos y alcanzando 0% de B a los 40 min. El flujo se mantuvo durante toda la separación a 0,7 ml/min. La detección de los compuestos se realizó con un detector de haz de diodos de la serie 1100 (Hewlett-Packard) en un rango de longitud de onda desde 200 hasta 450 nm. La ranura de detección se estableció en 4 nm y el

intervalo de muestreo en 200 ms. La longitud de onda elegida para la detección de los compuestos fue de 230 nm.

El análisis de las muestras y fracciones enriquecidas de desodorizados de aceite de soja se realizó en un equipo de HPLC equipado con un horno (CTO 10A VP2), un bomba (LC-10AD VP), un módulo de gradiente (FCV-10AL VP), un desgasificador (DGU-14A) y un detector de dispersión evaporativa de luz (evaporative light scattering detector (ELSD), Shimadzu, IZASA, España) en columna Kromasil silica 60 (Análisis vínicos, Tomelloso, España) de 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno. El método de separación empleado fue desarrollado por Torres y col., 2005, y permite la separación de los distintos compuestos que se encuentran en las muestras de los desodorizados de aceites y de sus fracciones. De forma breve, el método consiste en una separación con una mezcla de distintos eluyentes (isooctano, metil tert-butil éter y isopropanol) en modo gradiente a 2,2 bar de presión, 35°C y un flujo de 2,2 ml/min.

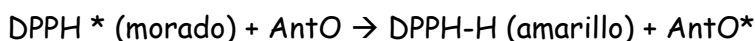
## 5.5.) MEDIDAS DE ACTIVIDAD FUNCIONAL

### 5.5.1.) ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

El bloqueo de radicales libres es el mecanismo principal mediante el cual actúan los antioxidantes en los alimentos. Uno de los métodos más utilizados para medir la actividad antioxidante de un extracto se basa en la capacidad del antioxidante de atrapar radicales libres sintéticos de un compuesto en un disolvente orgánico.

Para la medida de actividad funcional de esta tesis, la actividad antioxidante se determina mediante el ensayo de neutralización de radicales libres del DPPH (DPPH) (2,2-Difenil-2-picrilhidracil) descrito por Brand-Williams (Brand-Williams y col., 1995), puesto que el DPPH ofrece un radical libre muy estable. La

medida se realiza por disminución de la absorbancia de la muestra a 515 nm. Se puede observar, de esta manera, un cambio del color inicial morado (DPPH en forma radical), a amarillo, que es cuando los radicales de la molécula han sido bloqueados por el antioxidante, como muestra la siguiente reacción:



Gracias a este ensayo se puede calcular el  $EC_{50}$ , que expresa la cantidad del antioxidante necesaria para reducir en un 50% los radicales libres del DPPH, a un tiempo determinado.

Para cada una de las fracciones obtenidas mediante PS-SFC y para el extracto inicial, se probaron diferentes concentraciones de reactivo (de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$  en solución de metanol y DPPH). La reacción se lleva a cabo de la siguiente manera: a 1950  $\mu\text{l}$  de una disolución de DPPH (23,5  $\mu\text{l/l}$  en etanol) se le añaden 50  $\mu\text{l}$  de muestra a diferentes concentraciones. La reacción se deja transcurrir durante 3 horas y posteriormente se mide la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro de ultravioleta-visible y cubetas desechables. Cada medida se repite dos veces. Para las medidas del espectrofotómetro se utiliza metanol para ajustar el cero y la solución de DPPH con etanol como muestra de referencia.

Se prepararon disoluciones con diferentes concentraciones de DPPH en metanol para obtener la recta de calibrado de la concentración de DPPH remanente una vez transcurrida la reacción. La ecuación es la siguiente ( $R^2=0.999$ ):

$$Y = 0.0247x - 0.0029$$

Cada uno de los valores de absorbancia medidos en el espectrofotómetro se corrigió sumándole el valor de absorbancia perdido por el DPPH control. El valor obtenido se extrapoló en la recta de calibrado del DPPH para hallar el equivalente

a la concentración de DPPH a tiempo final. El DPPH remanente (%DPPH<sub>REM</sub>) se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$\%DPPH_{REM} = C_{DPPH}(\text{final})/C_{DPPH}(t=0) \times 100$$

Donde  $C_{DPPH}(\text{final})$  y  $C_{DPPH}(t=0)$  son las concentraciones de DPPH a tiempo final y tiempo cero respectivamente.

Posteriormente se representó la concentración remanente de DPPH frente a la concentración de extracto utilizada para obtener el valor de EC<sub>50</sub>. Se ha de tener en cuenta cuanto menor sea este valor, más alto será el valor de actividad antioxidante del compuesto o fracción analizada.

#### 5.5.2.) ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los extractos purificados de romero también se sometieron a un test frente a distintos microorganismos: un Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), un Gram - (*Escherichi coli* ATCC 11775), y una levadura (*Candida albicans* ATCC 60193). Las dos cepas bacterianas se mantuvieron en agar nutritivo a 4°C, mientras que para la levadura se mantuvo en un medio de agar con dextrosa Sabourand a 4°C.

Como recomienda la NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute de EEUU), para obtener el valor de la concentración mínima inhibitoria se empleó un método de microdilución (broth microdilution method, NCCLS, 1999). Todos los experimentos se llevaron a cabo en medio de crecimiento Mueller-Hinton suplementado con tween-20 para las bacterias y medio de crecimiento Sabouraud dextrosa con 0,5 tween-20 para las levaduras.

Las bacterias se dejaron crecer durante toda la noche en medio Mueller-Hinton a 37°C para preparar los inóculos. En el caso de las levaduras, el crecimiento se llevó a cabo en medio Sabouraud dextrosa a 25°C. Para ambos casos, los cultivos se suspendieron en el medio adecuado (Muller-Hinton para las bacterias y Sabouraud dextrosa para las levaduras) para conseguir una densidad de 10<sup>7</sup> cfu/ml. Las fracciones purificadas de romero se prepararon en etanol en un rango de concentraciones de 50 mg/ml a 1 mg/ml.

Para los ensayos antimicrobianos se preparó una placa multipocillo con un volumen final en cada uno de los pocillos de 200 µl de la siguiente manera: 185 µl del medio de cultivo, 5 µl del inóculo y 10 µl de los diferentes concentraciones de extracto. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas para las bacterias y 24°C durante 48 horas para las levaduras.

Los controles negativos se prepararon con 10 µl de etanol, el disolvente empleado para los extractos de romero. Para los controles positivos se utilizaron dos estándares de antibióticos: Cloranfenicol y Amfotericina para determinar la sensibilidad de las especies antimicrobianas usadas.

Después de la incubación, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante inspección visual del fondo del pocillo, ya que el crecimiento bacteriano se observa como la presencia de un precipitado blanco en el fondo del mismo. La mínima concentración de extracto que es capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo, detectado como ausencia de "precipitado" blanco, es a lo que se denomina CMI. La concentración bactericida o fungicida mínima (MCB) se determinó realizando subcultivos de los pocillos con ausencia de crecimiento (precipitado). Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió dos veces.

## 6.) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1.) DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE COLUMNAS CON RELLENOS "AD HOC" IMPREGNADOS

Como ya se ha comentado ampliamente en la Introducción de la presente Memoria, una manera interesante de cambiar las propiedades del sistema cromatográfico para analizar compuestos polares, sin usar modificadores, consiste en ajustar la polaridad de la fase estacionaria utilizando como fase móvil CO<sub>2</sub> puro, puesto que se ha demostrado que las fases de las columnas pueden ser fácil y ampliamente adaptadas en SFC (Chester y col., 1996 e Ibáñez y Señoráns, 2000). Esta interacción es tanto más importante cuanto más altas son las temperaturas y presiones utilizadas (Lou y col., 1997). Por todo ello y, gracias al estudio previo realizado por el grupo de investigación sobre fases estacionarias para columnas capilares rellenas en SFC (Ibáñez y col., 1995 (c)), se planteó como objetivo la obtención de columnas capilares rellenas de acero inoxidable con partículas impregnadas con fases estacionarias de distinta polaridad para la separación y aislamiento de compuestos con actividades funcionales, muchos de ellos de elevada polaridad.

Los materiales que se utilizan, y que han sido descritos en el apartado 5.1.1.3 de Materiales y Métodos, cubren un amplio rango de polaridades, y van desde partículas de sílice impregnadas con una fase estacionaria apolar como la SE-54 (95% Metil-5% fenilsilicona) hasta partículas impregnadas con fase estacionaria polar como la CW-20M (polietilenglicol) e incluso partículas más polares tipo diol (Figura 23).



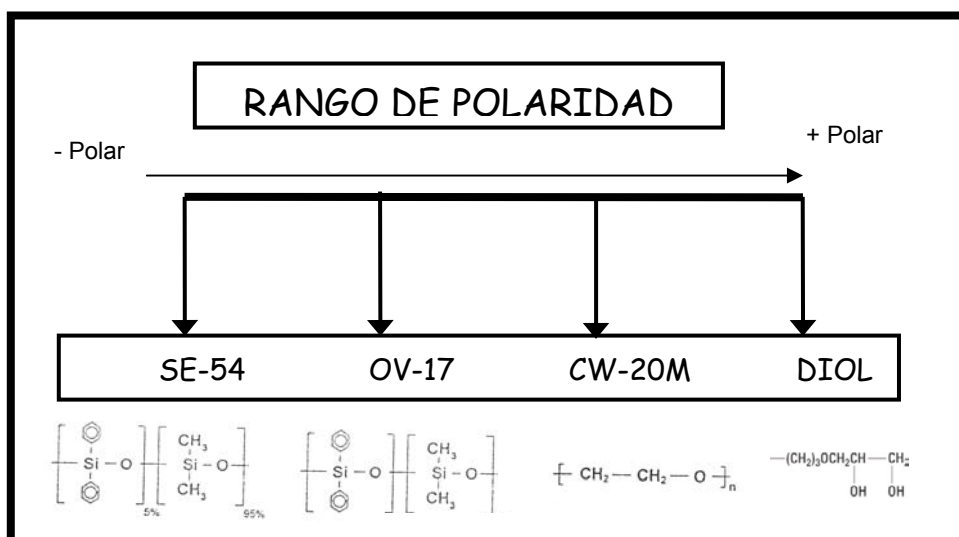


Figura 23: Esquema que representa el rango de polaridades empleado en los rellenos de las columnas.

Las etapas para la preparación de las columnas rellenas de acero, tanto para columnas analíticas como las preparativas, se describen con detalle en los siguientes apartados.

### 6.1.1.) DESACTIVACIÓN DEL TUBO DE ACERO INOXIDABLE

Este procedimiento se emplea sólo para las columnas analíticas, puesto que el tubo usado para las columnas preparativas está previamente desactivado. El tubo capilar de acero inoxidable de 0,5 mm. de diámetro interno se coloca en un cromatógrafo de gases y se hace pasar, por presión, una solución de CW20 M al 20%. Posteriormente el tubo se seca con helio a una temperatura de 70° C. El tubo se mantiene con un flujo bajo durante tres horas a una temperatura de 350° C y posteriormente se lava con diclorometano, secándolo en corriente de helio a 70°C. De esta manera se eliminan los puntos activos de la parte interna del tubo de acero, de tal forma que no interfieran en la separación cromatográfica.

### 6.1.2.) IMPREGNACIÓN DE RELLENOS

Para el recubrimiento de las partículas de sílice con las distintas fases estacionarias líquidas se diseñó un dispositivo como el que se muestra en la Figura 24, situado en el interior de un horno de un cromatógrafo de gases.

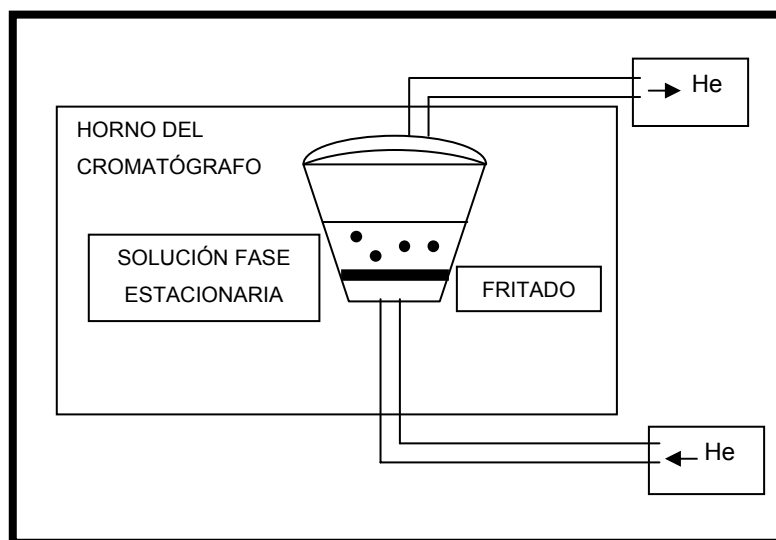


Figura 24: Dispositivo para la impregnación de rellenos.

El procedimiento que se sigue consiste en un primer lavado del recipiente con etanol, a una temperatura de 40°C, haciendo circular helio. A continuación se pesan las partículas de sílice y, tras cargarlas en el recipiente, se lavan con etanol y se secan en corriente de helio mediante rampa de temperatura de 50°C a 170°C (5°C/min.), dejándolo a esa temperatura durante una hora.

Se prepara la solución de recubrimiento con el porcentaje de fase adecuado (en la presente memoria se utilizan fases estacionarias al 3%) y se añade la cantidad adecuada de peróxido de dicumilo necesario en las fases OV-17, SE-54 y diol (puesto que la fase CW-20M no se disuelve en CO<sub>2</sub> supercrítico) para el entrecruzamiento de las partículas. Se añade la solución al recipiente y se procede al recubrimiento a temperatura ambiente en corriente de helio, formándose así un lecho fluidizado que favorece la impregnación regular de las partículas. Para

finalizar se procede al entrecruzamiento de las partículas en rampa de temperatura de 50°C a 160°C (5°C/min.) durante doce horas.

### 6.1.3.) LLENADO Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS COLUMNAS RELLENAS IMPREGNADAS

#### **6.1.3.1.) Columnas analíticas**

Para el llenado de las columnas se emplea el procedimiento descrito por Malik y col., 1993, con ciertas modificaciones. Las partículas impregnadas con la fase estacionaria se colocan en un recipiente cilíndrico de acero inoxidable ("*recipiente de relleno*" en la Figura 25) de 10 mm de diámetro interno, 100 mm de longitud y 2 mm de espesor de pared, con un extremo en forma de cono truncado mediante una unión cónica de latón al que se fija un tubo de sílice fundida de 250  $\mu\text{m}$  para la unión al extremo abierto del tubo. El otro extremo del recipiente se conecta a la línea de  $\text{CO}_2$ , controlada por la bomba. Es conveniente colocar en la línea del  $\text{CO}_2$  una hebra de lana de vidrio con unas gotas de etanol, de esta manera se crea la atmósfera necesaria para evitar la carga estática de las partículas del soporte. Cuando así se requiera, el tubo puede introducirse en un baño de ultrasonidos para favorecer el llenado de la columna. En la Figura 25 se muestra un esquema del montaje utilizado para el llenado de columnas analíticas.

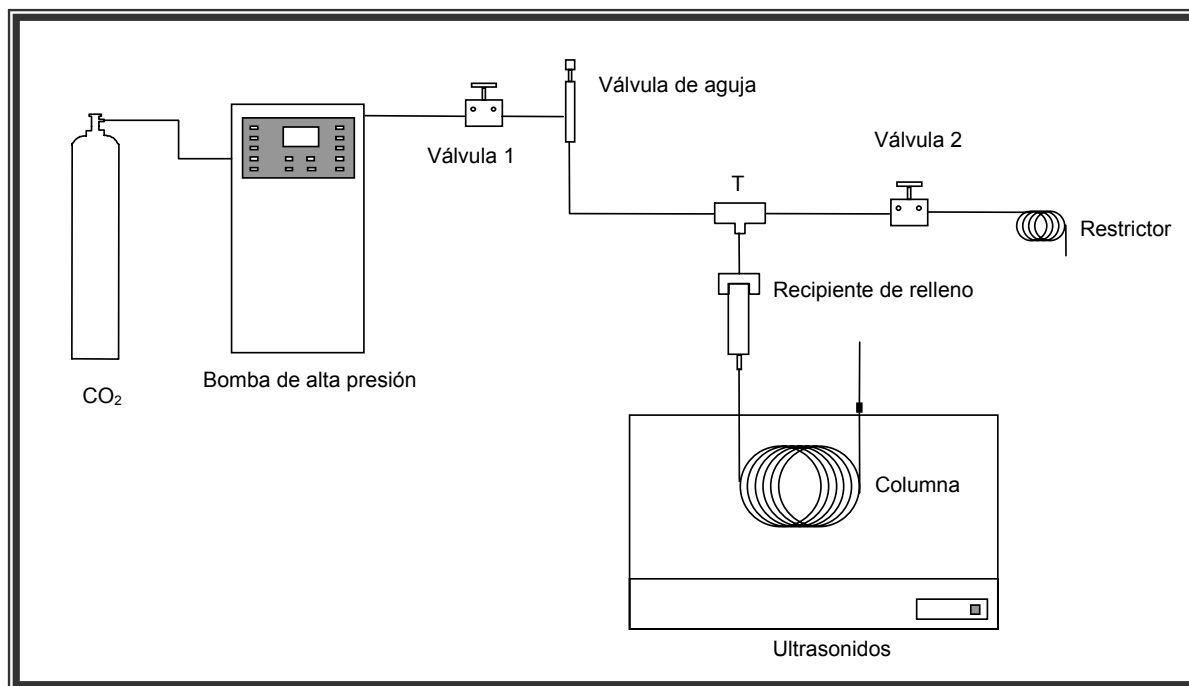


Figura 25: Esquema del montaje para el llenado de las columnas analíticas

El programa de presión para el llenado de las columnas es el siguiente: de 80 bar (20 min) a 280 bar mediante una programación de 3 bar/min. La presión final se mantiene durante 10 min. Posterior al llenado, y antes de utilizar las columnas para las separaciones cromatográficas, se procede a su colocación en el equipo de SFC y se lleva a cabo una fase de acondicionamiento mediante una programación de temperatura (de 40°C a 180 °C a 3 °C/min) y de presión (de 120 bar a 320 bar a 4 bar/min).

#### 6.1.3.2.) Columnas preparativas

El procedimiento de empaquetado de columnas preparativas se desarrolló en el presente trabajo y consistió en un método combinado de  $CO_2$  y slurry, que es el método típico de llenado de columnas para cromatografía de líquidos (HPLC).

El sistema, que es una modificación del utilizado para el llenado de las columnas analíticas, se muestra en la Figura 26 y consta de los siguientes elementos:

- una bomba de  $CO_2$  de alta presión (sistema de extracción con fluidos supercríticos SFE Suprex PrepMaster),
- tres válvulas "on/off" para regular la presión en el sistema durante las distintas etapas,
- dos válvulas de aguja que permiten ajustar el flujo de  $CO_2$  de una manera precisa,
- un tubo que hace de reservóreo de fase estacionaria conectado a
- la columna preparativa y
- un ultrasonidos que ayuda al correcto empaquetado de las partículas durante el llenado de la columna.

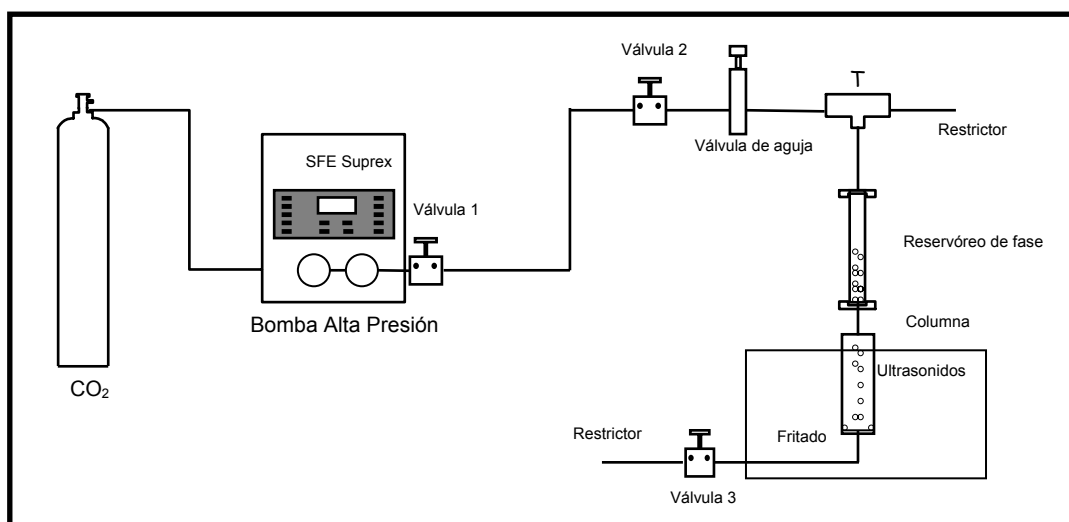


Figura 26: Esquema del montaje para el llenado de las columnas preparativas.

El procedimiento seguido es el que se describe a continuación: se prepara la disolución del slurry, mezclando 66 ml de un solvente adecuado (etanol) con 16 g de fase. Se mantiene durante 5 minutos en ultrasonidos para la completa disolución de la fase en el solvente. Una vez ensamblado el sistema de tubos y válvulas, se llena

la columna del solvente y se cierra la conexión entre la columna y el reservóreo de fase. Se llena el tubo que hace de reservóreo con la fase de slurry preparada previamente y se cierra la conexión del slurry. Con el sistema a 80 bar se comprueba la ausencia de fugas en todo el recorrido. Una vez comprobado se deja salir el solvente gota a gota a través del restrictor de la columna hasta que sólo se observen las burbujas indicativas de que únicamente circula  $CO_2$  por la columna, momento en el cual se lleva a cabo un aumento de presión desde 100 bar hasta 260 bar con una rampa de 3 bar/min. Una vez finalizada la rampa de presión, la columna se deja despresurizar durante dos días hasta que no se observa flujo a la salida del restrictor de la columna. Entonces, el sistema se desmonta y la columna preparativa se coloca en la planta de SFC preparativo descrita en el apartado 5.4.2.1, donde se realiza un acondicionamiento de la misma mediante una rampa de presión y temperatura siempre a condiciones superiores a las requeridas en el sistema cromatográfico.

En la fotografía de la Figura 27 se muestra el montaje para el llenado de las columnas preparativas, diseñado en el presente trabajo.



Figura 27: Foto del montaje para el llenado de las columnas preparativas.

## 6.1.4.) CARACTERIZACIÓN DE COLUMNAS RELLENAS IMPREGNADAS

### 6.1.4.1.) Columnas analíticas

#### Estudio de la Eficacia

Para llevar a cabo el estudio de la eficacia se evaluó en primer lugar el efecto de la velocidad lineal de la fase móvil sobre la eficacia, utilizando la ecuación de Poiseuille (descrita en el apartado 5.2.1. del presente trabajo). Posteriormente se llevó a cabo el estudio de la eficacia (gráficas H vs k') para cada columna.

Para el estudio del efecto de la velocidad lineal (flujo) sobre la eficacia se empleó la ecuación siguiente:

$$F = \frac{\pi (P_E - P_S) r^4}{8 L \eta}$$

Según ésta, el aumento de la velocidad lineal de la fase móvil se obtiene bien al aumentar el diámetro interno del tubo (expresado en la ecuación como radio, (r)) o bien al disminuir la longitud del mismo (L). En esta ecuación se deben considerar tanto el flujo del restrictor como el del "split" o división de flujo.

A partir de las condiciones iniciales de trabajo se llevaron a cabo dos modificaciones cuyo objetivo era aumentar el flujo de fase móvil sin perder eficacia, aunque éstas afectaban de manera inversa a la cantidad de muestra introducida en la columna. Las modificaciones sugeridas implicaban una variación de las dimensiones del split y del restrictor a la salida de la columna cromatográfica. Al aumentar el diámetro interno del split, aumenta el flujo, reduciéndose la cantidad de muestra que pasa a través de la columna, mientras que al disminuir la

longitud del restrictor aumenta el flujo y, por tanto, la velocidad lineal de la fase móvil. De esta manera, se evalúa la influencia del flujo sobre la eficacia de las columnas. Las dimensiones de los tubos de sílice fundida de cada una de las experiencias se muestran en la Tabla 8:

Tabla 8: Condiciones experimentales para el estudio de la eficacia.

ENSAYO	SPLIT (diámetro interno x longitud)	RESTRICTOR (diámetro interno x longitud)
Condiciones Iniciales	13 μm x 20 cm	13 μm x 20 cm
Modificación nº 1	25 μm x 20 cm	13 μm x 20 cm
Modificación nº 2	25 μm x 20 cm	13 μm x 10 cm

La eficacia se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$N = 5,54 [ t_R / W_{1/2} ]^2$$

Donde N es el número de platos teóricos por metro;  $t_R$  es el tiempo de retención del compuesto y  $W_{1/2}$  es la anchura del pico a mitad de su altura máxima. La eficacia se representa en función del factor de capacidad ( $k'$ ), que relaciona el equilibrio de distribución del soluto entre las fases estacionaria y móvil en función del tiempo de permanencia en las mismas.

Las datos obtenidos para cada una de las experiencias se presentan en la Tabla 9. Cada uno de ellos es la media resultante de dos ensayos sucesivos, todos con el alcano  $C_{20}$  y la columna SE-54. En la Tabla se muestran además las condiciones experimentales utilizadas y la velocidad lineal resultante (calculada a partir del tiempo muerto y la longitud de la columna).



Tabla 9: Resultados del estudio de eficacia.

	PRESIÓN (bar)	TEMP. (°C)	k'	N (N° platos/m)	H (cm)	u (cm/seg)
Condiciones Iniciales	100	80	12,0	6.770	0,0148	0,185
	105	80	9,4	6.400	0,0156	0,196
	110	80	6,5	5.500	0,0182	0,198
	115	80	5,0	4.700	0,0213	0,205
	120	80	3,7	4.050	0,0247	0,263
Modificación nº 1	100	80	19,2	6.900	0,0145	0,304
	110	80	10,5	5.750	0,0174	0,326
	120	80	6,0	4.500	0,0222	0,353
Modificación nº 2	100	80	18,8	5.400	0,0185	0,743
	110	80	10,5	4.100	0,0244	0,780
	120	80	5,9	3.500	0,0286	0,812

La representación de estos datos (y sus curvas lineales de tendencia) se muestran en la Figura 40, expresada como relación entre la altura equivalente a un plato teórico (H o HETP), calculada a partir de N, que es la longitud de columna necesaria para alcanzar el equilibrio de distribución, y el factor de capacidad (k').

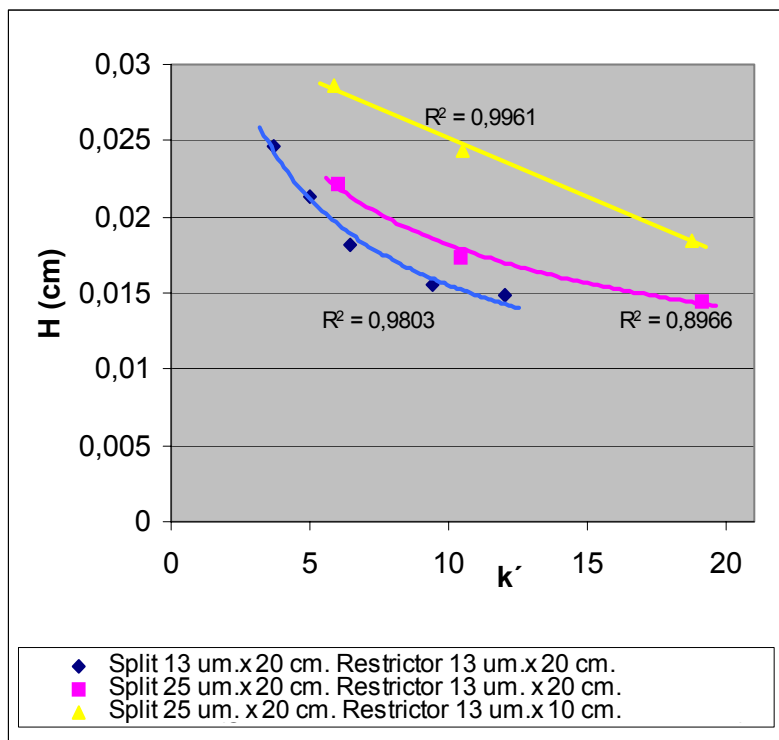


Figura 28:  
Representación de H vs k' según el flujo.

De la gráfica puede deducirse que los resultados entre el split de 25 μm y el de 13 μm son parecidos en cuanto a H, aunque cuando existe mayor flujo (split de 25 μm) los tiempos de retención del compuesto aumentan para el mismo número de platos teóricos. La modificación sobre el flujo del restrictor (gráfica amarilla en la Figura 40) aumenta notablemente la velocidad lineal de la fase móvil pero hace empeorar los resultados de eficacia.

De los datos de la Tabla 9 también se puede evaluar el efecto de la presión sobre la eficacia de las columnas, a temperatura constante (Figura 29). Así, se puede deducir que la eficacia es siempre menor al aumentar la velocidad lineal de la fase móvil, lo que indica una mayor influencia del término de resistencia a la transferencia de materia. Esto indica que para obtener eficacias razonables se debe trabajar en la zona de velocidades lineales bajas (entre 0,2 y 0,3 cm/s) para un soluto que eluya a un k' de aproximadamente 10.

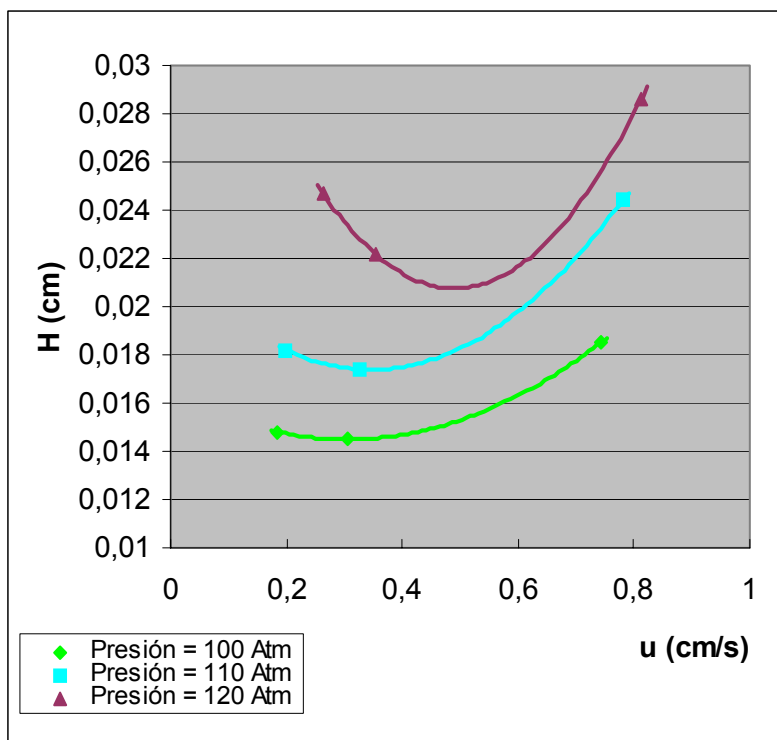


Figura 29: Efecto de la presión de la fase móvil en la eficacia para la columna SE-54.

Considerando lo comentado anteriormente, se eligen las condiciones iniciales como las que proporcionan los mejores resultados, es decir, un restrictor para el split de 13  $\mu\text{m}$  de diámetro interno x 20 cm de longitud y un restrictor de flujo de 13  $\mu\text{m}$  de diámetro interno x 20 cm de longitud.

El estudio de la eficacia para cada columna consistió en la obtención del número de platos teóricos por metro para cada una de ellas y, a partir de este dato, en el cálculo de la altura equivalente a un plato teórico (H o HETP). Se emplearon distintas condiciones de presión que, para un soluto determinado, modifican su factor de capacidad. Este hecho se aprovechó para obtener la representación gráfica de H vs  $k'$  para cada una de las columnas (que se han llevado a cabo con dos alcanos diferentes a modo de comprobación aunque sólo se presenta los resultados correspondientes a uno de ellos). Tal y como se describía en Ibáñez, 1993, para todas las columnas estudiadas los valores de eficacia prácticamente no varían con el factor de capacidad, aunque la ligera diferencia

observada permite deducir la tendencia del número de platos teóricos en función de la retención. En la Tablas 10 a 13 se presentan los datos para cada columna en las condiciones indicadas (cada dato es la media de dos resultados).

Tabla 10: Eficacia de la columna SE-54.

	PRESIÓN (bar)	TEMP. (°C)	k'	N (Nº platos/m)	H (cm)	μ (cm/seg)
C <sub>20</sub>	100	80	12,0	6.770	0,0148	0,17
	110	80	6,5	5.500	0,0182	0,19
	120	80	3,7	4.050	0,0247	0,22

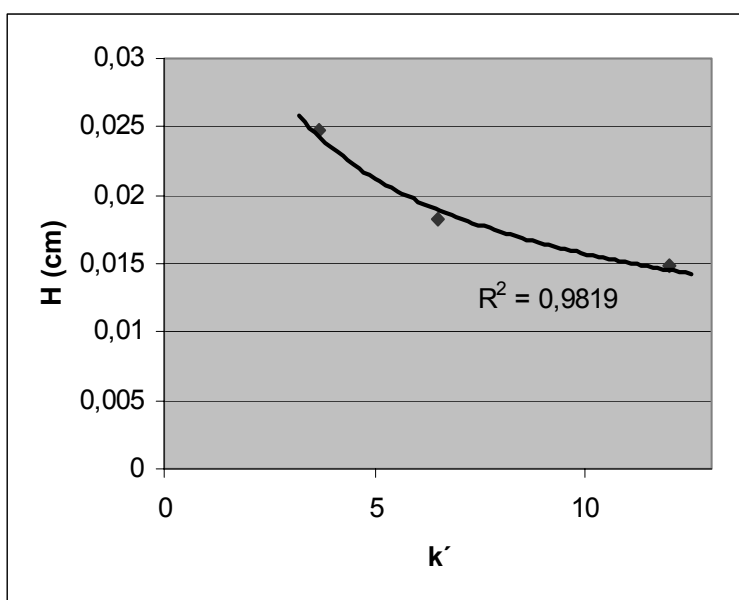


Figura 30: Representación H vs k' para la columna SE-54.

Los datos de esta columna son los correspondientes a las condiciones iniciales de split y restrictor que se presentan en la Tabla 9. Como puede observarse, los datos se ajustan mejor a un modelo potencial que a uno lineal como ocurre también en la columna diol, quizá porque los valores de k' son más altos. En este sentido, parece lógico que en una columna apolar, como es la impregnada con la fase estacionaria SE-54, los alcanos presenten una mayor retención comparada con fases polares como la CW-20M. El mayor valor de N obtenido para esta columna (k' = 12) es 6.770 platos/m.

Tabla 11: Eficacia de la columna OV-17.

	PRESIÓN (bar)	TEMP. (°C)	k'	N (Nº platos/m)	H (cm)	μ (cm/seg)
C <sub>12</sub>	80	80	3,0	5.100	0,0195	0,11
	85	80	2,5	5.300	0,0188	0,12
	90	80	2,1	5.600	0,0179	0,12

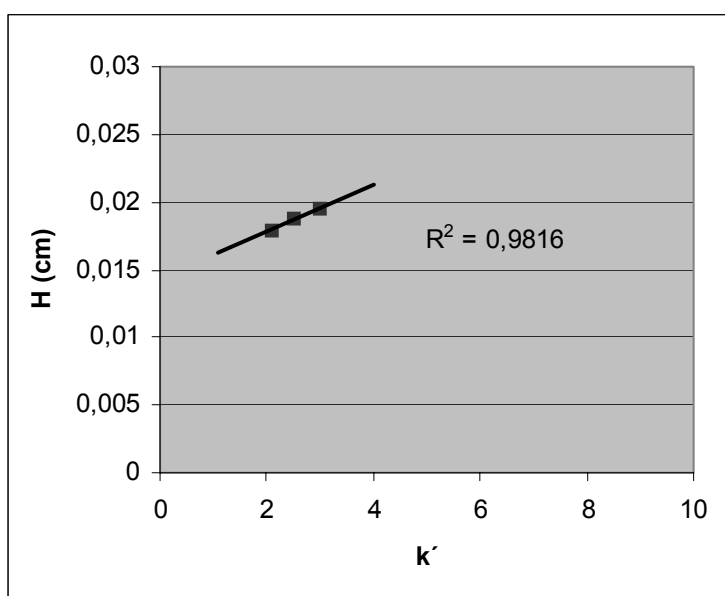


Figura 31: Representación H vs  $k'$  para la columna OV-17.

Como puede apreciarse en la Figura 31, la tendencia en la variación de la eficacia en función del factor de capacidad en esta columna es inversa con respecto a las otras columnas. En este caso, el número de platos teóricos disminuye al aumentar la retención de los solutos a valores de  $k'$  bajos.

Tabla 12: Eficacia de la columna CW-20M.

	PRESIÓN (bar)	TEMP. (°C)	k'	N (Nº platos/m)	H (cm)	μ (cm/seg)
C <sub>12</sub>	85	80	3,2	19.700	0,0051	0,15
	90	80	2,8	15.600	0,0064	0,15
	95	80	2,1	12.500	0,0080	0,16

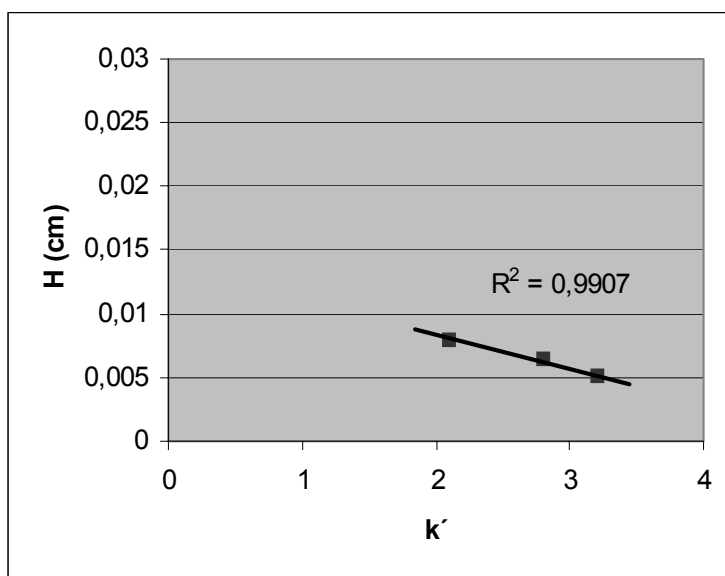


Figura 32: Representación H vs k' para la columna CW-20M.

Esta columna es la que mayor número de platos por metro presenta, del orden de 20.000 platos/m ( $k' = 3,2$ ). Los datos concuerdan con una línea de tendencia lineal bastante aproximada para valores de  $k'$  bajos (entre 2 y 3 aproximadamente). Como se ha comentado anteriormente, la menor retención de los alcanos concuerda con la naturaleza polar de la fase estacionaria evaluada en este caso.

Tabla 13: Eficacia de la columna Diol.

	PRESIÓN (bar)	TEMP. (°C)	k'	N (N° platos/m)	H (cm)	$\mu$ (cm/seg)
C <sub>18</sub>	80	80	11	12.000	0,0083	0,13
	85	80	7,4	8.055	0,0124	0,13
	90	80	6	6.015	0,0166	0,14

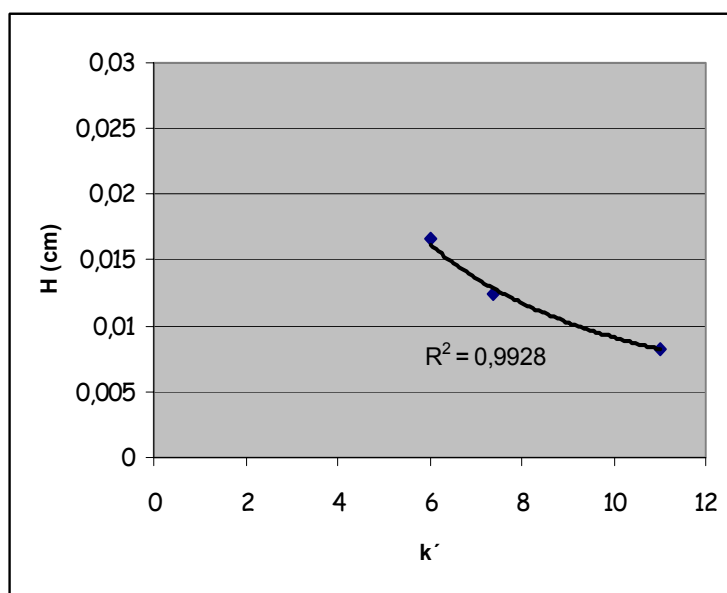


Figura 33: Representación H vs k' para la columna Diol.

Esta columna tiene un comportamiento parecido a la SE-54, aunque el número de platos es bastante mayor. Esto es lógico si se considera que esta columna se rellena con partículas de 7  $\mu$ m. Se ha utilizado uno de los alcanos de longitud de cadena más larga puesto que al ser la columna más polar, la tendencia es a que los tiempos de retención se reduzcan. El mayor valor de N obtenido para esta columna ( $k' = 11$ ) es 12.000 platos/m.

En la Figura 34 se muestra, a modo de ejemplo, la separación de una mezcla de alcanos en la columna diol en las condiciones que se indican.

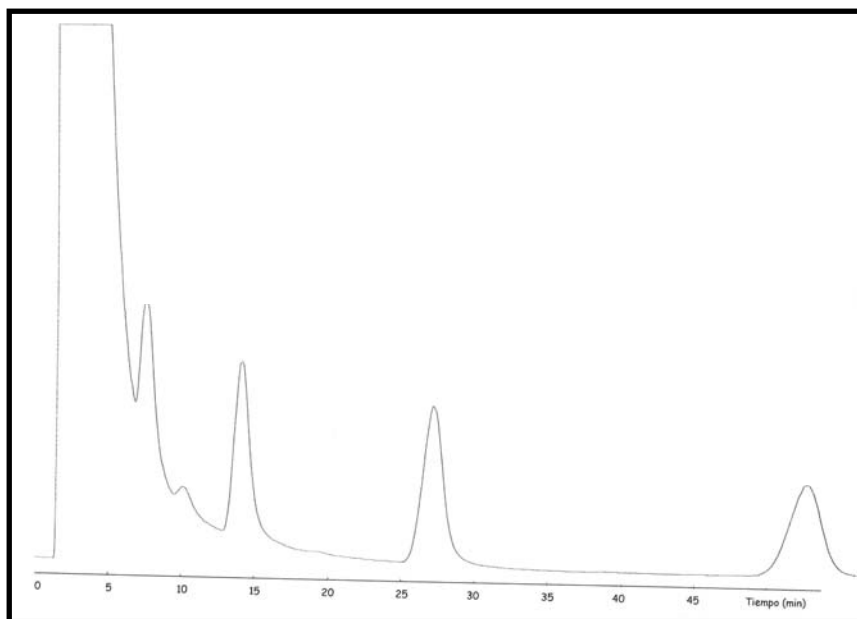


Figura 34: Cromatograma de la separación de los alcanos:  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{18}$  y  $C_{20}$  en la columna Diol. Condiciones: Presión: 85 bar; Temperatura: 80°C.

### Estudio de la Actividad Superficial

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, el uso de modificadores además de aumentar la fuerza solvente del  $CO_2$ , ayuda a reducir la actividad superficial de la columna ya que sus moléculas interaccionan con los puntos activos de las partículas del relleno y así se reduce su efecto sobre la separación. Sin embargo, en SFC con  $CO_2$  puro, juega un papel fundamental la desactivación de la columna y la correcta impregnación de las partículas, puesto que la ausencia de modificador pone de manifiesto un mayor riesgo de actividad superficial. En este sentido se hace necesario conocer el comportamiento de la columna en cuanto a las posibles interacciones no deseadas con los analitos que pueden ser de polaridad variada.

El estudio de la actividad superficial consiste en la separación de una mezcla de compuestos de diferente polaridad que, por lo tanto, tienen distintas



interacciones específicas y no específicas con las partículas del relleno de la columna. Para poder describir de forma cuantitativa las interacciones de los solutos con el relleno, se utiliza el factor de asimetría para cada compuesto (cuyo cálculo se ha descrito en el apartado 5.2.2 como medida de la actividad superficial de la columna). A modo de ejemplo, se presenta en la Figura 35 el cromatograma correspondiente a la separación del fluoranteno en la columna SE-54.

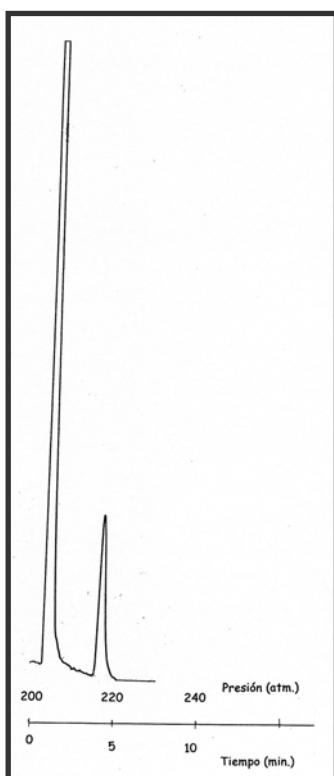


Figura 35: Cromatograma SFC del fluoranteno en la columna SE-54.

Condiciones: Rampa de presión de 200 a 260 bar.  
(4 bar/min) y 120°C.

Los resultados que se presentan en las Tablas 14 a 17 (una para cada columna), salvo que se indique lo contrario, se han obtenido en las condiciones siguientes: programación de presión de 120 a 280 bar (4 bar/min) y temperatura constante igual a 120°C.

Tabla 14: Actividad Superficial en la Columna SE-54.

Compuesto	Tiempo retención (min.)	Factor Asimetría <sup>①</sup>
Antraceno	12,37	1,8 (P)
Metilbenzoico	12,85	1,1 (P)
Fluoranteno	15,99	1,3 (P)
2,6-Dimetil-Anilina	16,62	1,7 (P)
Mentol	20,80	1,9 (P)
2,3-Butanodiol	--	--
Ácido Benzoico	--	--

<sup>①</sup> Se indica si la asimetría se da en la zona frontal del pico (F) o en la zona posterior del mismo (P).

Los datos de polaridad de esta columna revelan que, aunque la desactivación no se ha completado y no se consigue eluir el butanodiol y el ácido benzoico, la desactivación conseguida es buena ya que la asimetría del resto de picos es pequeña y sólo se observa una ligera desviación posterior, incluso en el mentol.

La Figura 36 muestra el cromatograma de la mezcla de polaridad obtenida con la columna rellena con partículas impregnadas con fase estacionaria SE-54 en las condiciones descritas anteriormente.

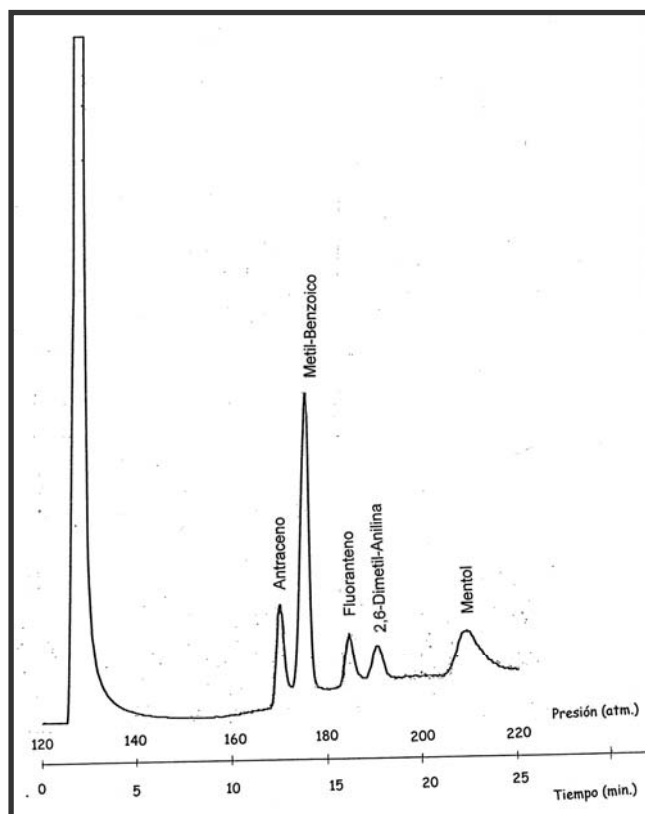


Figura 36: Cromatograma SFC de la mezcla de polaridad en la columna SE-54. Condiciones: Rampa de presión de 120 a 280 bar. (4 bar/min) y 120°C.

Tabla 15: Actividad Superficial en la Columna OV-17.

Compuesto	Tiempo retención (min.)	Factor Asimetría <sup>①</sup>
Metilbenzoico	17,35	1,2 (F)
2,6-Dimetil-Anilina	22,30	1,2 (P)
Mentol	27,56	2,4 (P)
2,3-Butanodiol <sup>②</sup>	21,23	1,4 (P)
Ácido Benzoico <sup>②</sup>	27,24	1,7 (F)
Antraceno	--	--
Fluoranteno	--	--

<sup>①</sup> Se indica si la asimetría se da en la zona frontal del pico (F) o en la zona posterior del mismo (P).

<sup>②</sup> Programación de presión 200 a 300 bar (4 bar./min.) y 120°C.

Para la columna rellena con partículas impregnadas con fase estacionaria OV-17, el compuesto que presenta una mayor asimetría es el mentol, en el que se observa un pico asimétrico en su parte posterior, es decir con "tailing". Aún así, puede decirse que la columna ha tenido una desactivación bastante completa, pues el resto de compuestos, incluyendo el ácido benzoico, eluyen con una forma bastante simétrica.

Tabla 16: Actividad Superficial en la Columna CW-20M.

Compuesto	Tiempo retención (min.)	Factor Asimetría <sup>①</sup>
Metilbenzoico	14,36	1,3 (F)
Antraceno	14,37	1,2 (P)
2,6-Dimetil-Anilina	18,76	1,3 (P)
Fluoranteno	18,80	1,5 (P)
Mentol	23,27	1,6 (P)
Ácido Benzoico	48,07	1,2 (P)
2,3-Butanodiol	50,67	1,2 (P)

<sup>①</sup> Se indica si la asimetría se da en la zona frontal del pico (F) o en la zona posterior del mismo (P). Los datos son la media de tres resultados.

Como ejemplo de la actividad superficial en la columna rellena con partículas impregnadas con fase estacionaria CW-20M, en la Figura 37 se presenta el cromatograma obtenido para el ácido benzoico.

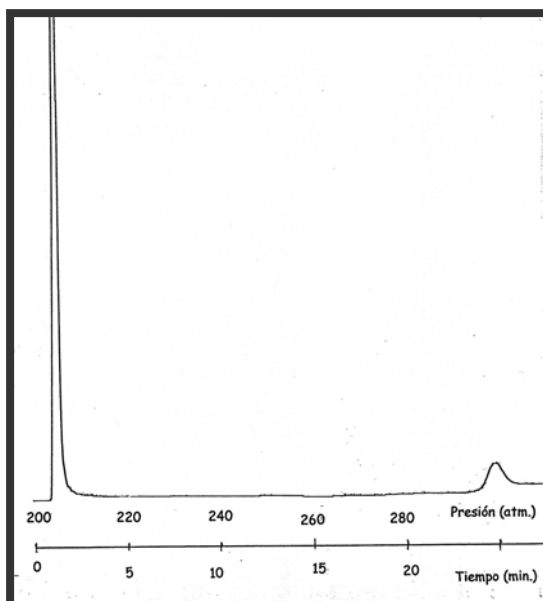


Figura 37: Cromatograma SFC del ácido benzoico en la columna CW-20M.  
Condiciones: Rampa de presión de 200 a 310 bar. (4 bar/min) y 120°C.

Los datos de actividad superficial de esta columna revelan que la desactivación ha sido completa, pues todos los compuestos de la mezcla eluyen con valores de factor de asimetría bastante bajos, incluso el ácido benzoico.

La separación de los cinco primeros compuestos de la mezcla anterior se muestra en la Figura 38.

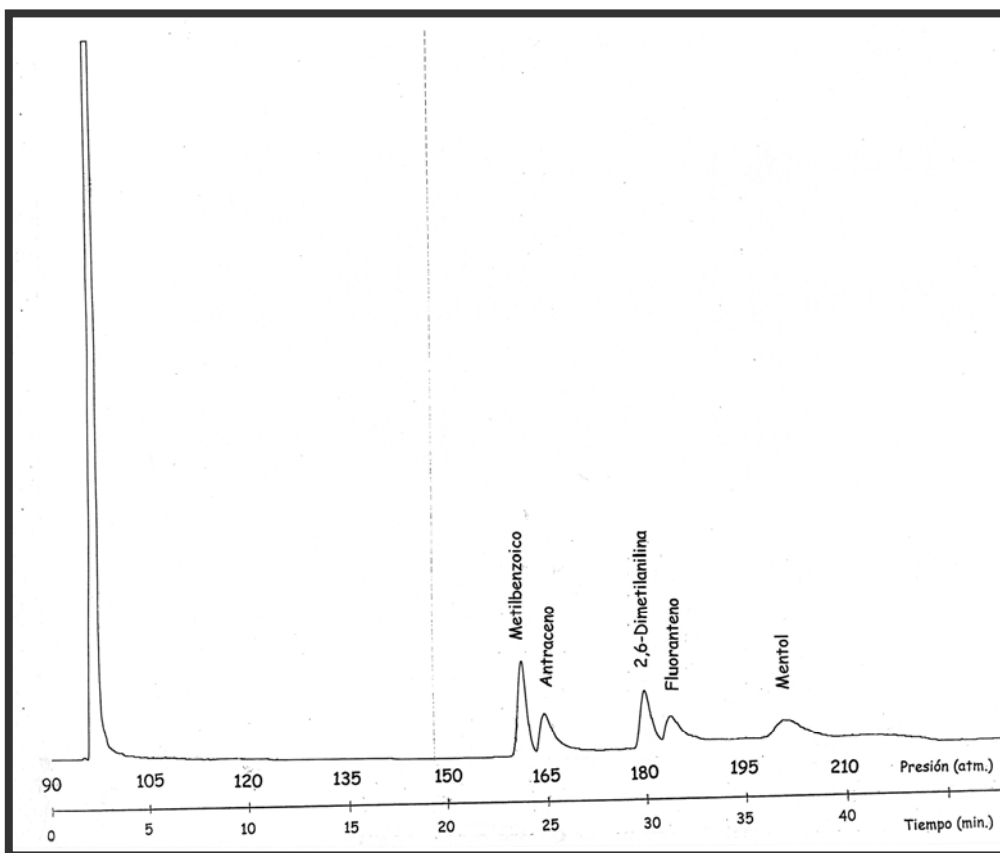


Figura 38: Cromatograma SFC de la mezcla de polaridad en la columna CW-20M. Condiciones: Rampa de presión de 90 a 210 bar. (3 bar/min) y 120°C.

Tabla 17: Actividad Superficial en la Columna Diol.

Compuesto	Tiempo retención (min.)	Factor Asimetría ①
Metilbenzoico	4,9	1,1 (F)
2,6-Dimetil-Anilina	7,6	1,1 (F)
Mentol	8,6	1,5 (P)
Antraceno	9,9	1,3 (P)
Fluoranteno	14,3	1,3 (P)
2,3-Butanodiol	23,3	1,1 (F)

① Se indica si la asimetría se da en la zona frontal del pico (F) o en la zona posterior del mismo (P). Los datos son la media de tres resultados.

Como ejemplo de la actividad superficial en columna diol se presenta en la Figura 39 el cromatograma obtenido para la separación de los distintos compuestos que se muestran en la Tabla 17.

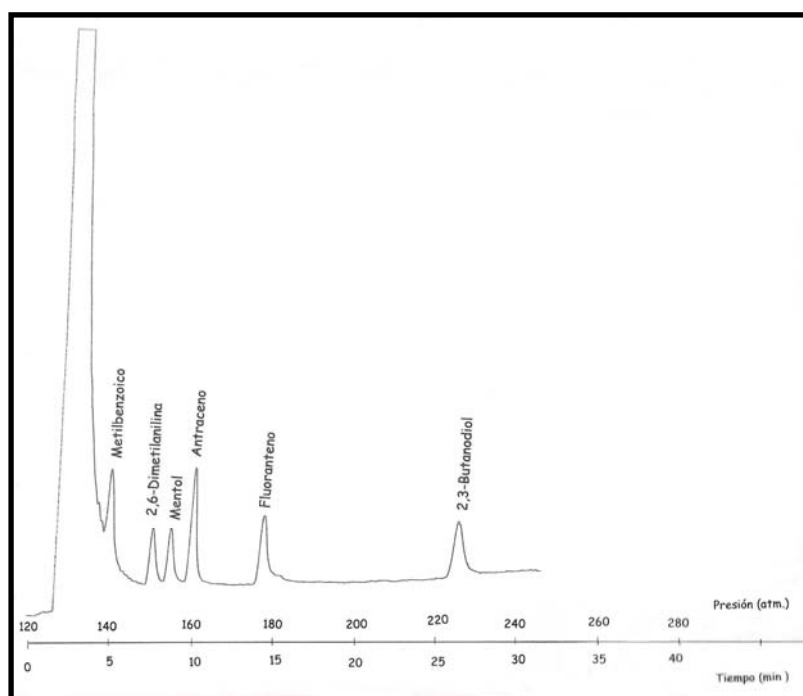


Figura 39: Cromatograma SFC del ácido benzoico en la columna Diol. Condiciones: Rampa de presión de 120 a 280 bar. (4 bar/min) y 120°C.

Los datos de actividad superficial de esta columna revelan que la desactivación no ha sido completa, pues no se consigue la elución del ácido benzoico, aunque para el resto de compuestos los valores de actividad superficial son bastante aceptables en todos los casos, con unos tiempos de retención bastante bajos.

## COMPARACIÓN DE COLUMNAS

El procedimiento descrito tanto para la impregnación de las partículas de sílice con fase estacionaria, como para el de llenado de las columnas proporcionan unas columnas con una eficacia suficiente y con una buena desactivación siendo ésta mayor o menor en función de la fase empleada. La columna que presenta una mayor eficacia es la que contiene las partículas impregnadas con la fase estacionaria CW-20M, hecho que puede explicarse por la ausencia de entrecruzamiento de la misma. Como ya se ha descrito previamente en otros trabajos realizados por el grupo de investigación, el entrecruzamiento de las partículas, por otro lado necesario al trabajar con SFC, reduce notablemente la eficacia de las columnas.

Otro aspecto importante que se ha podido evaluar ha sido el efecto de la velocidad lineal de la fase móvil en la eficacia de las columnas; de esta forma se han podido seleccionar los restrictores más adecuados para llevar a cabo las separaciones con muestras reales.

En cuanto a la actividad superficial, como era de esperar, varía en función de la fase estacionaria que se emplea en la impregnación aunque, en muchos casos, permite una correcta elución de los compuestos de la mezcla test que, como se ha comentado, incluye compuestos con interacciones específicas y no específicas. La columna CW-20M es en la que se ha conseguido una mayor desactivación,



permitiendo la elución de todos los compuestos de la mezcla test en un tiempo razonable y con valores de factor de asimetría relativamente bajos.

#### 6.1.4.2.) Columnas preparativas

Una vez seleccionadas las fases estacionarias más adecuadas para la separación y fraccionamiento de los compuestos de interés, se lleva a cabo el llenado de las columnas preparativas, según el método descrito en el apartado 6.1.3.2. Previamente, se realiza un cálculo del escalado en función de las dimensiones de las columnas analítica y preparativa utilizadas, según la siguiente ecuación (Ganetsos y Barker, 1993):

$$FE = \frac{r_{\text{prep}}^2}{r_{\text{anal}}^2} = \frac{(0,05)^2}{(6,5E-05)} = 591.716$$

donde FE es el factor de escalado y  $r_{\text{prep}}$  y  $r_{\text{anal}}$  los radios de las columnas preparativa y analítica respectivamente.

A partir del flujo utilizado en el estudio analítico:

$$F_{\text{anal}} = \frac{\pi (P_E - P_S) r^4}{8 L \eta} = 0,09 \mu\text{l}/\text{min}$$

donde  $P_E$  y  $P_S$  son respectivamente la presión externa e interna,  $r$  es el radio del tubo utilizado como restrictor,  $L$  es la longitud de la columna y  $\eta$  es la viscosidad (230E-07 Pa seg, en nuestro caso) se calcula, a través del factor de escalado, el flujo que debería usarse para la columna preparativa:

$$F_{\text{prep}} = 591.716 \times 0,09 \mu\text{l}/\text{min} = 53.254 \mu\text{l}/\text{min} = 53,3 \text{ ml}/\text{min}$$

### Estudio de la Eficacia

Por otro lado, antes de utilizar la columna preparada para la separación de muestras reales, se procede a la medida de eficacia inyectando, en las condiciones seleccionadas, 50  $\mu\text{l}$  de tolueno y detectando a 254 nm.

Para la columna SE-54 preparativa se obtuvo un valor máximo de 10.900 P/m (media de dos medidas) en las condiciones siguientes: presión, 90 bar y temperatura, 80°C (Figura 40).

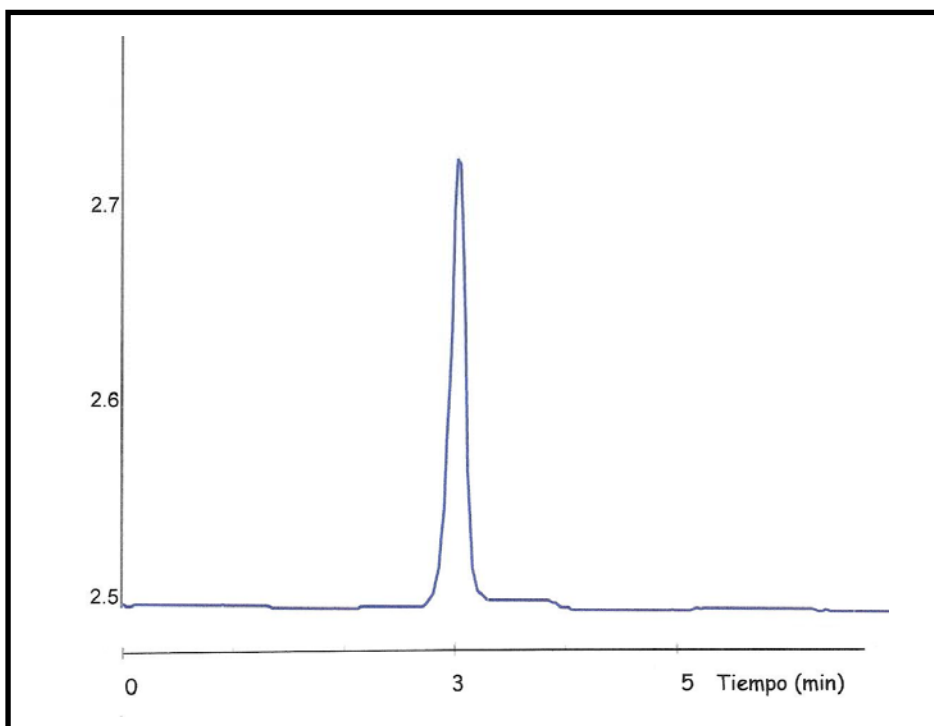


Figura 40: Cromatograma de la separación de tolueno en la columna SE-54 preparativa  
Condiciones: Presión: 90 bar; Temperatura: 80°C.

Para la columna CW-20M preparativa se obtuvo un valor máximo de 6.600 P/m (media de dos resultados) en las condiciones siguientes: presión, 80 bar y

temperatura, 80°C. Este valor es más bajo que para la columna SE-54, pero aceptable para llevar a cabo las separaciones de interés, como se verá en capítulos siguientes de la presente memoria.

En la Figura 41 se muestra el cromatograma de elución de tolueno, en las condiciones que se indican, para llevar a cabo el cálculo de eficacia en la columna CW-20M preparativa.

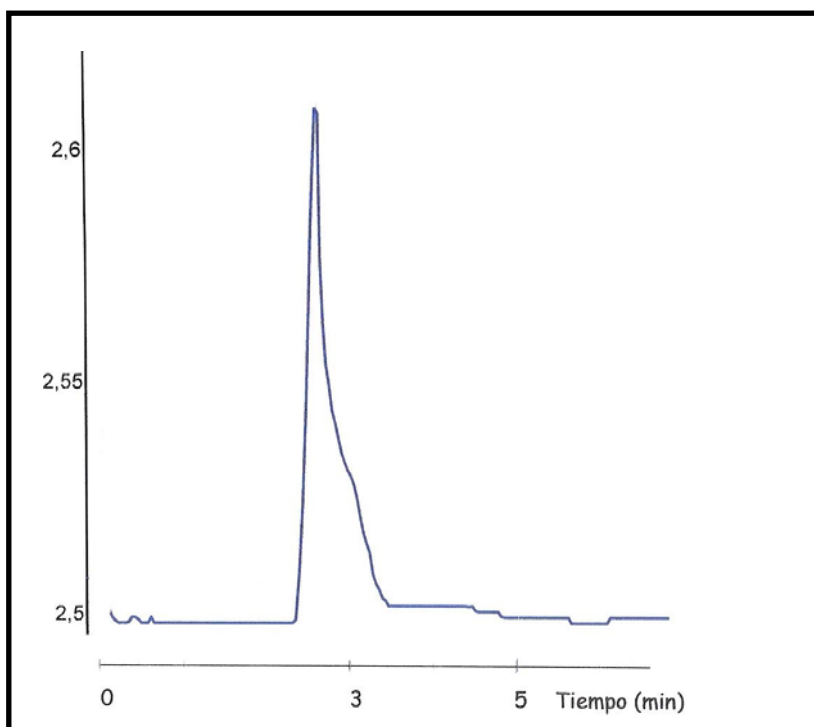


Figura 41: Cromatograma de la separación de tolueno en la columna CW-20M preparativa.

Condiciones: Presión: 80 bar; Temperatura: 80°C.

## 6.2.) AISLAMIENTO DE SUSTANCIAS NATURALES MEDIANTE SFC

### 6.2.1.) EXTRACTOS DE ACEITES VEGETALES

#### **6.2.1.1.) Separación de extractos de aceites vegetales a escala analítica: Antecedentes y elección de fase estacionaria.**

Como ya se ha comentado en el Capítulo correspondiente (4.2), los desodorizados de aceites vegetales son muestras complejas, compuestas principalmente por ácidos grasos libres y ésteres de ácidos grasos, además de otros compuestos que tienen gran interés debido a las propiedades funcionales que presentan.

Este trabajo de investigación se inició, por tanto, con el objetivo de conseguir la separación de muestras reales de aceites no comestibles mediante SFC, primero a escala analítica y posteriormente preparativa, ajustando la polaridad de la fase estacionaria y minimizando el uso de disolventes para conseguir el aislamiento de los compuestos funcionales de interés.

El punto de partida a escala analítica, teniendo como base el uso de  $CO_2$  puro y centrando la selectividad de la separación en el tipo de fase estacionaria, fueron los trabajos previos publicados por el grupo de investigación sobre el análisis de tocoferoles de aceite de oliva mediante fluidos supercríticos (Ibáñez y col., 1999 (b); Ibáñez y col., 2000 (b)). Estos trabajos constituyen una primera aproximación a la selección de la fase estacionaria y el porcentaje de recubrimiento adecuados en cuanto a la resolución y condiciones de separación para los isómeros de la vitamina E. De los resultados de estos trabajos se selecciona, como recubrimiento para las partículas de sílice, la fase de polaridad alta CW-20M al 3% para la separación y posterior recuperación de los distintos grupos de compuestos del aceite. De esta manera, se utiliza la columna capilar rellena (25 cm

x 500  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y rellenas con partículas de 10  $\mu\text{m}$ ) CW20M al 3% descrita en los apartados 6.1.2 y 6.1.3.1 del presente capítulo.

Una vez que la columna es apta para su uso en el fraccionamiento de muestras reales (tras el procedimiento de acondicionamiento y su caracterización en términos de eficacia y actividad superficial), se procede a la optimización de las condiciones de elución de una mezcla de patrones de aceites: isómeros de tocoferoles, escualeno, triglicéridos, ácidos grasos y esteroides.

Con respecto a la separación de los cuatro isómeros de los tocoferoles, se muestra la Tabla 18 con los resultados de tiempos de retención y resoluciones obtenidas a presión constante de 320 bar y temperatura de 60°C.

Tabla 18: Resumen de los datos de separación de los isómeros de los tocoferoles a 320 bar de presión y 60°C de temperatura.

PATRÓN	$t_R$ (min)
$\alpha$ -tocoferol	6,8
$\beta$ -tocoferol	10,4
$\gamma$ -tocoferol	11,7
$\delta$ -tocoferol	15,8

Como se puede observar, es posible la separación de los tocoferoles:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , en orden de polaridad creciente y de tiempo de retención, sin necesidad de modificador y controlando la polaridad de la fase estacionaria. Estos compuestos son muy parecidos en estructura química (ver Figura 42) y, por tanto, difíciles de separar por cromatografía. De hecho, sólo es posible separar los distintos isómeros en HPLC en fase normal (Manzi y col.,1996)

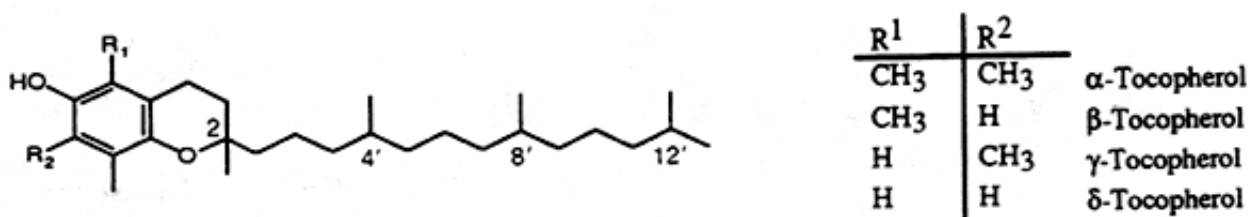


Figura 42: Estructuras químicas de los cuatro isómeros de los tocoferoles.

En la Figura 43 se presenta la separación de los isómeros de los tocoferoles mediante SFC con CO<sub>2</sub> puro y programación de presión en la fase móvil. Aunque con programación de presión no es posible separar los isómeros β y γ, considerando que el objetivo del presente estudio era el fraccionamiento de los distintos grupos de compuestos que forman parte de las muestras de aceite para su posterior aislamiento, se decidió emplear estas condiciones por su mayor rapidez y porque proporcionaban resoluciones aceptables del resto de los compuestos de la mezcla.

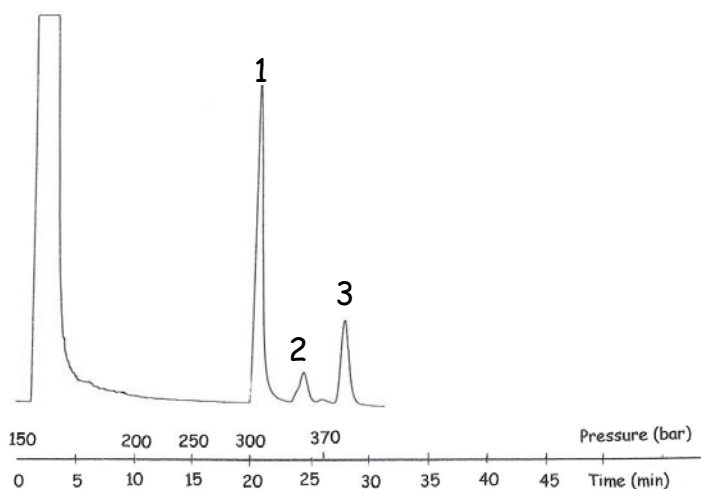


Figura 43: Cromatograma SFC de los isómeros de los tocoferoles.  
 Condiciones: Rampa de presión de 150 (5 min.) a 370 bar (10 bar/min) y 60°C.  
 Asignación de picos: 1: α-Tocoferol; 2: β y γ-Tocoferol; 3: δ-Tocoferol.

Así, la programación de presión permite la elución de los tocoferoles en tiempos más cortos produciéndose únicamente la pérdida de resolución para los isómeros  $\beta$  y  $\gamma$ -tocoferol, que se cuantificarán conjuntamente.

Una vez optimizadas las condiciones de separación de los isómeros de los tocoferoles, se estudia el comportamiento de distintos patrones de los grupos que están presentes en la muestra de aceites: escualeno, isómeros de tocoferoles, trioleína como patrón de triglicéridos, ácido palmítico como patrón de ácidos grasos, dioleína como patrón de diglicéridos y  $\beta$ -sitosterol como patrón de fitosteroles. En la Tabla 19 se muestran los resultados de tiempos de retención para cada uno de los patrones en las condiciones seleccionadas.

Tabla 19: Resumen de los datos de separación de los distintos patrones de aceites.  
Condiciones: Rampa de presión de 150 (5 min.) a 370 bar (10 bar/min) y 60°C.

PATRÓN	$t_R$ (min)
Escualeno	5,5
Trioleína	12,0
$\alpha$ -tocoferol	20,5
$\beta$ -tocoferol	24,0
$\gamma$ -tocoferol	24,5
Ácido Palmítico	25,9
Dioleína	26,1
$\delta$ -tocoferol	28,1
$\beta$ -Sitosterol	42,4

El método desarrollado permitió obtener los perfiles lipídicos de los extractos de desodorizados de semillas y de oliva, que se muestran en la Figura 44.

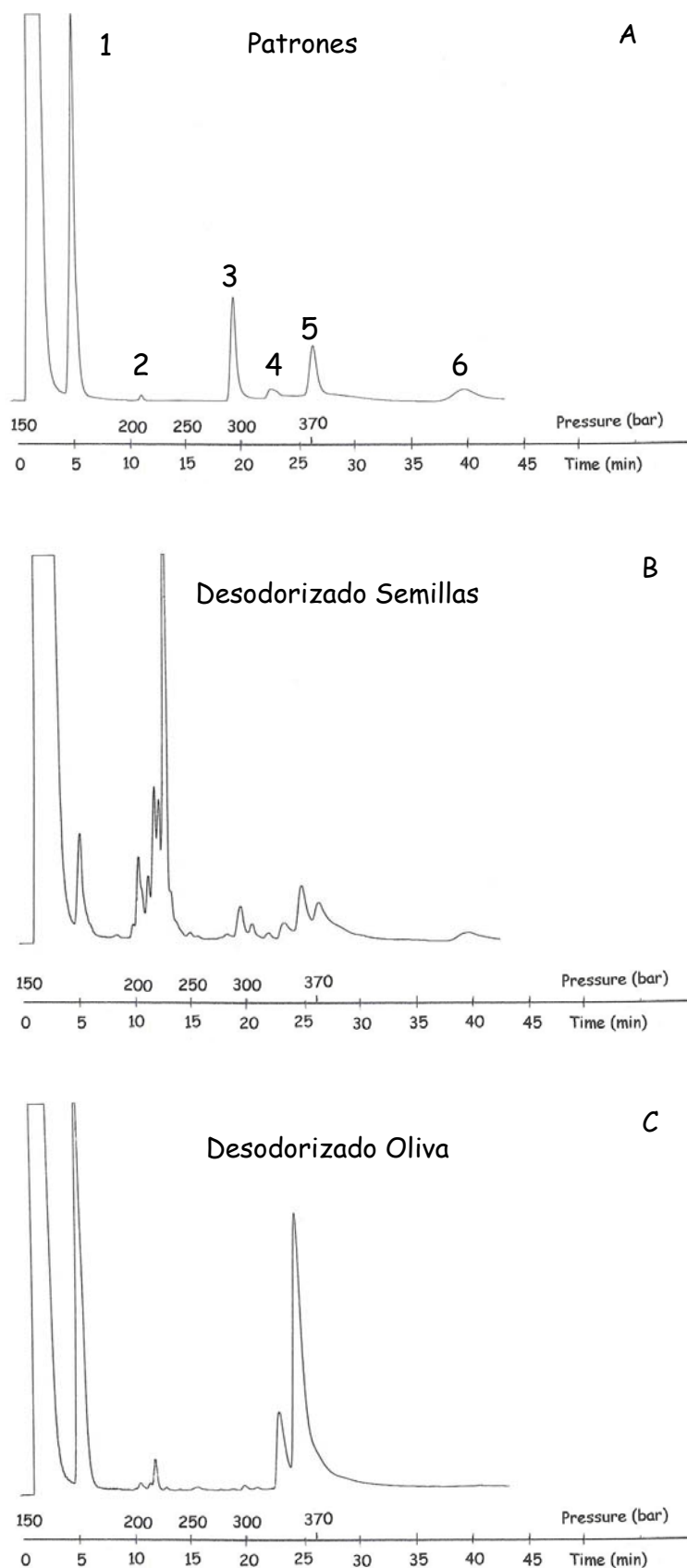


Figura 44: Cromatograma SFC de patrones y muestras de aceites. Condiciones: Rampa de presión de 150 (5 min.) a 370 bar (10 bar/min) y 60°C. Asignación de picos: 1: Escualeno; 2: Trioleína; 3:  $\alpha$ -Tocoferol; 4:  $\beta$  y  $\gamma$ -Tocoferol; 5:  $\delta$ -Tocoferol; 6:  $\beta$ -Sitosterol.



Comparando los tiempos de retención ( $t_R$ ) (Figura 44, A) de los patrones y las muestras, se consiguieron identificar los siguientes compuestos: escualeno, isoformas de tocoferol y  $\beta$ -sitosterol. Además, se identifican las zonas de elución de ácidos grasos (palmítico), diglicéridos (dioleína) y triglicéridos (trioleína).

En el desodorizado de semillas (Figura 44, B) se observa un menor contenido en escualeno, mayor número y cantidad de compuestos en la zona de elución de la trioleína, menor contenido en ácidos grasos y mayor contenido en tocoferoles y sitosterol que en el desodorizado de oliva (ver Figura 44, C).

El método de análisis por SFC permite, de una forma rápida, la separación e identificación de los principales y más interesantes compuestos de muestras de aceites empleando  $CO_2$  puro (en ausencia de modificadores) y una fase estacionaria de polaridad ajustada. Los análisis de los desodorizados de aceites de semillas y de oliva permiten obtener un perfil de su contenido lipídico y de la naturaleza y concentración de aquellos compuestos susceptibles de ser extraídos y/o enriquecidos a partir de los desodorizados.

A partir de los resultados anteriores se deduce que las columnas impregnadas con una fase estacionaria de polaridad elevada (CW-20M) al 3% son adecuadas para la separación de los compuestos de los aceites empleando  $CO_2$  puro. Es destacable la elevada eficacia y grado de desactivación de la columna seleccionada. Con esta columna se consigue, además, la completa separación de los isómeros de tocoferol en condiciones isocráticas y en ausencia de modificadores. Por tanto, se considera de interés el escalado del sistema para el estudio de las condiciones de separación y fraccionamiento que permita la recogida de fracciones enriquecidas en los compuestos de interés.

### 6.2.1.2.) Condiciones experimentales para el análisis de extractos a escala preparativa.

La columna preparativa de las dimensiones apropiadas se prepara siguiendo el esquema que se presenta en el apartado 6.1.3.2 de esta memoria. Una vez preparada la columna, se acondiciona y evalúa su eficacia utilizando una planta de PS-SFC (Thar Designs) como la que se describe en el apartado 5.4.2.1.

En un primer momento se lleva a cabo la selección de las condiciones que permitan la separación de los distintos componentes del aceite en el sistema preparativo. Para ello se emplean patrones y se eligen como grados de libertad del proceso (variables a optimizar) la presión y temperatura de la columna, el modificador y el porcentaje de éste sobre el flujo total. Aunque a escala analítica se demostró la capacidad de las columnas y del sistema para la completa elución y separación de los compuestos de interés empleando CO<sub>2</sub> puro, no fue posible trabajar sin modificadores en la planta piloto de PS-SFC debido a limitaciones del equipo. Los límites de cada una de las variables que intervienen en el proceso se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20: Resumen de los valores de las variables optimizadas en el proceso de separación de patrones de aceites a nivel preparativo.

Variable	Valor Mínimo	Valor Máximo
Presión (bar)	120	175
Temperatura (° C)	40	60
Modificador	Hexano:Etanol (55:45)	Etanol (100%)
Porcentaje Modificador	1%	8%

Los valores de las condiciones del proceso se evalúan en función de la respuesta seleccionada que, en este caso, es la resolución entre los picos de los

patrones que permita el fraccionamiento de las muestras reales de aceites vegetales y, por tanto, el aislamiento de los compuestos de interés.

Los patrones seleccionados como modelos de la muestra de aceites vegetales fueron: escualeno,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  tocoferol, ácido oleico como patrón de ácidos grasos, éster de oleil oleico como patrón de éster de ácido graso, trioleína como patrón de triglicéridos y  $\beta$ -sitosterol, como patrón de fitosteroles.

El efecto de la presión se estudió a los siguientes niveles: 120, 140, 150 y 175 bar. Los resultados indicaron que la presión más baja era la que proporcionaba mejores resoluciones, puesto que aumentaba la retención de los compuestos y permitía una mejor separación. Un aumento de temperatura también producía un aumento de retención, por disminución de la densidad de la fase móvil, aunque no de forma crítica para el intervalo seleccionado, lo que se comprobó con los ensayos a 40 y 60°C.

Por otro lado se seleccionaron dos tipos de modificadores, para que al añadirse en baja concentración al  $\text{CO}_2$  éste fuera capaz de eluir todos los compuestos de la muestra. Por un lado, se seleccionó un modificador poco polar mezcla de hexano (55) y etanol (45) y otro más polar formado únicamente por etanol. Debido a las implicaciones negativas que tiene el uso de disolventes orgánicos tipo hidrocarburo (hexano), se decidió rechazar el primer modificador puesto que los resultados que proporcionó en cuanto al fraccionamiento de los distintos compuestos no era lo suficientemente bueno comparado con los resultados que se obtuvieron con etanol como modificador (que es un disolvente aceptado para muestras alimentarias).

Por tanto, se seleccionaron las condiciones de 120 bar de presión y etanol como modificador, en el caso de que fuera necesario aumentar el poder solvente

del  $CO_2$ , para permitir la óptima separación de los distintos grupos de compuestos de la muestra en un tiempo razonable.

En la Tabla 21 se presentan los tiempos de retención de los patrones, eluidos empleando el mínimo porcentaje de modificador que se plantea usar, en caso de ser necesario.

Tabla 21: Resumen de los datos de separación de los distintos patrones de aceites. Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 40°C y 1% de Etanol.

PATRÓN	$t_R$ (min)
Escualeno	4,4
Éster de oleil-oleico	6,2
Ácido Oleico	10,0
$\alpha$ -tocoferol	14,5
Trioleína	16,0
$\delta$ -tocoferol	30,2
$\beta$ -Sitosterol	40,1

En la Figura 45 se muestra la separación de una muestra de desodorizado de soja empleando un 5% de etanol como modificador, 120 bar de presión y 60°C de temperatura en la fase móvil. En la Tabla 22 se presentan los  $t_R$  de los patrones de aceites en las mismas condiciones empleadas para la separación de los desodorizados, es decir, empleando un 5% de etanol como modificador.

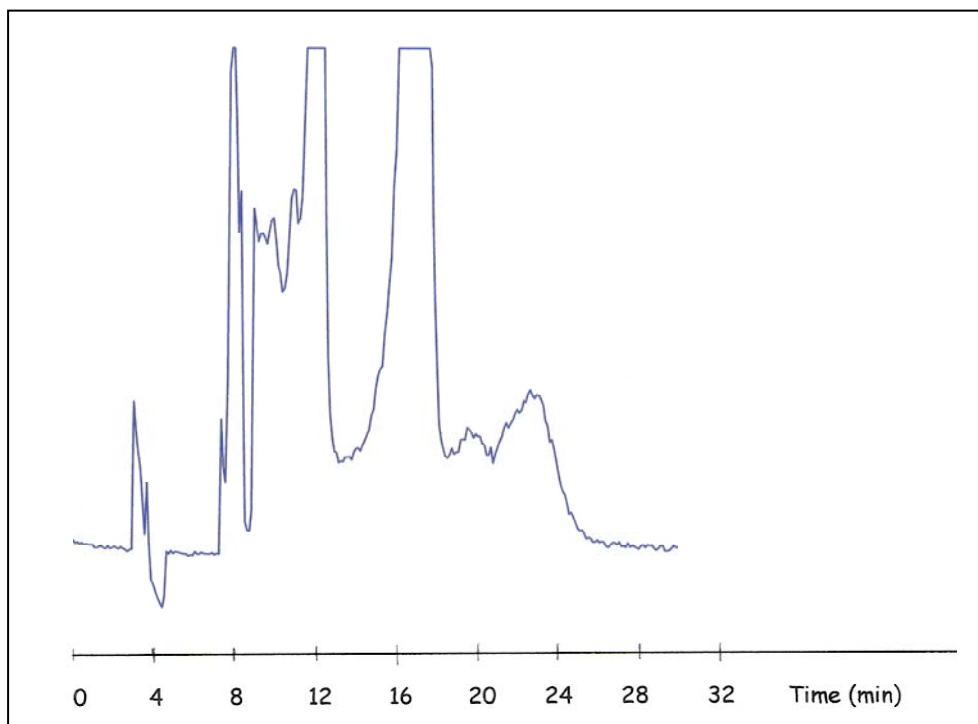


Figura 45: Cromatograma SFC del desodorizado de aceite de soja.  
Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 60°C y 5% de Etanol.

Tabla 22: Resumen de los datos de separación de los distintos patrones de aceites. Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 60°C y 5% de Etanol.

PATRÓN	$t_R$ (min)
Escualeno	6,6
Ácido Oleico	8,4
$\beta$ -tocoferol	15,1
$\delta$ -tocoferol	16,1
Trioleína	23,3
$\beta$ -Sitosterol	24,5

Los resultados de la separación de patrones en distintas condiciones con ciertas variables de operación fijas a nivel de planta preparativa sirven para el estudio del proceso, aunque no de forma definitiva puesto que muchos de estos patrones se toman como modelo del grupo de compuestos que representan (por

ejemplo, la trioleína como patrón de triglicéridos). Esto no quiere decir que todos estos compuestos eluyan con el mismo tiempo de retención, aunque se asume que el hecho de presentar una estructura química parecida les condiciona a tener el mismo patrón de retención (esto se aproxima menos en el caso de los triglicéridos, donde la cadena de la cada uno de los ácidos grasos que componen la molécula condiciona la polaridad final).

#### **6.2.1.3.) Aislamiento e identificación de compuestos funcionales a partir de aceites vegetales mediante PS-SFC.**

Una vez estudiadas las mejores combinaciones de fase estacionaria y fase móvil para la separación de patrones representativos de las mezclas de aceites, se procedió al aislamiento de los compuestos de interés a partir de muestras reales de desodorizados de aceite de soja. Como ya se comentó en el apartado 4.2 sobre muestras alimentarias de aceites vegetales, los desodorizados del aceite de soja contienen compuestos de alto interés para la industria de los alimentos funcionales puesto que de ellos pueden obtenerse fracciones ricas en escualeno, tocoferoles, o distintos sitosteroles, todos ellos compuestos sobre los que existe un gran interés en la actualidad debido a sus demostrados efectos positivos sobre la salud (ver apartado 4.2.2).

En colaboración con el Departamento de Química-Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, se llevó a cabo el aislamiento de compuestos funcionales a partir de aceites vegetales empleando el equipo semipreparativo descrito en el apartado 5.4.2.2 de la presente memoria. Este equipo, a diferencia del empleado en la separación de mezclas de patrones, posee una mayor versatilidad en la recogida de las fracciones permitiendo, en algún caso, la separación empleando  $\text{CO}_2$  puro.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para tres tipos de recogida en tres condiciones distintas. En la primera de ellas se reproducen las condiciones de rampa de presión en ausencia de modificador que, a nivel analítico, conseguían la separación de los distintos grupos de compuestos del desodorizado del aceite de partida. Para el caso de la separación y fraccionamiento de un desodorizado de aceite de soja en el equipo semipreparativo, se realiza la separación con  $CO_2$  puro y se recogen posteriormente cada una de las fracciones en etanol, gracias a la bomba conectada tras el restrictor de la columna (para una mayor descripción del equipo ver el apartado 5.4.2.2). De esta manera es posible el aislamiento de trece fracciones, tres de las cuales (5, 6 y 7) se obtienen en muy baja concentración y, por tanto, no es posible cuantificar. Una vez obtenidas, las fracciones se caracterizan mediante HPLC, tal y como se describe en el apartado 5.4.3.2 de Materiales y Métodos. Los resultados correspondientes a la separación en el equipo semipreparativo, así como las fracciones aisladas se muestran en la Figura 46.

El análisis de los resultados de la caracterización mediante HPLC de cada una de las fracciones, así como del desodorizado de soja empleado en la separación, se resume en la Tabla 23, como porcentajes de área frente al área total.

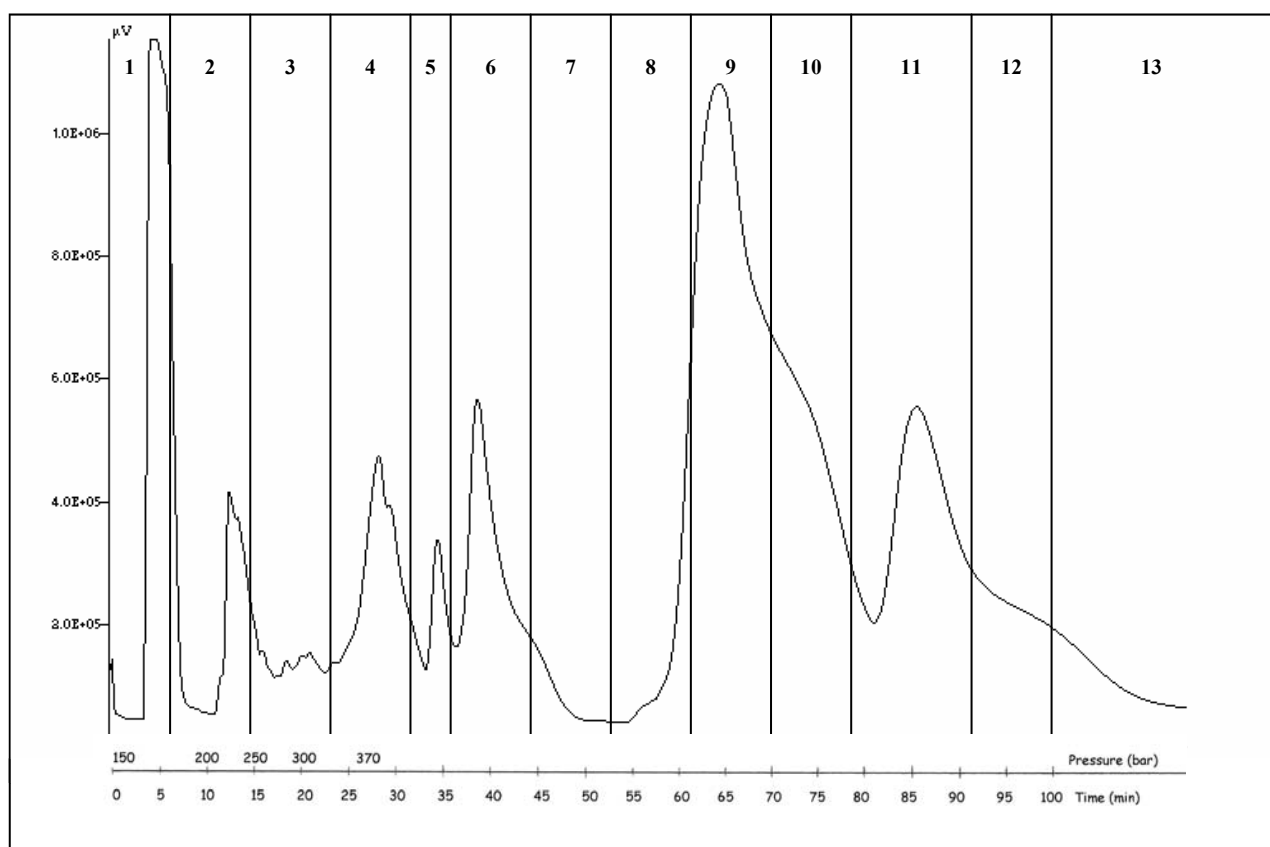


Figura 46: Cromatograma SFC del desodorizado de aceite de soja.  
 Condiciones: Rampa de presión de 150 (5 min.) a 370 bar (10 bar/min) y 40°C.

Tabla 23: Caracterización de las fracciones (%Área frente al Área total) de la separación del desodorizado de aceite de soja. Condiciones: Rampa de presión de 150 (5 min.) a 370 bar (10 bar/min) y 40°C.  
 Abreviaturas: AG ME/EE: Ácidos grasos metil o étil ésteres, TG: Triglicéridos, AG: Ácidos grasos, DG:

	Soja	F1	F2	F3	F4	F8	F9	F10	F11	F12	F13
ESCUALENO	4,73	97,34	2,32	0,24	0,01	0,32	0,02	0,61	0,28	0,90	2,31
ESTEROL ESTERES	16,77	0,42	53,92	94,62	96,46	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00
AG ME/EE	2,09	0,04	40,50	2,23	1,09	0,00	0,03	0,85	0,00	0,00	0,00
α-TOCOFEROL	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TG	2,85	0,14	0,00	1,79	0,66	0,00	0,13	0,97	4,19	13,74	29,26
γ-TOCOFEROL	4,05	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	24,26	12,94	1,68	0,45	1,23
AG	56,44	1,78	3,25	1,12	1,75	91,73	72,70	77,46	55,72	34,85	47,30
δ-TOCOFEROL	3,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	28,88	37,53	10,53
ESTEROLES	8,05	0,13	0,00	0,00	0,04	7,95	2,73	6,89	9,24	12,52	9,36
1,3-DG	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,2-DG	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1-MG	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



De los datos obtenidos y en relación al aislamiento de compuestos funcionales de interés, se puede destacar el aislamiento con una pureza superior al 90% de escualeno (97,3%) en la primera fracción (F1) y de ésteres de esteroles (94,6% y 96,5%) en las fracciones tres y cuatro (F3 y F4). Además se obtiene una fracción (F9) con casi un 25% de  $\gamma$ -tocoferol y otra fracción (F12) con casi un 40% de  $\delta$ -tocoferol junto con más de un 12% de esteroides. A pesar de estas purezas, de gran interés comparadas con las de los compuestos en la muestra original, también es destacable el hecho de que los ácidos grasos libres (AG) eluyan con dificultad cuando se utiliza  $\text{CO}_2$  puro como fase móvil. En este caso, los ácidos grasos de la muestra del desodorizado de partida están presentes de manera importante desde la fracción 8 (91,7%) a la fracción 13, no permitiendo una mejor purificación de los tocoferoles ni de los esteroides.

Es destacable también la similitud de resultados obtenidos para la separación analítica y semipreparativa con  $\text{CO}_2$  puro en ausencia de modificadores en cuanto al perfil de elución de los grupos de compuestos. Hay que tener en cuenta que en la separación analítica se utilizan ácido palmítico y tripalmitina como patrones de ácidos grasos y triglicéridos respectivamente, mientras que en el caso de la purificación del desodorizado de aceite de soja, la muestra es real, y por tanto, las zonas de elución pueden no ser únicas, en función de la polaridad del compuesto en cuestión. Como era de esperar, el escalado del proceso hace que, por un lado, el tiempo total necesario para eluir la muestra aumente (de unos 45 minutos a más de 100) y, por otro, que los compuestos sufran cierta saturación y la resolución entre los picos disminuya (puesto que la concentración de la muestra de partida se aumenta).

Aunque, como se puede deducir de los resultados mostrados anteriormente, las purezas conseguidas son elevadas, se lleva a cabo a continuación un estudio de la separación incluyendo una mínima cantidad de modificador en la fase móvil para

evaluar su efecto en la mejora del porcentaje de recuperación de los compuestos de interés.

Se muestran, en la Figura 47, los resultados correspondientes a la separación del desodorizado de aceite de soja a 60°C con un 4% de etanol ( con un flujo total de 4 ml/min). Como se puede observar, el tiempo total de análisis disminuye con la adición de un 4% de etanol en la fase móvil, a pesar de que el aumento de temperatura (de 40 a 60°C ) produce una mayor retención de los compuestos.

De nuevo, con la separación de la muestra, se realiza el fraccionamiento de los picos del cromatograma en 9 fracciones distintas, procediendo a la caracterización de cada una de ellas mediante HPLC.

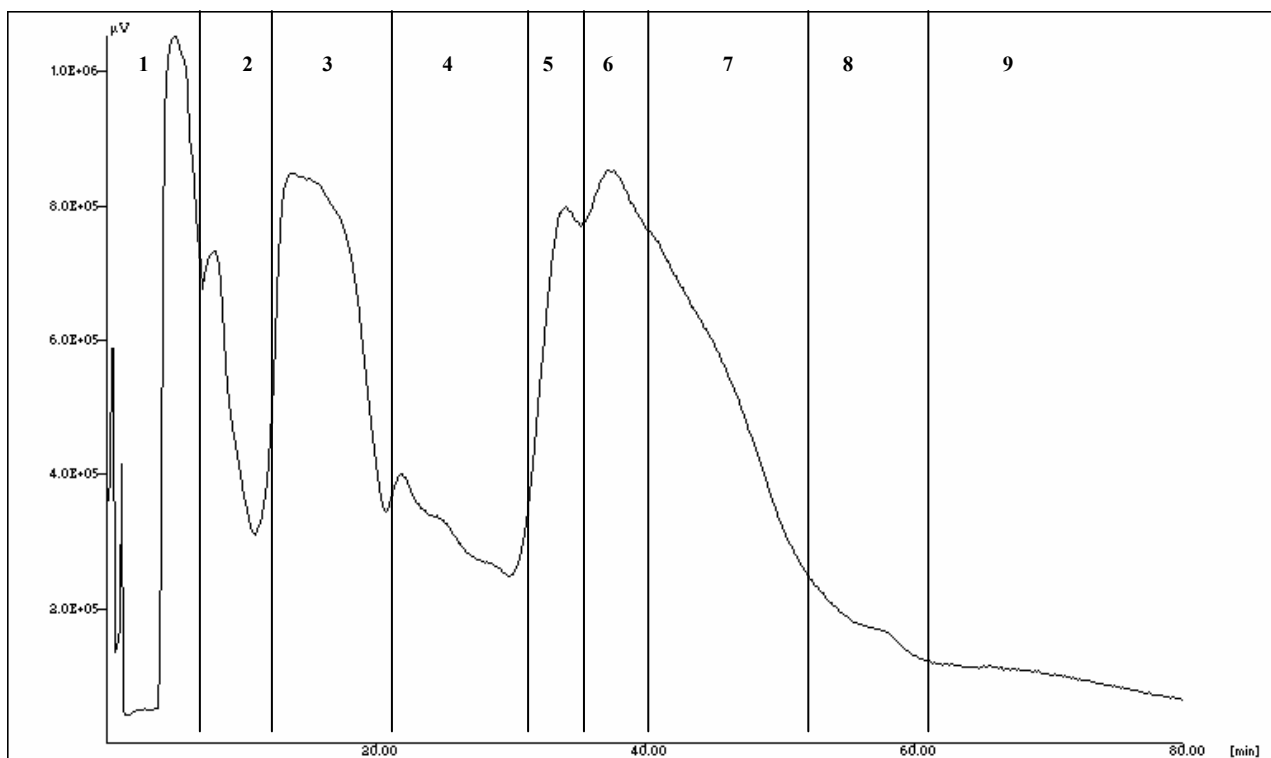


Figura 47: Cromatograma SFC del desodorizado de aceite de soja.  
Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 60°C y 4% de Etanol.

En la Tabla 24 se muestran los resultados de la caracterización química de cada una de las fracciones:

Tabla 24: Caracterización de las fracciones (%Área frente al Área total) de la separación del desodorizado de aceite. Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 60°C y 4% de Etanol. Abreviaturas: AG ME/EE: Ácidos grasos metil o étil ésteres, TG: Triglicéridos, AG: Ácidos grasos, DG: Diglicéridos.

	Soja	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
ESCUALENO	4,73	48,58	36,10	0,00	0,15	0,30	0,11	0,16	0,17	0,21
ESTEROL ESTERES	16,77	46,48	56,06	4,31	53,98	7,87	0,64	0,00	0,14	0,00
AG ME/EE	2,09	1,89	2,51	0,09	1,39	0,71	0,22	0,00	0,00	0,00
$\alpha$ -TOCOFEROL	0,27	0,00	0,00	0,00	21,01	1,95	0,00	0,00	0,00	0,00
TG	2,85	2,47	2,43	0,56	15,52	7,43	3,41	2,15	0,26	0,17
$\gamma$ -TOCOFEROL	4,05	0,00	0,00	0,00	0,46	80,71	77,52	41,32	0,00	0,00
AG	56,44	0,59	2,90	95,04	5,82	0,00	17,88	0,00	0,00	0,35
$\delta$ -TOCOFEROL	3,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	29,44	0,25	0,00
ESTEROLES	8,05	0,00	0,00	0,00	1,31	0,00	0,00	20,19	91,81	82,85
1,3-DG	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,73	5,80	10,05
1,2-DG	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,58	5,87
1-MG	0,18	0,00	0,00	0,00	0,36	0,21	0,00	0,00	0,00	0,51

En este caso se obtienen dos fracciones (F1 y F2) enriquecidas en escualeno y ésteres de esteroles en más de un 90% (95 y 92% respectivamente). Con respecto a los tocoferoles, se obtienen purzas del 21% para el  $\alpha$ -tocoferol (lo que supone un enriquecimiento de 78 veces, desde un 0,3% inicial), un 80,7% para el  $\gamma$ -tocoferol (lo que supone un enriquecimiento de 20 veces, desde un 4,1% inicial) y un 29,4% para el  $\delta$ -tocoferol (lo que supone un enriquecimiento de casi 9 veces, desde un 3,4% inicial). Además, se obtienen las dos últimas fracciones con un elevada pureza en esteroides: la F8 con un 91,8% (lo que supone un enriquecimiento de más de 11 veces) y la F9 con un 82,9%.

En este caso, y en comparación con la separación en ausencia de modificador, los ácidos grasos libres se obtienen en su gran mayoría en las

fracciones 3, 4 y 6, por lo que es posible obtener purezas en tocoferoles y esteroides mayores que para el caso de la separación con CO<sub>2</sub> puro. Por lo tanto es posible, con una pequeña adición de un modificador admitido por la legislación alimentaria como es el etanol, separar con mayor resolución los grupos de compuestos principales que contiene la muestra de desodorizado de aceites para recuperar con una alta pureza aquellos compuestos funcionales de interés.

Por último, se realiza otra separación y fraccionamiento con el mismo porcentaje de modificador pero a una temperatura más baja, que permitirá la menor retención de los compuestos y, por tanto, una disminución del tiempo total de análisis, variable importante en la optimización de los procesos industriales. Es importante tener en cuenta además que una gran parte de estos compuestos son termolábiles, por lo que purificarlos y procesarlos con una temperatura más baja puede resultar beneficioso para incrementar su vida útil y mantener intactas sus propiedades.

En la Figura 48 se muestran los resultados correspondientes a la separación del desodorizado de aceite de soja a 40°C y con 4% de etanol (con un flujo total de 4 ml/min). Como se puede observar, el tiempo total de análisis disminuye aún más que en los dos casos anteriores siendo, en este caso, inferior a 60 minutos.

De manera similar, la separación del desodorizado de aceite en estas condiciones se divide en distintas fracciones según los picos mayoritarios del cromatograma, tal como muestra la Figura 48. Cada una de las 6 fracciones se caracteriza posteriormente mediante HPLC. Los resultados comparativos de cada una de las fracciones y del desodorizado de aceite de partida se muestran en la Tabla 25.

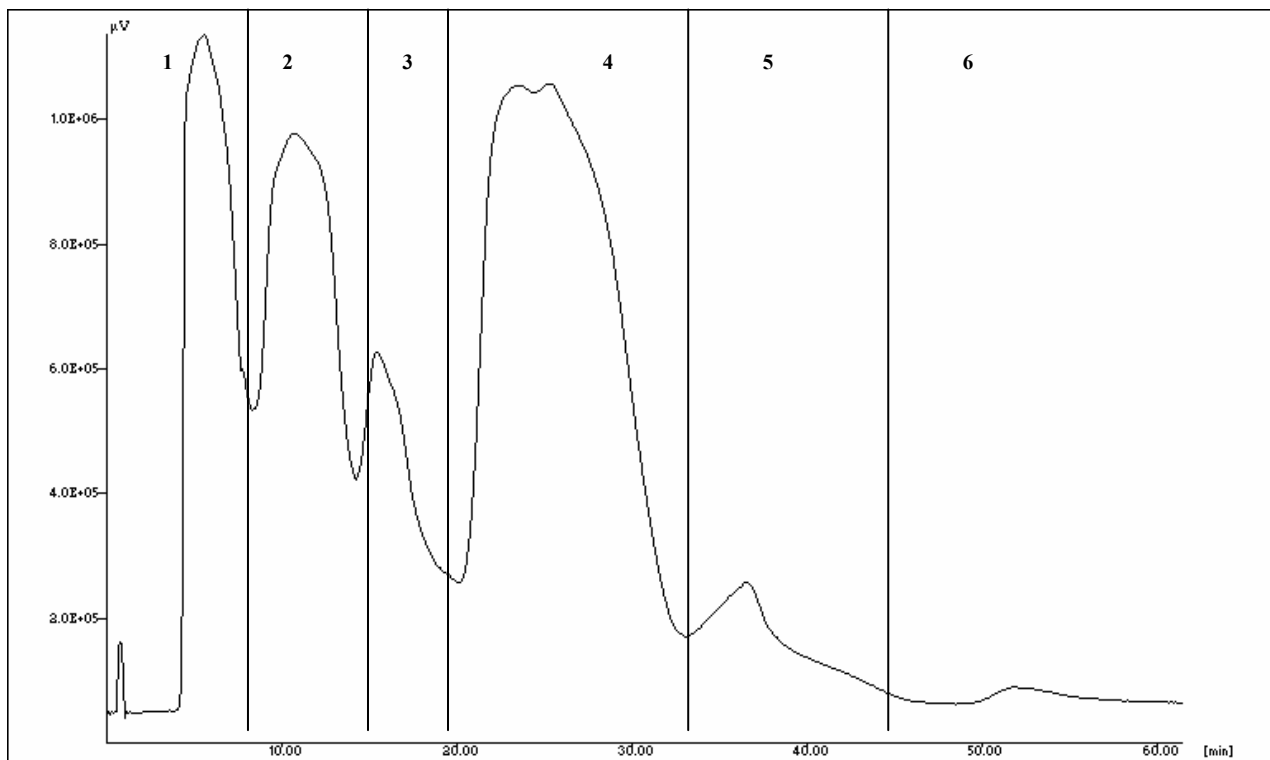


Figura 48: Cromatograma SFC del desodorizado de aceite de soja.  
 Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 40°C y 4% de Etanol.

Tabla 25: Caracterización de las fracciones (%Área frente al Área total) de la separación del desodorizado de aceite. Condiciones: . Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 40°C y 4% de Etanol.  
 Abreviaturas: AG ME/EE: Ácidos grasos metil o étil ésteres, TG: Triglicéridos, AG: Ácidos grasos, DG: Diglicéridos.

	Soja	F1	F2	F3	F4	F5
ESCUALENO	4,73	0,07	22,53	0,00	0,16	0,63
ESTEROL ESTERES	16,77	3,66	47,62	0,00	0,08	0,00
AG ME/EE	2,09	0,23	2,44	1,58	0,13	0,00
α-TOCOFEROL	0,27	0,00	0,00	19,63	0,00	0,00
TG	2,85	0,75	9,16	2,27	0,39	0,00
γ-TOCOFEROL	4,05	0,00	0,00	56,52	49,69	0,00
AG	56,44	95,18	18,17	0,00	0,13	0,00
δ-TOCOFEROL	3,40	0,00	0,00	2,46	20,56	0,00
ESTEROLES	8,05	0,12	0,06	0,00	21,71	99,37
1,3-DG	0,77	0,00	0,00	17,54	4,12	0,00
1,2-DG	0,40	0,00	0,00	0,00	2,95	0,00
1-MG	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Como era de esperar, el descenso de temperatura frente a las condiciones anteriores produce una menor retención de todos los compuestos disminuyendo, como ya se ha comentado anteriormente, el tiempo total de análisis. La disminución más apreciable en el tiempo de retención se produce para los ácidos grasos libres (AG), que en estas condiciones se recogen principalmente en la F1 y, en todo caso, eluyen antes de los 17 minutos (como ya se comentó para el caso de la recogida en ausencia de modificador, los ácidos grasos libres continuaban eluyendo a más de 100 minutos, incluso a presiones superiores a 300 bar).

La purificación de los ésteres de esteroles y del escualeno en la fracción F2 se consigue, en este caso, en más de un 70% , coeluyendo con los ácidos grasos libres de más polaridad y con los triglicéridos). Los factores de enriquecimiento de los tocoferoles, en este caso, varían desde 72 para el  $\alpha$ -tocoferol y 14 para el  $\gamma$ -tocoferol (ambos en la F3, representando un 75% de la muestra total) a 6 para el  $\delta$ -tocoferol (en la F4, donde también se encuentra el  $\gamma$ -tocoferol, siendo más del 70% el contenido en tocoferoles totales). Además de la alta pureza de las fracciones 3 y 4 en los distintos isómeros de los tocoferoles, la última fracción recogida (F5) es prácticamente pura en esteroides (99,4%), lo que es de gran importancia para la industria alimentaria, donde existe una gran demanda de estos compuestos necesariamente en alta pureza para poder ser añadidos a los alimentos enriquecidos.

Una vez optimizado el proceso de separación y fraccionamiento de desodorizados de aceites vegetales mediante cromatografía de fluidos supercríticos, en columnas con polaridad ajustada, para la obtención de distintos compuestos funcionales, son destacables las elevadas puridades obtenidas para los compuestos de interés, el corto tiempo de análisis (considerando la complejidad de la muestra) y el bajo porcentaje de etanol empleado en la fase móvil.

## 6.2.2.) EXTRACTOS DE ROMERO

### **6.2.2.1.) Estudio de la solubilidad del ácido carnósico en $CO_2$ y $CO_2$ con modificador. Estudio teórico y modelado experimental.**

Como ya se ha comentado, trabajar con compuestos polares en SFC con  $CO_2$  puro, sin la ayuda de modificadores, conlleva ciertas dificultades derivadas de su escasa elución en columnas convencionales (Schoenmakers y Uunk, 1987). Por esta limitación, y contando con la posibilidad del ajuste de la polaridad de la fase estacionaria, se consideró interesante el estudio de la solubilidad del ácido carnósico (tomado como compuesto modelo de la muestra) como paso previo para la selección de las condiciones cromatográficas apropiadas, en cuanto a la densidad del  $CO_2$ , para conseguir la elución y el fraccionamiento fino de los extractos de romero obtenidos mediante SFE.

El estudio de la solubilidad correspondiente al ácido carnósico en  $CO_2$  supercrítico se ha realizado mediante una primera aproximación teórica a través del método de la contribución de grupos (Fedors, 1974) y, en segundo lugar, mediante un estudio experimental y de modelado termodinámico empleando la ecuación de estado asociada a la contribución de grupos (GCA-EoS). Este último se basó en resultados previos obtenidos por Cháfer y col., 2005, a partir de la estructura química del ácido carnósico que se presenta en la Figura 49.

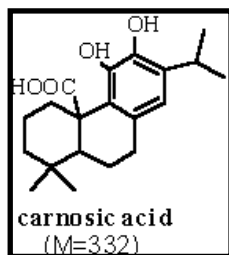


Figura 49: Estructura química del ácido carnósico

De esta manera, y considerando que la máxima solubilidad de un compuesto en un disolvente se obtiene cuando sus parámetros de solubilidad se igualan, se calcula la densidad (condiciones de presión y temperatura) del  $CO_2$  necesaria para eluir el ácido carnósico y conseguir el fraccionamiento de los extractos de romero.

***Estudio teórico a partir del Método de contribución de grupos de Fedors***

La solubilidad teórica del ácido carnósico se calcula, como en otros estudios previos (Ibáñez y col., 1998 y Favati y col., 1988), a partir del método de contribución de grupos según Fedors y col. (1974). De esta manera, el parámetro de solubilidad del ácido carnósico es el resultante de la suma de los grupos que contiene la molécula, calculados utilizando la expresión:

$$\delta = \left[ \frac{\Delta E_v}{V} \right]^{1/2}$$

donde  $\delta$  es el parámetro de solubilidad,  $\Delta E_v$  es la energía de vaporización a una temperatura dada y  $V$  es el volumen molar, que se calcula a partir de los pesos moleculares y las densidades correspondientes. En este método, los parámetros correspondientes a la energía de vaporización y el volumen molar se calculan como la suma de las contribuciones individuales de cada grupo de los que forman la molécula, a través de las expresiones:

$$\Delta E_v = \sum \Delta e_i$$

$$V = \sum v_i$$

Los valores que se asignan a cada uno de los grupos funcionales de la molécula del ácido carnósico (ver Figura 49) se indican en la Tabla 26, donde se



muestra el tipo y número de grupos funcionales (entre paréntesis) que contiene y la contribución global de cada uno de ellos, así como los valores totales. Los datos utilizados se encuentran tabulados en Fedors y col. (1974).

Tabla 26: Resumen de la contribución de grupos para la solubilidad del ácido carnósico.

GRUPOS	$\Delta e_i$	$v_i$
-CH3 (4)	4.500	134,0
-CH2 (5)	5.900	80,5
-CH (2)	1.640	-2,0
-OH (2)	10.440	26,0
-COOH (1)	6.600	28,5
-CH= (5)	5.150	-27,5
-C- (2)	700	-38,4
-C= (1)	1.030	-13,5
ANILLOS (3)	750	48,0
DOBLES ENLACES CONJUG. (3)	1.200	-6,6
<b>TOTAL</b>	<b>37.910</b>	<b>256,0</b>

Empleando estos datos, y según la ecuación anterior, el parámetro de solubilidad para el ácido carnósico es de 12,17 (cal/cm<sup>3</sup>)<sup>1/2</sup>.

Como la máxima solubilidad de un compuesto en un disolvente se obtiene cuando sus parámetros de solubilidad se igualan, el parámetro de solubilidad óptimo del CO<sub>2</sub> supercrítico debe ser lo más parecido al obtenido para el ácido carnósico. El cálculo del parámetro de solubilidad para el fluido supercrítico se obtiene mediante la ecuación de Hildebrand y Scott,

$$\delta_{SFC} = 1,25 P_c^{\frac{1}{2}} [\rho_{r,g}/\rho_{r,l}]$$

donde  $\delta_{SFC}$  es el parámetro de solubilidad,  $P_c$  es la presión crítica,  $\rho_{r,g}$  es la densidad reducida del fluido supercrítico y  $\rho_{r,l}$  es la densidad reducida del eluyente a compresión infinita. A partir de esta ecuación se puede obtener el valor de densidad necesario para que los parámetros de solubilidad del eluyente y el analito se igualen. Para ello se utiliza la densidad reducida y la densidad crítica (Saito y col., 1994), cuya relación con la densidad del eluyente a unas condiciones determinadas viene expresada como:

$$\rho = \rho_r \times \rho_c$$

Según los cálculos teóricos, se necesita una densidad para el  $CO_2$  supercrítico de 1.42 g/cm<sup>3</sup>. Modificando las condiciones de presión y temperatura se puede variar fácilmente la densidad del dióxido de carbono, aumentando así su poder solvente, como puede apreciarse en la Figura 50. Pero, parece claro que una densidad tan alta no puede obtenerse en este caso ni siquiera trabajando con  $CO_2$  líquido. Según el modelo teórico de la contribución de grupos y el poder solvente del dióxido del carbono, el ácido carnósico no podría eluirse de la columna.

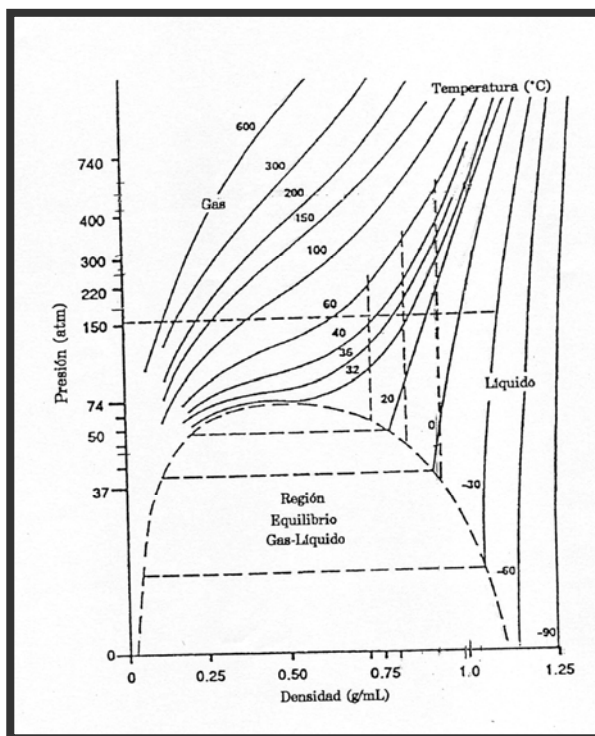


Figura 50: Presión del  $CO_2$  en función de la densidad a diferentes temperaturas.

### ***Estudio experimental y modelado termodinámico según la ecuación de estado GCA-EoS***

Como en la aproximación anterior, en este estudio se parte de la base de que aquellas condiciones de presión y temperatura que garanticen unas altas solubilidades del ácido carnósico en el CO<sub>2</sub> serán las más adecuadas para su separación cromatográfica.

El criterio de isofugacidad permite obtener una ecuación general de equilibrio entre un soluto sólido (s) y la fase supercrítica. Teniendo en cuenta que la solubilidad del fluido supercrítico en la fase sólida puede ser considerada despreciable, la fracción molar de soluto (y<sub>s</sub>) en el fluido supercrítico viene dada por la siguiente ecuación:

$$y_s = \frac{P_s^{sat}}{P} E$$

donde P<sub>s</sub><sup>sat</sup> es la presión de sublimación (vapor) del soluto puro, P es la presión, el cociente P<sub>s</sub><sup>sat</sup>/P es la solubilidad ideal y E es el factor de incremento, que viene dado por la ecuación siguiente:

$$E = \frac{\varphi_s^{sat} \exp \left[ \left\{ v_s^{solid} (P - P_s^{sat}) \right\} / RT \right]}{\varphi_s^{SCP}}$$

donde  $\varphi_s^{sat}$  es el coeficiente de fugacidad del soluto en condiciones de sublimación,  $\varphi_s^{SCP}$  es el coeficiente de fugacidad del soluto en la fase supercrítica y  $v_s^{solid}$  es el volumen molar sólido. El término exponencial en la ecuación anterior es la corrección de Poynting, asumiendo un valor constante para el volumen molar sólido ( $v_s^{solid}$ ).

$P_s^{sat}$  y  $\varphi_s^{sat}$  son los factores determinantes en el modelado termodinámico de las solubilidades del ácido carnósico en  $CO_2$  supercrítico, teniendo en cuenta que el valor de  $\varphi_s^{sat}$  está cercano a la unidad.

En el presente trabajo, las solubilidades del ácido carnósico en  $CO_2$  puro se calculan extrapolando el modelo termodinámico de Cháfer y col., 2005 a un contenido de etanol del 0%. Este modelo termodinámico está basado en la correlación de datos experimentales de la solubilidad del ácido carnósico en  $CO_2$  con etanol con la ecuación de estado GCA-EoS. Las propiedades físicas del ácido carnósico puro (la presión de sublimación, el volumen del soluto sólido y las propiedades críticas) se estimaron para obtener una ecuación que depende tanto de la presión como la temperatura.

La Figura 51 muestra la variación de la solubilidad del ácido carnósico en función de la densidad del  $CO_2$  para tres temperaturas seleccionadas: 40, 70 y 100°C y en el rango de presiones utilizadas en las separaciones cromatográficas.

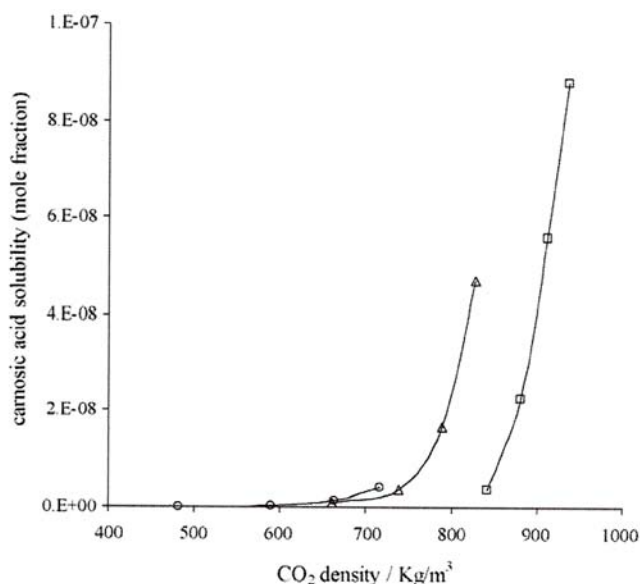


Figura 51: Solubilidad del ácido carnósico predicha por el modelo GCA-EoS en función de la densidad del  $CO_2$ . (□) 40°C; (○) 70°C; (△) 100°C.

Como era de esperar, el modelo predice un aumento de solubilidad con el aumento de densidad del  $CO_2$ . Comparando estos datos con los valores obtenidos mediante el método de contribución de grupos de Fedors, se puede observar que este segundo estudio explica mejor el comportamiento de solubilidad real del ácido carnósico en  $CO_2$  supercrítico. Pero las bajas solubilidades que predice el modelo termodinámico (fracciones molares del orden de  $10^{-8}$  a  $10^{-7}$ ) indican que el ácido carnósico es difícil de eluir usando  $CO_2$  puro. Esta valoración se tendrá en cuenta más adelante al analizar el comportamiento de retención del ácido carnósico en separaciones cromatográficas con  $CO_2$  puro en SFC.

#### **6.2.2.2.) Ácido carnósico y fase estacionaria. Condiciones experimentales para el análisis de extractos a escala analítica.**

Partiendo de los datos de solubilidad del ácido carnósico que predice el modelo anteriormente descrito, el estudio experimental para el análisis de extractos a escala analítica se lleva a cabo utilizando distintas condiciones de presión y temperatura para evaluar la influencia de los dos parámetros que controlan la solubilidad: la presión de vapor del soluto (que tiene más importancia cuanto más volátil sea) y la interacción del ácido carnósico con el fluido supercrítico según sea el poder solvente de éste.

Es conocido que un aumento de presión, a temperatura constante, produce un aumento de densidad del  $CO_2$  supercrítico, de manera que aumenta también su poder de solvatación. El efecto del aumento de temperatura, a presión constante, es algo más complicado pues, por un lado, disminuye la densidad del dióxido de carbono (haciendo que su poder de solvatación sea menor) y, por otro, aumenta la volatilidad del compuesto (según su presión de vapor) lo que se traduce en una disminución de la retención (Lou y col., 1997). Por otro lado, debe tenerse en cuenta también la interacción de la fase estacionaria con el ácido carnósico, de manera que pueden esperarse diferencias para cada una de las columnas estudiadas

utilizando las mismas condiciones de presión y temperatura (misma solubilidad en  $CO_2$ ).

En primer lugar se realiza el estudio de la retención del ácido carnósico en función de la polaridad de la fase estacionaria, empleando distintas condiciones de temperatura y programación de presión y utilizando  $CO_2$  puro. El objetivo de esta parte del estudio es observar las interacciones entre el ácido carnósico y las distintas fases estacionarias seleccionadas. El ácido carnósico se presenta como molécula objetivo de este trabajo por su elevada actividad antioxidante y, por tanto, por su interés para el aislamiento de productos naturales con posible uso para alimentación.

**Estudio de la retención del ácido carnósico en SFC analítico con columnas capilares rellenas de distinta polaridad.**

El estudio completo de solubilidad del ácido carnósico se lleva a cabo con la columna OV-17 (polaridad intermedia) empleando una programación de presión desde 150 bar hasta 350 bar a 4 bar/min y considerando las siguientes temperaturas constantes: 10, 40, 70, 100 y 130°C. Es importante destacar, como se ha comentado anteriormente, que el estudio se llevó a cabo empleando  $CO_2$  puro. Los resultados de los ensayos se resumen en la Tabla 27 (media de dos replicados).

Tabla 27: Resultados SFC para el ácido carnósico con la columna OV-17.

T (°C)	t muerto (min)	t retención (min)	k'	Factor asimetría
10	2,30	43,50	17,9	1,12
40	2,05	--	--	--
70	1,74	41,40	22,8	1,02
100	1,61	44,65	26,7	1,19
130	1,44	46,00	30,9	1,05

La elución del ácido carnósico se produce, en todos los casos, a elevadas presiones (de 310 a 340 bar aproximadamente) tal y como predecía el modelo GC-EoS que, incluso, están cercanas al límite de trabajo del equipo. De los resultados que se muestran en la Tabla 27 se puede deducir que según aumenta la temperatura, de 10 a 130°C, aumenta también la retención ( $k'$ ). Este hecho puede explicarse por una combinación de varios factores entre los que se encuentran una mayor afinidad del ácido carnósico por la fase estacionaria (que se pondría de manifiesto cuanto menor fuera la densidad, tal y como predicen Lou y col., 1997) o, propiamente dicho, por la menor solubilidad en el dióxido de carbono a menor densidad. En la Figura 52, que representa los datos de la Tabla 27, se puede observar esta tendencia.

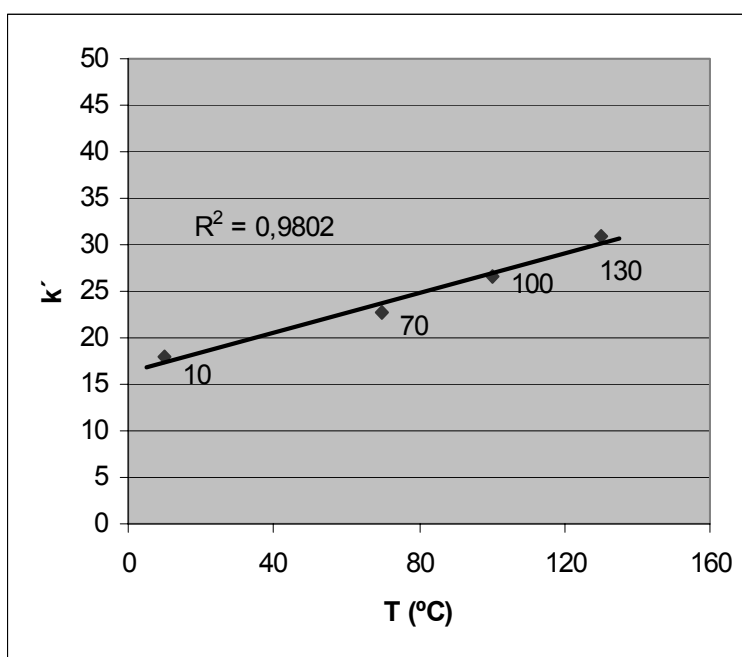


Figura 52: Representación  $k'$  vs T para el ácido carnósico en la columna OV-17.

En comparación con el estudio de Leyendeker, 1986 sobre varios hidrocarburos policíclicos aromáticos (Figura 53), el comportamiento del ácido carnósico se parece más a un compuesto volátil como el antraceno que al criseno, menos volátil. Esto significa que el aumento en la retención producido como

consecuencia del aumento en la temperatura es contrarrestado, en parte, por el incremento en la presión de vapor del compuesto (que a su vez produce un aumento en la solubilidad del soluto en la fase móvil).

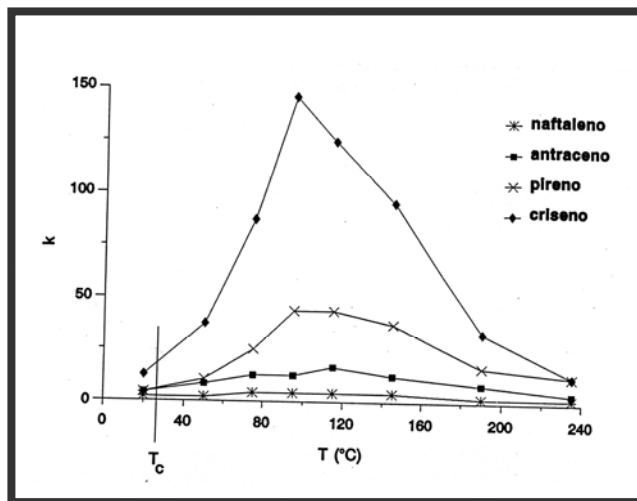


Figura 53: Factor de capacidad en función de la temperatura para distintos hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Por otro lado, como puede observarse de los datos de la Tabla 30, a una temperatura de 40°C no se consigue la elución del ácido carnósico de la columna OV-17, lo cual indica la existencia de una interacción fuerte entre los grupos fenilo de la fase estacionaria y el grupo ácido del analito. Este punto podría considerarse como el de máxima retención para el sistema cromatográfico estudiado.

A partir de los datos de retención del ácido carnósico en la columna OV-17 se eligieron las condiciones para llevar a cabo el estudio comparativo entre las diferentes columnas seleccionadas. Así, se eligió una programación de presión desde 150 bar a 370 bar (10 min) a 10 bar/min y temperaturas constantes de 40, 70 y 100°C. Los resultados se muestran en la Tabla 28 y en las Figuras 54-57, correspondientes a cada columna en las condiciones indicadas, obtenidos por duplicado.



Tabla 28: Resultados SFC para el ácido carnósico en las distintas columnas capilares rellenas de diferente polaridad.

COLUMNA	T (°C)	t muerto (min)	t retención (min)	k'	Forma del pico
OV-17	70	1,83	25,27	12,8	Ancho
SE-54	40	1,83	15,91	7,70	Pico ancho
	70	1,58	19,50	11,87	Pico con hombro
	100	1,54	22,07	13,35	Pico estrecho
CW-20M	40	1,90	19,91	9,48	Pico ancho
	70	1,60	21,78	12,61	Pico con hombro
	100	1,48	22,60	14,27	Pico estrecho
DIOL	100	1,19	8,6	6,22	Pico estrecho

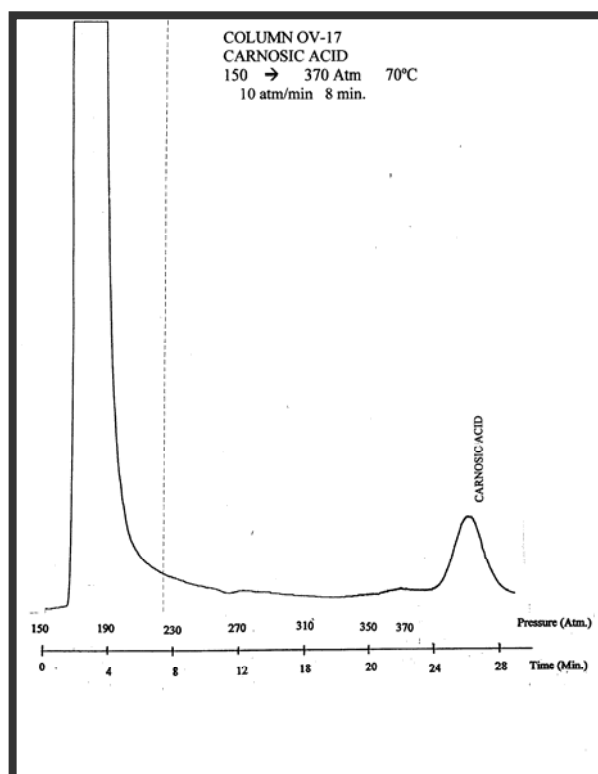


Figura 54: Cromatograma SFC del ácido carnósico en la columna OV-17.  
Condiciones: Rampa de presión de 150 a 370 bar (10 bar/min) y 70°C.

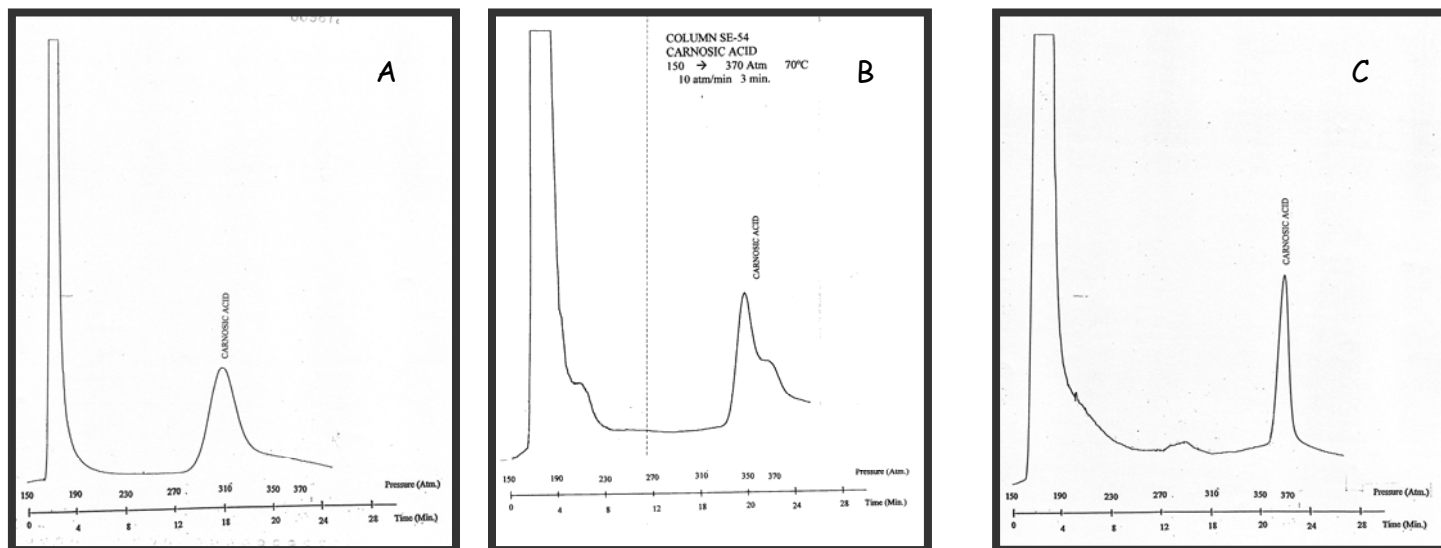


Figura 55: Cromatogramas SFC del ácido carnósico en la columna SE-54.  
Condiciones: Rampa de presión de 150 a 370 bar (10 bar/min). A: 40°C, B: 70°C y C: 100°C.

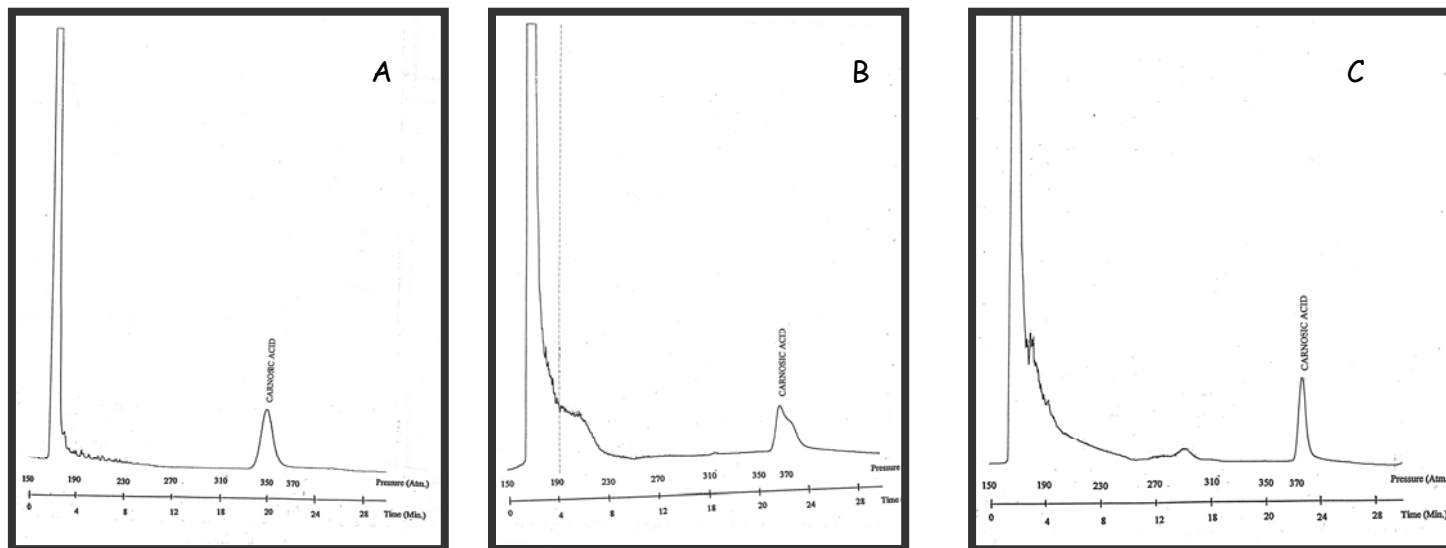


Figura 56: Cromatogramas SFC del ácido carnósico en la columna CW-20M.  
Condiciones: Rampa de presión de 150 a 370 bar (10 bar/min). A: 40°C, B: 70°C y C: 100°C.

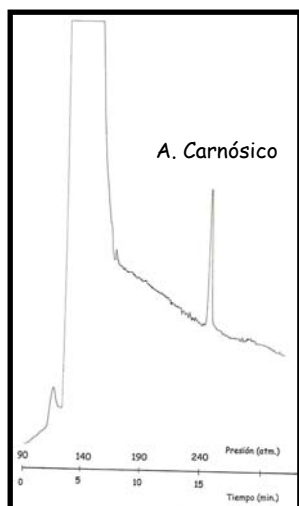


Figura 57: Cromatograma SFC del ácido carnósico en la columna Diol. Rampa de presión 90 bar → 370 bar (10 bar/min) y 100°C

A partir de los resultados obtenidos para la separación del ácido carnósico en las distintas columnas evaluadas, se pueden extraer las siguientes observaciones:

1. En relación a la columna OV-17 (50% metil-50% fenil silicona), el ácido carnósico interacciona con los grupos de la fase estacionaria de forma que sólo es posible eluir el compuesto a altas temperaturas; en estas condiciones, probablemente debido al incremento de la presión de vapor, las interacciones con la fase estacionaria son más débiles y el soluto es capaz de eluir de la columna.

2. En cuanto a la columna SE-54, se observa una mejor separación del ácido carnósico de la muestra patrón a todas las temperaturas, incluso a 40°C. Al igual que sucedía con la columna de polaridad intermedia OV-17, se observa que la retención aumenta con el incremento de temperatura y que el pico se hace más estrecho (y probablemente más puro, pues a 70°C coeluye con otro compuesto que podría ser el carnosol, que se encuentra como impureza en el patrón de ácido carnósico). Las causas, como ya se ha comentado anteriormente, pueden estar relacionadas con la interacción con la fase estacionaria (que aumenta con el aumento de temperatura), la presión de vapor del compuesto y el poder solvente del dióxido de carbono en cada una de las condiciones. Lo que si se puede afirmar es que esta columna posee una mayor selectividad en la separación del ácido carnósico que la OV-17 y que, variando las condiciones de densidad del CO<sub>2</sub> supercrítico, se puede conseguir una mayor eficacia en el fraccionamiento de la muestra.

3. Para la columna con partículas impregnadas con CW20M (polietilenglicol) se observa que la retención es mayor en todos los casos, comparada con la columna impregnada con una fase tipo silicona. Esto puede estar relacionado con la mayor polaridad de la fase Carbowax, de manera que los compuestos polares de la mezcla

quedan más retenidos en la fase estacionaria y, como consecuencia, tardan más en eluir.

Salvando la diferencia en cuanto a la retención, los perfiles de los picos del ácido carnósico para ambas columnas (SE-54 y CW-20M) son muy similares, observándose un patrón parecido para la forma del pico (tal y como se muestra en la Tabla 28), desde un pico ancho (lo que puede ser el resultado de una coelución de varios solutos) a 40°C, a dos picos con una resolución baja ("hombro") a 70°C hasta un pico estrecho a 100°C.

4. En cuanto a la columna Diol, los resultados obtenidos para la separación del ácido carnósico son esencialmente distintos a los que se observan para las otras columnas. En ésta, de polaridad mayor, la retención del ácido carnósico es mucho menor comparada no sólo con la columna polar impregnada (CW-20M) sino también para las columnas apolares. Este hecho no puede atribuirse simplemente a una diferencia de polaridad sino, probablemente, a una menor interacción del compuesto con los grupos funcionales presentes en la columna. Si se considera la diferencia entre los procedimientos para la obtención de los distintos rellenos se puede ver que en todos los casos, excepto para la columna diol, las partículas se impregnan con un 3% de fase estacionaria (independientemente de su polaridad), mientras que los restos diol se obtienen por reacción química y, por tanto, forman una monocapa de menor espesor que, lógicamente, puede influir en la fuerza de la interacción.

Finalmente para elegir la columna que proporcione las condiciones óptimas para el fraccionamiento de los extractos de romero obtenidos mediante SFE, se tomarán en consideración aspectos relacionados tanto con el tiempo de análisis como con la selectividad del sistema.

## Estudio de la separación de la fracción antioxidante de romero en SFC analítico con columnas capilares rellenas de distinta polaridad.

Una vez evaluadas, para cada columna, las mejores condiciones para la elución del ácido carnósico empleando  $CO_2$  sin modificador, se estudió la capacidad de las mismas para la separación de una mezcla compleja del extracto supercrítico de romero correspondiente a la fracción con actividad antioxidante. A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos en las condiciones seleccionadas para cada tipo de columna.

### COLUMNA OV-17

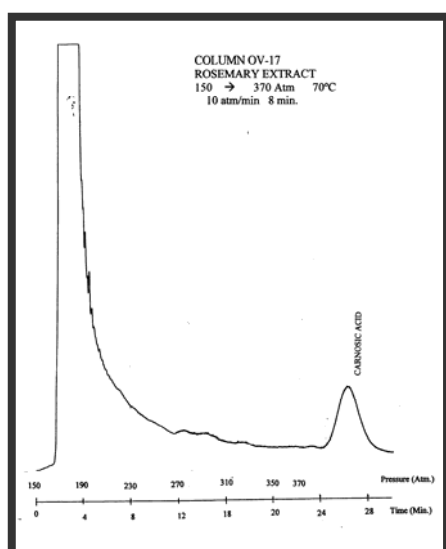


Figura 58: Cromatograma SFC del extracto de romero (Experimento 1 (F-2), Tabla 7) en la columna OV-17. Condiciones: Rampa de presión de 150 a 370 bar (10 bar/min) y 70°C.

Como se puede observar, la columna OV-17 no es lo suficientemente eficaz para conseguir la separación de los compuestos de los extractos, ya que el analito que se utiliza como modelo sufre una fuerte retención y no logra eluir de la columna con  $CO_2$  puro si no es empleando una temperatura elevada.

### COLUMNA SE-54

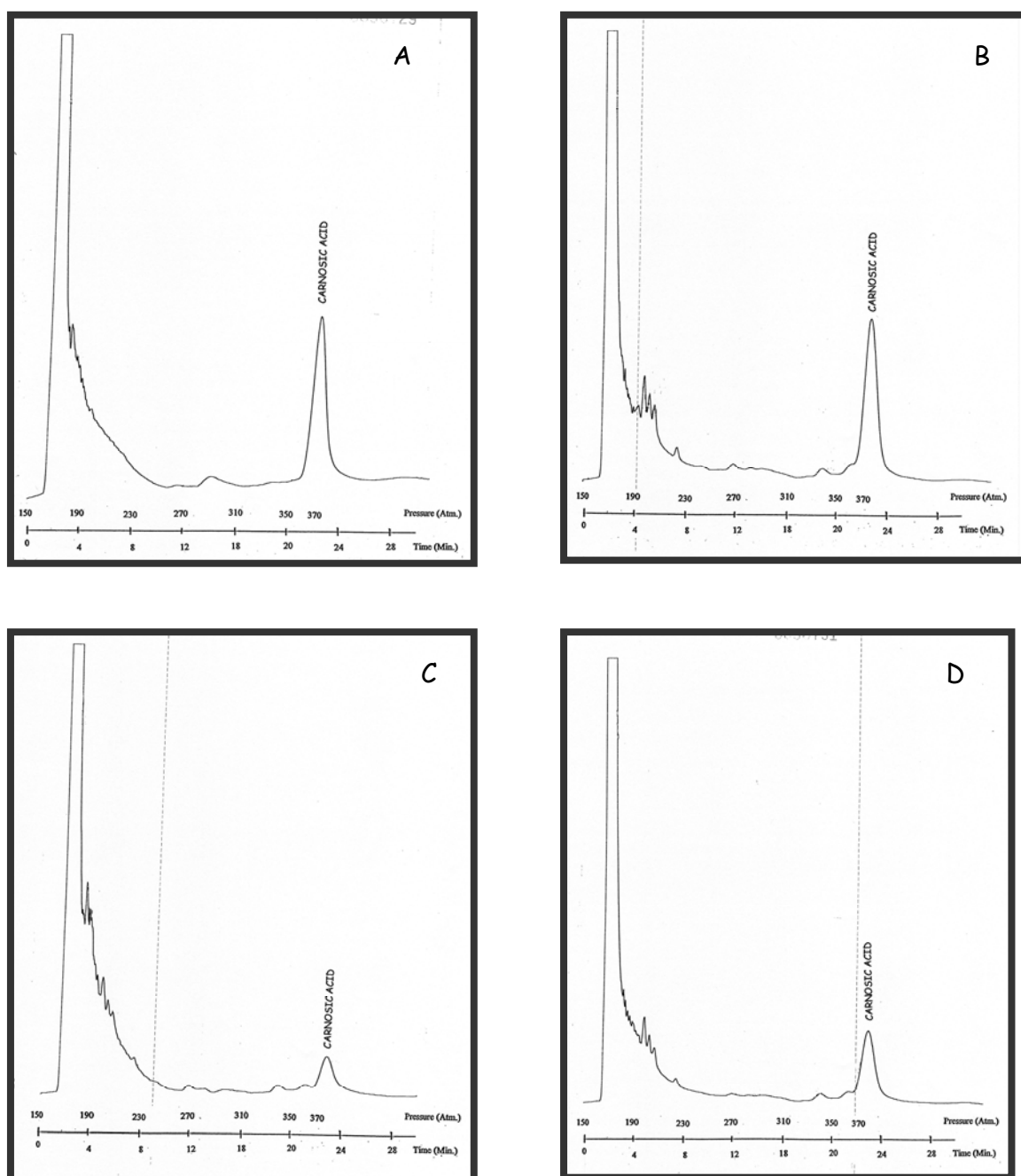


Figura 59: Cromatogramas SFC de los extractos SFE de romero en la Columna SE-54. Rampa de presión: 150 bar  $\rightarrow$  370 bar (10 bar/min) y 100°C. A: Experimento n°1 (F-2), SFE: 300 bar, 60°C; B: Experimento n° 2 (F-2), SFE: 350 bar y 50°C; C: Experimento n° 3 (F-2), SFE: 250 bar y 40°C; D: Experimento n° 4 (F-2), SFE: 400 bar y 60°C.

Como se puede observar, la columna con partículas impregnadas con la fase estacionaria SE-54 consigue una separación aceptable de los compuestos del

romero obtenidos en distintas condiciones de extracción de la fracción antioxidante mediante SFE, identificando en todos ellos el ácido carnósico que es el compuesto más interesante para posteriores investigaciones.

Comparando los perfiles cromatográficos correspondientes a los distintos extractos se observan mínimas diferencias entre ellos. Esto puede ser debido a que las condiciones de extracción estudiadas (250 y 400 bar y 40 a 60°C) proporcionan extractos de composición similar o a que la separación obtenida con esta columna no es suficiente para observar estas diferencias.

### COLUMNA CW-20M

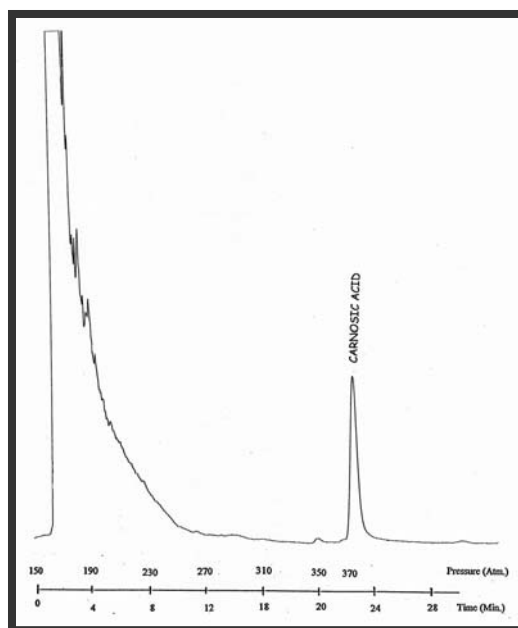


Figura 60: Cromatograma SFC en la columna CW-20M. Rampa de presión 150 bar → 370 bar (10 bar/min) y 100°C. Experimento n° 4 (F-2). Condiciones SFE: 400 bar y 60°C.

Los resultados obtenidos para esta columna indican que la selectividad del sistema para fraccionar los compuestos presentes en el extracto de romero no es adecuada. Este hecho está relacionado con la polaridad de la fase CW-20M que, tal y como se ha comentado, es mayor que para la fase SE-54 de tipo sílica.

## COLUMNA DIOL

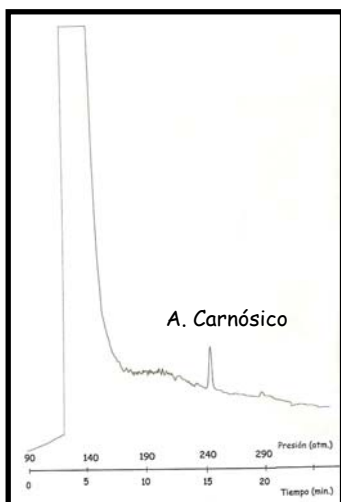


Figura 61: Cromatograma SFC en la columna Diol. Rampa de presión 90 bar → 370 bar (10 bar/min) y 100°C. Experimento n° 4 (F-2). Condiciones SFE: 400 bar y 60°C.

Teniendo en cuenta la información previa obtenida para la retención del ácido carnósico en esta columna, las condiciones que se utilizaron para el análisis de los extractos fueron las siguientes: programación de presión de 90 bar a 370 bar a 10 bar/min y temperatura constante igual a 100 °C. Como se puede observar en esta columna tampoco se obtiene la separación de los compuestos correspondientes a la fracción antioxidante. Esto, como se ha comentado anteriormente, puede ser debido a una baja retención de los compuestos en esta columna, que se traduce en una rápida elución de los mismos en el frente del disolvente.

### **Estudio de la separación del aceite esencial de romero en SFC analítico con columnas capilares rellenas de distinta polaridad.**

Otra de las fracciones de interés obtenidas mediante SFE es la que corresponde al aceite esencial y que, para las extracciones analíticas, se obtiene a bajas presiones y temperaturas. En esta parte del estudio se evaluaron, para cada una de las columnas estudiadas, las mejores condiciones de separación de este extracto complejo.



## COLUMNA SE-54

Los resultados obtenidos con la columna SE-54 para el análisis del aceite esencial (fracción 1 de los distintos experimentos) extraído mediante SFE se muestran en la Figura 62. En el pie de figura se describen las condiciones empleadas tanto en la extracción como para el análisis con CO<sub>2</sub> puro.

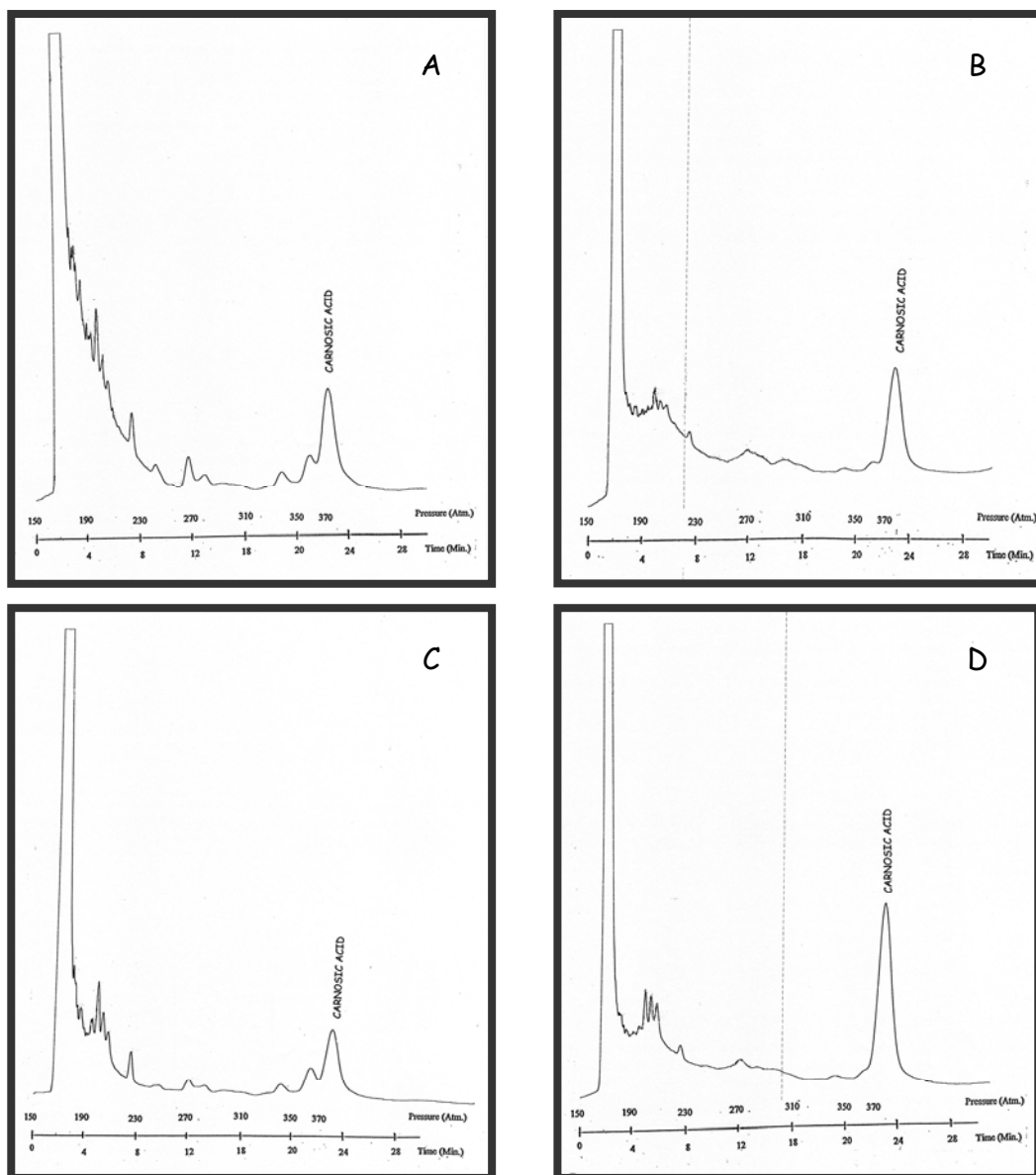


Figura 62: Cromatograma SFC en la columna SE-54. Rampa de presión 150 bar → 370 bar (10 bar/min) y 100°C. A: Experimento n°1 (F-1), SFE: 140 bar, 40°C; B: Experimento n° 2 (F-1), SFE: 140 bar y 50°C; C: Experimento n° 3 (F-1), SFE: 90 bar y 40°C; D: Experimento n° 4 (F-1), SFE: 100 bar y 40°C

Como se puede observar, al igual que para las fracciones correspondientes al extracto antioxidante, la columna con partículas impregnadas con la fase SE-54 consigue una separación aceptable de los compuestos del aceite esencial de romero obtenidos en distintas condiciones de SFE. Tampoco en esta fracción se observan grandes diferencias en cuanto a los perfiles de los extractos, aunque si existen diferencias entre perfiles de las fracciones 1 y 2 (Figura 59 A y 62 A, respectivamente) del mismo experimento.

Para mejorar la resolución de los picos de los cromatogramas anteriores y proceder a la identificación de los compuestos más abundantes de la fracción correspondiente al aceite esencial (según Ibáñez y col., 1999 (a)), se modificaron las condiciones de separación empleando una temperatura constante de 100°C y una programación de presión entre 90 y 370 bar a 10 bar/min (Figura 64). Para la identificación de los compuestos se utilizaron patrones correspondientes al 1,8-cineol, alcanfor, borneol y verbenona y ésta se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de los compuestos con sus patrones. En la Figura 63 se presenta, a modo de ejemplo, el cromatograma correspondiente a la separación del 1,8-cineol en las condiciones empleadas.

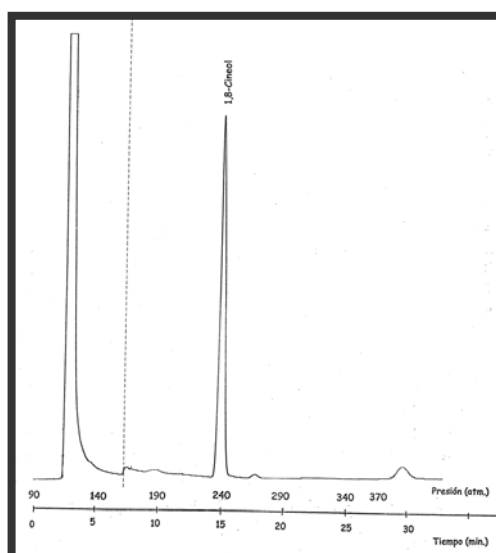


Figura 63: Cromatograma SFC del 1,8-Cineol en la Columna SE-54.  
Rampa de presión 90 bar → 370 bar (10 bar/min) y 100°C.

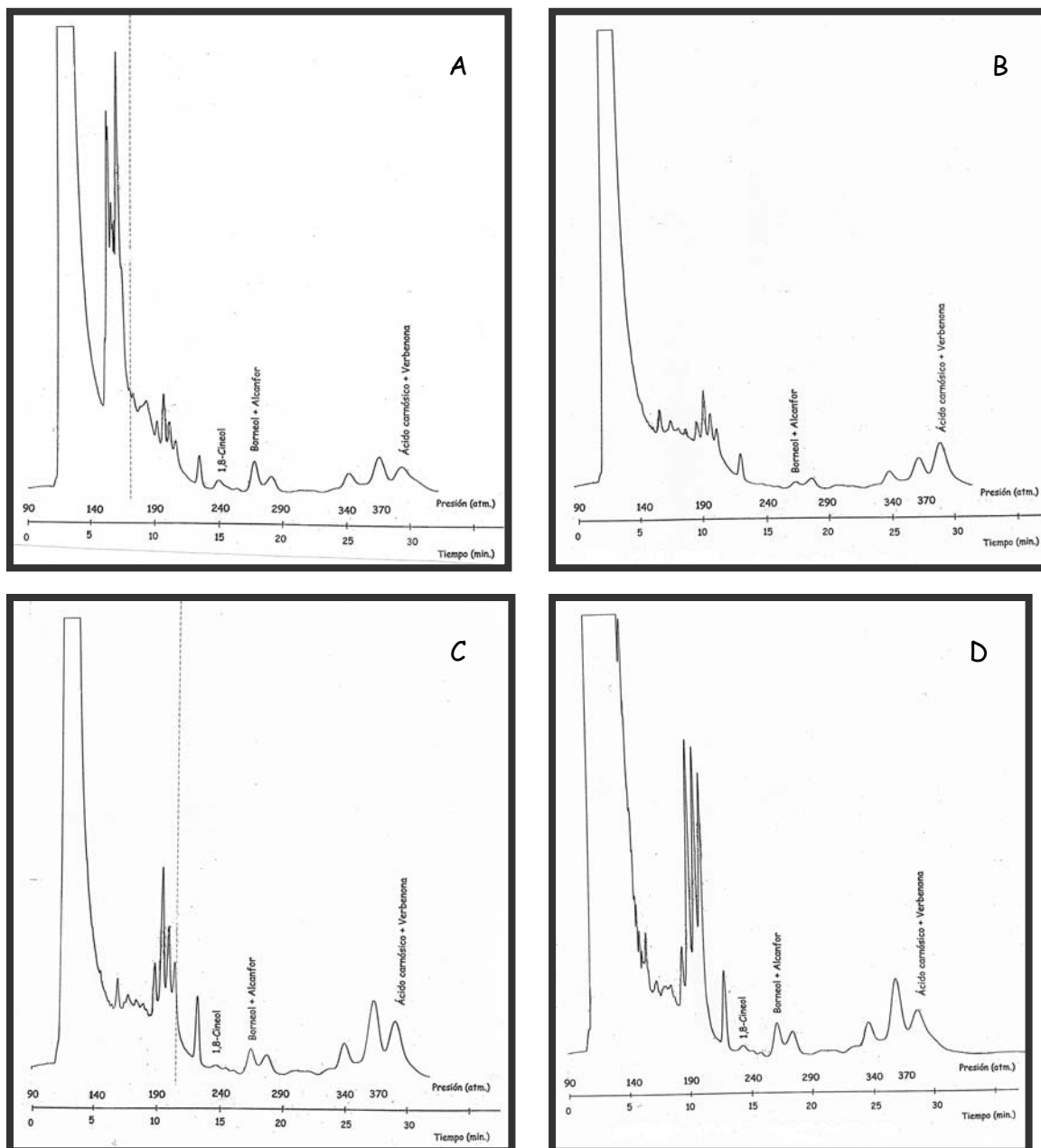


Figura 64: Cromatograma SFC en la columna SE-54. Rampa de presión 90 bar  $\rightarrow$  370 bar (10 bar/min) y 100°C. A: Experimento n°1 (F-1), SFE: 140 bar, 40°C; B: Experimento n° 2 (F-1), SFE: 140 bar y 50°C; C: Experimento n° 3 (F-1), SFE: 90 bar y 40°C; D: Experimento n° 4 (F-1), SFE: 100 bar y 40°C

A partir de los cromatogramas de la Figura 64, de la fracción correspondiente al aceite esencial, se puede observar, en primer lugar, que existen dos grupos de compuestos no identificados (el primero de ellos alrededor del minuto 5 y el segundo sobre el minuto 10) que están presentes en distinta

concentración en los cuatro experimentos: el primero de ellos es muy abundante en el experimento nº1 (Figura 64, A; minutos 5 al 8) y el segundo en el experimento nº4 (Figura 64, D; minutos 8-12).

De los analitos identificados, no se consigue separar el borneol y el alcanfor que coeluyen (y están presentes en todos los casos). En menor cantidad se identifica también el 1,8-Cineol. Por otro lado, se observa que la verbenona, que es un carbonilo monoterpénico, eluye al mismo tiempo de retención que el ácido carnósico, lo que está indicando que sería necesario un mayor fraccionamiento del extracto para llegar a la obtención de extractos puros de compuestos de interés.

Con esta misma columna, y para las fracciones 1 de todos los experimentos, se estudia el efecto de una programación más lenta de presión (en este caso a 4 bar/min) sobre la resolución. Los resultados se muestran en la Figura 65 y se comparan con el cromatograma correspondiente a la mezcla borneol y alcanfor en las mismas condiciones (Figura 66). Como se puede observar en la Figura 65, estas condiciones empeoran los resultados de eficacia y resolución obtenidos en las condiciones anteriores, por lo que no se utilizaron para posteriores análisis con otras columnas.

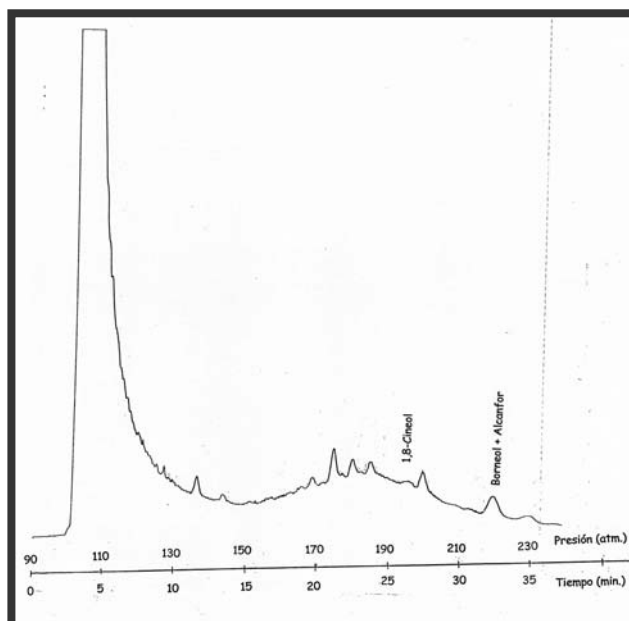


Figura 65: Cromatograma SFC en la Columna SE-54. Rampa de presión 90 bar → 370 bar (4 bar/min) y 100°C.

Experimento n° 1 (F-1). Condiciones SFE: 140 bar y 40°C.

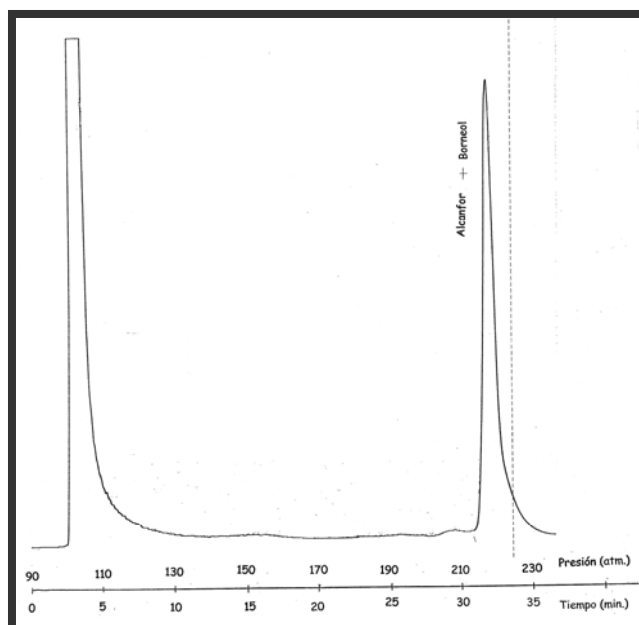


Figura 66: Cromatograma SFC de la mezcla Alcanfor y Borneol en la Columna SE-54.

Rampa de presión 90 bar → 370 bar (4 bar/min) y 100°C.

### COLUMNA CW-20M

El estudio completo llevado a cabo con los extractos de la fracción correspondiente al aceite esencial en la columna SE-54 no se realiza con esta columna puesto que, como se ha comentado, la selectividad del sistema cromatográfico con la columna CW20M proporciona un fraccionamiento menor, a pesar de que la eficacia de esta columna es mayor. Para esta columna sólo se muestran los resultados correspondientes a uno de los experimentos empleando una programación de presión entre 150 bar y 370 bar a 10 bar/min y una temperatura constante de 100 °C. El perfil cromatográfico se muestra en la Figura 67.

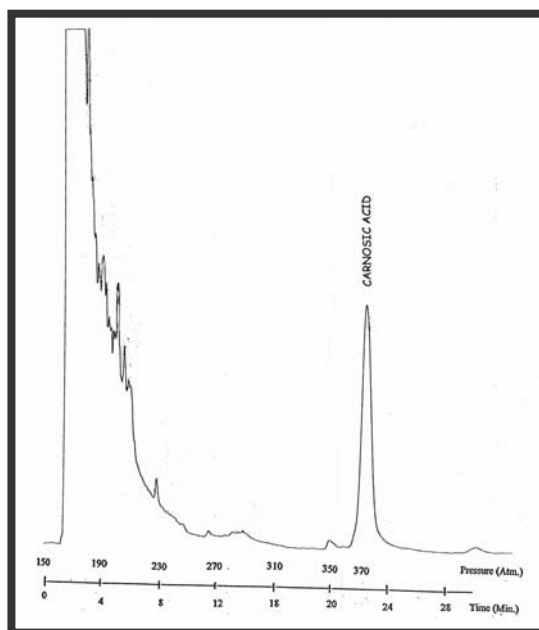


Figura 67: Cromatograma SFC en la columna CW-20M. Rampa de presión 150 bar → 370 bar (10 bar/min) y 100°C. Experimento n° 4 (F-1). Condiciones SFE: 100 bar y 40°C.

## COLUMNA DIOL

Con la columna diol se realiza un estudio sobre la elución de los compuestos más importantes del aceite esencial, empleando las condiciones: programación de presión de 90 bar a 370 bar a 10 bar/min y temperatura constante igual a 100 °C. Los tiempos de retención observados para los compuestos mayoritarios del aceite esencial se detallan en la Tabla 29.

Tabla 29: Tiempos de retención de los compuestos mayoritarios del aceite esencial en columna Diol. Rampa de presión 90 bar → 370 bar (10 bar/min) y 100°C.

<b>Compuesto</b>	<b>t retención (min)</b>
1,8-Cineol	6,1
Alcanfor	7,8
Borneol	9,3
Verbenona	11,1
Ácido Carnósico	15,5

A modo de ejemplo, se presenta el cromatograma de la separación del borneol en las condiciones indicadas (Figura 68).

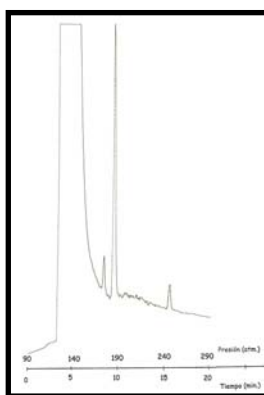


Figura 68: Cromatograma SFC del Borneol en la Columna Diol.  
Rampa de presión 90 bar → 370 bar (4 bar/min) y 100°C.

El perfil cromatográfico de un extracto de aceite esencial se muestra en la Figura 69.

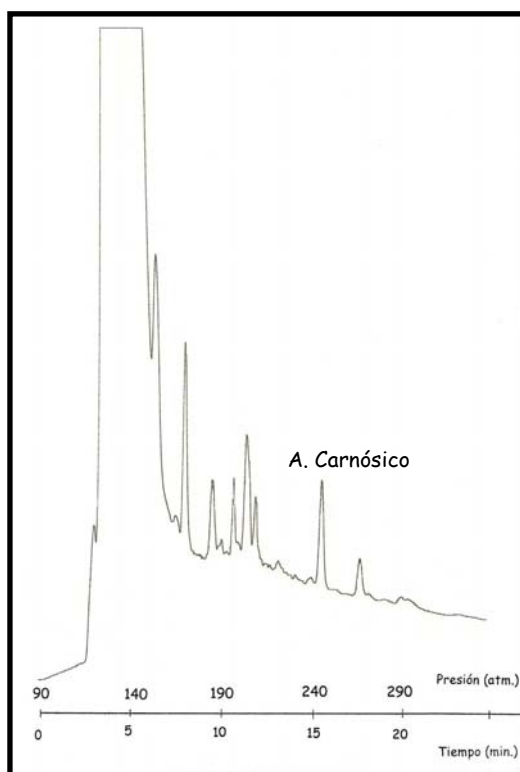


Figura 69: Cromatograma SFC en la columna Diol. Rampa de presión 90 bar → 370 bar (10 bar/min) y 100°C. Experimento n° 4 (F-1). Condiciones SFE: 100 bar y 40°C.

Analizando los resultados obtenidos para la separación de las distintas fracciones (antioxidante y aceite esencial) de los extractos supercríticos de romero en las cuatro columnas anteriormente descritas, se elige la columna con relleno de sílice impregnado con SE-54 como la más apropiada para llevar a cabo el fraccionamiento a escala preparativa. Como ya se ha comentado, esta columna proporciona una mayor separación de los componentes de los extractos en un tiempo razonable. Asimismo se seleccionó una columna tipo diol considerando que esta columna proporcionaba una adecuada eficacia y selectividad en la separación de las fracciones correspondientes al aceite esencial de romero obtenido mediante SFE. Así, se procedió a la evaluación de ambos tipos de columnas a escala preparativa.



### **6.2.2.3.) Fraccionamiento de extractos supercríticos de romero en columna comercial tipo Diol mediante PS-SFC. Actividad antioxidante y antimicrobiana de las fracciones.**

#### **Caracterización de los extractos SFE de romero**

Previa a su separación cromatográfica mediante PS-SFC, los extractos supercríticos de romero obtenidos en una planta piloto de SFE empleando  $\text{CO}_2$  con un 7% de etanol como modificador a 150 bar y  $40^\circ\text{C}$ , se caracterizaron químicamente. Este extracto se seleccionó basándonos en resultados previos obtenidos en el grupo de investigación (Señoráns y col., 2000), que ponían de manifiesto la elevada actividad funcional de los extractos recogidos en los dos separadores, en comparación con la extracción y fraccionamiento en condiciones más extremas. Para ello, la fracción correspondiente al Separador 1, que se obtuvo mediante despresurización a un 50% de la presión de extracción y que contenía fundamentalmente los compuestos antioxidantes, se analizó mediante HPLC-DAD (empleando el método descrito en el apartado 5.4.3.2). A su vez esta fracción se analizó mediante GC (empleando el método descrito en el apartado 5.4.3.1), para conocer su composición en compuestos volátiles, correspondientes al aceite esencial de romero.

En la Tabla 30 se muestran los tiempos de retención y los máximos de absorbancia de los compuestos del extracto seleccionado y que, como ya se ha comentado, corresponden a los compuestos con actividad antioxidante descrita. Para la identificación de los compuestos y, dado que la disponibilidad de patrones era limitada, se recurrió tanto a los datos publicados por otros autores (Cuvelier y col., 1996; Richheimer y col., 1996), como a la experiencia previa de nuestro grupo de investigación (Señoráns y col., 2000).

Tabla 30. Caracterización de compuestos mediante HPLC para el extracto SFE:  $t_R$ , máximos de absorbancia y %Área sobre el total.

Compuestos	$t_R$ (min)	Abs max (nm)	% Área Extracto
Escutellareína	3,68	230, 275, 332	3,5
NI1	3,81	255	5,7
Isómero Rosmanol	4,42	230, 273	1,0
Genkwanina	4,92	230, 266, 334	4,2
Carnosol	10,20	232, 282	25,4
NI	11,21	231, 424	3,8
NI 5	11,94	230, 284	1,7
NI	12,24	230, 266, 329	2,0
NI	12,56	230, 267, 329	1,7
Ácido Carnosico	14,40	239, 283	40,7
Carnosato metilo	17,12	231, 281	5,1
NI	19,45	230	2,6
NI	19,65	230, 284	1,5
NI 7	26,06	230, 282	1,2

El análisis cromatográfico mediante HPLC permitió, por tanto, identificar dos grupos de compuestos: los diterpenos fenólicos, como el ácido carnósico, el carnosol y el carnosato de metilo y los flavonoides como la genkwanina y escutellareína. Asimismo se pudo detectar la presencia de otros compuestos aunque éstos no pudieron ser identificados completamente, como el NI 1 o el NI 5, que ya habían sido descritos previamente (Cuvelier y col., 1996). Para el análisis comparativo entre el extracto original y las fracciones obtenidas de la separación mediante PS-SFC, los datos se presentan como áreas normalizadas (% relativos frente al total de área de los picos de los compuestos detectados a 230 nm).

A su vez, el análisis cromatográfico mediante GC permitió la caracterización del aceite esencial (Tabla 31). Los principales compuestos del extracto SFE de romero fueron: verbenona (26,7%), alcanfor (24%) y 1,8-Cineol (10,2%). Esta composición química no muestra grandes diferencias ni con aquellos extractos de aceite esencial de romero descritos previamente en la bibliografía (Pintore y col., 2002; Lawrence, 1995), ni con los descritos para extractos SFE de romero (Santoyo y col., 2005).

Tabla 31. Caracterización de compuestos mediante GC para el extracto inicial:  $t_R$  y %Área sobre el total.

Compuestos	$t_R$ (min)	% Área Extracto
$\alpha$ -Pino	5,35	n.d.
1,8-Cineol	6,71	10,2
Linalol	8,54	1,7
Alcanfor	10,27	24,0
Borneol	11,51	11,9
Terpinen-4-ol	11,99	2,4
$\alpha$ -Terpineol	12,47	7,1
Verbenona	12,89	26,7
Transcariofileno	21,62	7,2
NI	22,67	2,8
NI	26,22	1,5
NI	27,57	1,5
NI	28,10	2,8

## Optimización de las condiciones de fraccionamiento

El estudio a escala analítica de la separación de extractos de romero mediante SFC, permitió abordar, con el conocimiento previo necesario sobre las interacciones de la fase estacionaria y la fase móvil con los compuestos de la muestra, el fraccionamiento y purificación de los compuestos con actividad funcional.

Como se ha comentado anteriormente, se seleccionaron dos columnas: una Diol, comercial, de polaridad alta y otra diseñada y preparada en el laboratorio con relleno impregnado con fase estacionaria SE-54, puesto que fue la seleccionada como óptima en el estudio analítico con fases estacionarias dirigidas.

Debido a las diferencias existentes en los equipos de PS-SFC y SFC analítico (descritos ambos en el apartado 5.4. de la presente memoria) se decidió iniciar la optimización del fraccionamiento de los extractos con el estudio de las variables que más influyen en el proceso, también a escala preparativa, es decir, la presión y la temperatura de la columna y la composición de la fase móvil, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las separaciones analíticas. En primer lugar se optimizó la temperatura de la columna, realizando experimentos a presión y composición de fase móvil constantes (200 bar y CO<sub>2</sub> con un 10% de etanol, respectivamente) a tres temperaturas distintas: 40, 60 y 80°C. Como era previsible, el incremento en la temperatura de trabajo produjo una mayor retención de los compuestos debido a la disminución de la densidad de la fase móvil. De esta manera se seleccionó la temperatura de 80°C porque permitía un mayor fraccionamiento de los compuestos, favoreciendo la separación de solutos con estructuras químicas similares. Además, se comprobó que, a esta temperatura, la integridad del ácido carnósico se mantenía, sin producirse degradaciones térmicas.

Una vez establecida la temperatura de trabajo, se realizaron una serie de experimentos para valorar el efecto de las otras variables del proceso (presión y porcentaje de modificador de la fase móvil) sobre la retención. En condiciones isotermas, al aumentar la presión aumenta también la densidad y la fuerza de elución de la fase móvil. Este comportamiento explica la disminución en la retención y en la anchura de los picos, al aumentar la presión. Un efecto similar se observa con la adición del modificador: al añadir un modificador polar al  $\text{CO}_2$ , la retención de los compuestos disminuye debido principalmente al incremento de la fuerza de elución, aunque también puede influir en la retención mediante la desactivación de los puntos activos de las partículas del relleno de la columna. En la Tabla 32 se muestran los resultados del ácido carnósico (en términos de tiempo de retención,  $t_R$  y anchura de pico a media altura,  $w_{1/2}$ ) a diferentes condiciones de presión y porcentaje de modificador.

Tabla 32. Variación del tiempo de retención ( $t_R$ ) y de la anchura a media altura ( $w_{1/2}$ ) para los distintos experimentos.

Presión (bar)	5% Etanol		10% Etanol		15% Etanol	
	$t_R$ (min)	$w_{1/2}$ (mm)	$t_R$ (min)	$w_{1/2}$ (mm)	$t_R$ (min)	$w_{1/2}$ (mm)
130	39,8	43,6	8,2	9,6	3,3	4,8
150	17,0	24,0	5,3	8,9	2,8	4,2
200	12,2	14,2	3,5	3,5	1,6	2,2
250	11,1	12,4	1,5	1,5	1,5	1,8

Es importante comentar que la elución del ácido carnósico no fue posible en ausencia de modificador, en el intervalo de presiones que permite la planta de PS-SFC (hasta 300 bar). En este sentido, los resultados concuerdan con los obtenidos, por un lado, para el estudio de solubilidad del ácido carnósico, y por otro, para las separaciones a escala analítica.

Como se puede observar en la Tabla 32, la mejor combinación de variables se encontró a porcentajes de modificador intermedios (10% de etanol), ya que separaciones del ácido carnósico empleando un 5 ó un 15% de etanol proporcionaban tiempos de retención muy largos o demasiado cortos, respectivamente. Por tanto, se seleccionó un 10% de etanol como modificador de la fase móvil y se eligió la presión adecuada para permitir el fraccionamiento de los extractos de romero; en estas condiciones, una presión igual a 130 bar proporcionaba una anchura de pico adecuada capaz de permitir la purificación de los compuestos de interés.

Por tanto, se seleccionaron las siguientes condiciones como óptimas para el fraccionamiento de las muestras reales de romero: temperatura de la columna, 80°C; presión de columna, 130 bar y 10% de etanol como modificador. (Otras condiciones de los ensayos: Flujo másico total, 20 g/min (Flujo CO<sub>2</sub>, 18 g/min). Temperatura de los ciclones, 50°C).

#### **Fraccionamiento de los extractos SFE de romero mediante PS-SFC en columna Diol.**

La Figura 70 muestra el perfil de retención del extracto SFE de romero, descrito y caracterizado en la sección anterior, en una columna Diol en las condiciones elegidas. Asimismo se indican las ventanas de recogida seleccionadas para el aislamiento de los compuestos activos en los distintos ciclones. El fraccionamiento fue el siguiente: Ciclón 1 (C1), del minuto 0 a 3,20; Ciclón 3 (rechazo, C3), del minuto 3,20 al minuto 6,45 y Ciclón 2 (C2), del minuto 6,45 al minuto 15.

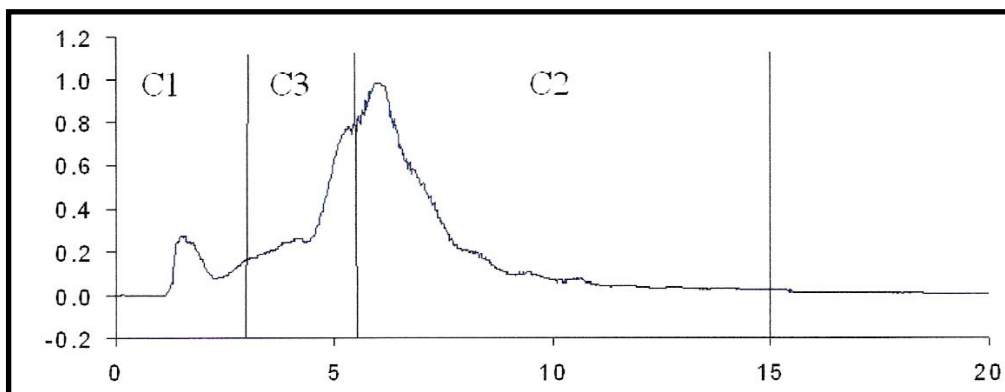


Figura 70. Fraccionamiento del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna Diol a 130 bar, 80°C y 10% etanol en tres ciclones diferentes (C1, C2 y C3).

El protocolo de fraccionamiento seguido en este estudio consistió en realizar 12 inyecciones sucesivas del extracto SFE de romero para su separación y fraccionamiento mediante PS-SFC en los tres ciclones según las ventanas de tiempo seleccionadas, como muestra la Figura 71.

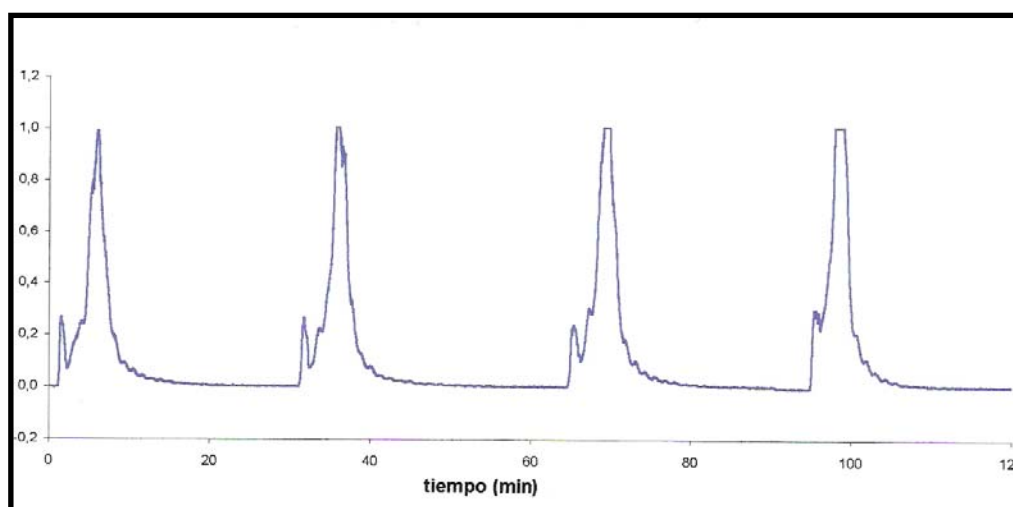


Figura 71. Fraccionamiento en inyecciones sucesivas del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna Diol a 130 bar, 80°C y 10% etanol en tres ciclones diferentes.

## Caracterización Química de las fracciones aisladas

Las fracciones recogidas en cada uno de los ciclones se caracterizaron químicamente para evaluar el enriquecimiento logrado mediante la separación por PS-SFC. La Tabla 33 muestra la comparación entre la composición química, determinada mediante HPLC, del extracto SFE de romero original y de los tres diferentes ciclones (C1, C2 y C3) en los que se fraccionó el extracto. Como puede observarse, el ciclón 1 contiene principalmente los compuestos flavonoides y el compuesto NI 1, además de una pequeña concentración de carnosol. El ciclón 3 no muestra un fraccionamiento como tal, puesto que contiene casi todos los compuestos detectados en el extracto SFE de romero inicial; este hecho puede explicarse por ser el ciclón al que se deriva la muestra cuando no se recoge selectivamente, es decir, actúa realmente como ciclón de desecho. En comparación con los dos ciclones anteriores, en el ciclón 2 se encontró el 92% del total de ácido carnósico y el 83% del total de carnosol, junto con un 43% del total de carnosato de metilo. Comparado con el extracto SFE de romero inicial, se incrementa el contenido en ácido carnósico en peso de 670 ppm a 740 ppm.

La Tabla 34 muestra la comparación de la composición determinada mediante GC, del extracto SFE inicial y de las tres fracciones (ciclones 1 al 3) recogidas. Como se puede observar, las condiciones de fraccionamiento del extracto de romero permiten un aislamiento selectivo de los compuestos del aceite esencial en el primer ciclón. Sólo una pequeña parte de verbenona se recoge en el ciclón 2 junto con los compuestos antioxidantes. De esta manera el fraccionamiento puede mejorar las características del ingrediente funcional, eliminando el aroma residual de la fracción recogida en el ciclón 2. La Figura 72 muestra, a modo de ejemplo, los cromatogramas de GC de las fracciones recogidas tras el fraccionamiento. En estos cromatogramas se puede observar el aislamiento selectivo del aceite esencial de romero en el C1.



Tabla 33. Caracterización química mediante HPLC (area neta y % área) de los compuestos identificados en el extracto SFE de romero y en los tres diferentes ciclones (C1, C2, C3) después de la separación mediante PS-SFC en columna Diol.

Compuestos	t <sub>R</sub> (min)	Abs max (nm)	% Área Extracto	Área C1	Área (%) C1	Área C2	Área (%) C2	Área C3	Área (%) C3
Escutellareína	3,68	230, 275, 332	3,5	15.158.594	7,0	11.053.113	2,5	2.197.803	1,7
NI1	3,81	255	5,7	144.544.448	67,0	3.360.688	0,8	3.211.081	2,5
Isómero Rosmanol	4,42	230, 273	1,0	n.d. *	n.d	2.396.716	0,5	3.112.626	2,5
Genkwanina	4,92	230, 266, 334	4,2	49.534.156	23,0	6.494.556	1,5	2.964.488	2,3
Carnosol	10,20	232, 282	25,4	6.541.069	3,0	116.525.424	26,3	17.360.018	13,7
NI	11,21	231, 424	3,8	n.d.	n.d	64.670.284	14,6	12.551.332	9,9
NI 5	11,94	230, 284	1,7	n.d.	n.d	6.013.212	1,4	11.780.574	9,3
NI	12,24	230, 266, 329	2,0	n.d.	n.d	17.048.856	3,8	n.d	n.d
NI	12,56	230, 267, 329	1,7	n.d.	n.d	18.354.632	4,1	9.870.840	7,8
Ácido Carnosico	14,40	239, 283	40,7	n.d.	n.d	172.270.368	38,9	15.126.071	11,9
Carnosato metilo	17,12	231, 281	5,1	n.d.	n.d	15.302.235	3,5	20.571.826	16,2
NI	19,45	230	2,6	n.d.	n.d	4.895.318	1,1	15.771.393	12,4
NI	19,65	230, 284	1,5	n.d.	n.d	3.773.833	0,9	5.586.948	4,4
NI 7	26,06	230, 282	1,2	n.d.	n.d	1.242.724	0,3	6.756.526	5,3

n.d.\*: compuesto no detectado

Tabla 34. Caracterización química mediante GC (área neta, % área y concentración, Ci) de los compuestos identificados en el extracto SFE de romero y en los tres diferentes ciclones (C1, C2, C3) después de la separación mediante PS-SFC en la columna Diol.

Compuestos	t <sub>R</sub> (min)	% Área Extracto	Ci Extracto (mg/ml)	Área C1	Área (%) C1 (Ci, mg/ml)	Área C2	Área (%) C2 (Ci, mg/ml)	Área C3	Área (%) C3 (Ci, mg/ml)
α-Pineno	5,35	n.d. *	n.d.	1.628	0,4 (0,06)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,8-Cineol	6,71	10,2	0,06	7.645	1,9 (0,07)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Linalol	8,54	1,7	n.d.	10.664	2,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alcanfor	10,27	24,0	0,14	72.042	18,2 (0,63)	n.d.	n.d.	1.638	19,88 (0,01)
Borneol	11,51	11,9	0,06	56.420	14,2 (0,42)	n.d.	n.d.	1.792	21,74 (0,01)
Terpinen-4-ol	11,99	2,4	n.d.	13.828	3,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α-Terpineol	12,47	7,1	n.d.	39.594	10,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Verbenona	12,89	26,7	0,15	121.286	30,6 (0,88)	1.235	100 (0,03)	3.341	40,54 (0,04)
Transcariofileno	21,62	7,2	n.d.	37.123	9,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	22,67	2,8	n.d.	15.923	4,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	26,22	1,5	n.d.	6.641	1,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	27,57	1,5	n.d.	5.328	1,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	28,10	2,8	n.d.	8.173	2,1	n.d.	n.d.	1.470	17,84

n.d.\*: compuesto no detectado

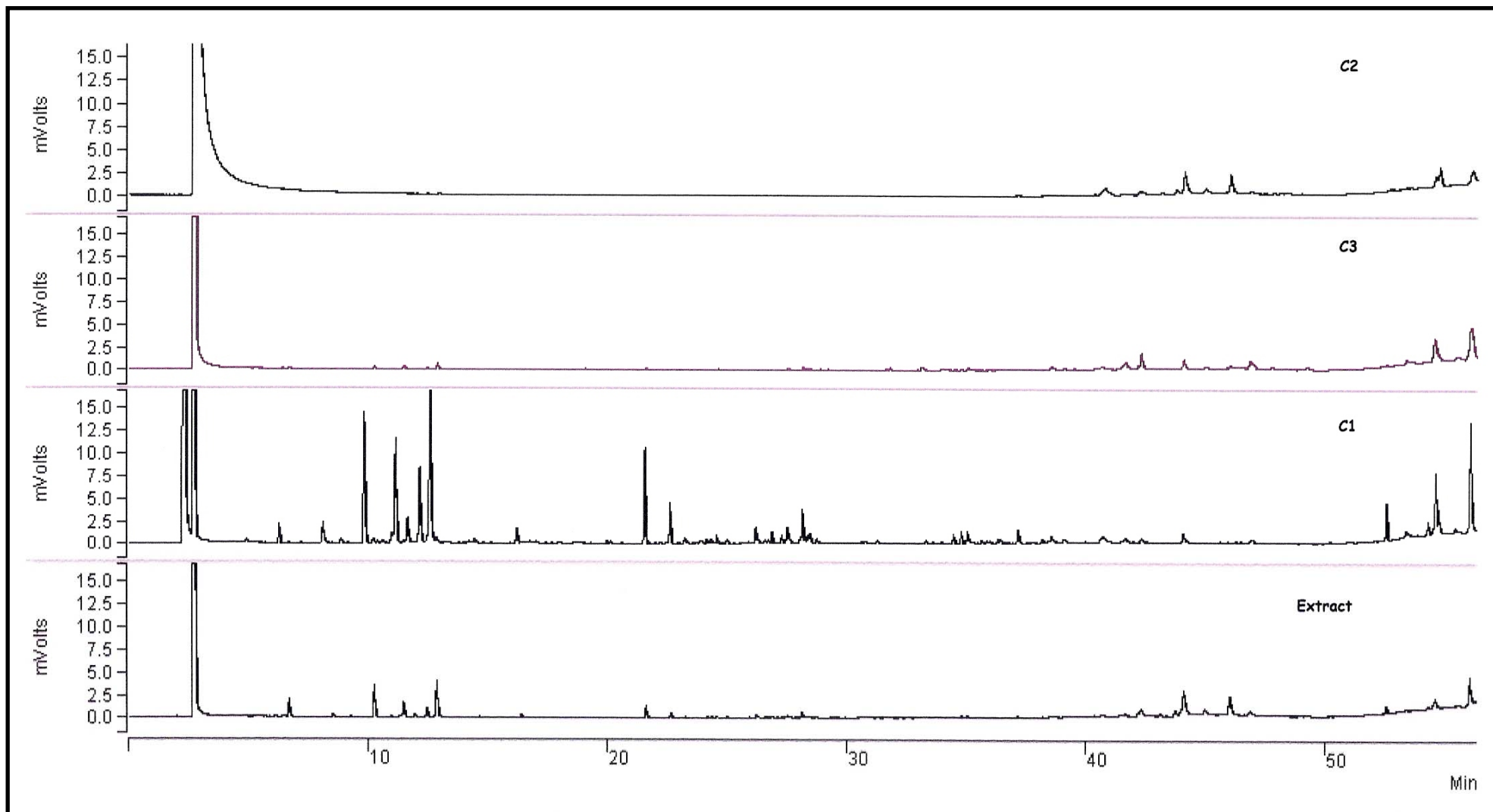


Figura 72. Cromatogramas GC del Extracto original y de los distintos ciclones tras el fraccionamiento PS-SFC en columna Diol en las siguientes condiciones: 130 bar, 80°C y 10% etanol.

## Caracterización Funcional de las fracciones aisladas

### A. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de las fracciones aisladas mediante PS-SFC se midió empleando el método del radical DPPH, tal como se describe en el capítulo 5.5.1. La Tabla 35 muestra los valores de  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los extractos SFE de romero original y de los ciclones en los que se detectó la presencia de compuestos antioxidantes (ciclones 2 y 3).

Tabla 35. Concentración de ácido carnósico (ppm) y concentración eficaz  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), medida por el método DPPH.

Muestra	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	HPLC-DAD (Ácido Carnósico ppm)
Extracto Original	6,52	670
Ciclón 2	5,34	740
Ciclón 3	19,1	74

Como se puede observar, todas las muestras poseen una importante actividad antioxidante, a juzgar por los reducidos valores de  $EC_{50}$  (menores de 20  $\mu\text{g/ml}$  en todos los casos), aunque con importantes diferencias entre ellos. Para el extracto original de romero y para la fracción recogida en el ciclón 2, a medida que aumenta la concentración de ácido carnósico, menor es el valor de  $EC_{50}$  obtenido. Estos resultados son, de hecho, similares a los encontrados en la bibliografía donde el ácido carnósico se ha descrito como el compuesto con mayor actividad antioxidante del romero (Cuvelier y col., 1996; Richheimer y col., 1996). A pesar de ello, los resultados del ciclón 3 (donde el contenido de ácido carnósico es de 74 ppm) no siguen el mismo patrón, por lo que es de esperar que existan efectos sinérgicos entre otros compuestos, presentes en el C3, que permitan predecir los valores de  $EC_{50}$  para este ciclón.

Para explicar este comportamiento, se utilizó un modelo basado en resultados previos de nuestro grupo (Cavero y col., 2005) que considera los efectos sinérgicos de compuestos tales como el ácido carnósico, el carnosato de metilo y el carnosol sobre el poder antioxidante, a partir de la siguiente ecuación ( $R^2$ : 0,95; Desviación estándar: 3,02):

$$EC_{50} = 64,422 - 0,501 \cdot (\text{Ácido carnósico}) - 3,998 \cdot (\text{carnosato de metilo}) - 0,694 \cdot (\text{carnosol})$$

Como puede observarse, todos los compuestos evaluados contribuyen negativamente a la ecuación, de manera que al incrementar el contenido de cualquiera de ellos en un extracto, los valores de  $EC_{50}$  disminuyen (aumentando la actividad antioxidante). Por tanto, la posible explicación para los resultados encontrados en el ciclón 3 estaría relacionada con el mayor contenido de carnosato de metilo en ese ciclón (que representa el 15% del área total de la misma).

## B. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Tal y como se comentó en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos, se eligieron tres microorganismos (una bacteria gram positiva (*Staphylococcus aureus*), una bacteria gram negativa (*Escherichia coli*) y una levadura (*Candida albicans*)) para realizar los ensayos de actividad antimicrobiana de las fracciones de romero obtenidas mediante PS-SFC. Los ensayos se llevaron a cabo mediante el método de microdiluciones calculando la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida, tal y como se detalla en el apartado 5.5.2 de la presente memoria. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 36.

Tabla 36. Actividad antimicrobiana de distintos extractos y patrones medida por el método MBC.

Muestra	MBC <sup>(1)</sup> S. aureus	MBC E. coli	MBC C. albicans
Extracto Original	0,6 mg/ml	0,75 mg/ml	1,5 mg/ml
Ciclón 1	0,9 mg/ml	1,25 mg/ml	1,75 mg/ml
Ciclón 2	0,35 mg/ml	0,5 mg/ml	0,9 mg/ml
Ciclón 3	0,7 mg/ml	0,75 mg/ml	1,25 mg/ml
Ácido carnósico	0,4 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
Borneol <sup>(2)</sup>	0,5 mg/ml	1,25 mg/ml	0,75 mg/ml
Alcanfor <sup>(2)</sup>	0,75 mg/ml	1,2 mg/ml	1,25 mg/ml
Linalol <sup>(2)</sup>	1,1 mg/ml	1 mg/ml	0,75 mg/ml
Verbenona <sup>(2)</sup>	1,25 mg/ml	1,6 mg/ml	1,25 mg/ml
1,8-cineol <sup>(2)</sup>	1,25 mg/ml	1,85 mg/ml	1,5 mg/ml
$\alpha$ -pineno <sup>(2)</sup>	1,25 mg/ml	2,15 mg/ml	1,75 mg/ml
Antibióticos de referencia <sup>(2)</sup>	10 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml

<sup>(1)</sup> MBC, Concentración bactericida mínima. Los valores se expresan en mg/ml para las muestras y  $\mu$ g/ml para los antibióticos.

<sup>(2)</sup> Datos a partir de trabajos previos del grupo de investigación (Santoyo y col., 2005).

Como se puede observar del análisis de los resultados de la Tabla 36, todas las fracciones recogidas en los diferentes ciclones (1, 2 y 3) muestran actividad antimicrobiana frente a los microorganismos seleccionados, con valores MBC del orden de 0,35-1,75 mg/ml. La fracción que presenta más actividad, en todos los casos, fue la recogida en el ciclón 2, seguida de la recogida en el ciclón 3. La fracción del ciclón 1 fue, en cambio, la menos activa. Comparando estos resultados con los obtenidos para el extracto SFE de romero original, sólo la fracción del ciclón 2 presenta una actividad antimicrobiana mayor (con un incremento alrededor del 40%).

*Staphylococcus aureus* se confirmó como el microorganismo más sensible al efecto de las fracciones, mientras que el menos sensible fue *Candida albicans*. Estos resultados coinciden, además, con los encontrados para el extracto original. Con el objetivo de explicar los valores de actividad antimicrobiana obtenidos para la fracción correspondiente al ciclón 2, y sabiendo que esta fracción está principalmente compuesta por ácido carnósico, se comprobó la actividad antimicrobiana de un patrón puro de ácido carnósico (Tabla 36). Los valores de MBC del ácido carnósico patrón fueron muy similares a los encontrados para la fracción recogida en el ciclón 2, lo que parece indicar que la actividad encontrada para esta fracción puede estar asociada a la presencia de ácido carnósico en la misma. Las pequeñas diferencias que existen entre los valores del patrón puro y de la fracción pueden atribuirse a la presencia de pequeñas cantidades de verbenona en la fracción purificada, cuya actividad antimicrobiana ya ha sido descrita previamente (Santoyo y col., 2005).

Con respecto a la fracción recogida en el ciclón 3, los valores de MBC descritos, similares a los del extracto original, pueden explicarse considerando que en esta fracción no existe un fraccionamiento real de la muestra sino que sigue existiendo una proporción de todos los compuestos que contenía el extracto original, aunque con una cantidad menor de ácido carnósico que la encontrada en el ciclón 2.

Por otro lado, a pesar de la presencia de compuestos oxigenados del tipo alcanfor, borneol o verbenona cuyas elevadas propiedades antimicrobianas han sido demostradas previamente (Santoyo y col., 2005; Pattnaik y col., 1997; Tabanca y col., 2001), la fracción recogida en el ciclón 1 presenta los valores más altos de MBC (peor actividad antimicrobiana) de todos los descritos. Este comportamiento se explica en base a la menor actividad antimicrobiana que presentan cada uno de estos compuestos de manera individual en comparación con la actividad del ácido carnósico (Tabla 36) junto con las pequeñas concentraciones de estos compuestos en la fracción purificada, como se comprobó mediante análisis por GC (Tabla 34).

#### 6.2.2.4.) Fraccionamiento de extractos supercríticos de romero en columna rellena con partículas de sílice impregnadas con fase estacionaria SE-54. Actividad antioxidante y antimicrobiana de las fracciones.

##### Fraccionamiento de los extractos SFE de romero mediante PS-SFC

Para la columna semipreparativa de fabricación propia SE-54 se realiza la separación del extracto SFE de romero en las mismas condiciones que para la columna anterior (temperatura de la columna, 80°C; presión de columna, 130 bar y 10% de etanol como modificador; otras condiciones de los ensayos: flujo másico total, 20 g/min; flujo CO<sub>2</sub>, 18 g/min; temperatura de los ciclones, 50°C). La Figura 73 muestra el perfil de retención del extracto SFE de romero y las ventanas de recogida seleccionadas para el aislamiento de los compuestos activos en distintos ciclones. El fraccionamiento fue el siguiente: Ciclón 1 (C1), del minuto 0 al minuto 5,00; Ciclón 3 (rechazo, C3), del minuto 5,00 al minuto 6,50 y Ciclón 2 (C2), del minuto 6,50 al minuto 14.

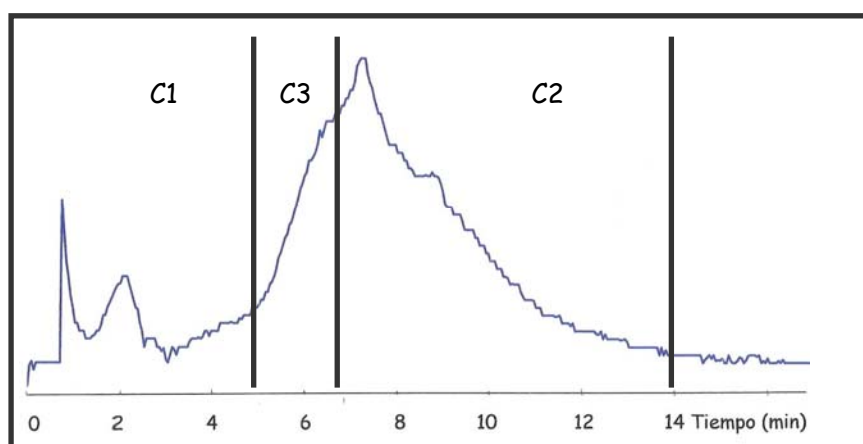


Figura 73. Fraccionamiento del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 10% etanol en tres ciclones diferentes (C1, C2 y C3).



Se realizaron 20 inyecciones sucesivas del extracto de romero para su separación y fraccionamiento mediante PS-SFC en los tres ciclones según las ventanas de tiempo seleccionadas (Figura 74), y entre cada una de las inyecciones se realizó una limpieza de 3 min/ciclón (9 minutos totales) que se recogieron y analizaron por separado para comprobar la ausencia de contaminación.

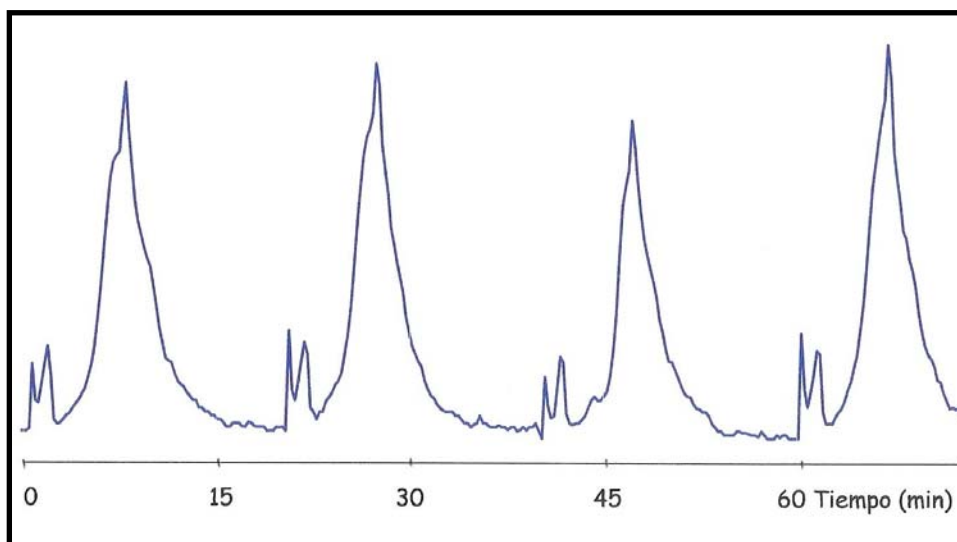


Figura 74. Fraccionamiento en inyecciones sucesivas del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 10% etanol en tres ciclones diferentes.

El contenido de los ciclones se recogió separadamente y se llevó a sequedad previo a su caracterización química y funcional.

#### **Caracterización Química de las fracciones aisladas**

Al igual que para la columna anterior, se llevó a cabo la caracterización química, mediante HPLC y GC, de las fracciones aisladas en los distintos ciclones para evaluar los resultados obtenidos en cuanto a enriquecimiento y selectividad del sistema. La Tabla 37 muestra la composición del extracto SFE inicial y de las tres fracciones (ciclones 1 al 3) purificadas, empleando el método de HPLC previamente descrito.

Tabla 37. Caracterización química mediante HPLC (area neta y % área) de los compuestos identificados en el extracto SFE de romero y en los tres diferentes ciclones (C1, C2, C3) después de la separación mediante PS-SFC en la columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 10% etanol.

Compuestos	t <sub>R</sub> (min)	Abs max (nm)	% Área Extracto	Área C1	Área (%) C1	Área C2	Área (%) C2	Área C3	Área (%) C3
Escutellareína	3,68	230, 275, 332	3,3	11.698.587	7,6	2.467.158	0,5	2.409.360	0,8
NI1	3,81	255	5,6	70.296.466	45,4	3.338.585	0,7	3.994.748	1,3
Isómero Rosmanol	4,42	230, 273	n.d.*	696.982	0,5	260.832	0,1	n.d.	n.d.
Genkwanina	4,92	230, 266, 334	2,9	28.810.425	18,6	4.705.232	1,0	4.878.885	1,6
Carnosol	10,20	232, 282	25,2	4.904.249	3,2	146.332.112	30,6	53.593.290	17,5
Isómero Carnosol	10,68	230, 280	1,5	n.d.	n.d.	20.380.586	4,3	27.630.955	9,0
NI	11,21	231, 424	0,8	8.428.262	5,4	9.267.010	1,9	15.403.241	5,0
NI 5	11,94	230, 284	2,5	2.035.039	1,3	52.900.528	11,1	30.070.845	9,8
NI	12,24	230, 266, 329	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	12,56	230, 267, 329	n.d.	1.164.556	0,8	7.888.503	1,6	3.123.137	1,0
Ácido Carnosico	14,40	239, 283	47,5	3.369.768	2,2	195.043.136	40,8	130.136.940	42,4
Carnosato metilo	17,12	231, 281	4,9	9.564.439	6,2	23.691.054	5,0	26.816.484	8,7
NI	19,45	230	5,3	13.900.238	9,0	11.821.660	2,5	8.911.860	2,9

n.d.\*: compuesto no detectado

Aunque los extractos originales de romero obtenidos mediante SFE son similares a los empleados en el fraccionamiento con la columna diol, se observan ligeras discrepancias en su composición, debidas, fundamentalmente, a transformaciones producidas durante la conservación del mismo. En cualquier caso, para poder realizar una comparación correcta, en cada caso se analiza el extracto empleado y se lleva a cabo su caracterización química mediante HPLC y GC. Así, por ejemplo, en el extracto empleado en el fraccionamiento con la columna SE-54 se detecta la presencia del isómero del carnosol (no detectado en el extracto empleado para la separación en la columna diol) y un mayor porcentaje de ácido carnósico.

Como puede observarse, el ciclón 1 contiene principalmente el compuesto NI1, la escutellareína y la genkwanina, así como distintas proporciones de otros compuestos, al igual que el C1 de la separación en columna Diol. El ciclón 3, que se consideró como rechazo para separar los compuestos obtenidos en los otros dos ciclones, contiene una mezcla de compuestos, intermedia entre el C1 y el C2 en contenido tanto de flavonoides como de diterpenos fenólicos. De entre estos compuestos, se identifican cantidades importantes de carnosol y ácido carnósico (562 ppm) que corresponde al comienzo de la salida del compuesto de la columna, tal y como se muestra en la Figura 101. En comparación con los dos ciclones anteriores, en el ciclón 2 se encontró el 60% del total de ácido carnósico y el 71% del total de carnosol, junto con un 39% del total de carnosato de metilo. Comparando con el extracto SFE de romero inicial, se incrementa el contenido en ácido carnósico en peso de 791 ppm a 836 ppm.

La Tabla 38 muestra la composición comparada del extracto SFE inicial frente a las tres fracciones (ciclones 1 al 3) purificadas, analizadas mediante GC. Como se puede observar, al igual que ocurría en la columna diol, es posible obtener un aislamiento selectivo de los compuestos del aceite esencial en el ciclón 1, mientras que sólo una pequeña parte de los compuestos se detecta en los ciclones 2 y 3 (aunque en una bastante menor concentración que el C1). Como ya se ha

comentado anteriormente, la posibilidad de concentrar el aceite esencial en el C1 permite la obtención de un extracto en el C2 sin aroma residual de romero, mejorando, de esta forma, las características organolépticas del ingrediente funcional obtenido. La Figura 75 muestra los cromatogramas de GC de las fracciones recogidas tras el fraccionamiento donde se puede observar esta tendencia.

Tabla 38. Caracterización química mediante GC (área neta, % área y concentración, Ci) de los compuestos identificados en el extracto de romero y en los tres diferentes ciclones (C1, C2, C3) después de la separación mediante PS-SFC en la columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 10% etanol.

Compuestos	t <sub>R</sub> (min)	% Área Extracto	Ci Extracto (mg/ml)	Área C1	Área (%) C1 (Ci, mg/ml)	Área C2	Área (%) C2 (Ci, mg/ml)	Área C3	Área (%) C3 (Ci, mg/ml)
α-Pineno	5,35	n.d. *	n.d.	3.075	0,3 (0,11)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,8-Cineol	6,71	10,2	0,06	62.853	6,7 (0,55)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Linalol	8,54	1,7	n.d.	19.010	2,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	8,98	n.d.	n.d.	4.917	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alcanfor	10,27	24,0	0,14	227.269	24,4 (1,90)	1.722	16,1 (0,01)	n.d.	n.d.
NI	10,65	n.d.	n.d.	6.145	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	11,00	n.d.	n.d.	9.001	1,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Borneol	11,51	11,9	0,06	98.958	10,6 (0,71)	1.032	9,7 (0,01)	n.d.	n.d.
Terpinen-4-ol	11,99	2,4	n.d.	26.615	2,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α-Terpineol	12,47	7,1	n.d.	64.762	6,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Verbenona	12,89	26,7	0,15	231.683	24,9 (1,69)	2.476	23,1 (0,02)	1.964	20 (0,01)
NI	16,07	n.d.	n.d.	11.428	1,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	20,38	n.d.	n.d.	4.104	0,4	1.208	11,3	1.365	13,9
NI	20,74	n.d.	n.d.	4.953	0,5	1.618	15,1	1.898	19,3
Transcariofileno	21,62	7,2	n.d.	65.653	7,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	22,67	2,8	n.d.	25.926	2,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	26,22	1,5	n.d.	13.485	1,4	1513	14,1	1.750	17,8
NI	26,61	n.d.	n.d.	10.988	1,2	1132	10,6	1.375	14
NI	27,57	1,5	n.d.	13.124	1,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	28,10	2,8	n.d.	27.917	3,0	n.d.	n.d.	1.470	15

n.d.\*: compuesto no detectado

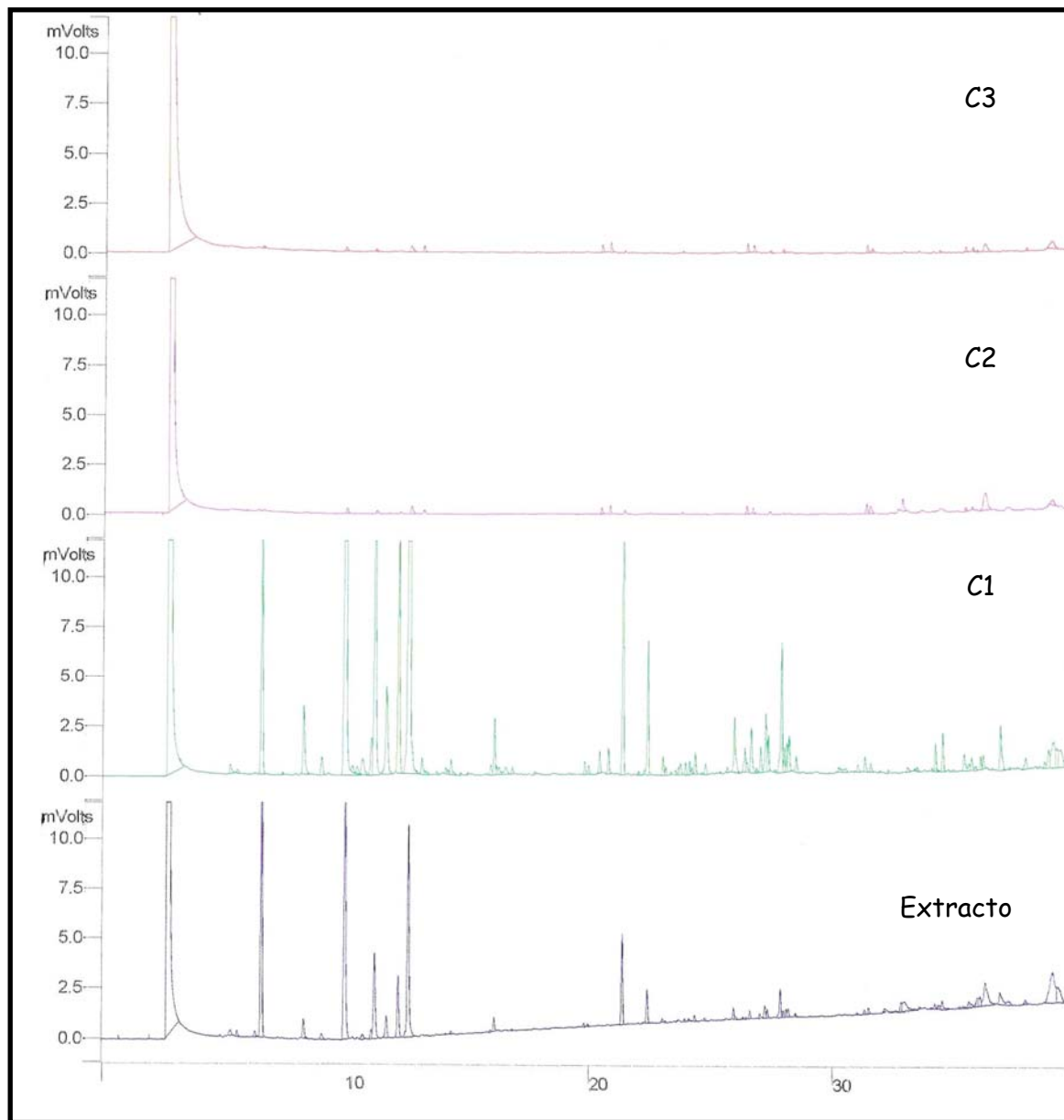


Figura 75. Cromatogramas GC del Extracto original y de los distintos ciclones tras el fraccionamiento PS-SFC en columna SE-54 en las siguientes condiciones: 130 bar, 80°C y 10% etanol.

## Caracterización Funcional de las fracciones aisladas

### A. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Al igual que para las fracciones recogidas empleando la columna comercial, se midió la actividad funcional de los extractos obtenidos en los distintos ciclones, empleando los métodos descritos anteriormente (Capítulo 5.5). La Tabla 39 muestra los valores de  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los extractos SFE de romero original y de los ciclones en los que se detectó la presencia de compuestos antioxidantes (ciclones 2 y 3).

Tabla 39. Concentración de ácido carnósico (ppm) y concentración eficaz  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), medida por el método DPPH.

Muestra	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	HPLC-DAD (Ácido Carnósico ppm)
Extracto Original	7,3	791
Ciclón 2	6,2	836
Ciclón 3	16,5	562

Los resultados obtenidos permiten deducir que todas las muestras poseen una importante actividad antioxidante, como ocurría con la columna Diol, a juzgar por los reducidos valores de  $EC_{50}$  (menores de 20  $\mu\text{g/ml}$  en todos los casos). El comportamiento, de hecho, es similar en los tres casos, de manera que al aumentar la concentración de ácido carnósico, disminuye el valor de  $EC_{50}$ . Estos resultados coinciden como los encontrados para los ciclones C1 y C2 de la recogida con la columna Diol y con la bibliografía, donde el ácido carnósico, como ya se comentó, ha sido descrito como el compuesto con mayor actividad antioxidante del romero. Las diferencias encontradas entre los ciclones C2 y C3 pueden deberse no sólo a la

diferencia de concentración de ácido carnósico sino también a la diferencia del contenido en carnosol y carnosato de metilo (Cavero y col., 2005), tal y como se ha descrito anteriormente.

## B. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados obtenidos para las concentraciones inhibitorias mínimas (MBC) de las fracciones aisladas, frente a los tres microorganismos seleccionados, se muestran en la Tabla 40.

Tabla 40. Actividad de distintos extractos y patrones medida por el método MBC.

Muestra	MBC <sup>(1)</sup> <i>S. aureus</i>	MBC <i>E. coli</i>	MBC <i>C. albicans</i>
Extracto Original	0,6 mg/ml	0,75 mg/ml	1,5 mg/ml
Ciclón 1	1 mg/ml	1,25 mg/ml	1,5 mg/ml
Ciclón 2	0,5 mg/ml	0,75 mg/ml	1 mg/ml
Ciclón 3	0,75 mg/ml	0,75 mg/ml	1 mg/ml
Ácido carnósico	0,4 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml

<sup>(1)</sup> MBC, Concentración bactericida mínima.

Al igual que sucedía para las fracciones aisladas con la columna comercial, todas las fracciones recogidas de los diferentes ciclones (1, 2 y 3) con la columna fabricada en nuestro laboratorio mostraron actividad antimicrobiana frente a los microorganismos seleccionados, con valores MBC del orden de 0,4-1,5 mg/ml. La fracción que presentó mayor actividad fue la recogida en el ciclón 2, seguida de la correspondiente al ciclón 3. La fracción del ciclón 1 fue, en cambio, la menos activa. Comparando estos resultados con los obtenidos para el extracto SFE de romero original, la fracción del ciclón 2 presenta una actividad antimicrobiana más alta que el extracto original, salvo para *E. coli*, cuya actividad es igual. La fracción del ciclón



C3 tiene un comportamiento muy parecido a la del extracto original (de hecho presentaron valores de MBC menores para *C. albicans*), mientras que la fracción del ciclón C1 presentó los valores más altos de  $EC_{50}$ .

*Staphylococcus aureus* se confirmó también como el microorganismo más sensible al efecto de las fracciones, siendo la menos sensible *Candida albicans*. Estos resultados coinciden, además, con los encontrados para el extracto original y para fracciones recogidas de la separación en la columna Diol. Los resultados obtenidos en este fraccionamiento (analizando los ciclones C2 y C3) están relacionados con el contenido en ácido carnósico, puesto que su comportamiento es muy similar al encontrado para la actividad antimicrobiana del ácido carnósico puro.

#### **Fraccionamiento de los extractos SFE de romero mediante PS-SFC con menor porcentaje de modificador**

En un intento por reducir el porcentaje de modificador empleado en el fraccionamiento de los extractos supercríticos de romero, se estudió, con la columna SE-54, la posibilidad de emplear un menor porcentaje de modificador. De esta manera, se seleccionaron las siguientes condiciones para el fraccionamiento: temperatura de la columna, 80°C; presión de columna, 130 bar; y 5% de etanol como modificador. (Otras condiciones de los ensayos: Flujo másico total, 20 g/min (Flujo  $CO_2$ , 19 g/min); temperatura de los ciclones, 30°C).

La Figura 76 muestra el perfil de retención del extracto SFE de romero y las ventanas de recogida seleccionadas para el aislamiento de los compuestos activos en distintos ciclones utilizando un 5% de etanol como modificador. El fraccionamiento fue el siguiente: Ciclón 1 (C1), del minuto 0 al minuto 13,00; Ciclón 3 (rechazo, C3), del minuto 13,00 al minuto 22,00 y Ciclón 2 (C2), del minuto 22,00 al minuto 34.

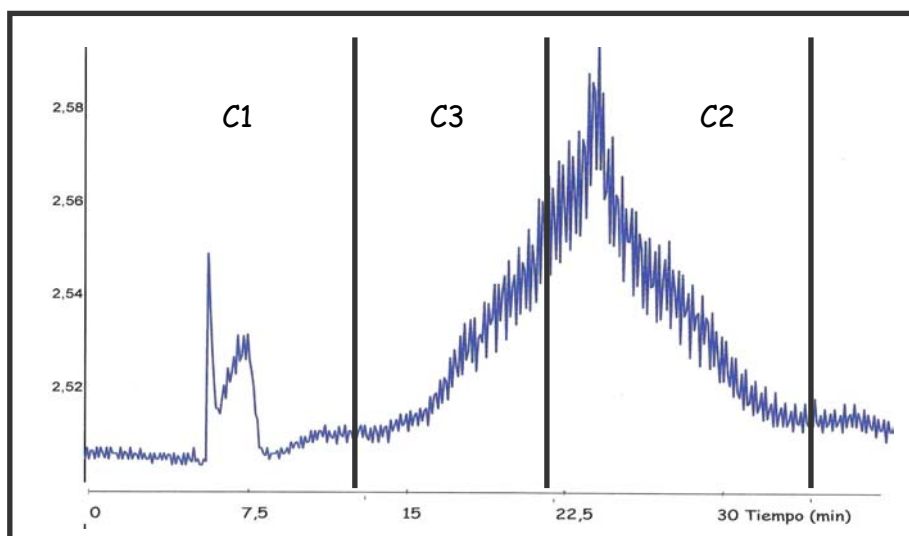


Figura 76. Fraccionamiento del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 5% etanol en tres ciclones diferentes (C1, C2 y C3).

Se realizaron 7 inyecciones sucesivas del extracto de romero para su separación y fraccionamiento mediante PS-SFC en los tres ciclones según las ventanas de tiempo seleccionadas (Figura 77), y entre cada una de las inyecciones se realizó una limpieza de 2 min/ciclón (6 minutos totales) que se recogieron y analizaron por separado para comprobar la ausencia de contaminación mediante HPLC y GC.

Como en los estudios anteriores, el contenido de los ciclones se recogió separadamente y se llevó a sequedad previo a su caracterización química y funcional.

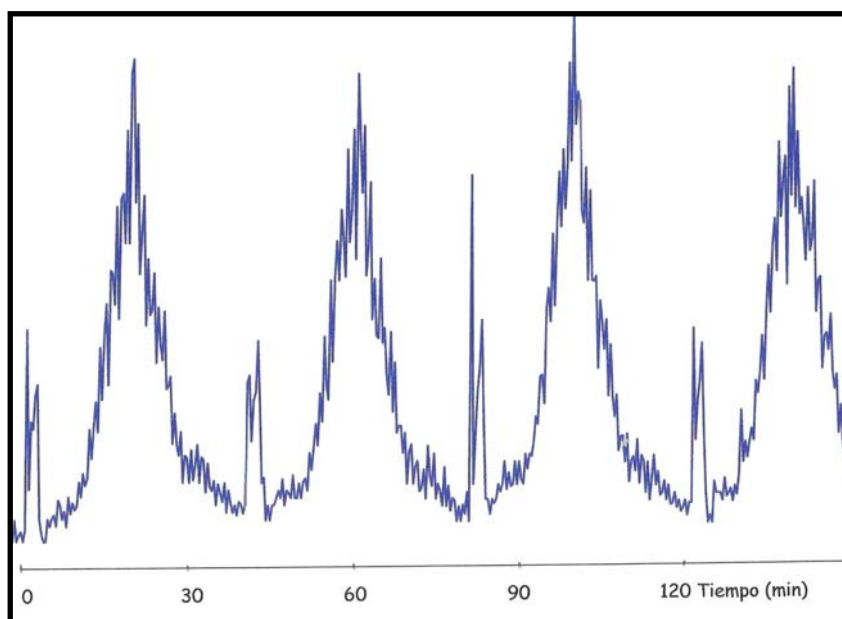


Figura 77. Fraccionamiento en inyecciones sucesivas del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 5% etanol en tres ciclones diferentes.

### Caracterización Química de las fracciones aisladas

La Tabla 41 muestra la composición del extracto SFE inicial y de las tres fracciones recogidas (ciclones 1 al 3), analizadas mediante HPLC en fase reversa. Como puede observarse, el ciclón 1 contiene principalmente el compuesto NI1 y carnosol, además de pequeñas proporciones de otros compuestos como escutellareína y ácido carnósico. El ciclón 3 tiene un alto contenido en ácido carnósico, carnosol, isómero de carnosol y el compuesto NI 5. En este caso se consigue un mejor fraccionamiento de los compuestos con menor tiempo de retención que son purificados en el primer ciclón frente a los diterpenos fenólicos que se recogen indistintamente en los ciclones C2 y C3. De hecho en este último ciclón se calcula que existe una concentración de 817 ppm de ácido carnósico.

Tabla 41. Caracterización química mediante HPLC (area neta y % área) de los compuestos identificados en el extracto SFE de romero y en los tres diferentes ciclones (C1, C2, C3) después de la separación mediante PS-SFC en la columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 5% etanol.

Compuestos	t <sub>R</sub> (min)	Abs max (nm)	% Área Extracto	Área C1	Área (%) C1	Área C2	Área (%) C2	Área C3	Área (%) C3
Escutellareína	3,68	230, 275, 332	3,4	4.829.663	9,7	4.193.795	0,8	7.067.434	1,23
NI1	3,81	255	4,5	10.774.205	21,6	8.925.606	1,6	10.113.102	1,75
Isómero Rosmanol	4,42	230, 273	0,1	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Genkwanina	4,92	230, 266, 334	2,4	n.d.	n.d.	9.688.402	1,8	8.000.213	1,39
Carnosol	10,20	232, 282	22,1	12.392.697	24,9	114.524.468	20,5	142.479.544	24,73
Isómero Carnosol	10,68	230, 280	1,7	3.809.162	7,6	72.216.864	12,0	74.870.016	12,78
NI	11,21	231, 424	1,4	4.857.005	9,7	11.495.495	2,1	18.926.564	3,29
NI 5	11,94	230, 284	3,4	4.428.241	8,9	63.161.038	11,3	88.777.144	15,40
NI	12,24	230, 266, 329	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.608.589	0,62
NI	12,56	230, 267, 329	0,4	n.d.	n.d.	4.594.094	0,8	n.d.	n.d.
Ácido Carnosico	14,40	239, 283	51,2	6.272.216	12,6	231.590.752	41,1	190.494.496	33,17
Carnosato metilo	17,12	231, 281	4,6	2.481.381	5,0	42.974.748	7,7	32.476.555	5,64
NI	19,45	230	4,7	n.d.	n.d.	1.819.380	0,3	n.d.	n.d.

n.d.\*: compuesto no detectado

En comparación con los ciclones 1 y 3, en el ciclón 2 se encontró el 54% del total de ácido carnósico y el 42% del total de carnosol, junto con un 55% del total de carnosato de metilo. Comparando con el extracto SFE de romero inicial, se incrementa el contenido en ácido carnósico en peso de 951 ppm a 991 ppm.

La Tabla 42 muestra la composición del extracto SFE inicial y de los 3 ciclones, analizadas mediante GC. Como se puede ver, en el ciclón 1 se han purificado los compuestos del aceite esencial frente al ciclón 2 (en el que sólo se detecta verbenona a baja concentración). En el ciclón 3, prácticamente se detectan los mismos compuestos que en el ciclón 1, aunque en menor concentración. Estos resultados son consistentes con los observados en los casos anteriores, empleando un mayor porcentaje de modificador y otra fase estacionaria.

Tabla 42. Caracterización química mediante GC (área neta, % área y concentración, Ci) de los compuestos identificados en el extracto de romero y en los tres diferentes ciclones (C1, C2, C3) después de la separación mediante PS-SFC en la columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 5% etanol.

Compuestos	t <sub>R</sub> (min)	% Área Extracto	Ci Extracto (mg/ml)	Área C1	Área (%) C1 (Ci, mg/ml)	Área C2	Área (%) C2 (Ci, mg/ml)	Área C3	Área (%) C3 (Ci, mg/ml)
α-Pineno	5,35	n.d. *	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,8-Cineol	6,71	10,2	0,06	6.390	6,2 (0,06)	n.d.	n.d.	3.098	7,0 (0,03)
Linalol	8,54	1,7	n.d.	2.078	2,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	8,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alcanfor	10,27	24,0	0,14	22.350	21,8 (0,19)	n.d.	n.d.	11.271	25,3 (0,09)
NI	10,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	11,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Borneol	11,51	11,9	0,06	11.326	11,0 (0,08)	n.d.	n.d.	5.639	12,7 (0,04)
Terpinen-4-ol	11,99	2,4	n.d.	2.626	2,6	n.d.	n.d.	1.173	2,6
α-Terpineol	12,47	7,1	n.d.	7.891	7,7	n.d.	n.d.	3.746	8,4
Verbenona	12,89	26,7	0,15	26.063	25,4 (0,19)	1.730	100 (0,01)	12.996	29,2 (0,10)
NI	16,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	20,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	20,74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Transcariofileno	21,62	7,2	n.d.	7.116	6,9	n.d.	n.d.	3.605	8,1
NI	22,67	2,8	n.d.	2.796	2,7	n.d.	n.d.	1.363	3,1
NI	26,22	1,5	n.d.	1.507	1,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	26,61	n.d.	n.d.	1.777	1,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	27,57	1,5	n.d.	3.640	3,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	28,10	2,8	n.d.	7.116	6,9	n.d.	n.d.	1.628	3,7

n.d.\*: compuesto no detectado

## Caracterización Funcional de las fracciones aisladas

### A. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La Tabla 43 muestra los valores de  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los extractos SFE de romero original y de los ciclones 2 y 3, donde se detectó la presencia de compuestos antioxidantes.

Tabla 43. Concentración de ácido carnósico (ppm) y concentración eficaz  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), medida por el método DPPH.

Muestra	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	HPLC-DAD (Ácido Carnósico ppm)
Extracto Original	8,36	951
Ciclón 2	8,03	991
Ciclón 3	7,3	817

Los resultados permiten observar que todas las muestras poseen una importante actividad antioxidante, como en el resto de fraccionamientos descritos en esta tesis, a juzgar por los reducidos valores de  $EC_{50}$  (menores de  $10 \mu\text{g/ml}$  en todos los casos). Puesto que el ácido carnósico ha sido descrito como el compuesto de mayor actividad antioxidante de los extractos de romero, se puede decir que las altas concentraciones de este compuesto encontradas en las fracciones de los ciclones C2 y C3 son las responsables de su potente actividad antioxidante, siguiendo, para el ciclón 2, una correlación inversa. En cambio, para el C3 el comportamiento no es el mismo ya que aunque contiene una menor concentración de ácido carnósico, su actividad antioxidante es mayor. Este hecho puede atribuirse, como ya se ha comentado, a sinergias entre el ácido carnósico, el carnosol y el carnosato de metilo (Cavero y col., 2005). En este sentido, el contenido en carnosol en el ciclón 3 es algo mayor que para el C2, siendo el contenido en ácido carnósico y carnosato de metilo muy parecidos.

## B. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados de la actividad antimicrobiana de las distintas fracciones se recogen en la Tabla 44 donde se observan que todas las fracciones recogidas en los diferentes ciclones (1, 2 y 3) muestran actividad antimicrobiana frente a los microorganismos seleccionados, con valores MBC del orden de 0,4-1,5 mg/ml. En este caso, la fracción que presenta más actividad es la recogida en el ciclón 2, seguida de la recogida en el ciclón 3.

Tabla 44. Actividad de distintos extractos y patrones medida por el método MBC.

Muestra	MBC <sup>(1)</sup> <i>S. aureus</i>	MBC <i>E. coli</i>	MBC <i>C. albicans</i>
Extracto Original	0,6 mg/ml	0,75 mg/ml	1,5 mg/ml
Ciclón 1	1 mg/ml	1,25 mg/ml	1,5 mg/ml
Ciclón 2	0,4 mg/ml	0,6 mg/ml	1 mg/ml
Ciclón 3	0,5 mg/ml	0,75 mg/ml	1 mg/ml
Ácido carnósico	0,4 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml

<sup>(1)</sup> MBC, Concentración bactericida mínima.

Comparando estos resultados con los obtenidos para el extracto SFE de romero original, la fracción del ciclón 2 presenta una actividad antimicrobiana más elevada que el extracto original (con un incremento alrededor del 30 al 50%). La fracción del C3 tiene un comportamiento intermedio entre el extracto original y la fracción del C2. El C1, sin embargo, tiene unas actividades inferiores al extracto original, excepto para *C. albicans*, con valores similares.

En cuanto a la actividad frente a los distintos microorganismos, se puede observar que *Staphylococcus aureus* es el microorganismo más sensible al efecto de las fracciones, siendo el menos sensible *Candida albicans*. Estos resultados



coinciden con los encontrados para el extracto original y para las fracciones recogidas de las separaciones anteriores.

Los resultados encontrados para las fracciones de los ciclones C2 y C3 están relacionados con el contenido en ácido carnósico, puesto que el comportamiento es muy similar al encontrado para la actividad antimicrobiana del ácido carnósico puro. Tan sólo para *E. coli* las actividades de las fracciones son ligeramente inferiores a la actividad del carnósico puro, lo que puede indicar que este compuesto es el principal responsable de la actividad antimicrobiana en bacterias gram negativas.

#### **6.2.2.5.) Comparación de columnas.**

En este capítulo se ha demostrado la aplicabilidad de la PS-SFC para el fraccionamiento de muestras complejas con el objetivo de obtener fracciones enriquecidas en compuestos con actividades biológicas interesantes para la industria alimentaria y farmacéutica. Para ello se ha llevado a cabo un trabajo experimental que permite la selección de la combinación fase estacionaria-fase móvil más apropiada, para el fraccionamiento óptimo de extractos de romero desde el estudio a nivel analítico hasta escala reparativa.

Así, en este capítulo se han caracterizado columnas rellenas con partículas de sílice impregnadas con fases estacionarias de distinta polaridad. Esto ha implicado un desarrollo de la metodología para rellenar y caracterizar estas columnas, no sólo a nivel analítico sino también semipreparativo.

El trabajo desarrollado con los extractos de romero ha permitido obtener fracciones de composición química y funcional distinta, con separaciones rápidas y reproducibles y con un uso muy reducido de modificadores. Gracias a las separaciones mediante PS-SFC se obtienen fracciones sin aroma, con unas

actividades antioxidante y antimicrobiana más potentes que el extracto de partida, de gran interés para la industria de los ingredientes alimentarios funcionales.

Finalmente, si se consideran las ventajas de esta técnica frente a otras, como por ejemplo la PS-HPL, se puede decir que los procesos de PS-SFC suponen un avance desde el punto de vista medioambiental e incluso de costes industriales, debido, fundamentalmente, al uso reducido de disolventes orgánicos, a las posibilidades de modulación de densidad de los fluidos supercríticos, a la facilidad de recuperación de las fracciones obtenidas, y a la posibilidad de reutilización de la fase móvil.

## 7.) RESUMEN DE RESULTADOS

### **Sobre el diseño y caracterización de nuevas columnas para cromatografía supercrítica preparativa.**

1.- Se han conseguido rellenos de polaridad ajustada gracias al desarrollo de un método para la impregnación de partículas de sílice de 10  $\mu\text{m}$  con distintos porcentajes de fases estacionarias líquidas. Estos materiales se han empleado para la obtención de columnas de acero especialmente diseñadas para la separación a escala analítica (500  $\mu\text{m}$  x 25 cm) y preparativa (10 mm x 25 cm). Se ha desarrollado un método especial de empaquetado para columnas preparativas combinando  $\text{CO}_2$  supercrítico y slurry.

2.- Los estudios de eficacia y actividad superficial permitieron confirmar la correcta desactivación de las columnas que permitió la separación de mezclas complejas con compuestos de naturaleza polar.

3.- A partir de resultados analíticos y cálculos teóricos de escalado se desarrollaron columnas preparativas con partículas impregnadas de polaridad específica que permitieron abordar estudios de fraccionamiento y enriquecimiento de compuestos biológicamente activos a partir de matrices de muy diversa naturaleza.

### **Sobre la optimización de los mecanismos de la separación para obtener la necesaria capacidad de resolución.**

1.- El método de análisis mediante SFC analítica desarrollado para extractos de aceites permitió la separación e identificación de los principales compuestos de muestras de aceites empleando  $\text{CO}_2$  puro (en ausencia de modificadores) y una fase

estacionaria de polaridad ajustada. Se consiguió, además, la completa separación de los isómeros de tocoferol en condiciones isocráticas y en ausencia de modificadores.

2. Los análisis de los desodorizados de aceites de semillas y de oliva permitieron obtener, de forma rápida, un perfil de su contenido lipídico y de la naturaleza y concentración de aquellos compuestos susceptibles de ser extraídos y/o enriquecidos.

3.- Los estudios teóricos y el modelado experimental termodinámico llevados a cabo con ácido carnósico permitieron determinar la baja solubilidad del mismo en  $CO_2$  supercrítico. Estos datos fueron tomados como punto de partida para la optimización de las condiciones de separación analítica por SFC con  $CO_2$  puro.

4.- El estudio de las interacciones del ácido carnósico (compuesto modelo), para cada una de las columnas con partículas impregnadas de diferentes fases estacionarias, permitió seleccionar las condiciones de máxima selectividad para el fraccionamiento de extractos de romero.

**Sobre el desarrollo de procesos de obtención de ingredientes funcionales naturales a partir de aceite vegetales y plantas, aplicando las columnas y mecanismos diseñados y optimizados.**

1.- Se desarrolló un método de obtención de ingredientes funcionales a partir de aceites vegetales mediante PS-SFC en ausencia de modificador empleando una columna con partículas impregnadas con fase estacionaria polietilenglicol (CW20M). En este proceso se consiguió el aislamiento de trece fracciones, cuatro de las cuales contenían una elevada pureza de los siguientes compuestos funcionales: escualeno (97% en la F1), ésteres de esterol (casi 97% en

la F4),  $\gamma$ -tocoferol (25% en la F9) y  $\delta$ -tocoferol junto con esteroides (40% y 12% respectivamente). Este proceso se optimizó empleando un mínimo porcentaje de etanol como modificador permitiendo reducir el tiempo total de fraccionamiento de más de 100 minutos a 45 minutos. De esta manera se obtuvieron fracciones enriquecidas en: escualeno y ésteres de esteroles (23% y 48% respectivamente en la F2),  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferol (casi 80% en la F3) y esteroides libres puros (99,4% en la F5).

2.- Se desarrolló un método de fraccionamiento de extractos de romero en dos columnas, una comercial (diol), y otra de polaridad controlada (SE-54), mediante PS-SFC con un 10% de etanol que permitió obtener una fracción enriquecida (C2) en ácido carnósico, carnosol y carnosato de metilo. Esta fracción poseía una mayor actividad antioxidante y antimicrobiana que el extracto de partida (un 20% más actividad antioxidante y un 40% más actividad antimicrobiana). En la fracción correspondiente al C1 se consiguió un aislamiento selectivo de los compuestos del aceite esencial de romero.

3.- Se optimizó el método de fraccionamiento de los extractos de romero mediante PS-SFC, empleando una columna con partículas impregnadas SE-54, minimizando el uso de modificador y se observó que empleando un 1% de etanol era posible obtener dos fracciones enriquecidas en los compuestos activos cuya actividad antioxidante y antimicrobiana era mayor que el extracto de partida.

## 8.) SUMMARY OF RESULTS

**Related to the design and characterization of new columns to be used in PS-SFC.**

1.- New specially designed packing materials have been obtained using a new method for coating 10  $\mu\text{m}$  silica particles with different percentages of liquid stationary phases. These new materials have been employed to build stainless steel columns of special dimensions to be used at analytical (500  $\mu\text{m}$  x 25 cm) and preparative scale (10 mm x 25 cm). A new method has been developed to pack preparative columns for SFC combining supercritical  $\text{CO}_2$  and slurry.

2.- Studies of efficiency and surface activity confirmed the appropriate deactivation of the columns and its usefulness to separate complex mixtures with containing polar compounds.

3.- From analytical results and theoretical calculations of scaling up it was posible to develop preparative SFC columns with specially designed particles that allowed to perform fractionation studies of biologically active compounds in complex matrices.

**Related to the optimization of the separation mechanisms in SFC.**

1.- The analytical SFC method developed for oil extracts allowed the separation and identification of the main compounds of the simples, using pure  $\text{CO}_2$  (no modifiers) and a specially designed stationary phase. The separation of tocopherol isomers was achieved without modifiers.

2. The separation by SFC of deodorized distillates from seeds and olive oil provide a quick tool to know their lipidic profile along with the nature and concentration of active compounds.

3.- The theoretical and experimental thermodynamic modelling of carnosic acid solubility in  $CO_2$  provided the necessary information to optimize the separation conditions by SFC with pure  $CO_2$ .

4.- The study of the interactions between carnosic acid and the different designed columns allowed the selection of the conditions of maximum selectivity to fractionate rosemary extract.

**Related to the development of fractionation processes using PS-SFC to isolate functional ingredients from vegetable oils and plants.**

1.- A method to obtain functional ingredients from vegetable oils using PS-SFC without modifier was developed using a specially designed column with particles coated with polyethylene glycol (CW-20M). In this process, 13 fractions were separated, four of them with high purity in some of the active compounds: squalene (97%, F1), sterol esters (97%, F4),  $\gamma$ -tocopherol (25%, F9) and  $\delta$ -tocopherol plus sterols (40% and 12%, respectively). This process was further optimized to reduce the total fractionation time (from 100 to 45 min) using a minimum amount of ethanol as modifier. Several fractions were obtained with important enrichments: squalene and sterol esters (23% y 48%, respectively, F2),  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocopherol (80%, F3) and pure sterols (99,4%, F5).

2.- A new method to fractionate rosemary extracts using PS-SFC was developed. Two different columns were studied, a commercial diol column and a designed column with SE-54 (medium polarity). Separation was achieved using 10% ethanol as modifier allowing to obtain a fraction (cyclone 2) enriched in carnosic

acid, carnosol and methyl carnosate. This fraction had a higher antioxidant and antimicrobial activity (20% and 40% higher, respectively) compared to the original extract. Also, it was possible to isolate the essential oil fraction in cyclone 1.

3.- The above mentioned method was optimized by reducing the amount of modifier (and using the SE-54 column) to 1% ethanol. It was possible then to obtain 2 fractions enriched in active compounds which activity was higher than the original extract.



## 9.) CONCLUSIONES

1.- La impregnación de partículas de sílice con distintas fases estacionarias de polaridad controlada mediante lecho fluidizado con helio y posterior entrecruzamiento en rampa de temperatura de 50°C a 160°C (5°C/min), permite obtener columnas analíticas y preparativas eficaces, de baja actividad superficial, con una amplia variedad de películas de fase líquida de alta estabilidad, aptas para la separación supercrítica de mezclas complejas de compuestos de naturaleza polar.

2.- Mediante SFC en columnas con rellenos impregnados de fase CW-20M y en rampa de presión de 150 (5 min) a 370 bar (10 bar/min) es posible separar, tanto a nivel analítico (60°C) como preparativo (40°C), mediante CO<sub>2</sub> como fase móvil y sin modificador, los principales componentes de los desodorizados de los aceites vegetales.

3.- En las siguientes condiciones: rampa de presión de 150 (5 min) a 370 bar (10 bar/min) y 40°C se puede obtener, a partir de aceites vegetales, escualeno (con pureza de hasta el 97%), ésteres de esterol (con pureza de hasta el 97%),  $\gamma$ -tocoferol (con pureza de hasta el 25%) y  $\delta$ -tocoferol junto con esteroides (con pureza de hasta el 40% y 12% respectivamente). Este proceso se optimizó empleando un mínimo porcentaje de etanol como modificador permitiendo reducir el tiempo total de fraccionamiento de más de 100 minutos a 45 minutos. De esta manera se obtuvieron fracciones enriquecidas en: escualeno y ésteres de esterol (23% y 48% respectivamente en la F2),  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferol (con pureza de hasta el 80%) y esteroides libres puros (con pureza de hasta el 99,4%).

4.- Las mejores condiciones, en lo que se refiere a selectividad para fraccionamiento de extractos de romero a nivel analítico y en ausencia de

modificador se dedujeron a partir del estudio de las interacciones del ácido carnósico con partículas impregnadas de diferentes fases estacionarias, siendo dichas condiciones las siguientes: columna con partículas impregnadas de fase SE-54 en rampa de presión de 150 a 370 bar (10 bar/min) y temperatura de 100°C.

5.- Mediante PS-SFC a 130 bar, 80°C y con un 10% de etanol como modificador, es posible fraccionar extractos de romero en dos columnas, una comercial (diol), y otra de polaridad controlada (SE-54), obteniéndose una fracción enriquecida en ácido carnósico, carnosol y carnosato de metilo. Esta fracción obtenida a partir del fraccionamiento en la columna diol es un 20% más antioxidante y un 40% más antimicrobiana que el extracto de partida. Este proceso se optimizó en la columna SE-54 empleando un mínimo porcentaje de etanol como modificador, lo que tiene importantes ventajas para el escalado del proceso en términos de costes y residuos, permitiendo obtener una mejora de un 13% en actividad antioxidante y una actividad antimicrobiana más elevada (con un incremento alrededor del 30 al 50%) que el extracto original.

## 10.) CONCLUSIONS

1.- A process for coating and packing silica particles with different stationary phases of adjusted polarity, based in the use of a fluidized bed with helium and crosslinking by heating from 50°C to 160°C (5°C/min), has been developed. Efficient analytical and preparative columns, with low-surface activity and a wide range of different liquid stationary phases with high stability, have been obtained. These columns can be advantageously used to separate complex mixtures containing polar compounds.

2.- The fractionation of deodorized oils in their main components by SFC with coated packed CW-20M columns has been achieved at analytical and preparative scale using the following conditions: pressure program 150 (5 min) to 370 bar (10 bar/min), neat CO<sub>2</sub> as mobile phase (without modifier), 60°C (analytical scale) or 40°C (preparative scale).

3.- Under certain conditions: pressure program from 150 (5 min) to 370 bar (10 bar/min) and 40°C, the following fractions can be obtained from a deodorized oil: squalene (purity up to 97%), sterol esters (purity up to 97%),  $\gamma$ -tocopherol (purity up to 25%) and  $\delta$ -tocoferol together with sterols (purity up to 40% and 12%, respectively). The process was optimized using a minimum amount of modifier, which allowed reducing the total analysis time from more than 100 minutes to 45 minutes. The fractions enriched were: squalene and sterol esters (23% and 48%, respectively),  $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ -tocoferol (purity up to 80%) and free sterols (up to 99,4%).

4.- The best conditions, in terms of selectivity for the fractionation of rosemary extracts at analytical scale without modifier were deduced studying the interactions between carnosic acid and particles coated with different stationary

phases. These conditions were: column packed with particles coated with SE-54 stationary phase, pressure program from 150 to 370 bar (10 bar/min) and 100°C.

5.- It is possible to separate rosemary extracts by PS-SFC at 130 bar, 80°C and 10% of ethanol as modifier in two different columns: one commercial (diol) and one with adjusted polarity (SE-54) to obtain a fraction enriched in carnosic acid, carnosol and methyl carnosate. From fractionation in diol column, this fraction has an improvement of about 20% and 40% of antioxidant and antimicrobial activity respectively compared to the original extract. The process has also been optimized in an SE-54 column using a minimum amount of modifier (5%), which has important advantages for scaling up the process in terms of costs and residues, allowing an improvement of about 13% of antioxidant activity and a higher antimicrobial activity (about 30-50%) compared to the original extract.

## 11.) BIBLIOGRAFÍA

**Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., Zilberg, D.** *Use of Rosmarinus officinalis as a treatment against Streptococcus iniae in tilapia.* *Aquaculture*, 238 (2004), 97-105.

**Alkio M., Gonzalez C., Jäntti M., Aaltonen O.** *Purification of polyunsaturated fatty acid esters from tuna oil with supercritical fluid chromatography.* *J. American Oil Chemists Society*, 77 (2000), 315-321.

**Alkio, M., Harvala, T., Kompa, V.** *Preparative scale supercritical fluid chromatography.* 1<sup>st</sup> Int. Symposium on Supercritical Fluids, Nice (France), 1988, edited by M. Perrut, ISBN 2-905267-13-5, 389-396.

**Ames, B.N.** *Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases.* *Science*, 221 (1983), 1256-1264.

**Anadon, A., Martínez-Larranaga, R.M.** *Factors increasing the toxicity of anticoccidial ionophores in poultry.* *Revue de Medecine Veterinaire*, 141 (1990), 17-24.

**Andrews, T.** *Phyl. Trans. Roy. Society*, 159 (1869), 575.

**Awad, A.B., Chen, Y.C., Fink, C.S., Hennessey, T.** *Beta-Sitosterols inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids.* *Anticancer Res.*, 16 (1996), 2792-2804.

**Awad, A.B., Downie, A.C., Fink, C.S.** *Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by beta-sitosterol treatment on MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture.* *Int. J. Mol. Med.*, 5 (2000), 541-545.

**Basaga, H., Tekkaya, C., Acikel, F.** *Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract.* *Lebensm. Wiss. Technol.*, 30 (1997), 105-108.

**Berger T. A., Wilson W.H.** *Analytical Chemistry*, 65 (1993), 1451-1455.

**Berger, C., Perrut, M.** *Preparative SFC.* *J. Chromatography*, 505 (1990), 37-43.

**Block, G., Langseth, L.** *Antioxidant vitamins and disease prevention.* *Food Technology*, 48 (1994), 80-85.

**Bober, K.M., Akerlund, J.-E., Bjorkhem, I.** *Effect of sitosterol on the rate-limiting enzymes in cholesterol synthesis and degradation.* *Lipids*, 24 (1989), 9-12.

**Bondioli P., Mariani C., Fedell E., Mossa A., Muller A.** *Lampante olive oil refining with supercritical carbon dioxide.* *J. American Oil Chemists Society*, 69 (1992), 477-480.

**Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset., C.** *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.* *Lebens. Wiss. Technol.*, 28 (1995) 25-30.

**Brieskorn, C.H., Fuchs, A., Bredenberg, J.B., McChesney, J.D., Wenkert, E.** *The structure of carnosol.* *J. Org. Chem.*, 29 (1966), 2293.

**Brunner G.** *Gas Extraction.* Steinkopff Darmstadt (1994) ISBN 3-7985-0944-1, 358-375.

**Brunner G..** *Fractionation of fats with supercritical carbon dioxide.* *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 102 (2000), 240-245.

**Brunner, G.** *Supercritical fluids: technology and application to food processing.* J.

Food Eng., 67 (2005), 21.

**Brunner, G., Reichmann, F.** *Process for recovering unsaturated fatty acid and derivatives thereof*, (1998). U.S. Patent 5.777.141.

**Burger, W.C., Qureshi, A.A., Din, Z.Z., Abuirmeileh, N., Elson, C.E.** *Suppression of cholesterol biosynthesis by constituents of barley kernel. Atherosclerosis*, 51 (1984), 75-87.

**Buskov S., Hasselstrom J., Olsen C.E., Sorensen H., Sorensen J.C. (b).** *Supercritical fluid chromatography as a method of analysis for the determination of 4-hydroxybenzylglucosinolate degradation products. J. Biochem. Biophys. Methods*, 43 (2000), 157-174.

**Buskov S., Olsen C.E., Sorensen H., Sorensen S. (a).** *Supercritical fluid chromatography as basis for identification and quantitative determination of indol-3-hydroxymethyl oligomers and ascorbigens. J. Biochem. Biophys. Methods*, 43 (2000), 175-195.

**Carbin, B.E., Larsson, B., Lindahl, O.** *Treatment of benign prostatic hyperplasia with phytosterols. Br. J. Urol.*, 66 (1990), 639-41.

**Catchpole, O.J., Von Kamp, J.C., Grey, J.B.** *Extraction of squalene from shark liver oil in a packed column using supercritical carbon dioxide. Ind. Eng. Chem. Res.*, 36 (1997), 4318-4324.

**Cavero, S., Jaime, L., Martín-Álvarez, P.J., Señoráns, F.J., Reglero, G., Ibáñez, E.** *In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (Rosmarinus officinalis L.). Eur. Food Res. Technol.*, 221 (2005), 478-486.

**Cháfer, A., Fornari, T., Berna, A., Ibáñez, E., Reglero, G.** *Solubility of solid carnosic acid in supercritical CO<sub>2</sub> with ethanol as a co-solvent.* J. Supercritical Fluids, 34 (2005), 323-329.

**Chaibi, A., Ababouch, L.H., Belasri, K., Boucetta, S., Busta, F.F.** *Inhibition of germination and vegetative growth of Bacillus cereus T. and Clostridium botulinum 62 A spores by essential oils.* Food Microbiol., 14 (1997), 161.

**Chester, T. L., Pinkston, J. D.** *Supercritical fluid and unified chromatography.* Anal. Chem., 74 (2002), 2801-2812.

**Chester, T. L., Pinkston, J. D., Raynie, D. E.** *Supercritical fluid chromatography and extraction.* Anal. Chem., 68 (1996), 487R-510R.

**Chester, T.L., Pinkston, J.D.** *Supercritical fluid and unified chromatography.* Anal. Chem., 76 (2004), 4606-4613.

**Child, P., Kuksis, A.** *Investigation of the role of micellar phospholipid in the preferential uptake of cholesterol over sitosterol by dispersed rat jejunal villus cells.* Biochemistry and Cell Biology, 64 (1986), 847-853.

**Chipault, J.R., Muzumo, G.R., Hawkins, J.M., Lundberg, W.O.** *The antioxidant properties of natural spices.* Food Res., 17 (1952), 46.

**Coleman, K., Boutant, R.; Verillon, F.** *Practical aspects of preparative supercritical fluid chromatography.* Gordon & Breach Science Publishers. UK (1999).

**Cully J., Schütz E., Vollbrecht H.R.** (1990). Eur. Patent Application 0363971.



**Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C.** *Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary.* J. American Oil Chemists Society, 73 (1996), 645-652.

**De Fillipi R.P., Krukonis V.J., Robey R.J., Modell M.** *Supercritical fluid regeneration of activated carbon for adsorption of pesticides.* En *Supercritical Fluid Extraction*, Mc Hugh, M.A. y Krukonis, V.A., Eds., (1980).

**De Stefani, E., Boffeta, P., Ronco, A.L.** *Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay.* Nutr. Cancer, 37 (2000), 140-144.

**De Weerd, M.; Dewale, C.; Verzele, M.; Sandra, P.** *Packing material activity in packed capillary column SFC.* J. High Resol. Chromatogr., 13 (1990), 40-46.

**Del Valle J.M.; Aguilera J.M.** (1999). *High pressure CO<sub>2</sub> extraction. Fundamentals and applications in the food industry.* Food Science Technology International, 5 (1999), 1-24.

**Demmig-Adams, B., Adams, W.W.** *Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition.* Science, 298 (2002), 2149-2153.

**Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S., Cabezudo, M.D.** *Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices. Comparison with simultaneous distillation-extraction.* J. Chromatography A, 947 (2002), 23-29.

**Dingenen, J.** *Columns and packing methods.* Analisis Magazine, 26 (1998), 18.

**Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid, M.B.** *Scientific Concepts of Functional Foods In Europe: Consensus Document.* Brit. J. Nutr. 81 (1999), S1-S27.

**Djarmati, Z., Jankov, R.M., Schwirtlich, E., Djulinac, B., Djordjevic, A.** *High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO<sub>2</sub> extraction.* JAOCS, 68 (1991), 731-737.

**Doguet L., Perrut M.** Proceedings 2<sup>nd</sup> Int. Symp. on supercritical fluids, editado por M. Mc Hugh. Boston, Johns Hopkins Univ., Baltimore, USA, (1991), 441-443

**Draper, H.H., Bird, R.P.** *Antioxidants and cancer.* J. Agric. Food. Chem., 32 (1984), 433-435.

**Dreon, D.M., Fernstrom, H.A., Williams, P.T., Krauss, R.M.** *A very low-fat diet is not associated with improved lipoprotein profiles in men with a predominance of large, low-density lipoproteins.* Am. J. Clin. Nutr., 69 (1999), 411-418.

**Erni F.** *Use of high performance liquid chromatography in the pharmaceutical industry.* J. Chromatography, 507 (1990), 141.

**Esaki, H., Onozaki, H., Morimitsu, Y., Kawakishi, S., Osawa, T.** *Potent antioxidative isoflavones isolated from soybeans fermented with *Aspergillus* *isaitoi*.* Biosci., Biotechnol. and Biochem. 62 (1998), 740.

**Estévez, M., Cava, R.** *Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effects in different types of frankfurters.* Meat Science, 72 (2006), 348-355.

**Favati, F., King, J. W., Friedrich, J. P., Eskins, K.** *Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates.* J. Food Sci., 53 (1988), 1532-1536.

**Fedors, R. F.** *A method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids.* Poly. Eng. Sci., 14 (1974), 147-154.

**Fernández-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pérez-Alvarez, J.A., Kuri, V.** *Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs.* Meat Science, 69 (2005), 371-380.

**Frutos, M.J., Hernández-Herrero, J.A.** *Effects of rosemary extract (Rosmarinus officinalis) on the stability of bread with an oil, garlic and parsley.* LWT - Food Science and Technology, 38 (2005), 651-655.

**Fuchs G., Doguet L., Barth D., Perrut M.** *Enantiomer fractionation of phosphine oxides by preparative subcritical fluid chromatography.* J. Chromatography, 623 (1992), 329.

**Galia, A., Argentino, A., Scialdone, O., Filardo, G.** *A new simple static method for the determination of condensed compounds in supercritical fluids.* J. Supercritical Fluids, 24 (2002), 7-17.

**Ganetsos, G., Barker, P.E.** *Preparative and production scale chromatography.* New York: M. Dekker, 1993.

**Gould, M.N., Haag, J.D., Kennan, W.S., Tanner, M.A., Elson, C.E.** *A comparison of tocopherol and tocotrienol for the chemoprevention of chemically induced rat mammary tumours.* American Journal of Clinical Nutrition, 53 (1991), 1068s-1070s.

**Gouw, T.H., Jentoft, R.E.** *Supercritical Fluid Chromatography.* J. Chromatogr. Rev., 68 (1972), 303.

**Guillén, M.D., Cabo, N., Burillo, J.** *Characterization of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest.* J. Sci. Food Agric., 70 (1996), 359.

**Hannay, J.B., Hogart, J.** *On the solubility of solids in gases.* Proc. Roy. Soc., 1879 (London), 29-33.

**Heinemann, T., Kullak-Ublick, G.-A., Pietruck, B., Von Bergmann, K.** *Mechanisms of action of plant sterols on the inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol.* European Journal of Clinical Pharmacology, 40 (1991), 59s-63s.

**Herrero, M., Arráez-Román, D., Segura, A., Kenndler, E., Gius, B., Raggi, M.A., Ibáñez, E. Cifuentes, A.** *Pressurized liquid extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts.* J. Chromatography A, 1084 (2005), 54-62.

**Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E.** *Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae.* Food Chem., 98 (2006) 136-148.

**Hildebrand, J.H.; Scott, R.T.** *The solubility of nonelectrolytes.* Reinhold, New York, (1958).

**Houlinan, C.M., Ho, C.T., Chang, S.S.** *The structure of rosmariquinone. A new antioxidant isolated from Rosmarinus officinalis L.* J. American Oil Chemists Society, 62 (1985), 1985.

**Huang, S-C., Ho, C-T., Lin-Shiau, S-Y., Huang, J-K.L.** *Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9*

*through down-regulating nuclear factor-kappaB and c-Jun.* Biochemical Pharmacology, 69 (2005), 221-232.

**Hurtado-Benavides, A.M., Señoráns, F.J., Ibáñez, E., Reglero, G.** *Countercurrent packed column supercritical CO<sub>2</sub> extraction of olive oil. Mass transfer evaluation.* J. Supercritical Fluids, 28 (2004), 29-35.

**Ibáñez, E.** *Estudio de un nuevo tipo de columna para cromatografía de fluidos supercríticos. Aplicación al análisis de vitaminas liposolubles.* Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid. (1993).

**Ibáñez, E., Cifuentes, A., Crego, A.L., Señoráns, F.J., Cavero, S., Reglero, G.(a)** *Combined use of SFE, MEC and reverse phase HPLC for the analysis of antioxidants from Rosemary.* J. Agric. Food Chem., 9 (2000), 4060-4065.

**Ibáñez, E., Herraiz, M., Reglero, G. (a).** *On-Line SFE/SFC coupling using micropacked columns.* J. High Res. Chromatogr., 18 (1995), 507-509.

**Ibáñez, E., Kubátová, A., Señoráns, F.J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthorne, S.B.** *Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants.* J. Agric. Food Chem., 51 (2003), 375-382.

**Ibáñez, E., Li, W., Malik, A., Lee, M.L. (b).** *Low flow rate modifier addition in packed capillary column SFC.* J. High Resol. Chromatogr., 18 (1995), 559-563.

**Ibáñez, E., López-Sebastián, S., Tabera, J., Reglero, G.** *Separation of carotenoids by sub-SFC with coated, packed capillary columns and neat carbon dioxide.* J. Chromatography A, 823 (1998), 313-319.

**Ibáñez, E., Palacios, J. Señoráns, F.J., Santa-María, G., Tabera, J.,**

**Reglero, G. (b)** *Isolation and separation of tocopherols from olive by-products with supercritical fluids.* J. American Oil Chemists Society, 77 (2000), 187-190.

**Ibáñez, E., Palacios, J., Reglero, G. (b)** *Análisis of tocopherols by on-line coupling SFE-SFC.* J. Microcolumn Sep., 11 (1999), 605-611.

**Ibáñez, E., Señoráns, F. J.** *Tuning of mobile and stationary phase polarity for the separation of polar compounds by SFC.* J. Biochem. Biophys. Methods, 43 (2000), 25-43.

**Ibáñez, E., Tabera, J., Reglero, R., Herraiz, M. (c).** *Optimization of Separation of Fat-Soluble Vitamins by Supercritical Fluid Chromatography Using Serial Micropacked Columns.* J. Agric. Food Chem., 43 (1995), 2667 - 2671.

**Ibáñez, E.; Oca, A., de Murga, G., López-Sebastián, S., Tabera, J.; Reglero, G. (a)** *Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants.* Journal Agric. Food Chem., 47 (1999), 1400-1404.

**Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H.** *Antioxidative effect of the constituents of Rosemary and their derivatives.* Agric. Biol. Chem., 47 (1983), 521.

**Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H., Seto, H.** *Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from Rosemary.* Agric. Biol. Chem., 46 (1982), 1666.

**International Human Genome Sequencing Consortium.** *Initial sequencing and analysis of the human genome.* Nature 409 (2001), 860-921.

**Jaime, L., Mendiola, J.A., Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Señorans, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E.** *Separation and characterization of*

*antioxidants from Spirulina platensis microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD.* Journal of Separation Science, 28 (2005), 2111-2119.

**Jentoft, R.E., Gouw, T.H.** *Pressure-programmed supercritical fluid chromatography of wide molecular weight range mixtures.* J. Chromatogr. Sci., 8 (1970), 138.

**Johannsen, M., Brunner, G.** *SFC as successful tool in chemical and pharmaceutical industry.* 8<sup>th</sup> Meeting on Supercritical Fluids, Versailles (France), 2003.

**Johannsen, M., Peper, S., Brunner, G.** *SFC as successful separation tool in chemical and pharmaceutical industry.* 9<sup>th</sup> Meeting on Supercritical Fluids, Trieste (Italy), 2004.

**Jones, P.J., MacDougall, D.E., Ntanios, F., Vanstone, C.A.** *Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agent in humans.* Can. J Physiol Pharmacol., 75 (1997), 217-27.

**Juárez, M., Olano, A., Morais, F.** *Alimentos Funcionales.* Ed. FECYT. Madrid. 2005

**Jump, D.B.** *Fatty acid regulation of gene transcription.* Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 41 (2004), 41-78.

**Jusforgues P., Shaimi, M.** *Preparative supercritical fluid chromatography.* Analisis magazine, 26 (1998), 55.

**Kamangerpour, A., Ashraf-Khorassani, M., Taylor, L.T., McNair, H.M.,**

**Chorida, L.** *SFC of polyphenolic compounds in grape seed extract.* Chromatographia, 55 (2002), 417-421.

**Kaput, J., Rodríguez, R.L.** *Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era.* Physiol Genomics, 15 (2004), 166-177.

**King, J.W., List, G.R.** *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry.* J. American Oil Chemists Society press, Champaign, Illinois (1996).

**Kiritsakis, A.K.** *El Aceite de Oliva.* A. Madrid Vicente Ediciones, Madrid (1992).

**Kleimann, P., Finley, J.W.** *Process for separation of sterol compounds from fluid mixtures using substantially insoluble compounds.* (1991), U.S. Patent 5.063.070.

**Klesper, E., Corwin, A.H., Turner, D.A.** *High pressure gas chromatography above critical temperature.* J. Org. Chem., 27 (1962), 700.

**Klippel, K.F., Hiltl, D.M., Schipp, B.A.** *A multicentric placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia.* German BPH-Phyto Study Group, 80 (1997), 427-432.

**Knez Z., Posel F., Hunek J., Golob J.** En Proceedings 2nd Int. Symp. on Supercritical Fluids, edited by M. McHugh, pp. 101-104. Johns Hopkins Univ., Boston, Baltimore, U.S.A, (1991).

**Kohler, M., Haerdi, W., Christen, P., Veuthey, J-L.** *Extraction of artemisinin and artemisic acid from Artemisia annua L. using supercritical carbon dioxide.* J. Chromatography A, 785 (1997), 353-360.



**Kong, R. C., Fields, S. M., Jackson, W. P., Lee, M. L.** *Preparation of small-diameter capillary columns for gas and SFC.* J. Chromatography, 289 (1984), 105-116.

**Kosah, R.P.** Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy. New Orleans, L.A., 1988.

**Laencina, J., Guzmán, G., Guevara, L.A., Flores, J.** *Acción de los aceites esenciales sobre levaduras de la fermentación de aceitunas (Olea europaea L.)* Essence Derivati Agrumari, 55 (1985), 27.

**Law, M.R.** *Plant sterol and stanol margarines and health.* West J. Med., 173 (2000), 43-47.

**Lawrence, B.M.** Perfum. Flavor. 20 (1995) 35-37.

**Lee, H., Chung, B.H., Park, Y.H.** *Concentration of tocopherols from soybean sludge by supercritical carbon dioxide.* J. American Oil Chemists Society, 68 (1991), 571-573.

**Lee, M.L., Markides, K.E.** *Analytical supercritical fluid chromatography and extraction.* Chromatography conferences, Inc., Provo, Utah, 1990.

**Lee, M.L., Markides, K.E.** *Current technological challenges in capillary supercritical fluid chromatography.* J. High Resol. Chromatogr., 9 (1986), 652-656.

**Lesellier, E.** *Analysis of non-saponifiable lipids by super-/subcritical-fluid chromatography.* J. Chromatography A, 936 (2001), 201-214.

**Lesellier, E., West, C., Tchaplá, A.** *Advantages of the use of monolithic*

*stationary phases for modelling the retention in sub/supercritical chromatography. Application to cis/trans  $\beta$ -carotene separation.* J. Chromatography A, 1018 (2003), 225-232.

**Leyendeker, D.** Ph D Thesis, RWTH Aachen, 1986.

**List, G.R., Friedrich, J.P., Pominski, J.** *Processing characteristics and oxidative stability of soybean oil extracted with CO<sub>2</sub>.* J. American Oil Chemists Society, 61 (1985), 1847-1849.

**Liu G., Djordjevic N.M., Erni F.** *Reversed phase and normal phase separations by high temperature open tubular column liquid chromatography.* J. Chromatography, 598 (1992), 153-158.

**Liu, Y., Berthod, A., Mitchell, C., Xiao, T.L., Zhang, B., Armstrong, D.W.** *Super/subcritical fluid chromatography chiral separations with macrocyclic glycopeptide stationary phases.* J. Chromatography A, 978 (2002), 185.

**López-Sebastián, S., Ramos, E., Ibáñez, E., Bueno, J.M., Ballester, L., Tabera, J., Reglero, G.** *Dearomatization of antioxidant rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide.* J. Agric. Food Chem., 46 (1998), 13-19.

**Lou, X., Janssen H-G., Cramers, C.A.** *Temperature and pressure effects on solubility in supercritical CO<sub>2</sub> and retention in SFC.* J. Chromatography A, 785 (1997) 57-64.

**Luchetti F.** *Introducción al estudio del aceite de oliva en Manual del Aceite de Oliva.* Ramón Aparicio y John Harwood. A.Madrid Vicente, Ed., 2003. Pag. 13.

**Lunardi, C.** *Guía de arbustos.* Ediciones Grijalbo, S.A., Barcelona, 1988.

**Luxenburger, A.** *The synthesis of carnosol.* Tetrahedron, 59 (2003), 3297-3305.

**Mac Hugh M., Krukonis V.J.** *Activated-carbon regeneration.* Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice (1986). ISBN 0-409-90015 X. Butterworths, Boston, 118-130.

**Maftouh, M., Granier-Loyaux, Chavana, C.E., Marini, J., Pradines, A., Heyden, Y.H., Picard, C.** *Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals: Part III. Supercritical fluid chromatography for analysis and purification in drug discovery.* J. Chromatography A, 1088 (2005), 67-81.

**Malik, A., Li, W., Lee, M.L.** *Preparation of long packed capillary columns using carbon dioxide slurries.* J. Microcol. Sep., 5 (1993), 361-369.

**Manzi, P., Panfili, G., Pizzoferrato, L.** *Normal and reversed-phase HPLC for more complete evaluation of tocopherols, retinols, carotenes and sterols in dairy products.* Chromatographia, 43 (1996), 89-93.

**Markides, K. E., Blomberg, L., Buijten, J., Wännman, J.** *Cyanosilicones as stationary phases on gas chromatography.* J. Chromatography, 267 (1983), 29-38.

**Martí, A., Moreno-Aliaga, M.J., Zulet, M.A., Martínez, J.A.** *Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética.* Nutrición Hospitalaria, XX (2005), 157-164.

**McLachan, C.N.S, Catcpole, O., Hamilton, B.H.** *Separation of sterols from lipids.* (1991), US Patent 5.024.846.

**Meagher, E.A., Barry, O.P., Lawson, J.A., Rokach, J., FitzGerald, G.A.** *Effects of Vitamin E on Lipid Peroxidation in Healthy Persons.* JAMA, 285 (2001), 1178-1182.

**Mendiola, J.A., Marín, F.R., Hernández, S.F., Arredondo, B.O., Señoráns, F.J., Ibáñez, E., Reglero, G.** *Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of Spirulina platensis microalga.* J. Separation Science, 28 (2005), 1031-1038.

**Moreira, M.R., Ponce, A.G., del Valle, C.E., Roura, S.I.** *Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen.* LWT - Food Science and Technology, 38 (2005), 565-570.

**Moujir, L., Navarro, G.M.A., Andres, L.S., Luis, J.G.** *Structure–antimicrobial activity relationships of abietane diterpenes from Salvia species.* Phytochemistry, 34 (1993), 1493-1495.

**Mukhopadhyay M.** *Process schemes and parameters in SCFE.* En Natural Extracts using Supercritical Carbon Dioxide, CRC Press, Boca Ratón, Florida, 2000. ISBN 0-8493-0819-4.

**Munné-Bosch, S., Alegre, L., Schwarz, K.** *The formation of phenolic diterpenes in Rosmarinus officinalis, L. under mediterranean climate.* Eur. Food Res. Technol., 210 (2000), 263-267.

**Nakatani, N., Inatani, R.** *Two antioxidative diterpenes from Rosemary and a revised structure for rosmanol.* Agric. Biol. Chem., 48 (1984), 2081.

**Newmark H.L.** *Squalene, olive oil, and cancer risk: review.* Annals of the New York

Academy of Sciences, 889 (1999), 193 -203.

**Nguyen, U., Evans, D.D., Frakman, G.** *Natural antioxidants produced by supercritical fluid extraction.* En "Supercritical Fluid Processing of Foods and Biomaterials". Ed. S.S.H. Rizvi. Chapman & Hall. London. (1994), p.103.

**Nicoud R.M., Clavier J.Y., Perrut M.** *Preparative SFC: basics and applications.* En Practical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. Editado por Marcel Caude y Didier Thiébaud. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, 1999 (Holanda), 401.

**Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Nishida, N., Kasajima, N., Yoshino, T., Morikawa, T., Yoshikawa, M.** *Carnosic acid a new class of lipid absorption inhibitor from Sage.* Bioorganic and medicinal chemistry letters, 14 (2004), 1943-1946.

**Noverjaque, J.A.** *Method for the aromatization of plastic materials.* (1997), PCT Int. Appl. WO 9735909.

**Offord, E.A., Macé, K., Avanti, O., Pfeifer, A.M.** *Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells.* Cancer Letters, 114 (1997), 275-281.

**Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K., Yagi, A.** *Flavonoids in Rosmarinus officinalis leaves.* Phytochem., 37 (1994), 1463.

**Olson, J., Pan, J., Hochlowski, J., Searle, P., Blanchard, D.** *Customization of a Commercially Available Prep Scale SFC System to Provide Enhanced Capabilities.* J. Association Laboratory Automation, 7 (2002) 69-74.

**Oluwatuyi, M., Kaatz, G.W., Gibbons, S.** *Antibacterial and resistance modifying activity of Rosmarinus*. *Phytochemistry*, 65 (2004), 3249-3254.

**Ordovas, J.M., Corella, D.** *Genes, Diet and Plasma Lipids: The Evidence from Observational Studies*. In Simopoulos AP, Ordovas JM (eds): *Nutrigenetics and Nutrigenomics*. World Rev Nutr Diet. Basel, Karger, vol 93, pp 41-76. 2004.

**Owen, R.W., Mier, W., Giacosa A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B.** *Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols*. *Food. Chem. Toxicology*, 38 (2000), 647-659.

**Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T.** *Antioxidant food supplements in human health*. Academic Press., 1999. Pag. 55-71.

**Pandit, V.A., Shelef, L.A.** *Sensitivity of Listeria monocytogenes to rosemary (Rosmarinus officinalis L.)*. *Food Microbiology*, 11 (1994), 57-63.

**Paproski, R.E., Cooley, J., Lucy, C.A.** *Comparison of titania, zirconia, and silica stationary phases for separating diesel fuels according to hydrocarbon group-type by supercritical fluid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1095 (2005), 156-163.

**Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R.** *Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils*. *Microbios*, 89 (1997), 39-46.

**Peng D.Y., Robinson D.B.** *A new two-constant equation of state*. *Industrial Engineering Chemistry Fundamentals*, 15 (1976), 59.

**Perrut M.** (1982), Fr. Patent: 2527934.

**Perrut M.** *Fractionation process for mixtures by elutin chromatography with liquid in supercritical state and installation for its operation.* (1984), Fr. Demande, Patent 2527934.

**Petersen, M.** *Packed columns in SFC.* J. Chromatography, 505 (1990), 3-18.

**Peterson, M.L., Hirsch, J.** *A calculation for locating the carrier gas front of a gas-liquid chromatogram.* J. Lipid Research, 1 (1959), 132-134.

**Pettinello G., Bertucco A., Pallado P., Stassi A.** *Production of EPA enriched mixtures by supercritical fluid chromatography: from the laboratory scale to the pilot plant.* J. Supercritical Fluids, 19 (2000), 51-60.

**Piñero R., García J., Cocero M.J.** *Chemical recycling of polycarbonate from CD wastes in a continuous lab-plant. Green route with methanol and alcohol/water mixtures.* Green Chem., 7-5, (2005), 380-387.

**Piñero R., García J., Cocero M.J.** *Modelling of the phase behaviour for the direct synthesis of dimethyl carbonate from CO<sub>2</sub> and methanol at supercritical or near critical conditions.* Fluid Phase Equilibria, (2006), enviado.

**Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J. J.** *Flavour Fragrance*, 17 (2002), 15-19.

**Ponce, A.G., del Valle, C.E., Roura, S.I.** *Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables.* Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 37( 2004), 199-204.

*Preparative lab scale SFC.* Filtration and Separation, 34 (1997), 114.

**Pyo, D.** *Separation of vitamins by SFC with water-modified carbon dioxide as the mobile phase.* J. Biochem. Biophys. Methods, 43 (2000), 113-123.

**Qureshi, A.A., Burger, W.C., Peterson, D.M., Elson, C.E.** *The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley.* J. Biological Chemistry, 261 (1986), 10544-10550.

**Qureshi, A.A., Qureshi, N. Hasler-Rapacz, J.O., Weber, F.E., Chaudhary, V., Crenshaw, T.D., Gapor, A., Ong, A.S.H., Chong, Y.H., Peterson, D., Rapacz, J. (b).** *Dietary tocotrienols reduce concentrations of plasma cholesterol, apolipoprotein B, thromboxane B2, and platelet 4 in pigs with inherited hyperlipidemias.* American J. Clinical Chemistry, 53 (1991), 1042S-1047S.

**Qureshi, A.A., Qureshi, N., Wright, J.J.K., Shen, Z., Kramer, G., Gapor, A., Chong, Y.H., DeWitt, G., Ong, A.S.H., Peterson, D.M., Bradlow, B.A. (a).** *Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee).* American J. Clinical Nutrition, 53 (1991), 1021S-1026S.

**Rac, M., Ostric-Matijasevic, B.** *The properties of rosemary as an antioxidant.* Rev. Fr. Corps Gras, 2 (1955), 796.

**Rao C.V., Newmark H.L., Reddy B.S.** *Chemopreventive effect of squalene on colon cancer.* Carcinogenesis, 19 (1988), 287-290.

**Rao, B.G.V.N., Rao, P.S.** *The efficacy of essential oils against pathogenic fungi.* Riechstoffe Aromen Koerperpflegemittel, 21 (1971), 241.

**Raynor M.W., Sewram V., Venayagamoorthy.** *Capillary column SFC and requirements.* En "Practical supercritical fluid chromatography and extraction", Ed. Marcel Caude y Didier Thiébaud, 1999. Harwood academic Publishers. ISBN 90.



**Reid R.C.; Prausnitz J.M.; Poling B.E.** (1987). *Viscosity. The properties of gases and liquids*, Fourth Edition, ISBN 0-07-051799-1, Mc Graw Hill, New York, 1987. Pag. 338-390.

**Reverchon, E., Donsi, G., Pota, F.** *Extraction of essential oils using supercritical CO<sub>2</sub>: effect of some process and pre-process parameters*. Italian J. Food Science, 4 (1992), 187.

**Reverchon, E., Senatore, F.** *Isolation of rosemary oil: comparison between hydrodistillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction*. Flavour Fragrance J., 7 (1992), 227.

**Richheimer, S.L., Bernart, M.W., King, G.A., Kent, M.C., Bailey, D.T.** *Antioxidant activity and oxidative degradation of phenolic compounds isolated from rosemary*. J. American Oil Chemists Society, 73 (1996) 507-514.

**Roth, M.** *Determination of thermodynamic properties by supercritical fluid chromatography*. J. Chromatography A, 1037 (2004), 369.

**Rozzi, N.L., Singh, R.K.** *Supercritical fluids and the food industry*. C.R.F.S.F.S., 1 (2002), 33-44.

**Saito, M., Yamauchi, Y., Okuyama, T.** *Fractionation by packed-column SFC and SFE. Principles and applications*. VCH Publishers Inc. New York., 1994.

**Saito, M.; Yamauchi, Y.** *Isolation of tocopherols from wheat germ oil by recycle semi-preparative supercritical fluid chromatography*. J Chromatography A, 505 (1990), 257-271.

**Sandra P., David F., Munari F., Mapelli G., Trestianu S.** En *Supercritical Fluid*

Chromatography, editado por R.M. Smith, The Royal Society of Chemistry, 1998. London, UK.

**Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.S., Andrade, P.B., Fernandes-Ferreira, M.** *Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (Salvia officinalis L.).* Plant Science, 162 (2002), 981-987.

**Santoyo, S., Caverro, S., Jaime, L., Ibáñez, E., Señoráns, F.J., Reglero, G.** *Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction.* J. Food Protection, 68 (2005) 790-795.

**Scalia, S., Giuffreda, L., Pallado, P.** *Analytical and preparative SFE of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods.* J. Pharm. Biomed. Anal., 21 (1999), 549-558.

**Schoenmakers, P. J.** *Supercritical fluid chromatography: open columns vs packed columns.* J. High Resol. Chromatogr., 11 (1988), 278-282.

**Schoenmakers, P.J., Uunk, L.G.M.** *Supercritical fluid chromatography. Recent and future developments.* Europ. Chromatogr. News, 1 (1987), 14-22.

**Schomburg, G., Husman, H., Ruthe, S., Herraiz, M.** *Crosslinking of alkylpolysiloxane films on various types of glass surfaces including fused silica using  $\gamma$ -radiation of a  $^{60}\text{Co}$  source. Comparison to crosslinking by thermal peroxid treatment.* Chromatographia, 15 (1982), 599-610.

**Señoráns, F. J., Ibáñez, E.** *Análisis of fatty acids in foods by SFC.* Anal. Chem. Acta, 465 (2002), 131-144.

**Señoráns, F.J., Ibáñez, E., Caverro, S., Tabera, J., Reglero, G.** *Liquid*

*chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants.* J. Chromatography A, 870 (2000) 870, 491-499.

**Seok, J.K., Daeseok, H.; Kwang, D.M., Joon, S.R.** *Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants.* Biosci. Biotechnol. Biochem., 59 (1995), 822.

**Sesti-Osseo, L., Caputo, G., Gracia, I., Reverchon, E.** *Continuous fractionation of fried oil by supercritical CO<sub>2</sub>.* 8<sup>th</sup> Meeting on Supercritical Fluids, Versailles (France), 2003.

**Sihvonen, M., Järvenpää, E., Hietaniemi, V., Huopalahti, R.** *Advances in supercritical carbon dioxide technologies.* Trends Food Sci. Tech., 10 (1999), 217-22.

**Singletary, K.W., Rokusek, J.T.** *Tissue specific enhancement of xenobiotic detoxification enzymes in mice by dietary rosemary extract.* Plant Foods for Human Nutrition, 50 (1997), 47-53.

**Smith T.J., Kim S., Lee M.J., Newmark H.L., Yang C.S.** *Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone (NKK)-induced lung tumorigenesis and DNA oxidation by dietary squalene.* Proceedings of the American Association for Cancer Research, 40 (1999), 262.

**Smith, R. J., Davidson D., Wilson R.J.H.** *Natural foam stabilizing and bittering compounds derived from hops.* J. Am. Soc. Brew. Chem., 56 (1998), 52-57.

**Smith, R. M.** *Supercritical fluids in separation science- the dreams, the reality and the future.* J. Chromatography A, 856 (1999) 83-115.

**Smith, T.J.** *Squalene: potential chemopreventive agent.* Expert Opin Investig Drugs, 9 (2000), 1841-1848.

**Snyder, J.M.; Taylor, S.L.; King, J.W.** *Analysis of tocopherols by capillary supercritical fluid chromatography and mass spectrometry.* J. American Oil Chemists Society, 70 (1993), 349.

**Sugiyama, K.; Saito, M.; Hondo, T.; Senda, M.** *New double-stage separation analysis method : Directly coupled laboratory-scale supercritical fluid extraction--supercritical fluid chromatography, monitored with a multiwavelength ultraviolet detector.* J. Chromatography A, 32 (1985), 107-116.

**Tabanca, N., Kirimer, N., Demirci, B., Demirci, F., Baçer, K.H.C.** *Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the Enantiomeric Distribution of Borneol.* J. Agric. Food Chem., 49 (2001) 4300-4303.

**Tan, B., Chu, F.L.** *Effects of palm carotenoids in rat hepatic cytochrome P450-mediated benzo(a)pyrene metabolism.* American Journal of Clinical Nutrition, 53 (1991), 1071s-1075s.

**Tan, D.T.S., Khor, H.T., Low, W.H.S., Ali, A., Gapor, A.** *Effect of palm-oil-vitamin E concentrate on the serum and lipoprotein lipids in humans.* American Journal of Clinical Nutrition, 53 (1991), 1027s-1030s.

**Taylor S.L., King J.W., Montanari L., Fantozzi P., Blanco M.A.** *Enrichment and fractionation of phospholipid concentrates by supercritical fluid extraction and chromatography.* Italian J. Food Science, 12 (2000), 65-76.

**Taylor, S.L., King, J.W.** *Preparative-scale SFE/SFC of corn bran.* J. American

Oil Chemists Society, 79 (2002), 1133-1136.

**Thomson, D.P., Cannon, C.** *Toxicity of essential oils on toxigenic and nontoxigenic fungi.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36 (1986), 527.

**Thorsen, M.A., Hildebrandt, K.S.** *Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts: Aspects of accurate quantification.* J. Chromatography A, 995 (2003), 119-125.

**Tiwari, R., Dikshit, R.P., Chandan, N.C., Saxena, A., Gupta, K.G., Vahedra, D.E.** *Inhibition of growth and aflatoxin B1 production of Aspergillus parasiticus by spice oils.* J. Food Sci. Technol. India, 20 (1983), 131.

**Toribio, L., Nozal, M.J., Bernal, J.L., Nieto, E.M.** *Use of semipreparative supercritical fluid chromatography to obtain small quantities of the albendazole sulfoxide enantiomers.* J. Chromatography A, 1011 (2003), 155.

**Torres, C.F., Lin, B., Moeljadi, M., Hill, C.G.** *Lipase-catalyzed synthesis of designer acylglycerols rich in residues of eicosapentaenoic, docosahexaenoic, conjugated linoleic, and/or stearic acids.* European J. Lipid Science and Technology, 105 (2003), 614-623.

**Torres, C.F., Vázquez, L., Señoráns, F.J., Reglero, G.** *Study of the análisis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid cromatography coupled with ELSD.* J. Chromatography A, 1078 (2005) 28-34.

**Turner, C., King, J.W., Mathiasson, L.** *SFE and SFC for fat-soluble vitamin analysis.* J. Chromatography A, 936 (2001), 215-237.

**Van Deemter, J.J., Zuiderweg, F.J., Klinkenberg, A.** *Longitudinal diffusion*

*and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. Chem. Eng. Sci.*, 5 (1956), 271-289.

**Van Duuren B.L., Goldsmith B.M.** *Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst.*, 56 (1976), 1237-1242.

**Von Holtz, R.L., Fink, C.S., Awad, A.B.** *beta-Sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. Nutr. Cancer*, 32 (1998), 8-12.

**West, C., Lesellier, E.** *Separation of substituted aromatic isomers with porous graphitic carbon in subcritical fluid chromatography. J. Chromatography A*, 1099 (2005), 175.

**Wilt, T.J., MacDonald, R., Ishani, A.** *Beta-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. BJU Int.*, 83 (1999), 976-983.

**Wu, J.W., Lee, M.H., Ho, C.T., Chan, S.S.** *Elucidation of the chemical structures of antioxidants isolated from rosemary. J. American Oil Chemists Society*, 59 (1982), 339.

**Yamaguchi M., Kadota Y., Tanaka I., Ohtsu Y.** *New separation method for high purity DHA by supercritical fluid chromatography. J. Japan Oil Chemists Society*, 48 (1999), 1169-1176.

**Yamaguchi T., Nakagawa M., Hidaka K.** *Potentiation by squalene of antitumor effect of 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidiny)methyl]-1-(2-chloroethyl)-nitrosourea in a murine tumor system. Japanese Journal Cancer Research.*, 76 (1985), 1021-1026.

**Yamauchi, Y., Saito M.** *Fractionation of lemon peel oil by semi-preparative supercritical fluid chromatography.* J. Chromatography, 505 (1990), 237-246.

**Yuen, M.C., Ah, N.M., Yahaya, H., Yamauchi, Y., Bounoshita, M., Saito, M.** *Separation of crude palm oil components by semipreparative supercritical fluid chromatography.* J. American Oil Chemists Society, 73 (1996), 523.

**Zou, W., Dorsey, J.G., Chester, T.L.** *Modifier effects on column efficiency in packed column supercritical fluid chromatography.* Anal. Chem., 72 (2000), 3620-3626.

DIRECCIONES WEB:

<http://www.epa.gov/greenchemistry>

<http://www.feique.org>

<http://www.modcol.com>

<http://www.fedepalma.org>

<http://www.elchao.com/palma.htm>

<http://www.fao.org>

## ANEXO I. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1	El triángulo de los alimentos funcionales	15
FIGURA 2	Número de publicaciones obtenidas para "functional" y "health"	17
FIGURA 3	Diagrama de fases se un compuesto puro	29
TABLA 1	Comparación de las propiedades físicas de líquidos, gases y FSC	30
TABLA 2	Propiedades físicas de algunas sustancias usadas como FSC	33
TABLA 3	Aplicaciones SFE en plantas	44
FIGURA 4	Diagrama de flujo básico en un proceso de PS-SFC	59
FIGURA 5	Esquema del sistema de compresión dinámica axial	60
TABLA 4	Escalas de producción	61
FIGURA 6	Estructuras químicas de algunos de los compuestos más interesantes del romero	73
TABLA 5	Composición del insaponificable de algunos aceites vegetales (%)	78
FIGURA 7	Estructura química del escualeno	79
TABLA 6	Contenido de escualeno en distintas matrices	80
FIGURA 8	Principales esteroides presentes en los aceites vegetales.	82
FIGURA 9	Nombre y estructura de los isómeros de tocoferoles y tocotrienoles	84
FIGURA 10	Gráfico que representa la asimetría	93
FIGURA 11	Esquema de un extractor de fluidos supercríticos "off line"	94
FIGURA 12	Esquema del equipo SFE	95
TABLA 7	Condiciones de los experimentos de SFE	96
FIGURA 13	Esquema del dispositivo diseñado para recoger extractos	96
FIGURA 14	Esquema del equipo SFC	97
FIGURA 15	Detalle del cromatógrafo SFC-3000	98
FIGURA 16	Montaje para el llenado de columnas	99
FIGURA 17	Diagrama del equipo de PS-SFC	100
FIGURA 18	Planta PS-SFC en la Universidad Autónoma de Madrid	101
FIGURA 19	Sistema de recogida de fracciones de la planta de PS-SFC por medio de separadores ciclónicos	104



FIGURA 20	Esquema del PS-SFC de la Universidad de Valladolid	106
FIGURA 21	Foto del equipo PS-SFC de la U. Valladolid	106
FIGURA 22	Esquema de las válvulas del inyector Wilson 233XL	107
FIGURA 23	Esquema del rango de polaridades empleado en los rellenos de las columnas	114
FIGURA 24	Dispositivo para la impregnación de rellenos	115
FIGURA 25	Esquema del montaje para llenado de las columnas analíticas	117
FIGURA 26	Esquema del montaje para el llenado de las columnas preparativas	118
FIGURA 27	Foto del montaje para el llenado de las columnas preparativas	119
TABLA 8	Condiciones experimentales para el estudio de la eficacia	121
TABLA 9	Resultados del estudio de eficacia	122
FIGURA 28	Representación H vs $k'$ según el flujo	123
FIGURA 29	Efecto de la presión de la fase móvil en la eficacia para la columna SE-54	124
TABLA 10	Eficacia de la columna SE-54	125
FIGURA 30	Representación H vs $k'$ para la columna SE-54	125
TABLA 11	Eficacia de la columna OV-17	126
FIGURA 31	Representación H vs $k'$ para la columna OV-17	126
TABLA 12	Eficacia de la columna CW-20M	127
FIGURA 32	Representación H vs $k'$ para la columna CW-20M	127
TABLA 13	Eficacia de la columna Diol	128
FIGURA 33	Representación H vs $k'$ para la columna Diol	128
FIGURA 34	Cromatograma de la separación de los alcanos en la columna Diol	129
FIGURA 35	Cromatograma SFC del fluoranteno en la columna SE-54	130
TABLA 14	Actividad superficial en la columna SE-54	131
FIGURA 36	Cromatograma SFC de la mezcla de polaridad en la columna SE-54	132
TABLA 15	Actividad superficial en la columna OV-17	132
TABLA 16	Actividad superficial en la columna CW-20M	133
FIGURA 37	Cromatograma SFC del ácido benzoico en la columna CW-20M	134
FIGURA 38	Cromatograma SFC mezcla de polaridad en la columna CW-20M	135

TABLA 17	Actividad superficial en la columna Diol	135
FIGURA 39	Cromatograma SFC del ácido benzoico en la columna Diol	136
FIGURA 40	Cromatograma del de tolueno en la columna SE-54 preparativa	139
FIGURA 41	Cromatograma del de tolueno en la columna CW-20M preparativa	140
TABLA 18	Datos de separación de los isómeros de los tocoferoles	142
FIGURA 42	Estructuras químicas de los cuatro isómeros de los tocoferoles	143
FIGURA 43	Cromatograma SFC de los isómeros de los tocoferoles	143
TABLA 19	Datos de separación de los distintos patrones de aceites	144
FIGURA 44	Cromatograma SFC de patrones y muestras de aceites	145
TABLA 20	Valores de las variables optimizadas en la separación de patrones	147
TABLA 21	Datos de separación de los distintos patrones de aceites	149
FIGURA 45	Cromatograma SFC del desodorizado de aceite de soja	150
TABLA 22	Datos de separación de los distintos patrones de aceites	150
FIGURA 46	Cromatograma SFC del desodorizado de aceite de soja. Condiciones: Rampa de presión de 150 bar (5 min.) a 370 bar (10 bar/min) y 40°C.	153
TABLA 23	Caracterización de las fracciones de la separación del desodorizado. Condiciones: Rampa de 150 a 370 bar (10 bar/min) y 40°C.	153
FIGURA 47	Cromatograma SFC del desodorizado de aceite de soja. Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 60°C y 4% de Etanol.	155
TABLA 24	Caracterización de las fracciones de la separación del desodorizado. Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 60°C y 4% de Etanol.	156
FIGURA 48	Cromatograma SFC del desodorizado de aceite de soja. Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 40°C y 4% de Etanol.	158
TABLA 25	Caracterización de las fracciones de la separación del desodorizado. Condiciones: Presión: 120 bar; Temperatura: 40°C y 4% de Etanol.	158
FIGURA 49	Estructura química del ácido carnósico	160
TABLA 26	Resumen de la contribución de grupos para la solubilidad del ácido carnósico	162
FIGURA 50	Presión del CO <sub>2</sub> en función de la densidad a distintas temperaturas	163
FIGURA 51	Solubilidad del carnósico predecida por GCA-EoS según la densidad	

	del CO <sub>2</sub>	165
TABLA 27	Resultados SFC para el ácido carnósico para la columna OV-17	167
FIGURA 52	Representación k' vs T para el ácido carnósico en la columna OV-17	168
FIGURA 53	Factor de capacidad en función de la temperatura para PHA	169
TABLA 28	Resultados SFC para el ácido carnósico en las distintas columnas	170
FIGURA 54	Cromatograma SFC del ácido carnósico en la columna OV-17	170
FIGURA 55	Cromatogramas SFC del ácido carnósico en la columna SE-54	171
FIGURA 56	Cromatogramas SFC del ácido carnósico en la columna CW-20M	171
FIGURA 57	Cromatograma SFC del ácido carnósico en la columna Diol	171
FIGURA 58	Cromatograma SFC de Romero Exp 1 (F-2). Columna OV-17	174
FIGURA 59	Cromatogramas SFC de los extractos de romero en la Columna SE-54	175
FIGURA 60	Cromatograma SFC en la columna CW-20M	176
FIGURA 61	Cromatograma SFC en la columna Diol	178
FIGURA 62	Cromatograma SFC en la columna SE-54	178
FIGURA 63	Cromatograma SFC del 1,8-Cineol en la Columna SE-54	179
FIGURA 64	Cromatograma SFC en columna SE-54. Rampa de presión intermedia	180
FIGURA 65	Cromatograma SFC Exp 1 (F-1). Columna SE-54 Rampa lenta	182
FIGURA 66	Cromatograma SFC Alcanfor y Borneol. Columna SE-54 Rampa lenta	182
FIGURA 67	Cromatograma SFC en la columna CW-20M	183
TABLA 29	t <sub>R</sub> de los compuestos mayoritarios del aceite esencial en columna Diol	184
FIGURA 68	Cromatograma SFC del Borneol en la Columna Diol.	184
FIGURA 69	Cromatograma SFC en la columna Diol. Rampa intermedia	185
TABLA 30	Caracterización de compuestos mediante HPLC en el extracto inicial	187
TABLA 31	Caracterización de compuestos mediante GC para el extracto inicial	188
TABLA 32	Variación del t <sub>R</sub> y de w <sub>1/2</sub> para los distintos experimentos	190
FIGURA 70	Fraccionamiento del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna Diol a 130 bar, 80°C y 10% etanol en tres ciclones	192
FIGURA 71	Fraccionamiento en inyecciones sucesivas del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna Diol	192

TABLA 33	Caracterización química mediante HPLC del extracto SFE de romero y de los ciclones después de la separación PS-SFC en columna Diol	194
TABLA 34	Caracterización química mediante GC del extracto SFE de romero y de los ciclones después de la separación PS-SFC en la columna Diol	195
FIGURA 72	Cromatogramas GC del Extracto original y de los distintos ciclones tras el fraccionamiento PS-SFC en columna Diol	197
TABLA 35	Concentración de carnósico y $EC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) según el método DPPH	198
TABLA 36	Actividad de distintos extractos y patrones según el método MBC	200
FIGURA 73	Fraccionamiento del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 10% etanol en tres ciclones	202
FIGURA 74	Fraccionamiento en inyecciones sucesivas del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna SE-54	203
TABLA 37	Caracterización química mediante HPLC del extracto SFE de romero y de los ciclones después de la separación PS-SFC en columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 10% etanol	204
TABLA 38	Caracterización química mediante GC del extracto SFE de romero y de los ciclones después de la separación PS-SFC en la columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 10% etanol	207
FIGURA 75	Cromatogramas GC del Extracto original y de los distintos ciclones tras el fraccionamiento PS-SFC en columna SE-54 en las siguientes condiciones: 130 bar, 80°C y 10% etanol	209
TABLA 39	Concentración de carnósico y $EC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) según el método DPPH	210
TABLA 40	Actividad de distintos extractos y patrones según el método MBC	211
FIGURA 76	Fraccionamiento del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 5% etanol en tres ciclones	213
FIGURA 77	Fraccionamiento en inyecciones sucesivas del extracto SFE de romero mediante PS-SFC en columna SE-54	214
TABLA 41	Caracterización química mediante HPLC del extracto SFE de romero y de los ciclones después de la separación PS-SFC en columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 5% etanol	215

TABLA 42	Caracterización química mediante GC del extracto SFE de romero y de los ciclones después de la separación PS-SFC en la columna SE-54 a 130 bar, 80°C y 5% etanol	217
TABLA 43	Concentración de carnósico y $EC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) según el método DPPH	218
TABLA 44	Actividad de distintos extractos y patrones según el método MBC	219

## ANEXO II. RELACIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS DE LA TESIS DOCTORAL

P. Ramírez, E. Ibáñez, F.J. Señoráns, G. Reglero, SEPARATION OF ROSEMARY ANTIOXIDANT COMPOUNDS BY SFC WITH COATED PACKED CAPILLARY COLUMNS, *J. Chromatogr. A* 1057, 241-245 (2004)

P. Ramírez, T. Fornari, F.J. Señoráns, E. Ibáñez, G. Reglero, ISOLATION OF PHENOLIC ANTIOXIDANT COMPOUNDS BY SFC, *J. Supercrit. Fluids* 35, 128-132 (2005)

Pilar Ramírez, Mónica R. García-Risco, Susana Santoyo, F. Javier Señoráns, Elena Ibáñez, Guillermo Reglero, ISOLATION OF FUNCTIONAL INGREDIENTS FROM ROSEMARY BY PREPARATIVE-SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY (PREP- SFC), *J. Pharm. Biomed. Anal. (Special Issue: Analysis of Nutraceuticals)* 41, 1606-1613 (2006).

Pilar Ramírez, Susana Santoyo, Mónica R. García-Risco, F. Javier Señoráns, Elena Ibáñez, Guillermo Reglero, USE OF SPECIALLY DESIGNED COLUMNS FOR ANTIOXIDANTS AND ANTIMICROBIALS ENRICHMENT BY PREPARATIVE- SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY (PREP-SFC), *J. Chromatogr. A* (submitted)

Short communication

# Separation of rosemary antioxidant compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns

Pilar Ramírez<sup>a</sup>, Francisco J. Señoráns<sup>a</sup>, Elena Ibañez<sup>b,\*</sup>, Guillermo Reglero<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Área de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Unidad Asociada al CSIC, 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain*

<sup>b</sup> *Departamento de Caracterización de Alimentos, Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain*

Received 3 March 2004; received in revised form 8 September 2004; accepted 13 September 2004

## Abstract

Antioxidant compounds in rosemary extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE) were separated by supercritical fluid chromatography (SFC) on packed capillary columns. The columns contained silica particles coated with SE-54 (5% phenyl, 95% methyl silicone) and Carbowax 20M [poly(ethylene glycol)]. The use of coated packed capillary columns allowed the separation of polar compounds by SFC with neat CO<sub>2</sub>. The SFC conditions were selected on the basis of previous work. High pressures (up to 370 atm; 1 atm = 10,325 Pa) and moderate temperatures (up to 100 °C) were used to separate the compounds responsible for the antioxidant activity such as carnosic acid and carnosol while lower pressures were sufficient to separate the compounds of the essential oil.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Antioxidant compounds; Supercritical fluid extraction; Rosemary; Packed capillary columns; Coated particles; Neat CO<sub>2</sub>

## 1. Introduction

An important trend in food technology is the production of food ingredients with nutraceutical properties from natural sources such as aromatic plants or spices. Among the nutraceuticals, antioxidants receive much attention in the food industry [1], not only as preservatives in food products to prevent or retard oxidation of fats and oils, but also because of their beneficial effects on human health.

Rosemary has been widely accepted as a spice with high antioxidant activity [2]. The most active compounds are the phenolic diterpenes, primarily carnosic acid, and also carnosol, rosmanol, and epi- and isorosmanol [3,4]. Supercritical fluid extraction (SFE) has been suggested as a method for selective isolation of antioxidants from rosemary,

mainly because of the mild conditions which avoid oxidation and/or degradation of such phenolic compounds [5,6]. Isolation under SFE conditions can be accomplished through cascade fractionation or using supercritical fluid chromatography (SFC). SFC allows a fractionation of the extracts which is compatible with SFE in terms of mobile phase, instruments and conditions and, what is even more important, maintaining the integrity of the compounds of interest. Preparative-scale SFC is an environmentally clean technology whose main advantage, compared to preparative LC, is the easy recovery of the isolated compounds by a simple decompression of the supercritical fluid [7].

One main problem encountered when separating polar compounds by SFC is the lack of polarity of the CO<sub>2</sub> used as mobile phase. An interesting approach to analyze polar compounds without the use of added modifiers is to tune the polarity of the stationary phase to increase the range of polar compounds that can be analyzed using either silica-based or new materials as stationary phase [8,9].

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 562 2900x388; fax: +34 91 564 4853.

E-mail address: [elena@ifi.csic.es](mailto:elena@ifi.csic.es) (E. Ibañez).

The objective of the present work was the optimization of the separation of carnosic acid from other antioxidants in rosemary extracts obtained by SFE. In an earlier study in our laboratory, the elution of phenolic diterpenes such as carnosic acid in SFC with pure CO<sub>2</sub> using packed capillary columns was studied [10]. To evaluate the influence of the polarity of the coating polymer on the separation of polar compounds, two columns were tested, silica particles coated with SE-54 (5% phenyl, 95% methyl silicone) and Carbowax 20 M (CW20M) [poly(ethylene glycol)].

## 2. Experimental

### 2.1. Samples

The rosemary sample (*Rosmarinus officinalis* L.) consisted of dried rosemary leaves obtained from an herbalist's shop and grown in Murcia, Spain (dried using the traditional method, as follows: once collected, the plant is ventilated to remove humidity, covered with a blanket to avoid sunlight and let dry in a ventilated place for 20–30 days, depending on the season) [6]. Samples were ground under cryogenic carbon dioxide and stored in amber flasks at –20 °C until use.

For efficiency measurements, a mixture of pure *n*-alkanes (C<sub>12</sub>–C<sub>28</sub>) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used. For surface activity evaluation, a mixture of menthol, benzoic acid, anthracene, fluoranthene (Sigma), methyl benzoate and 2,6-dimethylaniline (Fluka, Switzerland) was utilized. Carnosic acid standard from *R. officinalis* (93% purity), camphor, 1,8-cineole and borneol were purchased from Sigma. Hexane and dichloromethane used to prepare the solutions were purchased from LabScan (Dublin, Ireland). Carnosic acid solutions were maintained at 4 °C in dark glass flasks.

### 2.2. Instrumentation

A supercritical fluid chromatograph SFC 3000 (Carlo Erba, Milan, Italy) equipped with a flame ionization detector was used. Sample was loaded by a time-controlled, rotating-valve injection device (Vici, Houston, TX, USA) containing an 1 µL internal loop. The injector temperature was 40 °C; the detector temperature was kept at 350 °C. SFC-grade CO<sub>2</sub> (Liquid Carbonic, Madrid, Spain) was pumped by using a SFC300 pump (Carlo Erba). The flow rate of the mobile phase was set by using a linear restrictor of 20 cm × 13 µm i.d. made of fused silica tubing (Composite Metal Services, Ilkley, UK) connected to the column through a zero dead-volume union. The columns were connected to the injection valve via a flow splitter consisting on a silica tubing of 20 cm × 13 µm i.d. SFC conditions of analysis are detailed in figure captions.

### 2.3. Columns

Packed capillary columns were prepared according to a reported procedure [11] by using 500 µm i.d. stainless steel

tubing (Symta, Madrid, Spain) of 25 cm length. The stainless-steel tubing was deactivated with 20% polyethyleneglycol (Sigma). The packing procedure was performed at a starting pressure of 80 atm followed by a pressure rate of 3 atm min<sup>-1</sup> up to 340 atm (1 atm = 10,325 Pa). The tubing was introduced into a sonication bath maintained at room temperature. Once filled, the column was allowed to depressurize overnight. The columns were conditioned prior to their use in SFC using a pressure and temperature programme as follows: from 120 to 340 atm at 4 atm min<sup>-1</sup> and from 40 to 180 °C at 3 °C min<sup>-1</sup>.

### 2.4. Coating of silica particles

Porous silica particles (10 µm, 60 Å, Hichrom, Reading, UK) were used as base material. Particles were conditioned prior to coating by washing them with ethanol and dried by heating at 160 °C for 1 h in a fluidized bed reaction vessel [12] using He as a purge gas.

Silica particles (0.3 g) were placed in the fluidized bed reaction vessel and mixed with 3% (w/w) of SE-54 (5% phenyl, 95% methylsilicone) dissolved in hexane or with 3% (w/w) CW20M dissolved in dichloromethane. When coating with SE-54, dicumyl peroxide (DCUP) was used as crosslinking agent at a concentration of 0.5 mg DCUP/100 mg stationary phase [13]. Coating was performed at room temperature with He as purge gas. Crosslinking was obtained by placing the vessel in a chromatographic oven by heating from 50 to 160 °C at 5 °C min<sup>-1</sup> and maintaining the temperature at 160 °C overnight.

Efficiency measurements provided around 7000 plates m<sup>-1</sup> at *k'* = 10 (coating with 3% SE-54) and around 20,000 plates m<sup>-1</sup> (*k'* = 3) (coating with 3% CW20M).

### 2.5. SFE of rosemary

A Suprex PrepMaster (Suprex, Pittsburgh, PA, USA) supercritical fluid extractor was used for all the experiments. Sample (0.85 g, dry weight basis) was placed into a 5 mL stainless-steel extraction cell. The supercritical CO<sub>2</sub> flow rate was controlled using a needle valve as variable restrictor; flow rates of 3–4 mL min<sup>-1</sup> were obtained at the experimental conditions tested.

Sample was extracted by using a two-step method [fractions 1 (F1) and 2 (F2)] according to the experimental conditions shown in Table 1. Extraction time was 5 min static extraction followed by 60 min dynamic extraction for each step. F1 mainly correspond to rosemary essential oil. The residue obtained after the first extraction was re-extracted at conditions selected for F2. The conditions were selected based on previous work in our laboratory [6] and also considering conditions previously suggested by other authors [14,15].

Supercritical fluid extracts were collected in glass vials (2 cm × 0.5 cm) using a device specially designed in our laboratory [6].



Table 1  
Experimental conditions used for supercritical fluid extraction of rosemary

Experiments	Pressure (atm)	Temperature (°C)	Density (g mL <sup>-1</sup> )
Experiment 1			
F1	140	40	0.765
F2	300	60	0.831
Experiment 2			
F1	140	50	0.674
F2	350	50	0.900
Experiment 3			
F1	90	40	0.494
F2	250	40	0.835
Experiment 4			
F1	100	40	0.633
F2	400	60	0.891

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Surface activity

Surface activity of the two columns was measured by analyzing a polarity mixture. Table 2 shows the asymmetry factors obtained when using pure CO<sub>2</sub> as mobile phase. The results show a correct deactivation of the residual silanol groups in the particle surface allowing the separation of alcohols and amines, and, for 3% CW20M stationary phase, of benzoic acid with only slight peak tailing.

#### 3.2. Carnosic acid analysis

The retention behavior of carnosic acid on the two columns was studied at various temperatures (Table 3). Elution of carnosic acid is seen to be easier with the non-polar stationary phase which means that both deactivation and stationary phase polarity play a role in the selectivity of the SFC system.

Table 2  
Asymmetry factor ( $A_s$ ) of the two columns evaluated in the study

Compound	$A_s$ ( $n=3$ ) <sup>a</sup> 3%	
	SE-54	CW20M
Anthracene	1.1	1.1
Methyl benzoate	1.3	1.1
Fluoranthene	1.2	1.0
2,6-Dimethylaniline	1.0	1.4 (T)
Menthol	1.4 (T)	1.5 (T)
Benzoic acid	no elution	1.4 (T)

<sup>a</sup> Conditions: 120 °C, 90–300 atm at 4 atm min<sup>-1</sup>; T, tailing.

Table 3  
Retention of carnosic acid in SFC at three oven temperatures ( $n=3$ )<sup>a</sup>

$T$ (°C)	$k'$	
	SE-54	CW20M
40	7.7	9.5
70	11.9	12.6
100	13.3	14.2

<sup>a</sup> For columns see Section 2.3.

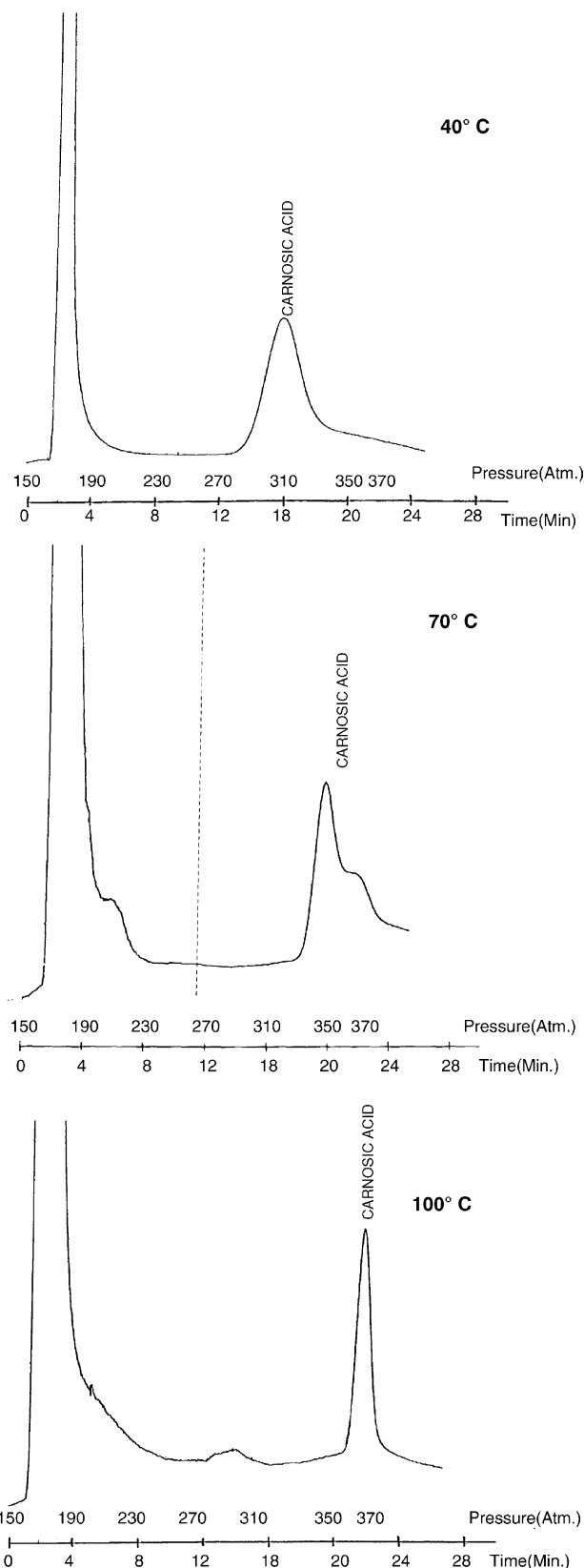


Fig. 1. SFC–FID of carnosic acid in the 25 cm × 500 μm i.d. column packed with 3% SE-54 coated silica particles (10 μm). Pressure program from 150 to 370 atm at 10 atm min<sup>-1</sup>. Column temperatures tested: 40, 70 and 100 °C.

tem when using neat CO<sub>2</sub>. The behavior of carnosic acid was found to be similar on the two columns; Fig. 1 shows results for SE-54. At lower temperatures the broad peak shape suggests the co-elution of carnosol (the standard contains 7% of carnosol). When the temperature increases from 40 °C via 70 to 100 °C the separation of carnosic acid and carnosol (appearing as a small peak at around 15 min) becomes possible.

### 3.3. Separation of SFE rosemary extracts

For an appropriate separation of phenolic antioxidants in rosemary, both column efficiency and selectivity were taken into account. While the CW20M column provides higher efficiencies, the SE-54 column allows a faster analysis. Therefore, the latter was selected in this study.

The separation of SFE experiments 2 and 4 (Table 1) are shown in Fig. 2 (F2, antioxidant fraction and F1, essential oil fraction). Fraction 2 does not show a very complex profile, and the major compound detected in all experiments

was carnosic acid which is extracted at the highest extraction density (350 atm and 50 °C). It is interesting to note the high resolution achieved between carnosic acid and most other compounds in the extracts. This will become important when developing packed columns with selectively coated particles for preparative SFC.

The F1 fraction also contain carnosic acid, but the profiles are more complex in terms of the number and type of compounds extracted by SFE. An important group of compounds is eluted close to the dead time of the solvent; those being the most volatile components of the essential oil. Major constituents of the essential oil (camphor, 1,8-cineole and borneol) were identified by comparing retention times with those of standards. These compounds can play an important role as natural antimicrobials; that is, their preparative-scale purification by SFC could be of interest. With the columns tested, baseline separation of 1,8-cineole was possible but borneol and camphor co-eluted. Obviously, further research will be required if preparative-scale SFC becomes desirable.

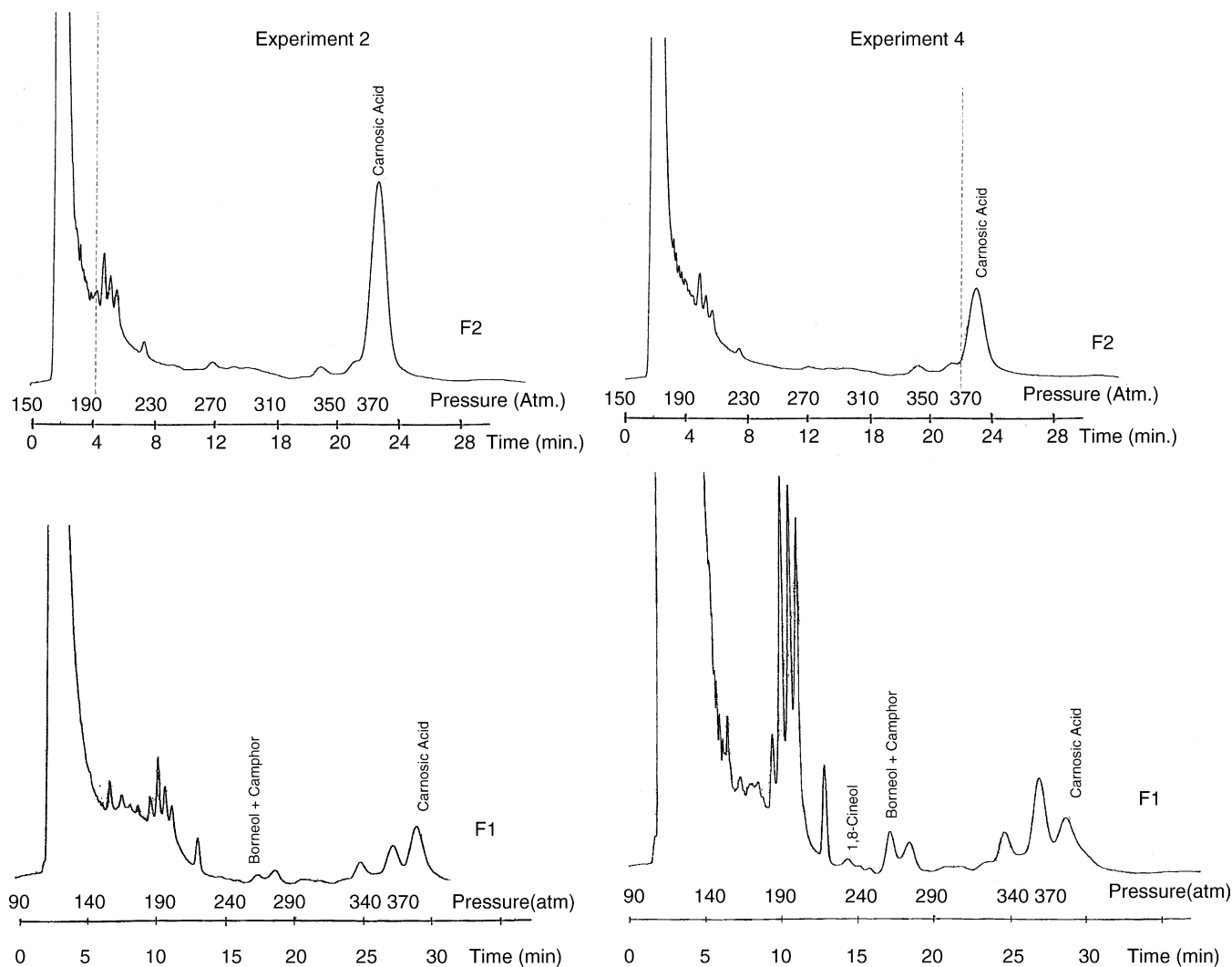


Fig. 2. SFC-FID of SFE rosemary on SE-54-coated silica columns. Extracts corresponding to F2 and F1 (experiments 2 and 4, Table 1). Column temperature: 100 °C, pressure program for F2 from 150 to 370 atm at 10 atm min<sup>-1</sup>, and for F1 from 90 to 370 atm at 10 atm min<sup>-1</sup>.

In conclusion, this work shows the feasibility of SFC with coated packed capillary columns as a method to separate rosemary extracts obtained by SFE with pure CO<sub>2</sub> as mobile phase. The next step will be preparative-scale SFC to purify carnosic acid. At present, these coated (packed) columns are being manufactured at a large scale for the fractionation and purification of antioxidants of high activity and high added value such as carnosic acid.

### Acknowledgments

This work was supported by Project AGL2000-0448 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain). P.R. greatly acknowledges the Spanish Ministry of Science and Technology for the FPI grant.

### References

- [1] D.L. Madhavi, S.S. Deshpande, D.K. Salunkhe, *Food Antioxidants*, Marcel Dekker, New York, 1996, p. 1.
- [2] J.R. Chipault, G.R. Mizumo, J.M. Hawkins, W.O. Lundberg, *Food Res.* 17 (1952) 46.
- [3] R. Inatani, N. Nakatani, H. Fuwa, *Agric. Biol. Chem.* 47 (1983) 521.
- [4] K. Schwarz, W. Ternes, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 195 (1992) 99.
- [5] K. Schwarz, W. Ternes, E. Schmauderer, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 195 (1992) 104.
- [6] E. Ibañez, A. Oca, G. de Murga, S. Lopez-Sebastian, J. Tabera, G. Reglero, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1400.
- [7] K. Coleman, R. Boutant, F. Verillon, *Practical Aspects of Preparative Supercritical Fluid Chromatography*, Gordon & Breach, London, UK, 1999.
- [8] E. Ibañez, F.J. Señorans, *J. Biochem. Biophys. Methods* 43 (2000) 25.
- [9] T.L. Chester, J.D. Pinkston, D.E. Raynie, *Anal. Chem.* 68 (1996) 487R.
- [10] P. Ramirez, F.J. Señorans, E. Ibañez, G. Reglero, *J. Supercrit. Fluids*, submitted.
- [11] A. Malik, W. Li, M.L. Lee, *J. Microcol. Sep.* 5 (1993) 361.
- [12] K.M. Payne, B.J. Tarbett, J.S. Bradshaw, K.E. Markides, M.L. Lee, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1379.
- [13] E. Ibañez, P.J. Martin Alvarez, G. Reglero, M. Herraiz, *J. Microcol. Sep.* 5 (1993) 371.
- [14] Z. Djarmati, R.M. Jankov, E. Schwirtlich, B. Djulinac, A. Djordjevic, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68 (1991) 731.
- [15] U. Nguyen, G. Frakman, D.A. Evans, US Patent 5,017,379 (1991).

## Isolation of phenolic antioxidant compounds by SFC

Pilar Ramírez<sup>a</sup>, Tiziana Fornari<sup>a</sup>, F. Javier Señoráns<sup>a</sup>,  
Elena Ibañez<sup>b,\*</sup>, Guillermo Reglero<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Área de Tecnología de Alimentos (Unidad Asociada al CSIC), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain*

<sup>b</sup> *Departamento de Caracterización de Alimentos, Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain*

Received 18 May 2004; received in revised form 11 January 2005; accepted 13 January 2005

### Abstract

Specially designed chromatographic columns were evaluated for antioxidant compounds separation by supercritical fluid chromatography (SFC) with pure CO<sub>2</sub>. Columns studied involved the use of commercial octadecylsilica particles (ODS) and silica particles coated with a stationary phase commonly used in gas chromatography, such as CW20M (polyethylene glycol) of high polarity. In order to select the appropriate chromatographic conditions to elute antioxidant compounds of phenolic structure, carnosic acid was selected as a model molecule and a theoretical study of the solubility of carnosic acid was performed. Carnosic acid was eluted using CO<sub>2</sub> as mobile phase (without modifiers) with a pressure programming up to 37 MPa (and at different temperatures) but only when coated particles were used. No elution was possible when ODS particles were tested, probably due to the strong interactions of the acid group of the molecule with the active sites remaining in the column. A separation of a complex mixture of a rosemary antioxidant extract (obtained by supercritical fluid extraction) using the columns designed in the present work is shown.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Carnosic acid; Antioxidant compounds; Supercritical fluid chromatography; Packed capillary columns; Coated particles

### 1. Introduction

At present, one of the most important areas of research in food technology is the isolation of natural compounds with functional properties from natural sources. Isolation of pure compounds or even groups of compounds with therapeutic properties, such as antioxidants, is usually done by HPLC at preparative scale (Prep-LC) [1,2]. Supercritical fluid chromatography (SFC) at preparative scale has been suggested as an alternative to Prep-LC with some advantages associated to its use such as the easy recovery of the isolated compounds by a simple decompression of the supercritical fluid where the mobile phase is spontaneously eliminated [3] and the possibility of obtaining pure compounds without the use of solvents.

Phenolic compounds have been described as responsible of the antioxidant activity of different matrices of natural origin such as aromatic plants [4]. Considering the polar nature of some of these compounds, a study is needed in order to be able to elute such compounds in SFC. Different strategies have been described to separate polar compounds by SFC with packed capillary columns: tuning the mobile phase polarity by adding polar cosolvents at low concentration, or tuning the polarity of the stationary phase through silica-based particles deactivation and/or polymer coating and later elution with pure CO<sub>2</sub> [5]. Packed capillary columns show high efficiency, a reasonable sample loadability and are easy to prepare with a wide variety of packing materials. Even more important, these types of columns can be used as a first step towards a scaling-up to a preparative scale separation.

The objective of the present work has been the separation of phenolic antioxidant compounds by SFC with pure CO<sub>2</sub> using specially designed chromatographic columns. In order

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 562 2900x388; fax: +34 91 564 4853.  
E-mail address: [elena@ifi.csic.es](mailto:elena@ifi.csic.es) (E. Ibañez).

to select the appropriate chromatographic conditions to elute antioxidant compounds of phenolic structure, carnosic acid was selected as a model molecule. A thermodynamic modeling based on the use of the Group Contribution Associating Equation of State (GCA-EoS) [6], was applied to estimate the solubility of carnosic acid in pure CO<sub>2</sub>. Elution was attempted using packed capillary columns with commercial octadecylsilica particles (ODS) and silica particles coated with a polymeric stationary phase of high polarity such as CW20M (polyethylene glycol). Also, evaluation of the columns used in the present study in terms of efficiency and surface activity was performed. Moreover, a separation of a complex mixture of a supercritical rosemary antioxidant extract using the columns designed in the present work is shown to demonstrate the usefulness of this columns for the isolation of certain phenolic compounds in complex samples.

The present study is presented as a first step towards the development of a process for off-line extraction and fractionation (SFE/SFC) at preparative scale of antioxidant compounds from aromatic plants.

## 2. Experimental

### 2.1. Samples

For efficiency measurements, a mixture of pure *n*-alkanes (C12–C28) (Sigma, St. Louis, MO) was used. For surface activity evaluation, a mixture of menthol, benzoic acid, methyl benzoate and 2,6-dimethylaniline (Fluka, Switzerland) was utilized. Carnosic acid standard from *Rosmarinus officinalis* (93% purity) was used as model sample of phenolic nature antioxidants (Sigma). Hexane and dichloromethane used to prepare the solutions were purchased from LabScan (Dublin, Ireland). Carnosic acid solutions were maintained at 277 K in dark glass flasks.

The rosemary sample (*R. officinalis* L.) consisted of dried rosemary leaves (Murciana de Herboristeria, Murcia, Spain). Samples were ground under cryogenic carbon dioxide and stored in amber flasks at 253 K until use.

### 2.2. Instrumentation

A supercritical fluid chromatograph SFC 3000 (Carlo Erba, Milan, Italy) equipped with a flame ionization detector was used. Sample was loaded by a time-controlled, rotating-valve injection device (Vici, Houston, TX, USA) containing 1 µL internal loop. Injector temperature was 313 K. Detector temperature was kept at 623 K. SFC grade CO<sub>2</sub> (Liquid Carbonic, Madrid, Spain) was pumped by using a SFC300 pump (Carlo Erba). The flow rate of the mobile phase was set by using a linear restrictor of 13 µm i.d. × 20 cm made of fused silica tubing (Composite Metal Services Ltd., Worcestershire, UK) connected to the column through a zero dead-volume union. The columns were connected to the injection

valve via a flow splitter consisting of a silica tubing of 13 µm i.d. × 20 cm length. Conditions of analysis are detailed in the figure caption.

### 2.3. Columns

Packed capillary columns were prepared according to a reported procedure [7] by using 500 µm i.d. stainless steel tubing (Symta Ltd., Madrid, Spain) of 25 cm length. The stainless steel tubing was deactivated with 20% polyethylene glycol (Supelco, Bellefonte, USA). The packing procedure was performed at a starting pressure of 8 MPa followed by a pressure rate of 0.3 MPa min<sup>-1</sup> up to 34 MPa. The tubing was introduced into an ultrasonic bath maintained at room temperature. Once filled, the column was allowed to depressurize overnight. The columns were conditioned prior to their use in SFC using a pressure and temperature program as follows: from 12 to 34 MPa at 0.4 MPa min<sup>-1</sup> and from 313 to 453 K at 3 K min<sup>-1</sup>.

### 2.4. Octadecylsilica particles

Octadecylsilica particles of 10 µm (Spherisorb ODS2, Hichrom Ltd., Reading, UK) were conditioned prior to their use by washing them with ethanol, and dried by heating at 433 K for 1 h in a fluidized bed reaction vessel [8] which allowed continuous inert gas (helium) purge throughout the washing, drying and coating. By performing all of these steps in the same container, handling was minimized and the integrity of the packing material maintained.

### 2.5. Coating of silica particles

Porous silica particles (10 µm, 60 Å, Hichrom, Reading, UK) were used as base material. Particles were washed as mentioned above.

#### 2.5.1. Silica particles coating with GC stationary phases

Silica particles (0.3 g) were placed in the fluidized bed reaction vessel and mixed with 3% (w/w) CW20M (polyethylene glycol) dissolved in dichloromethane. Coating was performed at room temperature with He as purge gas.

### 2.6. Supercritical fluid extraction of rosemary

A Suprex PrepMaster (Suprex Corp., Pittsburgh, PA, USA) supercritical fluid extractor was used. Sample (0.85 g, dry weight basis) was placed into a 5 mL stainless steel extraction cell. The supercritical CO<sub>2</sub> flow rate (3 mL/min) was controlled using a needle valve as variable restrictor.

Sample was extracted at 10 MPa and 313 K. Extraction time was 5 min static extraction followed by 60 min dynamic extraction. The supercritical fluid extract was collected in a glass vial (2 cm × 0.5 cm).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Column efficiency and surface activity

Packed capillary columns of special dimensions (500  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  25 cm length) were used to test the elution of phenolic compounds. Previous studies have demonstrated the performance of packed capillary columns of large diameter (500  $\mu\text{m}$  i.d.) packed with 10  $\mu\text{m}$  particles in terms of efficiency, sample capacity and sample volume loadability compared to packed capillary columns of 180  $\mu\text{m}$  i.d. [9]. Sample capacity ( $c$ ) and sample loadability ( $l$ ) represent the influence of the quantity of solute injected on the separation power of the tested column, and are of great importance for scaling up the separation to preparative scale. Columns made using 500  $\mu\text{m}$  tubing have five times more sample capacity and 4.4 times more sample loadability than columns prepared with 180  $\mu\text{m}$  tubing [9]; therefore, the expected separation power of the columns prepared with 500  $\mu\text{m}$  tubing would be less affected for both the volume injected and the concentration of the solutes in the sample.

Before studying the use of the columns for phenolic compounds separation, column efficiency and activity were evaluated. Efficiency was measured by separation of an  $n$ -alkanes solution at a constant pressure of 9 MPa and at a constant temperature of 353 K. The expected efficiency obviously depends on the quality of the packing procedure and on the type of material packed. The columns studied in the present work included a 500  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  25 cm length column packed with commercial 10  $\mu\text{m}$  octadecylsilica (ODS) particles (Column 1) and a 500  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  25 cm length column packed with 10  $\mu\text{m}$  particles coated with 3% CW20M stationary phase (Column 2). The average values obtained ranged from 8000 to 10500 plates/m at  $k' = 4.5$  and 7 (Column 1) and around 20 000 plates/m ( $k' = 3$ ) for Column 2.

The lack of polarity of neat carbon dioxide makes it unacceptable as a mobile phase for high molecular weight and polar compounds on packed columns. When neat  $\text{CO}_2$  is used, the risk of surface activity increases and the behavior of the columns in terms of activity is very important for separating compounds of different polarity. In the present work, the activity was evaluated by separating a test mixture containing compounds of different polarity that have different interactions with either the mobile or the stationary phase. Table 1 shows data of surface activity (asymmetry factor) obtained by injection of the test mixture in the two columns studied, Column 1 (ODS), deactivated by reaction of the silica surface with a monomeric silylation reagent to obtain a monolayer coverage with a C18 functionality, and Column 2, deactivated by coating the particles with 3% CW20M stationary phase.

As can be seen, methyl benzoate, a compound with nearly no interactions with neither mobile nor stationary phases, elute from both columns with symmetrical peak shapes. The compounds that have strong interactions, such as alcohols (menthol), amines (2,6-dimethylaniline) and acids (benzoic acid) are much more affected by the type of deactivation. If

Table 1

Surface activity (as asymmetry factor,  $A_s$ ) of the different columns evaluated in this study

Compound	500 $\mu\text{m}$ i.d. $\times$ 25 cm, 10 $\mu\text{m}$ ODS column	500 $\mu\text{m}$ i.d. $\times$ 25 cm, 10 $\mu\text{m}$ particles coated with 3% CW20M
Methyl benzoate	1.2	1.1
2,6-Dimethylaniline	1.5 (T)	1.4 (T)
Menthol	1.6 (T)	1.5 (T)
Benzoic acid	– (no elution)	1.4 (T)

T: peak tailing; separation conditions: 393 K, 9–30 MPa at 0.4  $\text{MPa min}^{-1}$ . Experiments performed by triplicate.

the deactivation is not complete, these polar solutes can interact with the residual silanol groups resulting in tailing and increased retention. Comparing data of Columns 1 and 2 (using pure  $\text{CO}_2$ ), it can clearly be seen that the coated particles offer the advantage of the separation of the polar compounds with, in most cases, only slight peak tailing. Menthol, aniline, and even benzoic acid can be eluted in all cases with this type of columns although some peak tailing can be seen for benzoic acid; nevertheless, elution of benzoic acid assures a complete deactivation of the active sites of the column.

##### 3.1.1. Analysis of carnosic acid solubility in supercritical $\text{CO}_2$

After testing the columns for efficiency and surface activity, carnosic acid was selected as model compound to study its elution in SFC with pure carbon dioxide. Temperature and pressure ranges which guarantee high carnosic acid solubility in  $\text{CO}_2$ , would be appropriate chromatographic conditions for elution. Thus, carnosic acid solubilities in pure  $\text{CO}_2$  were estimated using a theoretical analysis.

The isofugacity criteria provides the general equation of equilibrium between the solid solute ( $s$ ) and the supercritical fluid in the solid phase can be considered negligible, the solute mole fraction ( $y_s$ ) in the supercritical phase is given by

$$y_s = \frac{P_s^{\text{sat}}}{P} E$$

where  $P_s^{\text{sat}}$  is the sublimation (vapor) pressure of the pure solid,  $P$  the pressure, the ratio  $P_s^{\text{sat}}/P$  the ideal solubility and  $E$  the enhancement factor [10]. Usually, very small values of the fugacity coefficient of the solute in the supercritical phase, produces very large enhancement factors increasing ideal solubility by various orders of magnitude.

In a previous work [6] the authors reported experimental data on carnosic acid solubilities in supercritical  $\text{CO}_2$  + ethanol as a modifier. Measurements were carried out at temperatures in the range of 313.15–333.15 K, pressures ranging from 28 to 40 MPa, and at different content of the modifier ethanol (from 0.7 to 10%). Solubilities in pure  $\text{CO}_2$  were not possible to measure, because carnosic acid mole fractions were in the same order of magnitude of the experimental error ( $10^{-7}$ ). The correlation of the experimental sol-



Table 2  
Carnosic acid physical properties [6] used in the solubility calculations

Critical temperature, $T_c$	950.5 K
Critical pressure, $P_c$	1.04 MPa
Solid volume, $v_s^{\text{solid}}$	$393.03 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{mol}$
Sublimation pressure, $P_s^{\text{sat}}$	$8.22 \times 10^{-12} \text{ MPa}$ at 313.15 K
	$4.33 \times 10^{-9} \text{ MPa}$ at 343.15 K
	$7.34 \times 10^{-6} \text{ MPa}$ at 373.15 K

ubility data using the GCA-EoS [11,12] was also presented in this work. Pure carnosic acid physical properties (i.e. critical properties, solid volume and sublimation pressure) were also estimated and are reproduced in Table 2. A detailed description of the methods employed to estimate these properties, together with the thermodynamic modeling details, are given in [6].

In the present work carnosic acid solubilities in pure  $\text{CO}_2$  are calculated, extrapolating the thermodynamic modeling procedure given in [6] to 0% ethanol content. The values obtained in the temperature range of 313.15–333.15 K are in good agreement with the experimental data reported in [6]. Fig. 1 shows the variation of carnosic acid solubility with  $\text{CO}_2$  density, calculated at 313.15, 343.15 and 373.15 K, and pressures from 20 to 37 MPa. As expected, the model predictions result in an increase of carnosic acid solubility with  $\text{CO}_2$  density. Taking into account that 37 MPa is the maximum pressure achievable in the chromatographic system temperatures around 313.15 K would be the best conditions to elute carnosic acid using pure  $\text{CO}_2$ .

The low solubilities predicted by the thermodynamic model (mole fractions in the order of  $10^{-8}$  to  $10^{-7}$ ), indicated that carnosic acid would not be easy to elute using pure  $\text{CO}_2$ ; moreover, considering that the column packed with chemically bonded ODS ( $\text{C}_{18}$ ) particles has an excess of silanol groups on the silica surface (which have not been com-

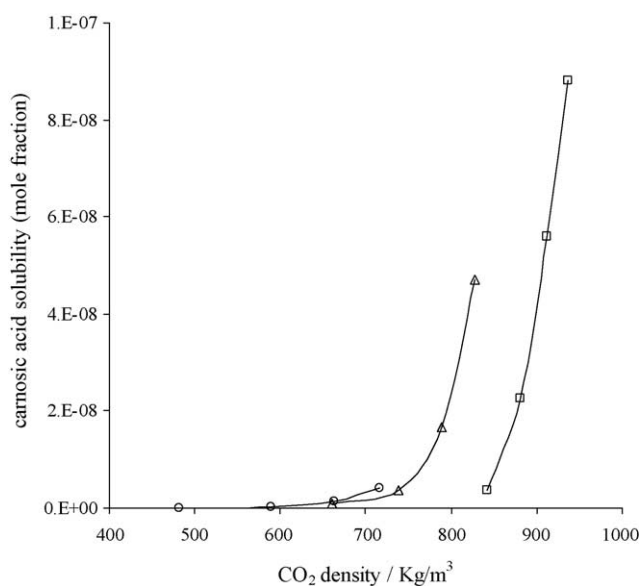


Fig. 1. Carnosic acid solubilities predicted by the GCA-EoS model as a function of  $\text{CO}_2$  density: ( $\square$ ) 313.15 K; ( $\Delta$ ) 343.15 K; ( $\circ$ ) 373.15 K.

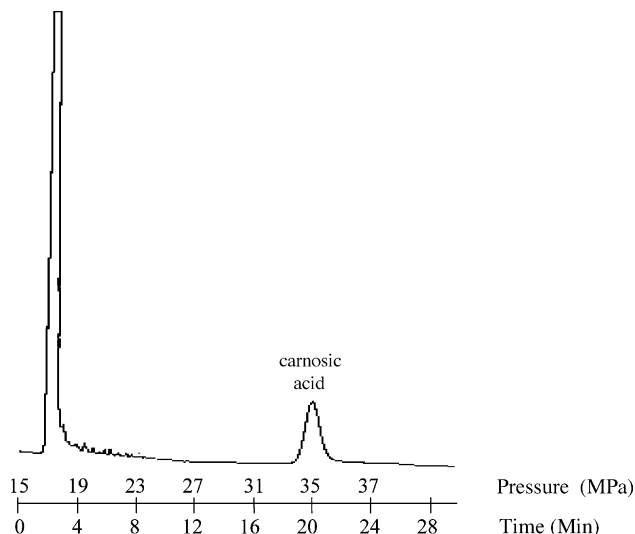


Fig. 2. SFC chromatogram of carnosic acid in the 25 cm  $\times$  500  $\mu\text{m}$  i.d. column packed with 3% CW20M coated silica particles (10  $\mu\text{m}$ ). Chromatographic conditions: column temperature 313.15 K, pressure program from 15 to 37 MPa at 1  $\text{MPa min}^{-1}$ .

pletely deactivated by the reaction with silylation reagents) this can explain the impossibility of eluting carnosic acid in such columns. Nevertheless, elution of carnosic acid was accomplished when a packed column with silica particles coated with 3% of CW20M was used. Fig. 2 shows the chromatogram obtained for the elution of carnosic acid at 313.15 K and using a pressure program up to 37 MPa. Experimental data showed that carnosic acid was eluted at very high pressures and at moderate temperatures (from 313.15 to 373.15 K) increasing its retention while increasing the temperature of the column, according to the decrease of solubility with temperature predicted by the model.

By comparing the results obtained with the two columns evaluated, it is easy to realize that the separation of carnosic acid was possible only when homogeneous and controlled coating was achieved, that is, only when exhaustive deactivation of the silica surface was performed. When coating the silica particles with liquid stationary phases the deactivation takes place through different mechanisms, one is associated to the degree of physical coverage of the active sites of the silica particles, while a different one is related to the presence of certain polar functional groups, such as phenyl groups, in the polymeric stationary phase that interact with the residual silanol groups on the silica phase surface through hydrogen-bond interaction; such interactions can provide further deactivation of the residual silanol groups on the particles thus favoring the separation of more polar compounds.

As an example of the usefulness of the designed columns towards the separation of phenolic compounds in a complex sample, Fig. 3 shows the chromatogram corresponding to the analysis of a supercritical rosemary extract obtained at the conditions described under experimental. At this conditions, a quite complex mixture is obtained where the major compound was identified as carnosic acid (as expected)

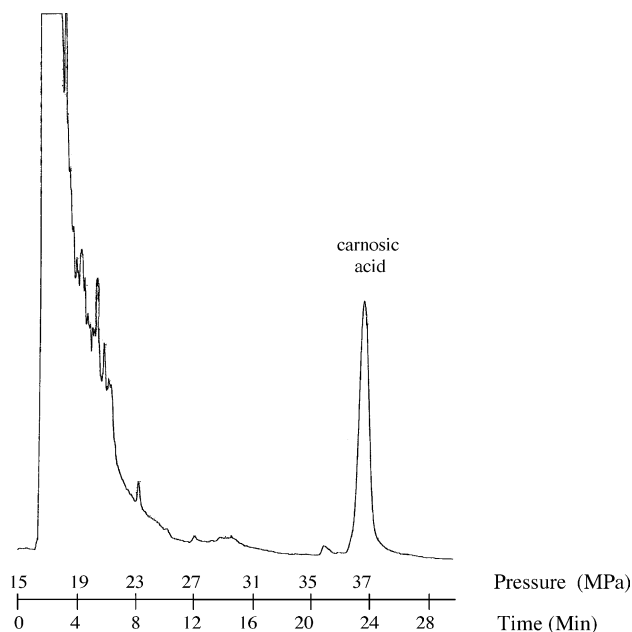


Fig. 3. SFC-FID of SFE rosemary on CW20M-coated silica columns. Extract corresponding to 10 MPa and 313 K. Column temperature 373 K, pressure program from 15 to 37 MPa at  $1 \text{ MPa min}^{-1}$ .

while the other compounds can correspond to other phenolic compounds previously described in such antioxidant extracts [13]. As can be seen, elution of carnosic acid was achieved under conditions of high selectivity allowing the isolation of this compound once working at preparative scale.

As a conclusion, the present study shows, for the first time, the possibility of separating phenolic compounds with antioxidant properties, such as carnosic acid, by SFC using coated packed capillary columns and pure  $\text{CO}_2$ . This work can be considered as a first step towards the optimization of separation conditions to fractionate complex extracts using a preparative scale SFC. At present, studies are conducted in our laboratory to achieve the purification of carnosic acid from rosemary extracts by preparative-SFC using coated packed columns.

### Acknowledgements

This work was supported by Project AGL2000-0448 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain). P. Ramírez

greatly acknowledges the Spanish Ministry of Science and Technology for the FPI grant. T. Fornari would like to acknowledge the financial support of the Secretaría de Estado de Educación y Universidades for the fellowship at the Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

### References

- [1] H. Esaki, H. Onozaki, Y. Morimitsu, S. Kawakishi, T. Osawa, Potent antioxidative isoflavones isolated from soybeans fermented with *Aspergillus isaitoi*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (1998) 740.
- [2] W.C. Sang, J.C. Eun, Y.H. Tae, H.C. Kyung, Antioxidative activity of acylated anthocyanin isolated from fruit and vegetables, *J. Food Sci. Nutr.* 2 (1997) 191.
- [3] K. Coleman, R. Boutant, F. Verillon, Practical Aspects of Preparative Supercritical Fluid Chromatography, Gordon and Breach Science Publishers, UK, 1999.
- [4] K. Schwarz, W. Ternes, Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 195 (1992) 99.
- [5] E. Ibañez, F.J. Señorans, Tuning of mobile and stationary phase polarity for the separation of polar compounds by SFC, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 43 (2000) 25.
- [6] A. Cháfer, T. Fornari, A. Berna, E. Ibañez, G. Reglero, Solubility of solid carnosic acid in supercritical  $\text{CO}_2$  with ethanol as a cosolvent, *J. Supercrit. Fluids*, in press.
- [7] A. Malik, W. Li, M.L. Lee, Preparation of long packed capillary columns using carbon dioxide slurries, *J. Microcol. Sep.* 5 (1993) 361.
- [8] K.M. Payne, B.J. Tarbet, J.S. Bradshaw, K.E. Markides, M.L. Lee, Simultaneous deactivation and coating of porous silica particles for microcolumn supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1379.
- [9] E. Ibañez, S. Lopez-Sebastian, J. Tabera, G. Reglero, Separation of carotenoids by sub-SFC with coated, packed capillary columns and neat carbon dioxide, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 313.
- [10] J.M. Prausnitz, Molecular Thermodynamics of Fluid-phase Equilibria, Prentice-Hall, 1969, p. 164.
- [11] H.P. Gros, S.B. Bottini, E.A. Brignole, High pressure phase equilibrium modeling of mixtures containing associating compounds and gases, *Fluid Phase Equilibria* 139 (1997) 75.
- [12] O. Ferreira, T. Fornari, E.A. Brignole, S.B. Bottini, Modeling of association effects in mixtures of carboxylic acids with associating and non-associating components, *Latin Am. Appl. Res.* 33 (2003) 217.
- [13] F.J. Señorans, E. Ibañez, S. Cavero, J. Tabera, G. Reglero, Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 491.



## Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC)

Pilar Ramírez<sup>a</sup>, Mónica R. García-Risco<sup>a</sup>, Susana Santoyo<sup>a</sup>,  
F. Javier Señoráns<sup>a</sup>, Elena Ibáñez<sup>b</sup>, Guillermo Reglero<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Sección Departamental Ciencias de la Alimentación, Unidad Asociada al CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Caracterización de Alimentos, Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

Received 5 December 2005; received in revised form 1 February 2006; accepted 1 February 2006

Available online 5 June 2006

### Abstract

A supercritical fluid extract of rosemary has been fractionated under supercritical conditions by using a preparative-SFC system. In this work, the optimum conditions have been evaluated to achieve a selective isolation of the compounds responsible for both, antioxidant and antimicrobial activities. A 25 cm × 10 mm i.d. LC-Diol packed column (dp = 5 μm) has been used and the separation took place at 80 °C of column temperature, 130 bar of pressure, and 10% of ethanol as modifier of the mobile phase (CO<sub>2</sub>). Two cyclones were employed to collect the fractions which were subsequently characterized by HPLC-DAD, GC, and in vitro antioxidant and antimicrobial assays. By a careful selection of the separation conditions it is possible to obtain two different fractions, one enriched with antioxidant and antimicrobial compounds (with an improvement of about 20% and 40% of antioxidant and antimicrobial activity, respectively, compared to the original extract) collected in cyclone 2 and with no residual rosemary aroma and another one containing the essential oil.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Rosemary extracts; Functional ingredients; Preparative-SFC; Antioxidants; Antimicrobials

### 1. Introduction

The growing interest in functional foods has fostered research on new natural sources of active ingredients. Vegetables are by far the most well studied natural sources since they contain a huge variety of active compounds that could be used in the food industry as functional compounds or nutraceuticals.

Spices and herbs have been added to foods since ancient times, mainly to modify or improve their flavors. Since 1952 [1], the antioxidant properties of some of these species have been recognized. Antioxidants are compounds that when present in foods at low concentrations, compared to that of an oxidizable substrate, markedly delay or prevent oxidation of the substrate [2,3]. Moreover, and even more important, the beneficial effects of antioxidants on human health have also been described [4]. It

is also a well-known fact that aromatic plants and spices as well as their essential oils have varying degrees of antimicrobial activity [5–7]. For this reason extracts from these plants can be used to delay or inhibit the growth of pathogenic or spoilage microorganisms [8]. Besides, the majority of the essential oils are classified as Generally Recognized As Safe (GRAS) ingredients [9].

Among herbs and spices, rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is a common household plant grown in many parts of the world. It is used for flavoring food, in cosmetics and in traditional medicine for its choleretic, hepatoprotective and antitumorigenic activity [10]. Rosemary is also known to exhibit antioxidant [11–14], and antimicrobial activities [15–18]. The potent antioxidant and antibacterial properties of rosemary extracts have been mainly attributed to its major diterpene, carnosic acid [19–22] and some compounds of the essential oil. Carnosic acid is quite unstable and, usually, is converted to carnosol upon heating. Carnosol can degrade further to produce other compounds such as rosmanol, epirosmanol and metoxyepirosmanol which still possess antioxidant activity.

Thus, rosemary extracts have a great interest for the food industry as a source of active compounds but to obtain a use-

\* Corresponding author at: Sección de Ciencias de la Alimentación, Facultad de Ciencias, Módulo C-XVI, Universidad Autónoma de Madrid, Carretera de Colmenar Km 15, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 4978128; fax: +34 91 4978255.

E-mail address: [guillermo.reglero@uam.es](mailto:guillermo.reglero@uam.es) (G. Reglero).

ful natural food additive is necessary to improve the functional activities while eliminating the interfering compounds that produce odour, taste and colour.

Supercritical fluids have useful physical properties such as low viscosity and high diffusivity into the sample matrix. This results in remarkably faster mass transport than in common organic solvents. Furthermore, SFE operates at low temperatures, which makes it a very suitable technique for the extraction of thermolabile compounds, such as antioxidants. Also because of these properties, supercritical fluids are uniquely suited to preparative separations [23] in which the supercritical solvent is used as mobile phase. Among the different methods available to separate complex extracts for the isolation of one or more compounds of the mixture, preparative-scale chromatographic techniques on both polar and non-polar stationary phases are a useful alternative. Most of the separations have been performed using HPLC but the disadvantages of these methods are the sample dilution and the high consumption of organic solvents. In supercritical fluid chromatography (SFC), the lower operating temperatures, the higher diffusivities of the solutes and the lower viscosity of the eluent also provide advantages compared to liquid chromatography (LC) [24] such as: fast analysis time, yielding at least a three-fold increase in the throughput, easy recovery of products by simple decompression, low consumption of organic solvents and wider range of applicability [25,26].

The objective of the present work was the separation of a complex supercritical fluid rosemary extract by semi-preparative SFC to obtain fractions with improved functional activities to be used as food ingredients and/or nutraceuticals. The isolation of biologically active fractions can lead to obtaining ingredients and/or nutraceuticals more active at lower concentrations. The isolated fractions have been chemically and functionally characterized using HPLC, GC, and antioxidant and antimicrobial *in vitro* assays.

## 2. Experimental

### 2.1. Samples and chemicals

The rosemary sample (*Rosmarinus officinalis* L.) consisted of dried rosemary leaves obtained from Herboristeria Murciana (Murcia, Spain). Rosemary leaves were collected during September and dried using a traditional method previously described [27]. Cryogenic grinding of the sample was performed under carbon dioxide and particle size was determined by sieving the ground plant material to the appropriate size (between 999 and 500  $\mu\text{m}$ ). The whole sample was stored in amber flasks at  $-20^\circ\text{C}$  until use (a maximum of 2 months).

2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl hydrate (DPPH, 95% purity) and carnosic acid (93%) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

Chloroform, methanol, acetonitrile (ACN) and acetone were all HPLC grade from Lab Scan (Dublin, Ireland). Ethanol (99.5%) was obtained from Panreac (Spain) and acetic acid (99%) from Merck Schuchardt (Germany).

Milli-Q water was obtained from a purification system (Millipore).  $\text{CO}_2$  (N-48 quality) was obtained from Air Liquide España S.A. (Madrid, Spain).

### 2.2. Supercritical fluid extraction of rosemary

The extraction of rosemary extract was carried out in a pilot-scale supercritical fluid extractor (Iberfluid, Spain) with a 285 ml extraction cell, previously described [28]. The extraction cell was made of 316 steel and was equipped with a 0.5  $\mu\text{m}$  frit at the inlet and a 2  $\mu\text{m}$  frit at the outlet. The extraction pressure was controlled by micrometering valves, and the carbon dioxide pump was from Bran + Luebbe (Germany). Fractionation was achieved in two different separators assembled in series, with independent control of temperature and pressure, by either a decrease in pressure, or in pressure and temperature.

The extraction cell was filled with 60 g of ground rosemary and 90 g of washed sea sand (Panreac). Dynamic extraction was performed at 150 bar and  $40^\circ\text{C}$ , and fractionation pressures were set in a first stage at 50% of extraction pressure and in the second stage at a fixed value of 20 bar. Ethanol (7%) was used as modifier. The addition of ethanol started after the selected pressure had been reached half of the extraction time (60 min).

All extracts were kept under  $\text{N}_2$ , at  $-20^\circ\text{C}$  in the dark, and ethanol was eliminated at  $35^\circ\text{C}$  in a vacuum rotary evaporator.

### 2.3. Supercritical fluid chromatography (SFC) system

Fig. 1 shows a schematic diagram of the preparative supercritical fluid chromatography pilot plant (Thar Designs, USA) employed. The separation was carried out in a 25 cm  $\times$  10 mm i.d. Supelco SIL LC-Diol packed column (5  $\mu\text{m}$  particle diameter) purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA) which is placed inside a water bath with temperature control. The column pressure is controlled by a back pressure regulator and the column is coupled to an UV/vis detector (UV 1000 model) purchased from SpectraSystem (San Jose, CA, USA). The  $\text{CO}_2$  and modifier are pumped by high pressure pumps, and the  $\text{CO}_2$  pump is cooled by a circulating bath at  $5^\circ\text{C}$ . The sample is injected through a Rheodyne 6 port valve (700  $\mu\text{L}$  injection loop). The pilot plant has three cyclonic separators, two in which the sample can be fractionated and a waste, with controlled temperature to collect different fractions from the injected sample. The plant has a computerized PLC-based instrumentation. The range of column pressures/temperatures tested was from 80 to 200 bar, and from 40 to  $80^\circ\text{C}$ . The  $\text{CO}_2$  flow rate was kept constant at 20 g/min. Ethanol was used as a modifier at different percentages between 5 and 15%.

### 2.4. Antioxidant activity assay

The antioxidant activity was determined by the DPPH scavenging assay based on a procedure described by Brand-Williams et al. [29]. This method consist in the neutralization of free radicals of DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) (Sigma-Aldrich, Spain) by the antioxidant extracts. For each fraction obtained in SFC and the original supercritical extract, different concen-

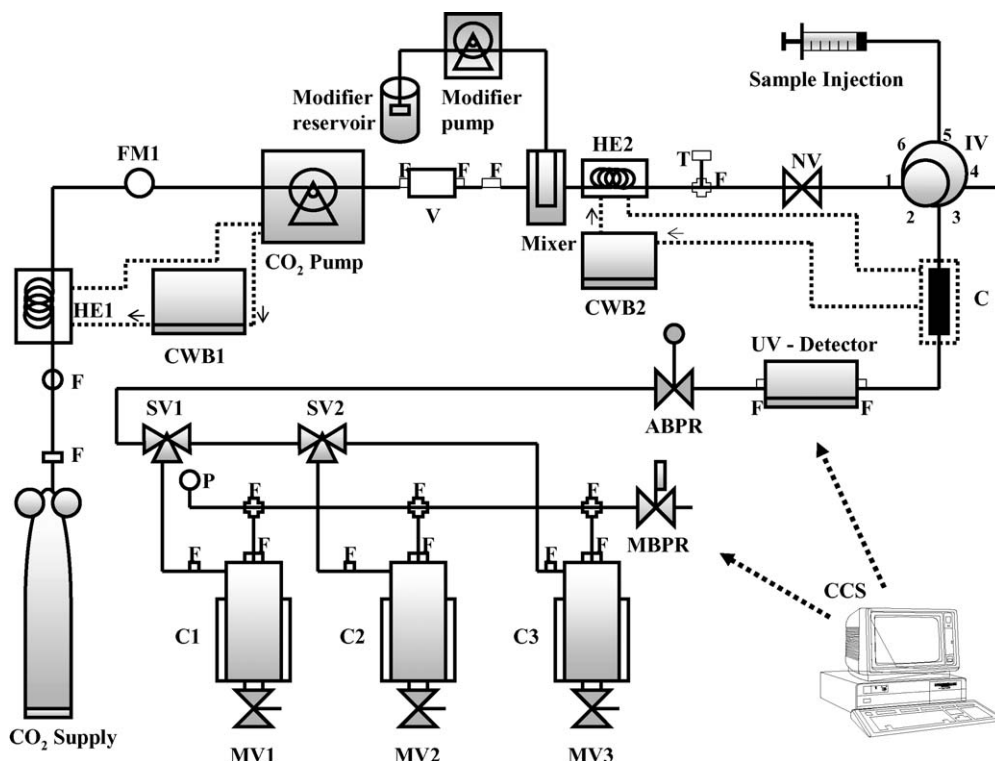


Fig. 1. Schematic diagram of the preparative-supercritical fluid chromatograph (Prep-SFC) used in the present study. F: filters; HE1 and HE2: heat exchangers; FMI: mass flow meter; CWB1: CO<sub>2</sub> pump cryogenic bath; CO<sub>2</sub> pump; V: pressure dampener; modifier pump; mixer: high pressure mixer; CWB2: column temperature heat exchanger; T: thermocouple; NV: needle valve; IV: Rheodyne 6 port valve; C: column; ABPR: back pressure regulator; SV1 and SV2: low pressure solenoid valves; C1, C2 and C3: cyclonic separators; MV1, MV2 and MV3: separators out valves; MBPR: manual restrictor; CCS: computer control system; P: pressure meter; Modifier reservoir; sample injection; CO<sub>2</sub> supply.

trations were tested (from 1 to 10  $\mu\text{g/mL}$  in DPPH–methanol solution). One thousand nine hundred and fifty microlitres of DPPH solution (23.5  $\mu\text{g/L}$  in ethanol) were placed in test tubes and 50  $\mu\text{L}$  of the different concentrations of samples were added. Reaction was completed after 3 h at room temperature and absorbance was measured at 516 nm in a Shimadzu UV-120-01 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Ethanol was used to adjust zero and DHHP–ethanol solution as a reference sample. The DPPH concentration in the reaction medium was calculated from the following calibration curve, determined by linear regression ( $r=0.999$ ):  $Y=0.0247X-0.0029$ .

The percentage of remaining DPPH against the extract concentration was then plotted to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% or  $\text{EC}_{50}$ . Thus, the lower the  $\text{EC}_{50}$ , the higher the antioxidant power. Each determination was repeated twice.

### 2.5. Determination of antimicrobial activity

The extracts were individually tested against a panel of microorganisms including *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11775 and *Candida albicans* ATCC 60193. Bacterial strains stock cultures were kept on nutrient agar at 4 °C. *Candida albicans* was kept on Sabouraud dextrose agar at 4 °C.

A broth microdilution method was used, as recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards

(NCCLS), for determination of the minimum inhibitory concentration [30]. All tests were performed in Mueller-Hinton broth supplemented with 0.5% tween 20, with the exception of yeasts (Sabouraud dextrose broth + 0.5% tween 20). The inocula of bacterial strains were prepared from overnight Mueller-Hinton broth cultures at 37 °C. Yeasts were cultured overnight at 25 °C in Sabouraud dextrose broth. Test strains were suspended in Mueller-Hinton (bacteria) or Sabouraud dextrose (yeasts) broth to give a final density  $10^7$  cfu/mL. The rosemary extracts dilutions in ethanol ranging from 50 to 1 mg/mL.

The 96-microwell plates were prepared by dispensing into each well 185  $\mu\text{L}$  of culture broth, 5  $\mu\text{L}$  of the inoculums and 10  $\mu\text{L}$  of the different extracts dilutions. The final volume of each well was 200  $\mu\text{L}$ . Plates were incubated at 37 °C for 24 h for bacteria and at 24 °C for 48 h for yeasts. Negative controls were prepared using 10  $\mu\text{L}$  of ethanol, the solvent used to dissolve the rosemary extracts. Chloranphenicol and amphotericin B (Sigma, Madrid) were used as positive reference standards to determine the sensitivity of the microbial species used. After incubation, the MIC of each extract was determined by visual inspection of the wells bottom, since bacterial growth was indicated by the presence of a white “pellet” on the well bottom. The lowest concentration of the extract that inhibited growth of the microorganism, as detected as lack of the white “pellet”, was designated the minimum inhibitory concentration (MIC). The minimum bactericidal and fungicidal concentration (MBC) was determined by making subcultures from the clear wells which

did not show any growth. Each test was performed in triplicate and repeated twice.

## 2.6. HPLC-DAD analysis

The analysis of the original extract and the isolated fractions was carried out in an HPLC (Varian Pro-star) equipped with a Nova Pack C<sub>18</sub> column (Waters) of 15 mm × 4.6 mm and 3.5 μm particle size. The mobile phase consisted of 1% acetic acid in acetonitrile (solvent A) and 1% acetic acid in water (solvent B) applying the following gradient: 0–5 min, 50% B; 5–15 min, 50–30% B; 15–40 min, 30–0% B. The flow rate was constant at 0.7 mL/min. Injection volume was 20 μL and the detection was accomplished by using a diode array detection system Varian storing the signal at a wavelength of 230 nm.

## 2.7. GC-FID analysis

SFE original rosemary extract and SFC fractions were analyzed by using a Varian 3400 (Varian, Walnut Creek, CA, USA) gas chromatograph equipped with a 1177 split/splitless injector (Varian). The system was coupled to a Saturn 2000 chromatography software system (Varian). A 30 m × 250 μm i.d. fused silica capillary column coated with a 0.25 μm layer of SE-54 stationary phase (Agilent Technologies) was used. Helium was the carrier gas at 18 psig.

Solutions of 10 mg/mL were prepared by dissolving the supercritical fluid extract and supercritical fluid chromatographic fractions in acetone. Three microliters of each solution were injected in a split mode (1:10 split ratio) at 200 °C. The oven temperature was programmed from 100 °C (10 min constant temperature) to 250 °C at 5 °C/min (10 min constant temperature); then to 300 °C at 15 °C/min. Final temperature was maintained for 10 min. Compounds were tentatively identified by comparison of retention time of those of standards injected at the same conditions and previous data.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Retention behavior of carnosic acid in SFC

In order to select the best conditions for the fractionation of supercritical rosemary extracts by Prep-SFC in a diol column, different factors have been studied including mobile phase pressure, temperature and composition (in terms of concentration of modifier). The range of conditions selected to carry out the

optimization at preparative scale were chosen based on previous results of our research group studying the solubility and separation of carnosic acid at analytical scale [31–33]. Following is a detailed description of the step-by-step optimization.

First of all, column temperature was optimized; three temperatures were tested, 40, 60 and 80 °C, while keeping the pressure and the modifier percentage constant at 200 bar and 10% ethanol, respectively. As expected, increasing the column temperature results in longer retention times of the solutes due to the decrease in density of the mobile phase, thus, 80 °C were selected to have a stronger retention of carnosic acid thus favoring the separation of similar compounds that can be found in the complex supercritical rosemary sample. Also, at 80 °C, carnosic acid integrity was maintained and no degradation was observed.

Once selected the column temperature, experiments were carried out to study the combination of pressure and modifier in the elution of carnosic acid. As expected, at isothermal conditions the density increases with the pressure thus increasing the solvating power. This results in shorter retention times and narrower peak widths as the pressure goes high. Similar behavior is found with the modifiers: the addition of a modifier shortens the retention mainly because the solvating power of the mobile phase increases; however, the modifier can also influence the retention by deactivation of the active sites of the packing material. Table 1 shows the results of carnosic acid behavior in terms of retention time and peak width at different chromatographic conditions (pressure and percentages of ethanol in the mobile phase). It is important to consider that no elution was obtained using pure CO<sub>2</sub> as mobile phase at the experimental conditions tested. This is in agreement with previous data published by our group for the elution of carnosic acid at analytical scale [33] where it was demonstrated that very high pressures (370 bar) were needed in order to elute carnosic acid from the chromatographic column when neat CO<sub>2</sub> was used. Considering that the semi-preparative SFC plant does not allow pressures higher than 300 bar, no elution was then possible. As can be seen, the best combination pressure/modifier can be found at intermediate percentage of ethanol, that is, 10%, since separations carried out using 5% or 15% of modifier provide too long and too short retention times, respectively. By using 10%, it is possible to select the best pressure conditions able to provide both, enough retention and narrower peak. Thus, the conditions selected as optimum for the fractionation of the SFE rosemary extract were: column temperature, 80 °C; column pressure, 130 bar; 10% ethanol as modifier; total mass flow 20 g/min being the CO<sub>2</sub> mass flow 18 g/min. The temperature of the three cyclones was set to 50 °C.

Table 1  
Retention time ( $t_R$ ) and peak width at half height ( $w_{1/2}$ ) of carnosic acid standard in SFC at different pressures and percentages of modifier

Pressure (bar)	5% Ethanol		10% Ethanol		15% Ethanol	
	$t_R$ (min)	$w_{1/2}$ (mm)	$t_R$ (min)	$w_{1/2}$ (mm)	$t_R$ (min)	$w_{1/2}$ (mm)
130	39.8	43.6	8.2	9.6	3.3	4.8
150	17.0	24.0	5.3	8.9	2.8	4.2
200	12.2	14.2	3.5	3.5	1.6	2.2
250	11.1	12.4	1.5	1.5	1.5	1.8

All the experiments were performed at constant temperature equal to 80 °C.



Table 2  
HPLC identification, neat peak area and peak area contribution (%) of compounds found in the supercritical rosemary extract and in the different cyclones (C1, C2, C3) after preparative SFC in diol column

Compounds	$t_R$ (min)	UV Mx Abs (nm)	Total extract area (%)	C1 area	C1 area (%)	C2 area	C2 area (%)	C3 area	C3 area (%)
Scutellarein	3.68	230, 275, 332	3.5	15.158.594	5.25	11053113	2.51	2197803	1.59
NI 1	3.81	255	5.7	144.544.448	50.04	3360688	0.76	3211081	2.33
Rosmanol isomer	4.42	230, 273	1.0	n.d. <sup>a</sup>	n.d.	2396716	0.54	3112626	2.26
Genkwanin	4.92	230, 266, 334	4.2	49.534.156	17.15	6494556	1.48	2964488	2.15
Carnosol	10.20	232, 282	25.4	6.541.069	2.26	116525424	26.49	17360018	12.58
NI	11.21	231, 424	3.8	n.d.	n.d.	64670284	14.70	12551332	9.09
NI 5	11.94	230, 284	1.7	n.d.	n.d.	6013212	1.37	11780574	8.54
NI	12.24	230, 266, 329	2.0	n.d.	n.d.	17048856	3.88	n.d.	n.d.
NI	12.56	230, 267, 329	1.7	n.d.	n.d.	18354632	4.17	9870840	7.15
Carnosic acid	14.40	239, 283	40.7	n.d.	n.d.	172270368	39.16	15126071	10.96
Methyl carnosate	17.12	231, 281	5.1	n.d.	n.d.	15302235	3.48	20571826	14.91
NI	19.45	230	2.6	n.d.	n.d.	4895318	1.11	15771393	11.43
NI	19.65	230, 284	1.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5586948	4.05
NI 7	26.06	230, 282	1.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6756526	4.67

<sup>a</sup>n.d.: compound not detected.

### 3.2. Characterization of SFE rosemary extract

Previous to its separation by Prep-SFC, the supercritical rosemary extract was analyzed by HPLC-DAD using a method based on a previous work done in our laboratory [28]. Compounds were characterized for their retention times ( $t_R$ ) and UV spectra (see Table 2). As commercial availability of reference standards was limited, tentative identification of the compounds was made based on previous data published by other authors [34,35] and previous experience of our research group [28]. Two groups of phenolic compounds have been identified: diterpenes such as carnosic acid, carnosol and methyl carnosate, and flavonoids, such as genkwanin and scutellarein. Some compounds were also detected but could not be identified or completely identified although others, such as NI 1 or NI 5 (non-identified 1 and 5, respectively), had been previously described [34]. To perform the study of the semiquantitative composition of the original SFE extract and SFC fractions, the detected compounds' relative percentages (referred to the total area of the selected components based on DAD peak area at 230 nm) were calculated, as shown in Table 2.

The essential oil composition of the extract was analyzed by GC using a method based on a previous work done in our laboratory [18]. Results are reported in Table 3. The main constituents of this SFE extract were verbenone (26.7%), camphor (24%), borneol (11.9%) and 1,8-cineole (10.2%). This chemical composition showed no big differences with the ones previously reported for rosemary essential oil [17,36] and for a supercritical rosemary extract [18].

### 3.3. Separation of SFE rosemary extracts by Prep-SFC

Fig. 2 shows the retention behavior of the rosemary SFE extract and the collection windows for the isolation in different cyclones. The fractionation was as follows: cyclone 1 (C1), from 0 to 3.20 min; cyclone 3 (waste, C3), from 3.20 to 6.45 min and cyclone 2 (C2), from 6.45 to 15 min. At these con-

ditions, a good separation was obtained in a reasonable time, 15 min.

The isolation and enrichment of specific compounds in the cyclones is done following a protocol consisting in the injection of the sample up to 12 times and collection in the cyclones at the selected times, as mentioned above.

### 3.4. Chemical characterization of the isolated fractions

The fractions collected in the three different cyclones were chemically characterized to know their composition and to evaluate the enrichment or purification achieved during the SFC separation step.

Table 2 shows the composition of the three fractions (cyclones 1–3) by RP-HPLC for the identification and quantification of antioxidant compounds (carnosic acid and by-products). As can be seen, cyclone 1 contains mainly flavonoids and NI 1 and only a small concentration of carnosol. Cyclone 3, which is actually the waste, shows no real fractionation containing almost all the compounds detected in the original extract; among them, small quantities of carnosic acid and carnosol were found while methyl carnosate was preferentially fractionated in this cyclone. In contrast, cyclon 2 is mainly enriched in carnosic acid and carnosol. Actually, 92% of total carnosic acid and 83% of total

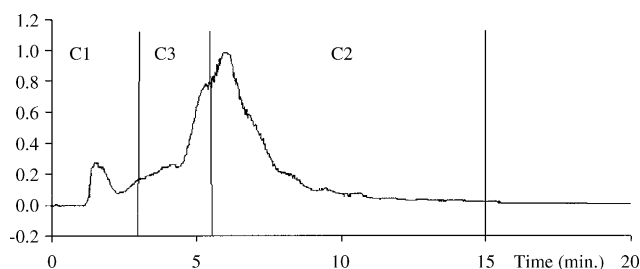


Fig. 2. SFC fractionation of a SFE rosemary extract at 130 bar, 80 °C and 10% ethanol in three different cyclones (C1, C2, C3).

Table 3  
GC identification, peak area contribution (%) and concentration (when standards were available) of compounds found in the original SFE extract of *Rosmarinus officinalis* L.

Compounds	$t_R$ (min)	Total extract area (%)	Total extract concentration (mg/ml)	C1 area (mg/ml)	C1 area (%) (concentration, mg/ml)	C2 area (mg/ml)	C2 area (%) (concentration, mg/ml)	C3 area (mg/ml)	C3 area (%) (concentration, mg/ml)
$\alpha$ -Pinene	5.35	n.d.	n.d.	1.628	0.4 (0.06)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,8-Cineole	6.71	10.2	0.06	7.645	1.9 (0.07)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Limonool	8.54	1.7	n.d.	10.664	2.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Camphor	10.27	24.0	0.14	72.042	182 (0.63)	n.d.	n.d.	1.638	19.88 (0.01)
Borneol	11.51	11.9	0.06	56.420	14.2 (0.42)	n.d.	n.d.	1.792	21.74 (0.01)
Terpinen-4-ol	11.99	2.4	n.d.	13.828	3.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Terpineol	12.47	7.1	n.d.	39.594	10.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Verbenone	12.89	26.7	0.15	121.286	30.6 (0.88)	1.235	100 (0.03)	3.341	40.54 (0.04)
<i>Trans</i> -caryophyllene	21.62	7.2	n.d.	37.123	9.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	22.67	2.8	n.d.	15.923	4.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	26.22	1.5	n.d.	6.641	1.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	27.57	1.5	n.d.	5.328	1.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NI	28.10	2.8	n.d.	8.173	2.1	n.d.	n.d.	1.470	17.84

NI: Not identified; n.d.: not detected; C1, C2, C3: different cyclones after preparative SFC in diol column.

Table 4

Concentration of carnosic acid (ppm) and efficient concentration  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), obtained in the DPPH test

Sample	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	LC-DAD (ppm carnosic acid)
Original extract	6.52	670
Cyclone 2	5.34	740
Cyclone 3	19.1	74

carnosol are detected in cyclone 2. Also, 43% of the total methyl carnosate is found in this cyclone. If we compare the original extract with cyclone 2, in terms of carnosic acid concentration, an increase from 670 to 740 ppm is obtained.

As for the essential oil composition of the isolated fractions, Table 3 shows the results obtained for the main constituents of rosemary essential oil [17,18,36]. As can be seen, the conditions for the supercritical rosemary extract fractionation allow the selective isolation of the essential oil in the first cyclone while only verbenone was collected in separator 2 and in a very small amount. This fractionation can improve the characteristics of the functional ingredient since it is able to improve the quality by removing the residual aroma in the fraction collected in cyclone 2. Fig. 3 shows the GC chromatograms of the fractions collected after SFC separation.

### 3.5. Functional characterization of the isolated fractions

#### 3.5.1. Antioxidant activity

Antioxidant activity of the fractions isolated by Prep-SFC was measured using the DPPH method. Table 4 shows the  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) values of the original SFE rosemary extract along with those of fractions collected from cyclone 2 and cyclone 3, where antioxidant compounds were found. Results show that all samples have an important antioxidant activity demonstrated by the low  $EC_{50}$  values (less than 20  $\mu\text{g/mL}$  in all cases), although with some important differences among them. As for the original extract and the fraction collected in cyclone 2, the higher the concentration of carnosic acid, the lower the  $EC_{50}$  obtained. These results are in agreement with data reported by other authors where carnosic acid has been described as the most active rosemary's antioxidant compound [19,33]. Nevertheless, results achieved in cyclone 3 (with a carnosic acid content of 74 ppm) do not follow the same trend, thus, further studies of synergy effects to predict  $EC_{50}$  values through the chemical composition of the samples were carried out. An estimated model based on previous results of our group [37] was used to consider the effect of other compounds in the antioxidant activity of rosemary extracts. Three compounds, in decreasing order of importance to predict the mentioned activity, were selected: carnosic acid, methyl carnosate and carnosol. The estimated model was:

$$EC_{50} = 64.422 - 0.501 (\text{carnosic acid}) - 3.998 (\text{methyl carnosate}) - 0.694 (\text{carnosol})$$

with values of 0.95 for the coefficient of determination ( $R^2$ ), and 3.02 for the standard error of estimate. As can be seen, all of them contribute negatively to the equation, that is, decreasing

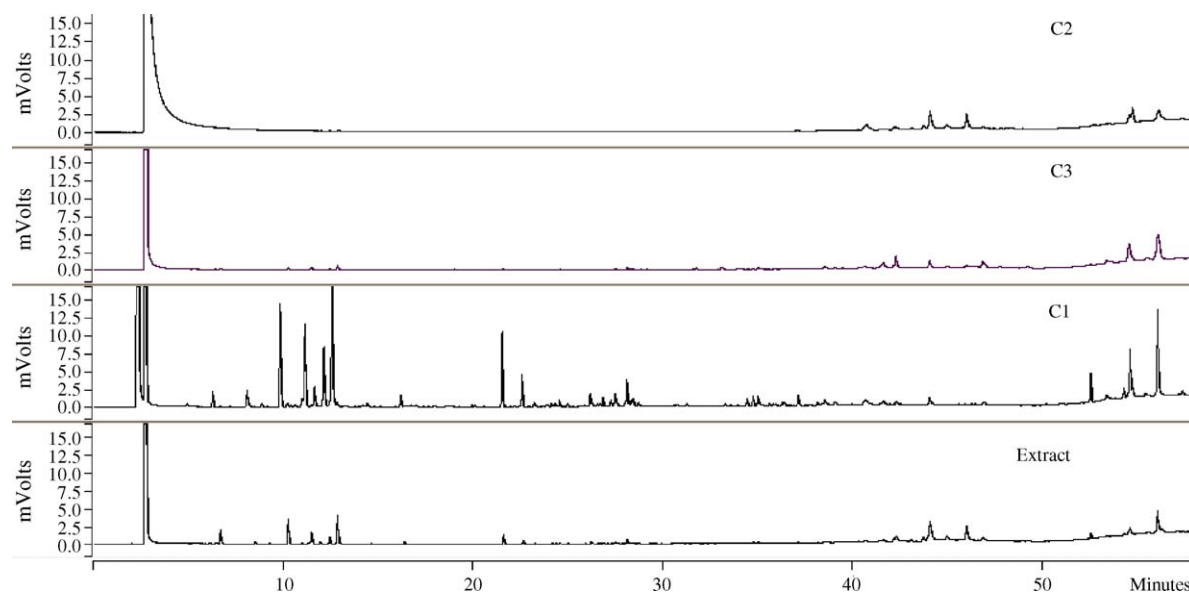


Fig. 3. GC chromatograms of the different fractions collected after the SFC separation at 130 bar, 80 °C and 10% ethanol.

the EC<sub>50</sub> value when increasing their content in the composition of the extracts. The possible explanation of our results is the important contribution of methyl carnosate in the fraction of cyclone 3, where the normalized area corresponded to 15% of the total sample.

### 3.5.2. Antimicrobial activity

Three different microbial species, including a gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*), a gram negative bacteria (*Escherichia coli*) and a yeast (*Candida albicans*), were used to screen the antimicrobial activity of the rosemary fractions isolated by Prep-SFC. The antimicrobial activity of these fractions was assessed by the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and the bactericidal concentration (MBC). The results obtained are given in Table 5.

All the fractions collected from the different cyclones (1–3) showed antimicrobial activity against all the microorganism tested, with MBCs values in the range of 0.35–1.75 mg/mL. The most active fraction, in all cases, was the one collected in cyclone 2, followed by the fraction from cyclone 3, whereas the

least active was fraction 1. Comparing these results with those obtained when using the original extract, only fraction collected in cyclone 2 presented a higher antimicrobial activity than original extract (with an improvement of about 40%). Meanwhile, fraction in cyclone 3 showed a similar antimicrobial activity to the original extract and this activity in cyclone 1 was clearly lower.

*Staphylococcus aureus* was the most sensitive microorganism, whereas the least susceptible was the yeast *Candida albicans*. These results were in agreement with those obtained with the rosemary original extract.

In order to explain the higher antimicrobial activity found in the fraction collected in cyclone 2 and knowing that this fraction is mainly composed by carnosic acid, a pure standard of this compound was also examined for antimicrobial activity under the same conditions (Table 5). The antimicrobial activity showed by carnosic acid was very similar to that reported for the fraction collected in cyclone 2, which seemed to indicate that the activity of this fraction could be associated with the presence of this compound. The small differences found in the antimicrobial activity between the standard and the fraction 2 could be attributed to the presence of small quantities of verbenone in the fraction 2, since this compound has been reported to have some antimicrobial activity [18].

The antimicrobial activity detected in the fraction collected in cyclone 3, similar to that found in the original extract, could be explained since cyclone 3 showed no real fractionation containing almost all the compounds detected in the original extract; with a lower quantity of carnosic acid respect to cyclone 2.

On the other hand, fraction collected in cyclone 1 presented the lowest antimicrobial activity, although the presence of oxygenated terpenes as camphor, borneol and verbenone, compounds that have been reported to possess a high antimicrobial activity [18,38,39] could induce to expect a higher activity in this fraction. However, this data could be explained by the small concentration of these compounds detected by GC analysis.

Table 5

Antimicrobial activities of different cyclones after preparative SFC in diol column from a supercritical fluid extract of *Rosmarinus officinalis* L. and carnosic acid

Sample	MBC <sup>a</sup>		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Original extract	0.6	0.75	1.5
Cyclone 1	0.9	1.25	1.75
Cyclone 2	0.35	0.5	0.9
Cyclone 3	0.7	0.75	1.25
Carnosic acid	0.4	0.5	1
Reference antibiotics	10	10	100

<sup>a</sup> MBC, minimum bactericidal concentration. Values given as mg/mL for samples and µg/mL for antibiotics.

As a general comment, the level of enrichment achieved cannot be obtained by SFE either using stepwise extraction or fractionation, as has been demonstrated in previous work of our research group, at least using the systems and conditions studied and reported in [27,37].

#### 4. Conclusions

In this work, the potential use of preparative-supercritical fluid chromatography has been demonstrated to fractionate complex supercritical rosemary extracts. By a careful selection of the separation conditions it is possible to obtain two different fractions, one collected in cyclone 2 with an improvement of about 20% and 40% of antioxidant and antimicrobial activities, respectively, compared to the original extract and with no residual rosemary aroma and another one containing the essential oil. With this approach, a better fractionation of the supercritical extracts can be achieved with an increase of functional properties and with a very low consumption of organic solvents (only 10% of ethanol in the mobile phase).

With the process developed in this work we have been able to improve both, the antimicrobial and antioxidant activity of the supercritical rosemary extract to a high extent; by increasing the biological activity of the isolated fraction, lower amounts can be used without loss in activity which can have several advantages in terms of both, industrial costs and possible side effects of the functional ingredients or nutraceuticals, which depend on the concentration used.

#### Acknowledgements

This work was supported by Spanish MEC projects (AGL2004-06893-C02-01 and AGL2004-06893-C02-02). P. Ramírez thanks the Ministerio de Ciencia y Tecnología for a grant.

#### References

- [1] J.R. Chipault, G.R. Mizumo, J.M. Hawkins, W.O. Lundberg, *Food Res.* 17 (1952) 46–58.
- [2] B. Halliwell, *Food Sci. Agric. Chem.* 1 (1999) 67–109.
- [3] B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Löliger, O.I. Aruoma, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 601–607.
- [4] D.L. Madhavi, S.S. Despande, D.K. Salunkhe, *Food Antioxidants*, Marcel Dekker, New York, 1996.
- [5] L.L. Zaika, *J. Food Safety* 9 (1988) 97–118.
- [6] H.-W. Chang, *Food Industries (ROC)* 27 (1995) 53–61.
- [7] H.J.D. Dorman, S.G. Deans, *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 308–316.
- [8] J.P. Rauha, S. Remes, M. Heimonen, A. Hopia, M. Kähkönen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela, P. Vuorela, *Int. J. Food Microbiol.* 56 (2000) 3–12.
- [9] J.J. Kabara, *Phenols and Chelators*, Blackie, London, 1991.
- [10] D. Slamenová, K. Kubosková, E. Horváthová, S. Robichová, *Cancer Lett.* 177 (2002) 145–153.
- [11] M.T. Tena, M. Valcárcel, P. Hidalgo, J.L. Uebera, *Anal. Chem.* 69 (1997) 521–526.
- [12] C. Bicchi, A. Binello, P. Rubinolo, *Phytochem. Analysis* 11 (2000) 236–242.
- [13] M. Elgayyar, F.A. Draughon, D.A. Golden, J.R. Mount, *J. Food Protect.* 64 (2001) 1019–1024.
- [14] E. Ibáñez, A. Kubátová, F.J. Señoráns, S. Cavero, G. Reglero, S.B. Hawthorne, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 375–382.
- [15] V.A. Pandit, L.A. Shelef, *Food Microbiol.* 11 (1994) 57–63.
- [16] M.T. Baratta, H.J.T. Dorman, S.G. Deans, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, G. Ruberto, *Flavour Frag. J.* 13 (1998) 235–244.
- [17] G. Pintore, M. Usai, P. Bradesi, C. Juliano, G. Boatto, F. Tomi, M. Chessa, R. Cerri, J. Casanova, *Flavour Frag. J.* 17 (2002) 15–19.
- [18] S. Santoyo, S. Cavero, L. Jaime, E. Ibáñez, F.J. Señoráns, G. Reglero, *J. Food Protect.* 68 (2005) 790–795.
- [19] M.E. Cuvelier, C. Berset, H. Richard, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 665–669.
- [20] O.I. Aruoma, B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Loligers, *Xenobiotica* 22 (1992) 257–268.
- [21] E.N. Frankel, S.W. Huang, R. Aeschbach, E. Prior, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 131–135.
- [22] E.N. Frankel, S.W. Huang, R. Aeschbach, E. Prior, *J. Sci. Food Agric.* 72 (1996) 201–208.
- [23] G. Brunner, *J. Food Eng.* 67 (2005) 21–33.
- [24] T.L. Chester, J.D. Pinkston, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2801–2812.
- [25] K. Yaku, F. Morishita, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 43 (2000) 59–76.
- [26] L. Toribio, M.J. Nozal, J.L. Bernal, E.M. Nieto, *J. Chromatogr. A* 1011 (2003) 155–161.
- [27] E. Ibáñez, A. Oca, G. De Murga, S. Lopez-Sebastián, J. Tabera, G. Reglero, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1400–1404.
- [28] F.J. Señoráns, E. Ibáñez, S. Cavero, J. Tabera, G. Reglero, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 491–499.
- [29] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Lebens. Wiss. Technol.* 28 (1995) 25–30.
- [30] NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Wayne, PA, M 100-S9, 1999.
- [31] A. Cháfer, T. Fornari, A. Berna, E. Ibáñez, G. Reglero, *J. Supercrit. Fluids* 34 (2005) 323–329.
- [32] P. Ramírez, T. Fornari, F.J. Señoráns, G. Reglero, *J. Supercrit. Fluids* (2005) 128–132.
- [33] P. Ramírez, F.J. Señoráns, E. Ibáñez, G. Reglero, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 241–245.
- [34] M.E. Cuvelier, H. Richard, C. Berset, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (1996) 645–652.
- [35] S.L. Riehheimer, M.W. Bernart, G.A. King, M.C. Kent, D.T. Bailey, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (1996) 507–514.
- [36] B.M. Lawrence, *Perfum. Flavor* 20 (1995) 35–37.
- [37] S. Cavero, L. Jaime, P.J. Martín-Álvarez, F.J. Señoráns, G. Reglero, E. Ibáñez, *Eur. Food Res. Technol.* 221 (2005) 478–486.
- [38] S. Pattnaik, V.R. Subramanyam, M. Bapaji, C.R. Kole, *Microbios* 89 (1997) 39–46.
- [39] N. Tabanca, N. Kirimer, B. Demirci, F. Demirci, K.H.C. Baçer, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4300–4303.



**Use of Specially Designed Columns for Antioxidants and Antimicrobials Enrichment  
by Preparative-Supercritical Fluid Chromatography (Prep-SFC)**

Pilar Ramírez<sup>1</sup>, Susana Santoyo<sup>1</sup>, Mónica R. García-Risco<sup>1</sup>, F. Javier Señoráns<sup>1</sup>, Elena Ibáñez<sup>2\*</sup>, Guillermo Reglero<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Sección Departamental Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain. Unidad Asociada al CSIC.*

<sup>2</sup>*Departamento de Caracterización de Alimentos, Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.*

Corresponding author: **Elena Ibáñez**  
Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, 28006 Madrid, Spain.  
[elena@ifi.csic.es](mailto:elena@ifi.csic.es). Fax# 34-91-5644853; Phone# 34-91-5618806 (ext.385)

## **Abstract**

A new, specially designed column has been developed for fractionation of supercritical fluid extract of rosemary by using a Preparative-SFC system. The column evaluated in this work was prepared using a new packing method consisting in a combination of slurry and supercritical CO<sub>2</sub> with commercial silica particles coated with a stationary phase commonly used in gas chromatography, such as SE-54 (5% phenyl, 95% methyl silicone). The new packing procedure provided columns with reasonable efficiencies, with high stability and useful at high pressure range. A 25 cm x 10 mm i.d. column packed with silica particles coated with 3% of SE-54 was prepared and its separation power was tested for isolating fractions with high antioxidant and/or antimicrobial activity from a supercritical rosemary extract. The SFC conditions were selected based on a previous work done with a commercial LC-Diol packed column (130 bar, 80°C) and different percentages of modifier in the mobile phase were tested (5 and 10%). Two cyclones were employed to collect the fractions which were then characterized by HPLC-DAD, GC, and *in vitro* antioxidant and antimicrobial assays. The use of coated packed columns allowed the fractionation of a complex mixture of rosemary supercritical extract with a minimum amount of modifier in the mobile phase (5% ethanol). At the optimum conditions it was possible to obtain 2 very active fractions in terms of antioxidant and antimicrobial activity, with no residual rosemary aroma and with improved activities compared to the original supercritical extract.

**Keywords:** rosemary extracts, functional ingredients, preparative-SFC, antioxidants, antimicrobials, slurry-supercritical packing method

## 1. Introduction

Nowadays, there is a growing interest in finding natural antioxidants and/or antimicrobial compounds as an alternative to synthetic substances, which are commonly used in the food industry. This idea is supported by the consumer's concern about the safety of food containing synthetic chemicals, because these synthetic molecules are suspected to cause or promote negative health effects [1, 2].

As a result, interest has been focused on different extracts of plants as sources of natural products, since many studies have reported that plants contain a wide variety of compounds with beneficial health effects. Particularly, many herbs and spices used to aromatize foods have been screened as sources of natural antioxidants and antimicrobial compounds [3, 4, 5, 6, 7].

Among herbs and spices, rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) is used for flavoring food, in cosmetics and in traditional medicine for its choleretics, hepatoprotective and antitumorigenic activity [8]. Rosemary is also known to exhibit antioxidant [9, 10, 11] and antimicrobial activities [12, 13, 14]. In rosemary, the antioxidant activity has been attributed to six different phenolic diterpenes: carnosol, carnosic acid, rosmadiol, rosmanol, epirosmanol and methyl carnosate [15, 16, 17]. Some flavonoids naturally occurring in rosemary, as genkwanin and cirsimaritin, have also been described as antioxidants [18]. Among these compounds, carnosic acid is believed to possess the highest antioxidant activity [19, 20, 21], although this compound is quite unstable and, usually, is converted to carnosol upon heating. The antimicrobial activity of rosemary has been also attributed to carnosic acid [22] and to some compounds of the essential oil, mainly borneol and camphor [14].

Supercritical fluid extraction (SFE) has been suggested as a method for selective isolation of antioxidants from rosemary, mainly because of the mild processing conditions [23, 24]. Isolation under supercritical conditions can be accomplished through cascade fractionation or

using supercritical fluid chromatography (SFC). SFC allows a fractionation of the extracts which is compatible with SFE in terms of mobile phase, instruments and conditions and, what is even more important, maintaining the integrity of the compounds of interest. Preparative-scale SFC (Prep-SFC) is an environmentally clean technology that has several advantages compared to preparative-LC, such as fast analysis time, yielding at least a three-fold increase in the throughput, easy recovery of products by simple decompression, low consumption of organic solvents and wider range of applicability [25, 26]. One main problem encountered when separating polar compounds, such as phenolic diterpenes, by SFC is the lack of polarity of the CO<sub>2</sub> used as mobile phase. Usually this has been overcome adding different (relatively high) amounts of modifiers into the mobile phase [22]. A different approach to fractionate polar compounds, reducing the concentration of modifiers used, is to tune the polarity of the stationary phase to increase the range of polar compounds that can be analyzed using either silica-based or new materials as stationary phase [27, 28]. In previous works, the elution of phenolic diterpenes in SFC with pure CO<sub>2</sub> using specially designed packed capillary columns has been studied at analytical scale [29, 30]. Even though good results have been obtained for the isolation of functional compounds from rosemary supercritical extract by Prep-SFC with a commercial diol column [22], attempts have been made in the present work to design special columns able to work, with enough resolution and efficiency, with low amounts of modifier providing, at the same time, fractions with improved functional activities to be used as food ingredients and/or nutraceuticals.

## **2. Experimental**

### **2.1. Samples and chemicals**

The rosemary sample (*Rosmarinus officinalis* L.) consisted of dried rosemary leaves obtained from Herboristeria Murciana (Murcia, Spain). Rosemary leaves were collected

during September and dried using a traditional method previously described [23]. Cryogenic grinding of the sample was performed under carbon dioxide and particle size was determined by sieving the ground plant material to the appropriate size (between 999 and 500  $\mu\text{m}$ ). The whole sample was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use.

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH, 95% purity), carnosic acid (93%),  $\alpha$ -pinene, 1,8-cineol, camphor, linalool, verbenone and borneol were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Chloroform, methanol, acetonitrile (ACN) and acetone were all HPLC grade from Lab Scan (Dublin, Ireland). Ethanol (99.5%) was from Panreac (Spain) and acetic acid (99%) from Merck Schuchardt (Germany). Milli-Q water was obtained from a purification system (Millipore).  $\text{CO}_2$  (N-48 quality) was from Air Liquide España S.A. (Madrid, Spain).

## **2.2. Supercritical Fluid Extraction of Rosemary**

The extraction of rosemary extract was carried out in a pilot-scale supercritical fluid extractor (Iberfluid, Spain) with a 285 ml extraction cell, previously described [14]. Fractionation was achieved in two different separators assembled in series, with independent control of temperature and pressure, by either a decrease in pressure, or in pressure and temperature.

The extraction cell was filled with 60 g of ground rosemary and 90 g of washed sea sand (Panreac). Dynamic extraction was performed at 150 bar and  $40^{\circ}\text{C}$ , and fractionation pressures were set in a first stage at 50% of extraction pressure and in the second stage at a fixed value of 20 bar. Ethanol (7%) was used as modifier. The addition of ethanol started after the selected pressure had been reached half of the extraction time (60 min).

All extracts were kept under  $\text{N}_2$ , at  $-20^{\circ}\text{C}$  in the dark, and ethanol was eliminated at  $35^{\circ}\text{C}$  in a vacuum rotary evaporator.

## 2.3. Prep-SFC chromatographic column

### 2.3.1. Coating of silica particles

The coating of the silica particles was done as previously reported [29]. Briefly, porous silica particles (10  $\mu\text{m}$ , 60  $\text{\AA}$ , Hichrom, Reading, UK) were conditioned prior to coating by washing them with ethanol and dried by heating at 160°C for 1 h in a fluidized bed reaction vessel [31] using He as a purge gas. 0.3 g of particles were placed in the fluidized bed reaction vessel and mixed with 3% (w/w) of SE-54 (5% phenyl-95% methyl-silicone) dissolved in hexane plus a concentration of 0.5 mg dicumyl peroxide (DCUP)/100 mg stationary phase, as crosslinking agent [32]. Coating was performed at room temperature with He as purge gas. Crosslinking was obtained by placing the vessel in a chromatographic oven by heating from 50°C to 160°C at 5°C  $\text{min}^{-1}$  and maintaining the temperature at 160°C overnight. Efficiency measurements provided around 11,000 plates/m at  $k' = 10$ .

### 2.3.2. Packing of Prep-SFC columns

The packing procedure for preparative columns developed in the present work consisted of a combined method of  $\text{CO}_2$  and slurry. Figure 1 shows a schematic diagram of the system used consisting of a high pressure  $\text{CO}_2$  pump (Suprex PrepMaster, Suprex Corp. Pittsburgh, PA, USA), three valves "on/off" to regulate the pressure, two needle valves to adjust the  $\text{CO}_2$  flow, one reservoir to hold the packing material, connected to the column, and an ultrasonic bath.

The packing procedure was as follow: the slurry solution was prepared by mixing 66 ml of solvent (ethanol) with 16 g of the silica particles coated with the stationary phase. The mixture was placed in an ultrasonic bath for 5 min. Once the system was assembled, the column (25 cm x 10 mm stainless steel tubing, Symta Ltda., Spain) was filled with solvent. Thereafter, the homogeneous slurry was poured into the packing reservoir. The system was pressurized with  $\text{CO}_2$  at 80 bar to check for leaks and then the slurry solvent was allow to

flow through the column restrictor until bubbles were observed, indicating that only CO<sub>2</sub> circulated along the column. The packing procedure then started increasing from 80 to 260 bar at 3 bar min<sup>-1</sup>. At this moment the pressure was increased from 100 bar to 260 bar with a 3 bar/min gradient. The column was introduced into a ultrasonic bath maintained at room temperature. Once filled, the column was allowed to depressurize for one day.

#### **2.4. Supercritical fluid chromatography (SFC) system**

The Prep-SFC system used in the present work has been described elsewhere [22]. The separation was carried out in a packed column built as described previously which was placed inside a water bath with temperature control. The SFC was carried out at 130 bar and 80°C based on previous results obtained in our laboratory [22]. The CO<sub>2</sub> flow rate was kept constant at 20 g/min. Ethanol was used as a modifier at different percentages between 5 and 10%.

#### **2.5. Antioxidant activity assay**

The antioxidant activity was determined by the DPPH scavenging assay based on a procedure described by Brand-Williams et al. [33]. This method consist in the neutralization of free radicals of DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) (Sigma–Aldrich, Spain) by the antioxidant extracts. For each sample, different concentrations were tested (from 1 to 20 µg/mL in DPPH–methanol solution). 1950 µL of DPPH solution (23.5 µg/L in methanol ) were placed in test tubes and 50 µL of the different concentrations of samples were added. Reaction was completed after 3 h at room temperature and absorbance was measured at 516 nm in a Shimadzu UV-120-01 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Methanol was used to adjust zero and DPPH-methanol solution as a reference sample. The DPPH concentration in the reaction medium was calculated from the following calibration curve, determined by linear regression ( $r = 0.999$ ):  $Y = 0.0247X - 0.0029$ .

The percentage of remaining DPPH against the extract concentration was then plotted to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% or EC<sub>50</sub>. Thus, the lower the EC<sub>50</sub>, the higher the antioxidant power. Each determination was repeated twice.

## **2.6. Determination of antimicrobial activity**

The extracts and fractions collected were individually tested against a panel of microorganisms including *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11775 and *Candida albicans* ATCC 60193. Bacterial strains stock cultures were kept on nutrient agar at 4°C. *Candida albicans* was kept on Sabouraud dextrose agar at 4°C.

A broth microdilution method was used, as recommended by NCCLS (1999), for determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). All tests were performed in Mueller-Hinton broth supplemented with 0.5% tween 20, with the exception of yeasts (Sabouraud dextrose broth + 0.5% tween 20). The inocula of bacterial strains were prepared from overnight Mueller-Hinton broth cultures at 37°C. Yeasts were cultured overnight at 25°C in Sabouraud dextrose broth. Test strains were suspended in Muller-Hinton (bacteria) or Sabouraud dextrose (yeasts) broth to give a final density 10<sup>7</sup> cfu/ml. The fractions from the different cyclones were diluted in ethanol ranging from 50 mg/ml to 1 mg/ml.

The 96-microwell plates were prepared by dispensing into each well 185 µl of culture broth, 5 µl of the inoculums and 10 µl of the different extracts dilutions. The final volume of each well was 200 µl. Plates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria and at 24°C for 48 h for yeasts. Negative controls were prepared using 10 µl of ethanol, the solvent used to dissolve the rosemary extracts. Chloranphenicol and amphotericin B (Sigma, Madrid) were used as positive reference standards to determine the sensitivity of the microbial species used. After incubation, the MIC of each extract was determined by visual inspection of the wells bottom, since bacterial growth was indicated by the presence of a white “pellet” on the well



bottom. The lowest concentration of the extract that inhibited growth of the microorganism, as detected as lack of the white “pellet”, was designated the minimum inhibitory concentration. The minimum bactericidal and fungicidal concentration (MBC) was determined by making subcultures from the clear wells which did not show any growth. Each test was performed in triplicate and repeated twice.

## **2.7. HPLC-DAD analysis**

The analysis of the original extract and the fractions was carried out in an HPLC (Varian Pro-star) equipped with a Nova Pack C<sub>18</sub> column (Waters) of 15 mm × 4.6 mm and 3.5 μm particle size. The mobile phase consisted of 1% acetic acid in acetonitrile (solvent A) and 1% acetic acid in water (solvent B) applying the following gradient: 0–5 min, 50% B; 5–15 min, 50–30% B; 15–40 min, 30–0% B. The flow rate was constant at 0.7 mL/min. Injection volume was 20 μL and the detection was accomplished by using a diode array detection system Varian storing the signal at a wavelength of 230 nm.

## **2.8. GC-FID analysis**

The GC analysis were carried out by using a Varian 3400 (Varian, Walnut Creek, CA, USA) gas chromatograph equipped with a 1177 split/splitless injector (Varian). The system was coupled to a Saturn 2000 chromatography software system (Varian). A 30 m × 250 μm i.d. fused silica capillary column coated with a 0.25 μm layer of SE-54 stationary phase (Agilent Technologies) was used. Helium was the carrier gas at 18 psig.

Solutions of 10 mg/mL were prepared by dissolving the samples in acetone. Three microliters of each solution were injected in a split mode (1:10 split ratio) at 200 °C. The oven temperature was programmed from 100 °C (10 min constant temperature) to 250 °C at 5 °C/min (10 min constant temperature); then to 300 °C at 15 °C/min. Final temperature was maintained for 10 min. Compounds were tentatively identified by comparison of retention time of those of standards injected at the same conditions and previous data.

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Separation of SFE rosemary extract by Prep-SFC**

As mentioned, in the present work we developed a procedure to pack specially designed preparative columns to be used in Prep-SFC. The selection of the liquid stationary phase to coat the silica particles was done based on previous results obtained in our laboratory working with analytical-scale packed capillary columns to separate supercritical rosemary extracts with neat CO<sub>2</sub> [29, 30]. From these results, comparing polar (polyethylene glycol) and non-polar (phenyl-methyl silicone) stationary phases, several conclusions would be drawn: elution of relatively polar compounds, such as phenolic diterpenes, was possible only when homogeneous and controlled coating was achieved, that is, only when exhaustive deactivation of the silica surface was performed; elution of carnosic acid (used as model compound for phenolic diterpenes) was easier with the non-polar stationary phase which means that both deactivation and stationary phase polarity play role in the selectivity of the SFC system when using neat CO<sub>2</sub>; the non-polar column provided high efficiency and faster analysis time than the polar one; elution of carnosic acid was only achieved working at very high pressures (370 bar) working with neat CO<sub>2</sub>. Based on these results, preparative columns packed with silica particles coated with non-polar (SE-54) stationary phase were prepared. The packing procedure developed in the present work has some advantages compared to conventional slurry packing: the lower viscosity and surface tension of carbon dioxide as well as the use of ultrasonic vibration and pressure programming in the packing process provide favorable conditions for achieving packing uniformity and longer stabilities for columns to be used under SFC conditions. Appropriate decompression rate is mandatory in achieving optimum column performance. Columns prepared using this combined procedure provided reasonable efficiencies (comparable to conventional packed columns for Prep-HPLC) and long stability time (more than 100 injections without a significant decrease in efficiency).

Once evaluated, the designed column was tested for fractionating a supercritical rosemary extract. The optimum separation conditions were selected based on previous results obtained in our research group [22]. Separation pressure and temperature were set at 130 bar and 80°C, respectively, and two different percentages of ethanol as modifier in the mobile phase were tested (5 and 10%) with the objective of reducing to a minimum the amount of modifier used. It is important to consider that, as expected, no elution of carnosic acid from the chromatographic column was observed at the selected pressure when using pure CO<sub>2</sub> as mobile phase. As mentioned, only very high pressures (up to 370 bar) were able to elute carnosic acid from the chromatographic column; these high pressures were not reachable in the preparative SFC plant used in this work, therefore, the use of modifier was necessary.

The retention behaviour of the rosemary SFE extract and the collection windows for the fractionation in different cyclones is shown in figure 2 ((a) 10% ethanol (b) 5% ethanol). As can be observed, the chromatographic profile is similar while the analysis time is more than double when using 5% ethanol. However, 34 min is a reasonable analysis time for a complex mixture, mainly if a higher enrichment of the fractions is obtained. When using 10% of modifier, the fractionation was as follows: cyclone 1 (C1), from 0 min to 5 min; cyclone 3 (C3, waste), from 5 min to 6.5 min and cyclone 2 (C2), from 6.5 min to 14 min. With a 5% of ethanol, the following time cycles were used: C1, from 0 min to 13 min; C3, from 13 min to 22 min and C2, from 22 min to 34 min. The isolation and enrichment of specific compounds in the cyclones was done following a protocol consisting in the injection of the sample up to 12 times and collection in the cyclones at the selected times, as mentioned above.

### **3.2. Chemical characterization of the isolated fractions**

The fractions collected in the three cyclones were chemically characterized in terms of composition to evaluate the enrichment or purification achieved during the SFC separation step with the different percentages of modifier. Special focus has been placed in the

identification and quantification of compounds reported to present antioxidant or antimicrobial activity. Besides, previous to its separation by Prep-SFC, the original supercritical rosemary extract was also analysed.

The composition of the original extract together with the three fractions (cyclones 1, 2 and 3) obtained with 10% and 5% of ethanol by HPLC-DAD is shown, respectively, in Table 1 and 2. The method used was based on a previous work done in our laboratory [24] and compounds were characterized for their retention times ( $t_R$ ) and UV spectra. As commercial availability of reference standards was limited, tentative identification of the compounds was made based on previous data published by other authors [34, 35] and previous experience of our research group [24]. Two groups of phenolic compounds were identified: diterpenes, such as carnosic acid, carnosol and methyl carnosate, and flavonoids, such as genkwanin and scutellarein. Some compounds were also detected but could not be identified or completely identified although others, such as NI 1 or NI 5, had been previously described [34].

When using a 10% modifier, C1 contained mainly flavonoids and NI 1 and a small amount of methyl carnosate. Cyclone 3, which was actually the waste, presented a high quantity of diterpenes, particularly carnosic acid. However, most of diterpenes were preferentially fractionated in cyclone 2: 60% of total carnosic acid, 71% of total carnosol and 40% of total methyl carnosate. The analysis of the different fractions obtained with a 5% of modifier showed that C1 contained mainly carnosol and NI 1. In this case, Cyclone 2 and 3 had a similar composition with a high amount of diterpenes, although the highest percentage of total carnosic acid was found in cyclone 2. By comparing, in terms of carnosic acid, the original extract with the content of cyclone 2 (for both 5% and 10% of modifier), an important enrichment can be always observed in C2 after SFC separation.

The essential oil composition of both, the original extract and the isolated fractions were analysed by GC using a previously described method [14]. The results obtained are presented

in Table 3 and 4. The main compounds identified were verbenone, camphor, borneol and 1,8-cineole. This chemical composition showed no big differences with those previously reported for rosemary essential oil [36, 37] and for a supercritical rosemary extract [14].

The results from the fractionation showed that with a 10% of modifier, the conditions employed allowed a selective isolation of the essential oil in the first cyclone, since only small quantities of verbenone and camphor were collected in cyclones 2 and 3. However, when using a 5% of ethanol, the isolation of the essential oil compounds in cyclone 1 was not complete, since a 32% of total verbenone, camphor, borneol and 1,8-cineole were collected in cyclone 3. Meanwhile only verbenone was found in cyclone 2 and in a very small amount.

### **3.3. Functional characterization of the isolated fractions**

To really determine the interest of a fraction purified by SFC it is important not only to chemically characterize its composition but also to determine its functional activity which, in fact, will establish its final usefulness.

#### *3.3.1. Antioxidant activity*

Antioxidant activity of the fractions isolated by Prep-SFC in the specially designed SE-54 column with both 5% and 10% of modifier was measured using the DPPH method. Table 5 shows the  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) values of the original SFE rosemary extract along with those of fractions collected in cyclone 2 and 3, where antioxidant compounds were found. Results showed that all samples had an important antioxidant activity demonstrated by the low  $EC_{50}$  values (less than 17  $\mu\text{g/mL}$  in all cases), although with some important differences among them.

Comparing the antioxidant activity of the different cyclones (C2 and C3), as a function of the percentage of modifier used (5% or 10%), results showed that the most active fraction, in both cases, was the one collected in cyclone 2. Besides, the antioxidant activity of the fraction from cyclone 2 was always higher than the one obtained from the original extract (around

20% higher). On the other hand, fractions from cyclone 3 only presented a higher antioxidant activity, compared to original extract, when fractionation was carried out with 5% of ethanol.

In order to correlate the differences in the antioxidant activity to the chemical composition of the different cyclones, analysis of the data shown in Table 1 and 2 in terms of carnosic acid, methyl carnosate and carnosol amounts were considered, since previous studies have reported the important relationship between the antioxidant activity of rosemary extracts and the concentration of such compounds [38]. Moreover, carnosic acid has been described as the most active rosemary's antioxidant compound [33, 39], followed by methyl carnosate and carnosol. The results showed that, when using 10% of ethanol, the antioxidant activity of C2 was much higher than the one of C3; this can be related to the higher relative concentration of carnosic acid and carnosol in C2. However, when using 5% ethanol, the percentages of carnosic acid, methyl carnosate and carnosol found in C2 and 3 were similar being therefore similar the antioxidant activity obtained for the two cyclones.

### 3.3.2. Antimicrobial activity

Three different microbial species, including a gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*), a gram negative bacteria (*Escherichi coli*) and a yeast (*Candida albicans*), were used to screen the antimicrobial activity of rosemary fractions isolated by Prep-SFC with the specially designed column. The antimicrobial activity of these fractions was assessed by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) (data not shown) and the minimal bactericidal concentration (MBC). The results obtained are given in Table 6.

All the fractions collected from the different cyclones (1-3) using 5% and 10% of modifier showed antimicrobial activity against all the microorganisms tested, with MBC values in the range of 0.4-1.5 mg/ml. Besides, *Staphylococcus aureus* was the most sensitive microorganism, whereas the least susceptible was the yeast *Candida albicans*.

The analysis of the antimicrobial activity of the different cyclones, as a function of the percentage of modifier used (5% or 10%), showed that the most active fraction, for the two sets of experiments, was the one collected in cyclone 2, followed by the fraction from cyclone 3. Comparing these results with those obtained with the original supercritical extract, the fraction of C2 always showed a higher antimicrobial activity being the most active fractions those obtained after fractionation using 5% ethanol (with antimicrobial activities 30% higher than those of the original extract). The fraction from C3 generally showed an antimicrobial activity similar to that of the original extract, except for the fractionation carried out with a 5% of ethanol against *Staphylococcus aureus* in which the antimicrobial activity clearly improved. As for cyclone 1, the antimicrobial activity was lower than the original extract for both percentage of modifier. Therefore, in terms of antimicrobial activity, the results clearly indicate that working with a 5% of modifier was advantageous in terms of the functional activity of the fractions isolated by Prep-SFC using the SE-54 column.

In order to explain the differences in terms of antimicrobial activity for the different fractions and knowing their chemical composition, pure standards of the compounds found in the extracts, that had been reported to present antimicrobial activity (carnosic acid, borneol, camphor, linalool, verbenone, 1,8-cineole and  $\alpha$ -pinene), were tested on the same cultures under identical conditions [14, 22, 39]. Results showed (Table 6) that among the compound tested, carnosic acid was the most effective, followed by borneol, camphor and linalool. Meanwhile, verbenone, 1,8-cineole and  $\alpha$ -pinene showed the weakest antimicrobial effect. Thus, the antimicrobial activity of C2 and 3, with 10% ethanol, can only be related to carnosic acid, since the presence of the other compounds studied in these cyclones was null. Concerning to C1, with only 1% of the total carnosic acid, its antimicrobial activity could be associated to the presence of camphor and verbenone, since both represented almost half of the volatile composition of the fraction (GC analysis). However, it is worth to mention the

presence, in this fraction, of small quantities of other compounds with antimicrobial activity like borneol and 1,8-cineole.

As mentioned, when using 5% of modifier, the antimicrobial activity of C2 and 3 was higher than when using 10% ethanol. This fact could be linked to the presence of higher quantities of carnosic acid in both, C2 and 3, when the fractionation was carried out with a small amount of modifier. On the other hand, no differences were found between the antimicrobial activity of C1 when using 5 or 10% ethanol, even though the quantity of camphor, verbenone and borneol was much lower when working with 5% ethanol, compared to 10%. An explanation could be found in the higher concentration of carnosic acid found with a 5% of modifier, which in fact was twice higher than the one obtained with a 10%.

## **Conclusions**

In this work, the potential usefulness of specially designed columns along with Prep-SFC has been demonstrated to fractionate complex supercritical rosemary extracts. The tuning of the polarity of the stationary phase allows the isolation of more active fractions with a low amount of modifier (5%), which has important advantages for scaling up the process in terms of costs and residues. By selecting the most appropriate separation conditions it is possible to obtain 2 fractions with improved biological activity, compared to the original extract, and with no residual rosemary aroma. As a result, lower amounts of isolated fractions can be used as functional ingredients, providing several advantages in terms of both, industrial costs and possible side effects, which strongly depend on the concentration used.



## **Acknowledgements**

This work was supported by Spanish MEC projects (AGL2004-06893-C02-01 and AGL2004-06893-C02-02) and project S-0505/AGR/000153 from the Comunidad Autónoma de Madrid.

P. Ramirez thanks the Ministerio de Ciencia y Tecnología for a grant.

## References

- [1] S.M. Barlow. In B. J. F. Hudson (Editors.), Elsevier, London, 1990, p. 253.
- [2] M. Namiki. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 29 (1990) 273.
- [3] K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley. *J. Applied Microbiol.* 86 (1999) 985.
- [4] M. Valero, M.C. Salmerón. *Int. J. Food Microbiol.* 2648 (2002) 1.
- [5] H.J.D. Dorman, A. Peltoketo, R. Hiltunen, M.J. Tilkkanen. *Food Chem.* 83 (2003) 255.
- [6] F. Sahin, M. Güllüce, D. Daferera, A. Sökmen, M. Sömen, M. Polissiou, G. Agar, H. Ozer. *Food Control*. 14 (2004) 549.
- [7] A. Tomaino, F. Cimino, V. Zimbalatti, V. Venuti, V. Sulfaro, A. De Pascale, A. Saija. *Food Chemistry*. 89 (2005) 549.
- [8] D. Slamenová, K. Kubosková, E. Horváthová, S. Robichová. 2002. *Cancer letters*. 177 (2002) 145.
- [9] M.T. Tena, M. Valcárcel, P. Hidalgo, J. L. Ubea. *Anal. Chem.* 69 (1997) 521.
- [10] C. Bicchi, A. Binello, P. Rubinolo. *Phytochem. Analysis*. 11 (2000) 236.
- [11] E. Ibáñez, A. Kubátová, F. J. Señoráns, S. Cavero, G. Reglero, S. B. Hawthorne. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003).
- [12] S. Pattnaik, V. R. Subramanyam, M. Bapaji, C. R. Kole. *Microbios*. 89 (1997) 39.
- [13] G. Pintore, M. Usai, P. Bradesi, C. Juliano, G. Boatto, F. Tomi, M. Chessa, R. Cerri, J. Casanova. *J. Flavour Fragrance*. 17 (2002) 15.
- [14] S. Santoyo, S. Cavero, L. Jaime, E. Ibáñez, F.J. Señoráns, G. Reglero. *Journal of food protection* 68 (2005) 790.
- [15] R. Inatani, N. Nakatani, H. Fuwa. *Agric. Biol. Chem.* 47 (1983) 521.
- [16] K. Schwarz, W. Ternes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 195 (1992) 99.
- [17] K. Schwarz, W. Ternes, E. Schmauderer. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 195 (1992) 104.

- [18] M.E. Cuvelier, C. Berset, H. Richard. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 665.
- [19] O.I. Aruoma, B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Loligers. *Xenobiotica.* 22 (1992) 257.
- [20] E.N. Frankel, S-W. Huang, R. Aeschbach, E. Prior. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 131.
- [21] E.N. Frankel, S.W. Huang, E. Prior, R. Aeschbach. *J. Sci. Food Agric.* 72 (1996) 201.
- [22] P. Ramírez, M.R. García-Risco, S. Santoyo, F.J. Señoráns, E. Ibáñez, G. Reglero. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* (2006) "in press".
- [23] E. Ibáñez, A. Oca, G. de Murga, S. Lopez-Sebastián, J. Tabera, G. Reglero. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1400.
- [24] F.J. Señoráns, E. Ibáñez, S. Cavero, J. Tabera, G. Reglero. *J. Cromatogr. A.* 870 (2000) 99.
- [25] K. Yaku, F. Morishita. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 43 (2000) 59.
- [26] L. Toribio, M.J. Nozal, J.L. Bernal, E.M. Nieto. *J. Chromatogr. A,* 1011 (2003) 155.
- [27] E. Ibáñez, F.J. Señoráns, *J. Biochem. and Biophys. Methods* 43 (2000) 25.
- [28] T.L. Chester, J.D. Pinkston, D.E. Raynie. *Anal. Chem.* 68 (1996) 487R.
- [29] P. Ramírez, F.J. Señoráns, E. Ibáñez, G. Reglero. *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 241.
- [30] P. Ramírez, T. Fornari, F.J. Señoráns, G. Reglero. *J. Supercrit. Fluids* (2005) 128.
- [31] K.M. Payne, B.J. Tarbett, J.S. Bradshaw, K.E. Markides, M.L. Lee. *Anal. Chem.* 62 (1990) 1379.
- [32] E. Ibáñez, P.J. Martín-Alvarez, G. Reglero, M. Herraiz. *J. Microcol. Sep.* 5 (1993) 371.
- [33] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset. *Lebens. Wiss. Technol.* 28 (1995) 25.
- [34] M. E. Cuvelier, H. Richard, C. Berset. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (1996) 645.
- [35] S.L. Richheimer, M.W. Bernart, G.A. King, M.C. Kent, D. T. Bailey. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (1996) 507.
- [36] G. Pintore, M. Usai, P. Bradesi, C. Juliano, G. Boatto, F. Tomi, M. Chessa, R. Cerri, J. Casanova. *Flavour Frag. J.* 17 (2002) 15.

[37] B.M. Lawrence. *Perfum. Flavor.* 20 (1995) 35.

[38] S. Cavero, L. Jaime, P.J. Martín-Alvarez, F.J. Señoráns, G. Reglero, E. Ibáñez. *Eur. Food Res. Technol.* 221 (2005) 478.

[39] S. Santoyo, S. Cavero, L. Jaime, E. Ibáñez, F.J. Señoráns, G. Reglero. *J. Food Protection.* 69 (2006) 369.

## Figure legends

**Figure 1.** Schematic diagram of the packing device used to manufacture the preparative SFC columns

**Figure2.** SFC fractionation of a SFE rosemary extract in three different cyclones (C1, C2, C3) at 130 bar, 80°C and (a) 10% ethanol (b) 5% ethanol.

Table 1. HPLC identification and absolute peak area of compounds found in the supercritical rosemary extract and in the different cyclones (C1, C2, C3) after preparative SFC in SE-54 column (130 bar, 80°C and 10% ethanol).

Compounds	t <sub>R</sub> (min)	UV max Abs (nm)	Supercritical rosemary extract Area	C1 area	C2 area	C3 area
Scutellarein	3.68	230, 275, 332	13,633,314	11,698,587	2,467,158	2,409,360
NI <sup>a</sup> 1	3.81	255	21,098,993	70,296,466	3,338,585	3,994,748
Rosmanol isomer	4.42	230, 273	1,330,875	696,982	260,832	n.d.
Genkwanin	4.92	230, 266, 334	12,589,011	28,810,425	4,705,232	4,878,885
Carnosol	10.20	232, 282	96,908,233	4,904,249	146,332,112	53,593,290
Carnosol isomer	10.68	230, 280	4,421,541	n.d. <sup>b</sup>	20,380,586	27,630,955
NI	11.21	231, 424	8,038,606	8,428,262	9,267,010	15,403,241
NI 5	11.94	230, 284	10,359,803	2,035,039	52,900,528	30,070,845
NI	12.24	230, 266, 329	3,029,224	n.d.	n.d.	n.d.
NI	12.56	230, 267, 329	2,854,496	1,164,556	7,888,503	3,123,137
Carnosic acid	14.40	239, 283	187,468,792	3,369,768	195,043,136	130,136,940
Methyl carnosate	17.12	231, 281	19,560,967	9,564,439	23,691,054	26,816,484
NI	19.45	230	17,015,268	13,900,238	11,821,660	8,911,860

<sup>a</sup>NI : non identified; <sup>b</sup> n.d.: compound non detected

Table 2. HPLC identification and absolute peak area of compounds found in the supercritical rosemary extract and in the different cyclones (C1, C2, C3) after preparative SFC in SE-54 column (130 bar, 80°C and 5% ethanol).

Compounds	t <sub>R</sub> (min)	UV max Abs (nm)	Supercritical rosemary extract Area	C1 area	C2 area	C3 area
Scutellarein	3.68	230, 275, 332	13,633,314	4,829,663	4,193,795	7,067,434
NI <sup>a</sup> 1	3.81	255	21,098,993	10,774,205	8,925,606	10,113,102
Rosmanol isomer	4.42	230, 273	1,330,875	n.d. <sup>b</sup>	n.d.	n.d.
Genkwanin	4.92	230, 266, 334	12,589,011	n.d.	9,688,402	8,000,213
Carnosol	10.20	232, 282	96,908,233	12,392,697	114,524,468	142,479,544
Carnosol isomer	10.68	230, 280	4,421,541	3,809,162	72,216,864	74,870,016
NI	11.21	231, 424	8,038,606	4,857,005	11,495,495	18,926,564
NI 5	11.94	230, 284	10,359,803	4,428,241	63,161,038	88,777,144
NI	12.24	230, 266, 329	3,029,224	n.d.	n.d.	3,608,589
NI	12.56	230, 267, 329	2,854,496	n.d.	4,594,094	n.d.
Carnosic acid	14.40	239, 283	187,468,792	6,272,216	231,590,752	190,494,496
Methyl carnosate	17.12	231, 281	19,560,967	2,481,381	42,974,748	32,476,555
NI	19.45	230	17,015,268	n.d.	1,819,380	n.d.

<sup>a</sup>NI : non identified; <sup>b</sup> n.d.: compound non detected

Table 3. GC identification and absolute peak area of compounds found in the supercritical rosemary extract and in the different cyclones (C1, C2, C3) after preparative SFC in SE-54 column (130 bar, 80°C and 10% ethanol).

Compounds	t <sub>R</sub> (min)	Supercritical rosemary extract Area	C1 area	C2 area	C3 area
α-pinene	5.35	n.d.	3,075	n.d.	n.d.
1,8-cineole	6.71	7,358	62,853	n.d.	n.d.
Linalool	8.54	1,229	19,010	n.d.	n.d.
Camphor	10.27	17,020	227,269	1,722	n.d.
Borneol	11.51	8,309	98,952	1,032	n.d.
Terpinen-4-ol	11.99	1,654	26,615	n.d.	n.d.
α-terpineol	12.47	4,929	64,762	n.d.	n.d.
Verbenone	12.89	19,317	231,683	2,476	1,964
NI <sup>a</sup>	20.38	n.d.	4,104	1,208	1,365
NI	20.74	n.d.	4,953	1,618	1,898
<i>Trans</i> -caryophyllene	21.62	5,127	65,653	n.d.	n.d.
NI	22.67	2,003	25,926	n.d.	n.d.
NI	26.22	1,028	13,485	1,513	1,750
NI	26.61	n.d.	10,988	1,132	1,375
NI	27.57	1,083	13,124	n.d.	n.d.
NI	28.10	1,964	27,917	n.d.	1,470

<sup>a</sup>NI : non identified; <sup>b</sup> n.d.: compound non detected



Table 4. GC identification and absolute peak area of compounds found in the supercritical rosemary extract and in the different cyclones (C1, C2, C3) after preparative SFC in SE-54 column (130 bar, 80°C and 5% ethanol).

Compounds	t <sub>R</sub> (min)	Supercritical rosemary extract Area	C1 area	C2 area	C3 area
α-pinene	5.35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,8-cineole	6.71	7,358	6,390	n.d.	3,098
Linalool	8.54	1,229	2,078	n.d.	n.d.
Camphor	10.27	17,020	22,350	n.d.	11,271
Borneol	11.51	8,309	11,326	n.d.	5,639
Terpinen-4-ol	11.99	1,654	2,626	n.d.	1,173
α-terpineol	12.47	4,929	7,891	n.d.	3,746
Verbenone	12.89	19,317	26,063	1,730	12,996
NI <sup>a</sup>	20.38	n.d.	n.d.	n.d.	1,365
NI	20.74	n.d.	n.d.	n.d.	1,898
<i>Trans</i> -caryophyllene	21.62	5,127	7,116	n.d.	3,605
NI	22.67	2,003	2,796	n.d.	1,363
NI	26.22	1,028	1,507	n.d.	n.d.
NI	26.61	n.d.	1,777	n.d.	n.d.
NI	27.57	1,083	3,640	n.d.	n.d.
NI	28.10	1,964	7,116	n.d.	1,628

<sup>a</sup>NI : non identified; <sup>b</sup> n.d.: compound non detected

Table 5. Antioxidant activity ( $EC_{50}$ ) of the different cyclones after preparative SFC in SE-54 column from a supercritical fluid extract of *Rosmarinus officinalis* L obtained using the DPPH test.

Sample	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Original extract	7.8
C1	-
5% ethanol C2	6.6
C3	7.3
C1	-
10% ethanol C2	6.2
C3	16.5

Table 6. Antimicrobial activity of different cyclones after preparative SFC in SE-54 column from a supercritical fluid extract of *Rosmarinus officinalis* L. and different standards.

Sample	<i>Staphylococcus aureus</i> MBC <sup>a</sup>	<i>Escherichia coli</i> MBC	<i>Candida albicans</i> MBC
Original extract	0.6	0.75	1.5
5% ethanol			
C1	1	1.25	1.5
C2	0.4	0.6	1
C3	0.5	0.75	1
10% ethanol			
C1	1	1.25	1.5
C2	0.5	0.75	1
C3	0.75	0.75	1
Carnosic acid	0.4	0.5	1
Borneol	0.5	1.25	0.75
Camphor	0.75	1.2	1.25
Linalool	1.1	1	0.75
Verbenone	1.25	1.6	1.25
1'8-cineol	1.25	1.85	1.5
$\alpha$ -pinene	1.25	2.15	1.75
Reference antibiotics	10	10	100

MBC<sup>a</sup>, minimum bactericidal concentration. Values given as mg/ml for samples and  $\mu$ g/ml for antibiotics.

Figure 1

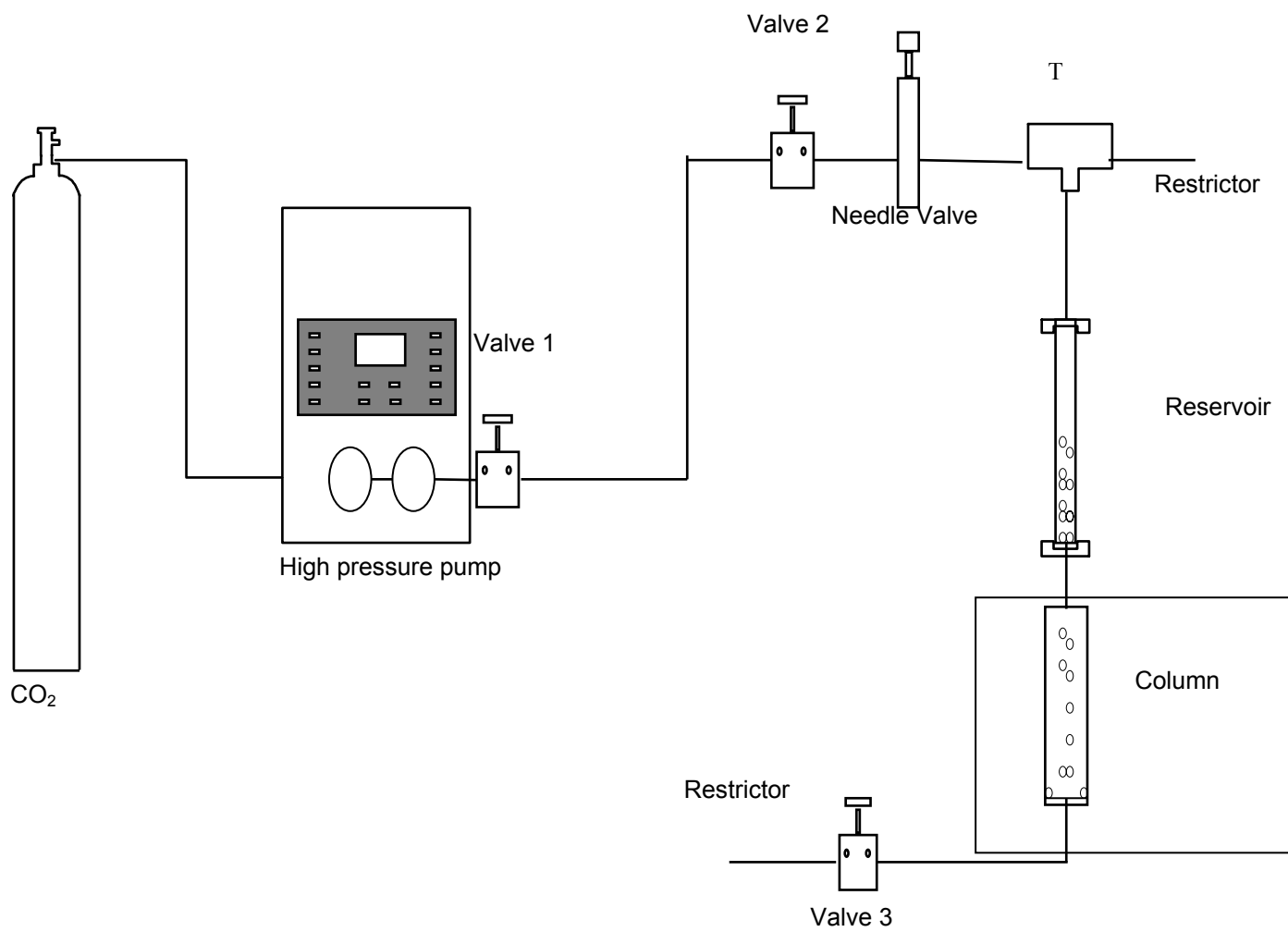
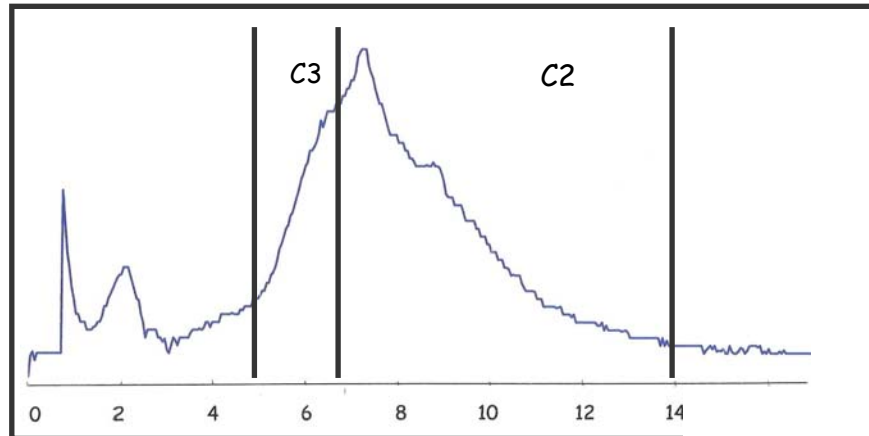
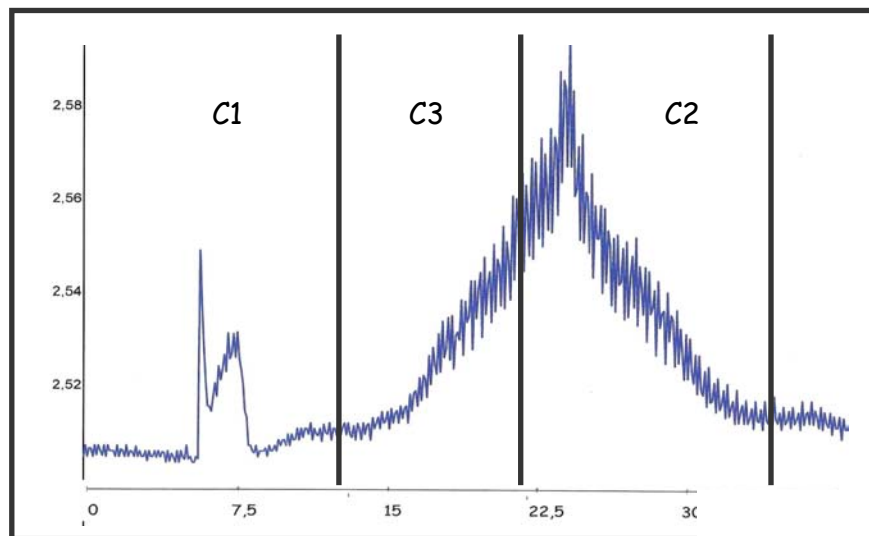


Figure 2



(a)



(b)