



Aplicación de procesos de separación con CO₂ supercrítico a la producción y optimización de bioplaguicidas

Luis Martín Navarro



CONSEJO ECONÓMICO Y SOCIAL DE ARAGÓN
COLECCIÓN TESIS DOCTORALES

Premio a trabajo de investigación o tesis doctoral 2011

Autor de la tesis doctoral:

Luis Martín Navarro

Directores de la tesis doctoral:

Ana María Mainar Fernández y José Santiago Urieta Navarro

Calificación obtenida:

Sobresaliente *cum laude*

La responsabilidad por las opiniones expresadas en las publicaciones del Consejo Económico y Social de Aragón incumbe exclusivamente a sus autores y su publicación no significa que el Consejo se identifique con las mismas.

2012

© De esta edición digital: Consejo Económico y Social de Aragón.

© Para otras ediciones: el autor.

Esta publicación se edita únicamente en formato digital.

La reproducción de esta publicación está permitida citando su procedencia.

Consejo Económico y Social de Aragón
c/ Joaquín Costa, 18, 1º
50071 Zaragoza (España)
Teléfono: 976 71 38 38 – Fax: 976 71 38 41
cesa@aragon.es
www.aragon.es/cesa

Premio del Consejo Económico y Social de Aragón 2011 a trabajos de investigación concluidos o tesis doctorales

El Consejo Económico y Social de Aragón, con el fin de promover y divulgar la investigación, convoca anualmente los Premios a trabajos de investigación concluidos o tesis doctorales, en cuya convocatoria del año 2011, efectuada por Resolución de 9 de agosto de 2011, de la Presidencia del Consejo Económico y Social de Aragón (*Boletín Oficial de Aragón* número 168, de 25 de agosto de 2011), pudieron participar los autores de trabajos de investigación concluidos o tesis doctorales presentadas para la colación del grado de doctor leídas y calificadas de sobresaliente *cum laude*, por unanimidad, entre el 1 de octubre de 2010 y el 30 de septiembre de 2011.

Por Resolución de 5 de diciembre de 2011, de la Secretaría General Técnica de la Presidencia (*Boletín Oficial de Aragón* número 254, de 29 de diciembre de 2011), se otorgó el premio del Consejo Económico y Social de Aragón 2011 a trabajos de investigación concluidos o tesis doctorales.

El premio, con una dotación económica de 4.000 euros, se otorgó a la tesis doctoral "Aplicación de procesos de separación con CO₂ supercrítico a la producción y optimización de bioplaguicidas", realizada por D. Luis Martín Navarro.

El accésit, dotado con 3.000 euros, recayó en el trabajo de investigación titulado "Historia económica de Aragón contemporáneo", cuyo autor es D. Luis Germán Zubero.

El Jurado, que propuso por unanimidad la concesión de ambos reconocimientos, estuvo compuesto por los siguientes miembros del Consejo:

Presidenta: D.^a Ángela Abós Ballarín

Secretaria: D.^a Belén López Aldea

Vocales: D. José Aixalá Pastó

D. Javier Asensio Galdiano

D.^a Rosa García Torres

Agradecimientos

Esta Tesis ha sido realizada con el apoyo económico del Programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (AP-2006-02054) y sus programas de movilidad, así como del grupo GATHERS y del Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A). También agradecer el apoyo económico de distintos proyectos: "Extracción con CO₂ supercrítico de productos naturales con actividad plaguicida a partir de matrices vegetales y fúngicas" (Ref. CTQ2006-15597-Co2-02/PPQ) y "Desarrollo de procesos de separación/obtención de bioplaguicidas con fluidos supercríticos" (Ref. CTQ2009-14629-Co2-02) del Ministerio de Innovación y Ciencia, "Aplicación de técnicas calorimétricas al estudio de la actividad metabólica de la *Spodoptera littoralis* bajo la influencia de insecticidas de origen natural" (Ref. UZ2006-CIE-11), de la Universidad de Zaragoza.

Agradecer en lo personal y en lo científico el apoyo recibido del grupo GATHERS, del Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y del Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A). Asimismo, agradecer a los centros colaboradores por su acogida durante las estancias investigadoras: Instituto de Ciencias Ambientales (ICA-CSIC), Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y Università degli Studi di Salerno.

*Para todos aquellos que me acompañan
durante el viaje a Ítaca*

Índice

Índice

Introducción	7
Resumen	17
Objetivos	18
Metodología	19
Aportaciones del doctorando	35
Conclusiones finales	38
Copia de los trabajos publicados o aceptados	41
Extracción con fluidos supercríticos de ajeno (<i>Artemisia absinthium</i> L.) ..	42
Química comparativa y acción antialimentaria de los extractos tradicionales (Clevenger y Soxhlet) y supercríticos (CO ₂) del ajeno (<i>Artemisia absinthium</i> L.) cultivado en dos poblaciones	61
Extracción con CO ₂ supercrítico de <i>Persea indica</i> : efecto de los parámetros de extracción, modelado y bioactividad de sus extractos	77
Fraccionamiento Supercrítico Antisolvente de Ryanodol a partir de <i>Persea indica</i>	97
Trabajos adicionales y perspectivas de futuro	109
1. Microcalorimetría: ensayo de la bioactividad de los extractos	110
2. Formulación de biopesticidas: encapsulado mediante atomización asistida con fluidos supercríticos (SAA)	114
Bibliografía	119

Introducción

La finalidad de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y aplicación de técnicas de separación con CO₂ supercrítico para obtener bioplaguicidas a partir de material vegetal

La Tesis se enmarca dentro del programa correspondiente al Doctorado en Química Sostenible ("Green Chemistry") (RD 778/98 de 30 de abril, BOE 1 de mayo). Se presenta como un compendio de publicaciones, reflejando la posibilidad y ventajas de mantener un discurso coherente en lo científico sin tener que posponer las publicaciones, uno de los mejores vehículos para difundir la investigación y el conocimiento. La revisión por pares de los artículos realizados publicados garantiza la calidad del trabajo. La investigación desarrollada asimismo, debe contar además con una estructura y planificación bien definidas. De esta manera, las publicaciones presentadas siguen una línea conductora destinada a la extracción o fraccionamiento de compuestos bioactivos mediante técnicas de separación avanzadas con CO₂ supercrítico de diferente material vegetal.

La memoria está estructurada en cuatro bloques: introducción, resumen, copia de los trabajos publicados y trabajos adicionales y perspectivas de futuro. La introducción general proporciona el marco de la investigación realizada y presenta los trabajos científicos publicados. En el resumen se especifican los objetivos de la investigación, se detalla la metodología seguida, se resaltan las aportaciones del doctorando y se enumeran las conclusiones finales alcanzadas. El tercer bloque contiene los trabajos publicados y aceptados en su formato definitivo. Por último, en el cuarto bloque se incluyen los trabajos adicionales realizados que entroncan directamente con las perspectivas de futuro de la investigación.

Uno de los pilares principales sobre los que se fundamenta este trabajo es la Química Sostenible, una corriente dentro de la Química para hacerla medioambientalmente más benigna mediante transformaciones más seguras y productos menos tóxicos. Esta filosofía surge como respuesta a grandes desastres ecológicos tales como la contaminación de ecosistemas con productos químicos como el DDT, las intoxicaciones masivas debidas a productos como la talidomida o los accidentes químicos de grandes dimensiones como el de Bhopal acontecido en 1984. Los pioneros en este campo, Anastas y Warner, recogen en su libro "Green Chemistry Theory and Practice" [1] los doce principios de esta Química Sostenible también llamada Química Verde. Algunos de estos principios pueden encontrarse reflejados en la obtención de plaguicidas a partir de material vegetal, tales como el ahorro de materia y energía, la seguridad en la industria química, la no toxicidad de sus productos o el uso de materias primas renovables (aquellas consideradas no finitas en el ciclo de vida humano).

La Química Sostenible está experimentando un gran auge, no sólo científico, sino también social, debido a que sus principios están adquiriendo nuevas dimensiones a la hora de frenar el cambio climático, contribuyendo a un desarrollo

más racional y respetando el medioambiente. Un Desarrollo Sostenible debe contemplar el crecimiento económico sin exceder la capacidad regeneradora de la naturaleza y sin comprometer el bienestar de las generaciones venideras [2]. A partir de esta mentalidad, hoy día está surgiendo un gran interés por el cálculo de la llamada huella ecológica de una población, es decir, la superficie de planeta necesaria para regenerar los recursos naturales que consume dicha población y para absorber los residuos generados por ella [3]. De igual modo, es posible evaluar el impacto social y ecológico que supone fabricar un producto textil, intentándose así concienciar a la sociedad de consumo [4].

Este Desarrollo Sostenible está reconocido como una de las piezas claves dentro de uno de los Objetivos del Milenio de Naciones Unidas [5] que es el de garantizar la preservación del medioambiente mediante el uso de energías limpias y materias primas renovables. Como paradigma de materias primas renovables, destaca por su importancia el material vegetal, el cual, además de suponer una fuente clara de material energético (biodiésel, biomasa) o de moléculas bloque para la formación de biopolímeros, incluye productos de alto valor añadido. Un claro ejemplo de productos valiosos son los aceites esenciales, conocidos desde la antigüedad, que en la actualidad resurgen como insecticidas, fármacos, cosméticos o antioxidantes naturales.

Los aceites esenciales se definen como las mezclas oleosas obtenidas de material vegetal tal como plantas aromáticas y medicinales mediante hidrodestilación. Este método, de sencilla aplicación y ampliamente conocido, presenta la desventaja de la alta temperatura a la que se somete el material vegetal durante la extracción, lo que conlleva la degradación de algunos de sus compuestos o la posibilidad de hidrólisis de los mismos debido al contacto con el agua.

Una alternativa a este método, es la extracción con disolventes orgánicos, que opera a temperaturas apreciablemente menores, y mediante la que se obtienen extractos cuya composición difiere de la de un aceite esencial. Uno de los ejemplos de esta extracción a nivel de laboratorio es la que se realiza mediante el Soxhlet, dispositivo ideado por Franz von Soxhlet en 1879 que permite optimizar el disolvente utilizado mediante recirculación. Sin embargo, conlleva la aparición de otros problemas: los derivados de la toxicidad del disolvente orgánico empleado en el proceso. Por una parte, los disolventes orgánicos son generadores de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, de sus siglas anglosajonas), que agravan el deterioro de la capa de ozono y pueden suponer un riesgo para la salud. Por otra parte, los disolventes orgánicos, al margen de su peligrosidad, introducen un proceso adicional de separación soluto-disolvente que, además de su costo, en general, puede dejar trazas de disolvente en los extractos. Estas trazas de disolventes en los solutos son perjudiciales para el consumidor y están siendo restringidas de forma cada vez más rigurosa por la legislación.

Como posible solución a esta encrucijada en la que se hallan los métodos tradicionales de extracción, surge en los años 70 del pasado siglo la técnica de

extracción con fluidos supercríticos (SFE, de sus siglas en inglés *supercritical fluid extraction*). Un fluido supercrítico puede describirse como un gas a una temperatura y presión superior a su temperatura y presión críticas. Detrás de esta definición, se encuentra un fluido cuyas prestaciones son asombrosas. Combina características del gas y del líquido; posee la difusividad del primero y el poder disolvente del segundo. Además, su densidad, es decir, su capacidad de solvatación, puede ser modulada variando las condiciones de presión y temperatura. Por otro lado, si el fluido supercrítico se despresuriza suficientemente, pasa a fase gas y se separa del soluto, que precipita.

El fluido más habitualmente empleado para trabajar en la región supercrítica en procesos sostenibles es el dióxido de carbono. El dióxido de carbono es un subproducto inerte, no tóxico, muy abundante y por tanto económico. Además, sus condiciones de operación son moderadas, ya que su presión y temperatura críticas así lo permiten (73,8 bar y 31,1 °C respectivamente). A escala industrial, como en el caso del descafeinado del café, el CO₂ utilizado puede reciclarse al final del proceso extractivo mediante una nueva compresión. Estas características hacen del CO₂ supercrítico un disolvente alternativo ideal en la Química Verde. La desventaja principal del empleo de CO₂ como disolvente es su apolaridad, debido a la cual solubiliza principalmente compuestos no polares. Para paliar este inconveniente, suele ser habitual adicionar al CO₂ modificadores o *entrainers* (principalmente alcoholes) en bajas concentraciones, que permiten que la mezcla disuelva compuestos más polares.

La extracción con fluidos supercríticos es una técnica novedosa en el tiempo, la cual sin embargo ya ha sido muy estudiada debido a su interés en la industria química, petroquímica y la alimentaria. Unas de las aplicaciones es la obtención de productos naturales de alto valor añadido de forma limpia y segura para el consumidor. Alimentos como el café y el té descafeinados, zumos de frutas con potenciadores del aroma, o bebidas alcohólicas cuya graduación ha sido rebajada, han sido obtenidos industrialmente mediante esta técnica [6]. A nivel de laboratorio o de planta piloto también es una técnica prometedora y numerosas especies vegetales han sido sometidas a procesos de extracción con CO₂ supercrítico (scCO₂) con diferentes resultados [7]. De dichas especies vegetales suelen obtenerse extractos análogos a los obtenidos mediante hidrodestilación. En la extracción de estos aceites influye un gran número de factores que hay que tener en cuenta para lograr la extracción con éxito. Factores tan evidentes como la temperatura y la presión del fluido supercrítico, el flujo del mismo o el tiempo de extracción y no tan evidentes, como el tamaño de partícula del material, el empaquetamiento del lecho de extracción o la cantidad de humedad que pueda tener la matriz vegetal a la hora de ser extraída, deben ser tenidos en cuenta a la hora de planificar y realizar una serie de experimentos [8-10].

Además de como agente extractor, el CO₂ puede emplearse como antisolvente (SAF, de sus siglas en inglés *Supercritical Antisolvent Fractionation*). El CO₂, utilizado como antisolvente, permite fraccionar los

extractos contenidos en una disolución orgánica. Gracias al carácter apolar del disolvente supercrítico es posible fraccionar los compuestos presentes en una disolución multicomponente. En el precipitador donde se lleva a cabo la separación principal, los compuestos más polares que no son arrastrados por el CO_2 se depositan, mientras que en el separador colocado a continuación se pueden recoger los compuestos que hayan sido arrastrados por la mezcla scCO_2 + disolvente orgánico. Esta técnica permite el fraccionamiento de mezclas con compuestos no solubles en CO_2 supercrítico, ampliando la versatilidad de las técnicas supercríticas. Las principales aplicaciones de este proceso aparecen recogidas en una revisión de Reverchon y de Marco [10] donde se esbozan algunas de las aplicaciones de esta técnica. Una de ellas es la purificación de fosfolípidos a partir de una disolución etanólica de yema de huevo, descrita por Aro et al. [11]. Otras son el aislamiento de digalactosil-diacilglicerol a partir de extractos acetónicos de salvado de avena [12], el fraccionamiento del propóleo para obtener un producto enriquecido en flavonoides [13], o la obtención selectiva de polifenoles y antocianinas a partir de soluciones etanólicas de residuos liofilizados de uvas [14].

La calidad de los extractos obtenidos, independientemente del método de extracción (bien tradicional bien innovador), debe ser lo suficientemente alta, máxime si se trata de un proceso industrial. Dicha calidad deberá ser investigada mediante técnicas de análisis de los extractos para determinar en qué proporción se encuentran los compuestos valiosos. Con la ayuda del análisis de composiciones de los extractos se puede modelar adecuadamente la extracción de la matriz vegetal para conseguir el producto más deseado. Adicionalmente, los modelos matemáticos ajustan los datos experimentales, lo que permite extraer información suficiente para predecir resultados cuando las condiciones de trabajo cambian. La importancia de desarrollar un buen modelo radica en su utilidad para efectuar el paso del laboratorio a la industria. Sin embargo, un modelo no sólo debe ser un simple instrumento matemático de ajuste, sino que también debe ofrecer un significado físico a los parámetros empleados en el mismo, incluyendo los de la estructura de la materia vegetal. Además de en su utilidad práctica, la robustez de un modelo se basa en la capacidad de proporcionar dicho significado físico a los parámetros que lo caracterizan y en el conocimiento inherente a los fenómenos que tienen lugar en los procesos bajo estudio.

Resulta muy útil clasificar los modelos de extracción supercrítica de aceites vegetales. Poletto y Reverchon [15] los dividen en tres grupos: empíricos, de transferencia de calor y de balance de materia. La selección de uno u otro depende fundamentalmente de la distribución del soluto dentro de la matriz vegetal, es decir, de su accesibilidad, y del tipo de extracción utilizada: dinámica, estática o estático-dinámica.

Por otra parte, las aplicaciones de los extractos vegetales tienen una gran demanda en campos como la cosmética, la alimentación o la agricultura. En este último sector se encuentran los bioplaguicidas o biopesticidas, plaguicidas de

origen natural (procedentes de animales, plantas, bacterias y ciertos minerales, según la USEPA, Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos [16]), que conforman un importante mercado emergente a nivel mundial (1600 millones de dólares en 2008 y 3300 millones de dólares en 2014 según previsiones [17]) debido a dos factores: la agricultura ecológica, que crece exponencialmente año a año, y las limitaciones para el uso de pesticidas sintéticos tradicionales, que aumentan de la misma manera en que lo hace la demanda de productos más limpios y seguros. Siempre según la USEPA, los bioplaguicidas se pueden diferenciar en pesticidas microbianos (microorganismos), protectores incorporados de las plantas (sustancias pesticidas generadas por las plantas al haber sido genéticamente modificadas) y pesticidas bioquímicos (sustancias que se generan en la naturaleza y que controlan las plagas). Entre estos biopesticidas destacan por una parte los microorganismos como las diferentes variedades del *Bacillus thuringiensis*, mientras que por la otra lo hacen los pesticidas bioquímicos, entre los que se encuentran los extractos obtenidos de las plantas, repelentes en unos casos y tóxicos en otros.

Los bioplaguicidas están sujetos a una serie de regulaciones en los distintos ámbitos oficiales. Dentro de la Unión Europea, en su Sexto Programa de Acción de la Comunidad Europea en materia de Medio Ambiente, en lo que respecta a agricultura ecológica [18], se establecen como prioritarios no sólo la rotación de los cultivos, la predilección por recursos renovables organizados a nivel local o la adecuada elección de especies para cada ecosistema, sino también el manejo de productos adecuados para el control de plagas. Entre estos productos adecuados se encuentran preferentemente las sustancias procedentes de la agricultura ecológica, los fertilizantes minerales de baja solubilidad y los productos naturales o derivados. Los productos químicos sintéticos aprobados por la agricultura ecológica se restringen a los casos excepcionales donde no existan las prácticas adecuadas de control de plagas, no haya productos disponibles de los indicados como preferentes o, simplemente, el manejo de éstos últimos conlleve un deterioro mayor del ecosistema.

La eficacia de dichos bioplaguicidas debe ser comprobada analizando la actividad de los mismos. En términos generales, un *bioensayo* puede ser definido como *cualquier prueba que involucra organismos vivos* y, de forma más estricta, se puede señalar como *cualquier método por medio del cual se determina la concentración o actividad de un producto químico en términos de la respuesta biológica que produce* [19]. En el caso de un plaguicida, es lógico que se realicen ensayos sobre organismos que sean considerados plagas. La voracidad, la capacidad migratoria o la fácil adaptación a diversos medios son algunas de las cualidades que pueden atesorar los siguientes insectos considerados como plagas: escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*), mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), rosquilla negra (*Spodoptera littoralis*) y pulgón de la avena (*Rhopalosiphum padi*) [20,21]. Además de comprobar el efecto dañino que puedan tener los plaguicidas sobre insectos, es importante comprobar que no tengan efecto fitotóxico sobre los cultivos de interés, o que lo tengan con cultivos dañinos,

comúnmente llamados malas hierbas. Para ello se pueden tomar como modelos plantas tales como *Lactuca sativa* y *Lolium perenne*, lechuga (cultivo de interés) y césped inglés (mala hierba) respectivamente.

De acuerdo a la normativa descrita anteriormente, se puede pensar perfectamente en una determinada especie vegetal como fuente de bioplaguicidas. Esta especie vegetal a estudiar debe resultar valiosa por sus posibles aplicaciones: insecticidas [22], antimicrobianas [23], antiparasitarias [24] o acaricidas [25], entre otras. Además de por sus propiedades, puede resultar interesante por su adaptación, por su valor ecológico, por sus altos rendimientos o por la posibilidad de ser sometida a procesos innovadores de extracción y no haber sido estudiada con anterioridad. Plantas interesantes que cumplen estos requisitos son el la *Artemisia absinthium* y la *Persea indica*.

Artemisia absinthium L. tiene de nombre común ajenjo, aunque también se la conoce como ajorizo, artemisia amarga o hierba santa. Su nombre científico procede etimológicamente de Artemisa, la diosa griega de la caza y del griego ἄψινθιον (apsinthion), no gozosa, probablemente por su desagradable sabor amargo. Cabe destacar también etimológicamente su denominación alemana Wermutkraut, hierba del Wermut (de origen desconocido, aunque probablemente del alemán antiguo hombre "wer" y coraje "mod"). Wermut, transformado al francés, vermouth, da nombre al aperitivo alcohólico de sabor amargo a base de hierbas, entre las que se encuentra el ajenjo y que adquiere su mejor versión junto a un sifón casero. Sin embargo, es la absenta la bebida espirituosa que mayor fama ha aportado al ajenjo. Esta bebida está indefectiblemente unida a la vida bohemia de los intelectuales europeos de finales del siglo XIX. Bajo los efluvios de esta bebida, el gran genio Van Gogh se rebanó su oreja para ofrecérsela como obsequio a una meretriz [26]. La absenta, apodada Fee Vert (hada verde en francés) es una bebida de alta graduación (entre 45 y 89,9 °) cuyo esporádico contenido en tuyonas, monoterpenos oxigenados altamente tóxicos, hizo que fuera prohibida a principios del siglo XX. En la actualidad, la bebida se ha vuelto a comercializar con estrictos límites en los niveles de tuyonas (35 ppm como máximo) [27]. Estos límites legislativos hacen interesante el cultivo de especies de ajenjo libres de tuyonas [28] e incluso el desarrollo de métodos para eliminarlas del ajenjo [29]. En cuanto a producción, se obtienen unos 8.500 a 12.000 kilogramos de materia verde fresca por hectárea que se transforman en unos 1.800 - 2.500 kilogramos de material desecado [30]. El rendimiento en aceite esencial es variable, aunque diversas fuentes lo sitúan en torno al 0,2-0,5% [31,32]. Las propiedades del ajenjo son conocidas desde tiempo atrás, y su uso está ampliamente extendido en la medicina tradicional. Es una planta con propiedades de estimulante estomacal, tónico, febrífugo y emenagogo. Además, se usa como remedio en la agricultura ecológica como efectivo insecticida [33]. Su aceite esencial presenta a su vez diversas propiedades biológicas, incluyendo actividad antimicrobiana [22], antiparasitaria [23], hepatoprotectiva [24] y acaricida [25].

Persea indica L., de nombre común viñátigo, es un endemismo macaronésico reducto de la era Terciaria. Su etimología redundante (*Persea*: referente a un árbol sagrado de Egipto y Persia; *indica*: proveniente de las Indias) está doblemente equivocada debido a su origen exclusivo de la zona macaronésica. Se extiende por las Islas Canarias, Madeira y Azores y es uno de los principales constituyentes del bosque de laurisilva canario [34]. De hecho una ley promulgada por el Gobierno Canario lo establece como símbolo natural de la isla de La Gomera junto con la paloma rabiche [35]. Un uso tradicional de las hojas de *Persea indica* demuestra la actividad insecticida de las mismas, ya que éstas se colocaban junto a las patatas almacenadas para protegerlas. Además sus extractos han demostrado ser una fuente del diterpeno tóxico ryanodol [36], cuyo interés radica en la mayor selectividad hacia los insectos que hacia los mamíferos: muestra una toxicidad baja frente a los ratones, mientras que es un potente insecticida frente moscas y cucarachas [37] y ha demostrado actividad antialimentaria en *Spodoptera litura* [22,38].

A pesar de contar con una técnica ampliamente conocida (13334 referencias en scifinder®, para las palabras clave *supercritical fluid extraction*), la separación de biopesticidas con técnicas supercríticas no está tan extendida (26 referencias en scifinder®, para las palabras clave *supercritical fluid extraction + natural pesticide*) y la mayoría de dichas referencias versan sobre la determinación de residuos de pesticidas en suelos de cultivos o alimentos, aunque también se han visto ejemplos en la literatura de la obtención de bioplaguicidas a partir de plantas. En una revisión general sobre las aplicaciones de los extractos supercríticos obtenidos a partir de material vegetal, Reverchon y de Marco [10] esbozan la obtención de biopesticidas con CO₂ supercrítico.

Una de las aplicaciones de la extracción de biopesticidas con fluidos supercríticos es la extracción de piretrinas a partir de plantas del género *Chrysanthemum*, estudiada por diferentes investigadores [39-42]. Las piretrinas, obtenidas a partir de los crisantemos, constituyen una familia de compuestos interesantes por sus propiedades insecticidas. Son dañinas para los peces, pero mucho menos tóxicas para los mamíferos y aves que otros insecticidas sintéticos. No son persistentes, ya que se descomponen fácilmente expuestos a la radiación solar [43,44].

Las piretrinas son muy solubles en el scCO₂, por lo que pueden ser extraídas a 90 bar y 40 °C [39] evitándose las altas presiones debido a que la coextracción de compuestos indeseados disminuye la concentración de compuestos activos. Sin embargo, se necesita la separación fraccionada de los extractos para eliminar las ceras cuticulares, por lo que se ha estudiado también un prelavado de las flores con scCO₂ para eliminar parte de las mismas [41]. También se puede purificar el extracto crudo obtenido con hexano mediante el uso de fluidos supercríticos, aunque el inconveniente de este proceso es el uso inherente del hexano [40].

Otros compuestos insecticidas obtenidos mediante la extracción con fluidos supercríticos son las azadiractinas, obtenidas a partir de las semillas del árbol del

neem, que presentan actividad larvicida, acaricida y nematocida [45]. En esta ocasión la extracción supercrítica se lleva a cabo a presiones de 250-300 bar y temperaturas de 40-50 °C, obteniéndose un producto cuyo contenido en azadiractinas ronda los 10.000 ppm [46-48]. Este proceso se ha llevado a cabo de manera industrial por Essences SRL, Salerno. También se puede usar metanol como modificador en la extracción supercrítica para lograr reducir las presiones de trabajo a 137 bar [49].

Otro de los compuestos insecticidas que puede ser extraído mediante la técnica de fluidos supercríticos es la rotenona. La rotenona, cuyo potencial insecticida es conocido desde la antigüedad, es una molécula obtenida a partir de numerosas especies vegetales tropicales como *Derris elliptica*, *Lonchocarpus nicou* y *Tephrosia vogelii*. Las tribus amazónicas esparcían en el agua extractos ricos en rotenona causando el envenenamiento de los peces, y realizando entonces la pesca a mano al subir a la superficie una vez paralizados o muertos. Además de ser un piscicida de gran acción, se usa como insecticida de amplio espectro contra diversas plagas como el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) y la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) entre otras. Se degrada rápidamente y de forma natural en pocos días, lo que a la vez es una ventaja y un inconveniente (no es persistente, pero por el contrario debe ser rociado varias veces si se desea un efecto prolongado). Otro inconveniente es que podría ser una sustancia causante de la enfermedad de Parkinson [50,51], tomada como modelo que podría ejemplificar la acción de un tóxico sobre las neuronas dopaminérgicas [52]. En cuanto a la extracción con fluidos supercríticos de esta sustancia, se han llevado a cabo varios estudios. Li et al. [53] y Huang et al. [54] han conseguido la extracción con $scCO_2$ de la rotenona a partir de la *Tephrosia vogelii*. Los primeros lograron extraer a 27,58 MPa y 60 °C añadiendo metanol como modificador el 98 % de la rotenona obtenida mediante maceración extractiva en cloroformo. Los segundos, en cambio, realizaron un estudio comparativo en el rango de presiones y temperaturas siguientes 22-28 MPa y 30-60 °C. La mayor concentración de rotenona en el extracto (7,41 %) se obtuvo en las condiciones de 30 °C y 24 MPa, mientras que el mayor rendimiento de rotenona respecto a la cantidad de material seco introducido (4,49 mg rotenona por gramo de material seco) para extraer se obtuvo en las siguientes condiciones: 60 °C y 22 MPa. Para mejorar la extracción añadieron un 10 % de acetato de etilo como modificador, obteniendo a 60 °C y 22 MPa un extracto con 7,96 % de rotenona y un rendimiento de 5,99 mg por gramo de material seco introducido en el reactor. D'Andrea et al. [55] propusieron la extracción de la rotenona a partir de las raíces de *Derris elliptica* (Wallich) Benth. Llevaron a cabo un estudio en el rango de presiones de 9-44 MPa y de temperaturas de 40-60 °C. Entre todas las condiciones ensayadas, obtuvieron que la extracción más eficiente ocurrió a la presión y temperatura mayores, 44 MPa y 60 °C. La pureza del extracto y el rendimiento de extracción en rotenona fueron mayores que los conseguidos mediante la extracción tradicional propuesta con Soxhlet (metanol:diclorometano 1:1).

En estos ejemplos se puede entrever la aplicación del dúo materia prima renovable-fluidos supercríticos, una combinación más que interesante para la puesta a punto de procesos químicamente verdes. Dichos elementos no constituyen el fin, sino el medio para el desarrollo de un logro ambicioso, la obtención de bioplaguicidas eficaces de principios activos de plantas a través de la extracción y concentración mediante fluidos supercríticos. Este dúo de referencia ha englobado los trabajos de investigación realizados durante la tesis doctoral. Estos trabajos están comprendidos en una unidad temática con el denominador común y concreto: la "Aplicación de Procesos de Separación con CO₂ Supercrítico a la Producción y Optimización de Bioplaguicidas", que constituye el título de la Tesis Doctoral. Esta Tesis Doctoral ha sido alumbrada a caballo entre dos importantes proyectos del MEC cuyos nombres poseen el mismo cariz temático, "Desarrollo de procesos de separación/obtención de bioplaguicidas con fluidos supercríticos" (Ref: CTQ2009-14629-Co2-02) y "Extracción con CO₂ supercrítico de productos naturales con actividad plaguicida a partir de matrices vegetales y fúngicas" (Ref. CTQ2006-15597-Co2-02). Los procesos de separación con fluidos supercríticos están presentes en las cuatro publicaciones, haciendo referencia a cada una de las especies vegetales estudiadas. Las técnicas de extracción aparecen como parte principal de los artículos (publicados la mayoría en una revista cuyo título delata la naturaleza de su contenido "The Journal of Supercritical Fluids"). También los extractos supercríticos obtenidos son analizados y evaluados en función de su actividad insecticida. Estos cuatro artículos no sólo constituyen el fruto de un trabajo de investigación sino que además han permitido fomentar las relaciones entre grupos investigadores de las distintas áreas, *networking*, entre los grupos GATHERS (Grupo de Termodinámica Aplicada y Superficies, de sus siglas en inglés), ICA del CSIC (Instituto de Ciencias Agrarias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas), CITA (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón) y el grupo de fluidos supercríticos del Catedrático Ernesto Reverchon dentro del Departamento de Ingeniería Industrial de la Universidad degli Studi di Salerno. Dicha red de trabajo me ha permitido realizar varias estancias investigadoras, tanto en Madrid (1 mes, tiempo total) como en Italia (1 año, tiempo total), que me han permitido, no sólo optar a la mención europea en el título de doctor, sino también captar las esencias de distintos grupos de investigación. Esta mezcla de esencias, nunca mejor dicho, ha permitido no sólo un trabajo intercultural diverso, sino además un trabajo multidisciplinar, puesto que tanto el CITA aragonés como el ICA madrileño están eminentemente orientados hacia la Biología, mientras que el grupo del Catedrático Ernesto Reverchon está especializado en Ingeniería, aunándose estos conocimientos con la experiencia Termodinámica del grupo GATHERS.

Resumen

Objetivos

El objetivo científico de esta Tesis es la optimización de procesos de separación con fluidos supercríticos de compuestos con actividad insecticida a partir de material vegetal.

Para alcanzar la consecución de este objetivo formal, el trabajo se ha estructurado en los objetivos concretos que aparecen en los siguientes epígrafes.

1. Selección del material vegetal, obtención de extractos bioactivos mediante la técnica de extracción supercrítica (SFE) y comparación con técnicas tradicionales.

La selección del material vegetal se refiere a la búsqueda del material idóneo dentro de las especies vegetales suministradas por nuestros grupos colaboradores (CITA e ICA). La obtención de compuestos bioactivos implica la optimización de las condiciones de trabajo adecuadas para obtener compuestos bioactivos a partir de material vegetal mediante extracción con fluidos supercríticos. Además, se establece una comparación con técnicas tradicionales de extracción (hidrodestilación y extracción Soxhlet con disolventes orgánicos).

2. Caracterización química de los extractos obtenidos.

Este objetivo incluye la identificación de los compuestos presentes en los diferentes extractos obtenidos mediante las diferentes técnicas. El fin de esta identificación es la caracterización de los diversos extractos, para poder establecer las similitudes y diferencias entre las técnicas convencionales de extracción (extracción tipo Soxhlet con disolventes orgánicos, hidrodestilación), y las técnicas avanzadas de extracción con fluidos supercríticos (SFE), además de ser una herramienta clave en la optimización del proceso. Se planteó el análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos obtenidos por diversos métodos.

3. Determinación de la bioactividad de los extractos obtenidos sobre especies diana.

Consta del análisis de la bioactividad de los diferentes extractos obtenidos mediante diversas técnicas sobre especies seleccionadas por su impacto económico. La actividad antialimentaria sobre rosquilla negra (*Spodoptera littoralis*), pulgón del melocotonero (*Myzus persicae*) y pulgón de la avena (*Rhopalosiphum padi*) así como la fitotoxicidad sobre *Lactuca sativa* y *Lolium perenne* constituirán los principales indicadores de la bioactividad.

4. Modelado del proceso de extracción con fluidos supercríticos (SFE).

Este objetivo se concreta, especialmente, en la aplicación del modelo matemático de Sovová, capaz de correlacionar e interpretar adecuadamente los

datos experimentales obtenidos durante las extracciones supercríticas para reducir el número de experimentos así como para obtener parámetros importantes para el escalado.

5. Aplicación de la técnica de fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF) al enriquecimiento de extractos

Se refiere a los ensayos de enriquecimiento de los extractos mediante un fraccionamiento usando CO₂ supercrítico como antidisolvente (SAF), una aplicación novedosa de esta técnica para concentrar los principios activos insecticidas.

Metodología

En primer lugar hay que mencionar el planteamiento de diferentes etapas a la hora de cubrir las tareas asociadas al cumplimiento de los diversos objetivos concretos que buscan la consecución del objetivo formal de la Tesis antes señalado: optimizar procesos de separación de compuestos con actividad insecticida a partir de material vegetal, utilizando fluidos supercríticos. En la primera etapa se incluye la obtención de extractos, a partir de material vegetal seleccionado, mediante el uso de la técnica de extracción con fluidos supercríticos y mediante el uso de técnicas tradicionales. En dicha selección intervienen nuestros colaboradores al suministrarnos una serie de plantas que son sometidas a los experimentos de extracción supercrítica. Además, cabe destacar la técnica de fraccionamiento antidisolvente, que más allá de extraer compuestos, los concentra, pudiendo dar lugar a extractos muy eficaces. La segunda etapa es la caracterización mediante diversas técnicas analíticas de los extractos obtenidos, mientras que en una tercera etapa se analiza la bioactividad de los mismos mediante diferentes bioensayos. En una cuarta etapa se realiza el modelado de la extracción supercrítica como herramienta para obtener variables interesantes para el escalado industrial.

El desarrollo de las diferentes etapas no es lineal a la hora de cumplir los objetivos ya que se establece una interrelación entre las mismas tal como se indica en la figura 1. Es decir, si un material vegetal es preseleccionado, pero no es susceptible de ser sometido a una extracción eficaz en condiciones adecuadas, se desecha. Sólo aquellas capaces de proporcionar extractos en calidad y en cantidad adecuadas serán sometidas a los estudios sistemáticos de extracción supercrítica y de técnicas tradicionales de extracción. Lo mismo sucede con los diferentes análisis cromatográficos y de la bioactividad, ya que éstos permiten establecer las mejores condiciones de trabajo de los experimentos de extracción y concentración y, a su vez, el material vegetal a utilizar. En la figura 1 se ilustra en un diagrama donde

aparecen las diferentes etapas metodológicas de la Tesis Doctoral, así como la interrelación entre las mismas.

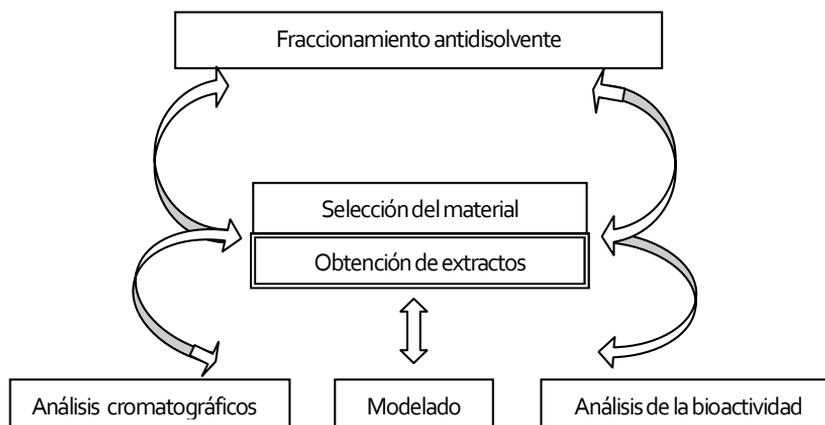


Figura 1. Etapas metodológicas durante el desarrollo de la Tesis.

Para la aplicación de esta metodología han sido necesarios la realización de una serie de tareas y el manejo de diversos instrumentos que aparecen a continuación, agrupados también según las etapas.

Pretratamiento y selección del material vegetal

El material suministrado por el CITA y por el ICA se recibe tras un proceso de secado en corriente de aire en el que la humedad queda reducida aproximadamente al 10%. A continuación se realizan las siguientes operaciones:

Deshojado: Se separan cuidadosamente hojas y sumidades florales.

Triturado: Se tritura el material con un molino de alimentos (Bosch), añadiéndose una pequeña cantidad de nitrógeno líquido para minimizar la pérdida de compuestos volátiles de la matriz vegetal.

Tamizado: Se utiliza un tamizador vibratorio (CISA) dotado con 7 tamices diferentes, de luz comprendida entre 900 y 125 μm . La elección de fracciones de diferentes tamaños de partículas nos permitió averiguar la influencia del tamaño de las partículas en el rendimiento de extracción.

Almacenado: El material tamizado se conserva en el frigorífico a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ en bolsas de plástico cerradas herméticamente.

El pretratamiento además de facilitar la difusión del disolvente y de los compuestos vegetales a través de la matriz sólida, permite incrementar la superficie de contacto y por tanto acelerar el proceso de extracción. Asimismo, la

fragmentación del material rompe estructuras orgánicas de la planta que alojan los aceites a extraer.

El conjunto de material vegetal preseleccionado incluyó árboles y plantas de diversas familias (*Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Vitaceae* y *Asteraceae*) y de diversos géneros (*Senecio*, *Artemisia*, *Vitis*, *Lavandula*). En concreto, las especies pretratadas fueron: *Senecio palmensis*, *Senecio hermosae*, *Lavandula luisieri*, *Vitis vinifera*, *Artemisia granatensis*, *Artemisia absinthium*, y *Persea indica*. Estas dos últimas especies vegetales fueron las elegidas para realizar los estudios sistemáticos al reunir las características idóneas para el desarrollo y optimización de los bioplaguicidas.

El cultivo del ajeno se realizó de manera controlada por el CITA en Ejea de los Caballeros. Se recolectó material vegetal de diferentes años (2005, 2006, 2007, 2008 y 2009). Además, se trabajó con material vegetal obtenido mediante la técnica de cultivo aeropónico (no se requiere suelo y se pueden alcanzar mayores rendimientos [49]) suministrado por el ICA. La recolección del viñátigo se llevó a cabo en el Monte de las Mercedes, Tenerife por parte del IPNA (Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, CSIC, Santa Cruz de Tenerife) en colaboración con el ICA.

Artemisia absinthium L.

El ajeno (figura 2) crece espontáneamente en Europa meridional y central, África septentrional y Asia, en condiciones de clima templado, resistiendo muy bien el frío y las condiciones de sequía. Es una planta vivaz, perteneciente a la familia de las compuestas, arbustiva, subleñosa, con tallo erecto muy ramificado, que alcanza una altura variable entre 50 y 120 cm. Presenta hojas alternas, pubescentes, de color verde grisáceo en el haz y gris plateado en el envés, sésiles o largamente pecioladas, pinnadas o bipinnadas. Las flores son pequeñas, las de la periferia femeninas y las del centro hermafroditas; están agrupadas en capítulos amarillo verdosos, brevemente pedunculados, dispuestos en racimos. Fruto seco de color grisáceo. La raíz es pivotante, leñosa, con numerosas ramificaciones laterales.



Figura 2. Ajeno.

Persea indica L.

El viñátigo (figura 3) es un árbol perennifolio de crecimiento rápido que puede alcanzar los 20 metros de altura y que requiere clima templado, suelos franco-arcillosos, neutro-ácidos con exposición soleada o media sombra y que se multiplica por semillas. Presenta un tronco recto y robusto, con la corteza gris oscura, fisurada y ramillas gruesas y frágiles con pubescencia sedosa. Las hojas son oblongo-lanceoladas o lanceoladas, de 15 a 18 cm de longitud y 3-4 cm de anchura, coriáceas, de borde entero algo revuelto, con haz de color verde reluciente y envés algo más pálido. El peciolo tiene 2-3 cm de longitud con la base ensanchada y tonalidad rojiza. Las hojas son aromáticas y las flores bisexuales de color amarillo-verdoso están dispuestas en panículas situadas al final de las ramillas, sobre pedúnculos largos cubiertos de tomento gris-amarillento. El fruto bacciforme ovado-elíptico tiene 1,5-2 cm de longitud y es de color morado-negruzco.



Figura 3. Árbol de viñátigo, junto con detalles de sus hojas, flores y frutos.

Obtención de extractos*Hidrodestilación*

Descripción del equipo y método operativo: El hidrodestilador utilizado fue de tipo Clevenger, similar a los empleados en farmacopea y que fue construido en el Servicio de Soplado de Vidrio de la Universidad de Zaragoza (figura 4). El hidrodestilador tiene una capacidad de un litro y se calienta mediante una manta calefactora. Se introduce una cantidad de masa conocida del material vegetal y se añaden 500 mL de agua destilada. Una vez alcanzada la ebullición, la destilación se prolonga 4 horas. Finalizado el proceso, el condensado recogido en la bureta lateral se separa por decantación.

Extracción Soxhlet con disolventes orgánicos

Descripción del equipo y método operativo: El dispositivo de extracción (figura 5) consta de un matraz de 100 mL de capacidad, de un cuerpo extractor de 125 mL de capacidad, y de un serpentín refrigerante de vidrio. Los vapores del disolvente ascienden por la rama lateral del cuerpo extractor y se condensan gracias al serpentín de vidrio. El disolvente condensado cae sobre el material vegetal, que se encuentra recluido en un contenedor poroso celulósico (inerte frente al disolvente) dentro del extractor. A medida que condensa el disolvente, el cuerpo del extractor se llena poco a poco, hasta que alcanza el nivel máximo, marcado por la altura del

sifón. Una vez que se alcanza la altura máxima, la disolución que contiene los componentes de la matriz vegetal desciende al matraz a través del sifón y el disolvente comienza de nuevo a evaporarse. Se trata de un proceso cíclico que se repite durante 20 horas, hasta que la matriz vegetal queda exhausta. Una vez finalizada la extracción, el disolvente se evapora con la ayuda de un rotavapor Buchi.



Figura 4.
Hidrodestilador



Figura 5.
Extractor Soxhlet



Figura 6. Planta de laboratorio de extracción con fluidos supercríticos

Extracción con CO₂ supercrítico (SFE)

Descripción del equipo y método operativo: La extracción con CO₂ supercrítico se llevó a cabo en la planta de laboratorio construida y puesta a punto por el grupo GATHERS situada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza. El dispositivo (figura 6) permite extraer y separar aceites y ceras de material vegetal en un intervalo de temperaturas entre 30 y 90 °C y presiones de hasta 250 bar.

Un esquema del sistema experimental aparece en la figura 7.

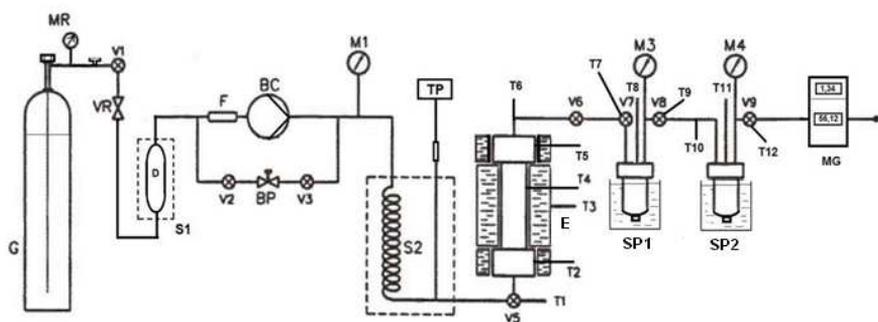


Figura 7. Esquema de la planta de extracción con CO₂ supercrítico. BC: Bomba. BP: Regulador de presión. E: Extractor. F: Filtro. G: Botella de CO₂. MG: Caudalímetro con totalizador. MR: Manorreductora. M₁, M₃ y M₄: Manómetros. TP: Transductor. SP₁, SP₂: Separadores. S₁: Refrigerador del CO₂. S₂: Intercambiador de calor. T₁-T₁₂: Termopares. VR: Válvula antirretorno. V₁-V₉: Válvulas.

El dispositivo cuenta con una botella de CO₂, una bomba que lo impulsa, un baño refrigerante para el CO₂, un intercambiador de calor, una vasija de extracción de acero inoxidable de 1 litro de capacidad, dos separadores para la recolección de los extractos, válvulas, manómetros, termopares y cables calefactores con reguladores de temperatura. Se introduce una masa conocida de planta (aproximadamente 100 g) en el cilindro del extractor. La disposición del material en el interior del reactor es la que se indica en la figura 8. El material vegetal se sitúa entre dos capas de algodón y dos grupos de esferas de vidrio, las pequeñas más próximas al algodón y las grandes más alejadas. En los extremos se introducen también la esponja de níquel y el disco de vidrio sinterizado. Cuando el extractor y los colectores han alcanzado la temperatura deseada, se pone en funcionamiento la bomba para alcanzar la presión de trabajo en todo el sistema, de tal manera que, mediante el adecuado manejo de las llaves, se mantenga una presión de 70-80 bar en el primer colector y de 15-20 bar en el segundo, mientras en el extractor tenemos la presión de trabajo. El cronómetro se pone en marcha en el instante en que se produce la apertura del segundo separador (SP₂). Una vez que ha pasado el volumen deseado de gas, se detiene el cronómetro y se cierran las válvulas. Se deja salir el gas del segundo separador y se determina la masa de aceite extraído. El mismo proceso se reinicia sobre el mismo material al objeto de obtener cada uno de los puntos que configuran la curva de extracción supercrítica. Cuando la curva que se obtiene al representar material extraído vs tiempo, o caudal de CO₂, tiende a un valor asintótico, el experimento de extracción supercrítica se da por concluido. Igualmente, si la cantidad de CO₂ pasada por el reactor es muy grande (más de 7500 litros), o si la cantidad de material extraído es muy pequeña (< 0,0500 g), el experimento se detiene. Una vez finalizado el experimento se vacía también el primer colector y, por diferencia de pesada, se determina la cantidad de material depositado. El procedimiento utilizado es similar al que aparece en literatura [56-58].



Figura 8. Disposición del material vegetal en el lecho de extracción

A la hora de trabajar con etanol como cosolvente de la extracción supercrítica, se realiza una pequeña modificación, añadiéndose 50 mL de etanol al material vegetal antes de comenzar el proceso de extracción. De esta manera se consiguen extraer compuestos más polares de los que se extraen en una extracción con sólo CO₂ supercrítico como disolvente.

Análisis de los extractos

Análisis cromatográficos

Se realizaron análisis de los diferentes extractos para determinar su composición. Los análisis cromatográficos realizados fueron: cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). La metodología utilizada a la hora de realizar una determinación cromatográfica fue similar en todos los casos. En primer lugar se realizó una extensiva búsqueda bibliográfica de la composición que podía encontrarse en los extractos de cada una de las plantas estudiadas y se consiguieron estándares de los componentes mayoritarios en dichos extractos (bien comerciales, bien aislados e identificados por el ICA). A continuación se optimizó el programa de horno en el caso de los análisis por GC o por GC-MS, o se optimizó el gradiente de disolventes en el caso del HPLC-MS. Por último, se pincharon los estándares y los extractos, identificándose los compuestos mayoritarios mediante los tiempos de retención y espectros de masas. Cuando no se dispuso de los estándares, se determinaron los compuestos bien por librerías de espectros (NIST y WILEY 2008), bien por comparación con los Índices de Retención de Kovats [59], que relacionan los tiempos de retención relativos de los compuestos sin identificar al de los hidrocarburos lineales saturados, usados como referencia.

i, Cromatografía de Gases (GC)

Los análisis de extractos se llevaron a cabo con un cromatógrafo de gases Trace GC 2000 Series de la casa Thermo Quest (figura 9) equipado con una columna capilar DB-5 de 30 m de longitud y un diámetro interno de 0,25 mm. La inyección de los estándares y muestras se realizó en modo split (50:1). El gas portador fue He, con un flujo de 2,3 mL/min. Como gas auxiliar se usó N₂ (30 mL/min). El flujo de aire sintético se fijó en 350 mL/min, mientras que el de H₂ fue de 35 mL/min. La temperatura del inyector y



Figura 9. Cromatógrafo de gases.

del detector fue de 310° C. El programa de horno empleado consistió en una rampa de temperatura desde los 65 °C hasta los 300 °C, a razón de 6° C/min, manteniéndose el horno a la temperatura final durante 20 minutos.

ii, Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Los análisis se realizaron con un GC Trace Ultra (figura 10) con una columna capilar (DB-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) acoplado a un espectrómetro de masas con ionización de electrospray ITQ 900. La inyección de las muestras y los estándares se realizó también en modo Split (50:1) y el programa de horno empleado fue el mismo que con el cromatógrafo anterior. El gas portador fue He, con un flujo de 1,0 mL/min. Las condiciones del MS fueron las siguientes: temperatura de la fuente, 230 °C, temperatura del interfaz, 230 °C en un rango de masas de 50-450.



Figura 10. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS).

iii, Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS)

Los análisis se efectuaron con un equipo, Waters de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas ZQ MS (detector de cuadrupolo con ionización de electrospray) (figura 11). La columna utilizada fue una Luna C18(2), de la casa Phenomenex, con tamaño de partícula de 5 µm, de 25 mm de largo y 4,6 mm de ancho. El análisis se lleva a cabo en un gradiente de metanol (grado de pureza HPLC, Carlo Erba) y agua (grado de pureza HPLC, Sigma Aldrich) con las siguientes características: gradiente lineal de 10% MeOH a 100% MeOH en 45 minutos y luego 15 minutos de 10% MeOH 90% agua. La ionización mediante electrospray se realizó en modo positivo. Los flujos de nitrógeno fueron: 311 L/h para el gas de desolvatación y 30 L/h para el gas del cono. Los voltajes fueron los siguientes: capilar, 3,00 kV, cono, 40 V y extractor, 5 V.



Figura 11. HPLC-MS.

Análisis microscópicos

Se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la morfología del diverso material vegetal estudiado en el caso de las extracciones supercríticas, así como para observar la morfología de los extractos obtenidos en el fraccionamiento supercrítico antidisolvente. El equipo utilizado fue un microscopio LEO 420 versión V2.04, de la casa Assing (figura 12). Para poder observar la morfología de las muestras fue necesaria una metalización previa. La metalización

se realiza cubriendo la muestra con una capa sutil de material conductor (oro o paladio/oro), para poder emitir electrones secundarios. El proceso tuvo lugar en un metalizador AGAR Auto Sputter Coater modelo 108 A (figura 13) en atmósfera inerte de argón.



Figura 12. Microscopio SEM.

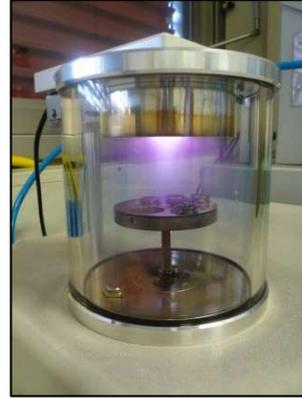


Figura 13. Metalizador

Análisis de la bioactividad

El análisis en laboratorio de la actividad biológica de los extractos resulta clave a la hora de producir y optimizar un bioplaguicida. A este fin, se han realizado una serie de ensayos consistentes en: ensayos sobre insectos de actividad antialimentaria e inhibidora del asentamiento sobre insectos y ensayos fitotóxicos sobre plantas. El objetivo de estos bioensayos es determinar si los extractos afectan a los insectos plaga, sin tener efecto dañino sobre los cultivos. Si bien es cierto que estos ensayos son sólo una pequeña parte de los posibles ensayos biológicos que se pueden realizar, constituyen un buen punto de partida para obtener información biológica valiosa de cara a optimizar el ciclo completo de producción de un bioplaguicida. Los ensayos realizados se llevaron a cabo durante la estancia investigadora realizada en el ICA.

Bioensayos sobre insectos

Se realizaron sobre *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*. La elección de estos insectos se debió a su impacto económico; además también se tuvo en cuenta la facilidad de cría y mantenimiento en el laboratorio (*Spodoptera littoralis*), así como su capacidad de transmitir virus entre plantas (*Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*). *Spodoptera littoralis*, también conocida como



Figura 14. Larva L6 de *S. littoralis*.

rosquilla negra, es un artrópodo de la orden de los lepidópteros y se reconoce por su extrema voracidad. Ataca cultivos de patata, tomate, arroz, tabaco, melón, alfalfa, pimiento y naranjo, entre otros [21]. La oruga (figura 14) es de color negruzco y se enrolla en espiral. Presenta seis estadios larvales (L1 a L6) y en su mayor desarrollo puede alcanzar de 3,5 a 4 cm de longitud. Tras su etapa de crisálida se transforma en mariposa. Ésta se caracteriza por llevar dibujado, en las alas anteriores, un 4 en la derecha y su simétrico en la izquierda. Las larvas se alimentan tanto de hojas como de las flores y frutos, llegando a alcanzar un marcado gregarismo. Esto, unido a su alta capacidad reproductora y de migración les confiere una gran importancia económica en Europa y norte de África [21].

Myzus persicae, también conocido como pulgón del melocotonero, es un áfido ampliamente distribuido por todo el mundo, propagándose fácilmente, sea por acción humana (a través del transporte de especies vegetales), sea por el viento, consiguiendo de este modo desplazarse grandes distancias. Presenta un gran impacto económico, puesto que es una plaga que provoca daños directos y porque además puede transmitir virus tales como: el luteovirus del reticulado amarillo de la remolacha, el enamovirus de las excrescencias y mosaico del guisante, o el luteovirus de la patata [60]. Es un pulgón de tamaño medio, de 1,2 a 2,3 mm. Las formas ápteras presentan color verde-amarillento mientras que las formas aladas presentan un color entre verde y negro.

Rhopalosiphum padi, también conocido como pulgón de la avena, presenta como el pulgón del melocotonero una importancia económica alta, debido a su distribución mundial. Es también vector de virus vegetales persistentes y no persistentes como el virus de la hoja manchada del maíz o el potyvirus del enanismo amarillo de la cebolla [61].

Spodoptera littoralis fue alimentada con una dieta artificial a base de agar-agar, sémola de maíz, germen de trigo, levadura de cerveza, sales minerales y vitaminas. *Myzus persicae* fue alimentado con hojas de *Capsicum annuum*, mientras que *Rhopalosiphum padi* fue alimentado con hojas de *Hordeum vulgare*. Los insectos se mantuvieron durante la cría y durante los ensayos en las siguientes condiciones: $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% humedad relativa y un fotoperíodo de 16:8 horas de luz:oscuridad. En los ensayos realizados sobre insectos, con metodología similar a la indicada por Burgueño [62], se investigó la capacidad antialimentaria o repelente de los extractos a corto plazo. Los ensayos, denominados de elección, permiten observar las preferencias de los insectos por discos de hojas tratadas o no, con los extractos a analizar.

i, Ensayos de elección con *Spodoptera littoralis*

En el caso de las larvas de *S. littoralis*, se halla el porcentaje de inhibición de la alimentación (% FI, feeding inhibition) con el siguiente procedimiento de ensayo: se introducen tres individuos de *S. littoralis* en una placa Petri, en la cual están colocados cuatro discos de hojas (1 cm^2) de *Capsicum annuum*, dos de ellos tratados superficialmente con 10 μl de extracto disuelto en acetona (concentración

de 5 µg/µl), y los otros dos tratados con 10 µl sólo de acetona. Una vez consumido el 50-75 % de la superficie de los discos, las superficies foliares no consumidas (tanto de control como de tratamiento), se midieron de acuerdo con la metodología propuesta por Escoubas et al. [63], usando el programa de análisis de imagen Image J. Cada extracto es analizado por triplicado. La inhibición de la alimentación (% FI) viene calculada según la ecuación 1:

$$\% FI = [1 - (T/C) \times 100] \quad (1)$$

donde T y C son las áreas consumidas de las hojas tratadas y del control, respectivamente. Los ensayos fueron analizados estadísticamente por el test de Wilcoxon. Un extracto se considera activo si su % FI es superior al 75 %.

ii, Ensayos de elección con *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*

En el caso de los áfidos, se obtiene el porcentaje de inhibición del asentamiento (% SI, settling inhibition) con una metodología distinta a la usada para *S. littoralis*. Se colocan 10 individuos adultos en una caja de plástico de 3 x 3 x 1,5 cm, tapada y con ventilación, colocándose en la tapa una capa muy fina de agar. En el interior se colocan dos medios discos de planta (*Capsicum annuum* en el caso de *Myzus persicae* y *Hordeum vulgare* en el caso de *Rhopalosiphum padi*), tratados superficialmente, uno con 10 µl de disolución de extracto (concentración de 5 µg/µl) y el otro con 10 µl de sólo disolvente. A las 24 horas finaliza el bioensayo contando los áfidos que se encuentran sobre cada una de las superficies (tratamiento y control). Este experimento se realiza 20 veces para cada extracto analizado. El porcentaje de inhibición del asentamiento (% SI) se halla con la ecuación 2, similar a la usada para calcular la inhibición alimentaria sobre *S. littoralis*

$$\% SI = [1 - (\% T / \% C) \times 100] \quad (2)$$

donde % T corresponde al porcentaje de pulgones sobre la superficie tratada y % C corresponde al porcentaje de pulgones sobre la superficie control.

Bioensayos sobre plantas

Se observan los efectos que los extractos producen en la germinación y longitud de la radícula de las semillas de *Lactuca sativa* y *Lolium perenne*. El procedimiento operativo es el siguiente: en cada uno de los 12 pocillos de una bandeja de plástico se introducen papeles de filtro humedecidos con 20 µL de extracto a estudiar (10 µg/µL). Además, en cada pocillo se introducen 500 µL de H₂O destilada y 10/5 semillas (*L. sativa* / *L. perenne*) previamente remojadas en H₂O destilada durante 12 h. Las bandejas, una vez cubiertas, se colocan en una cámara

refrigerada a 25 °C, 70% de humedad relativa y fotoperíodo de 16:8 horas luz:oscuridad. La germinación se controla en intervalos de 24 horas durante 6 días, midiéndose las longitudes de la hoja/radícula al final del experimento (se seleccionan 25 plantas al azar y se digitalizan con la aplicación ImageJ 1.43, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Se realizó un análisis no paramétrico de la varianza (ANOVA) con los datos de las longitudes de las raíces. La juglona, un compuesto natural abundante en la familia de las *Juglandaceae*, se incluye como estándar positivo (5 µg/ µL), ya que es conocida su acción herbicida.

Modelado de la Extracción con CO₂ supercrítico

Se emplean dos modelos: uno empírico y otro basado en balances de materia.

El modelo de Naik [64] utiliza una ecuación empírica, ecuación 3:

$$Y = \frac{Y_{\infty} t}{B + t} \quad (3)$$

donde Y es el rendimiento, Y_{∞} es el rendimiento para una extracción a tiempo infinito, t es el tiempo y B una constante. La aproximación empírica puede resultar útil para correlacionar datos cuando los mecanismos de transferencia de masa y las relaciones de equilibrio no se conocen.

Por su parte el modelo de Sovová [65], como todos los basados en los balances de materia, está basado en una serie de ecuaciones diferenciales para el balance de masa del soluto en la fase sólida (matriz vegetal) y en la fase fluida. Estos balances de materia aplicados a lo largo de una sección del extractor constituyen una herramienta matemática flexible y se utilizan ampliamente para describir el comportamiento de lechos fijos durante operaciones sólido-líquido tales como adsorción/desorción, reacción química y extracción.

Los modelos de balance de materia propuestos para la extracción supercrítica de material vegetal se vienen desarrollando sobre la premisa de que la dispersión axial es despreciable, que la densidad y el flujo del disolvente permanecen constantes a lo largo del lecho y que el aceite esencial se puede considerar, a efectos del modelado, como un único compuesto. De esta manera se pueden escribir dos ecuaciones diferenciales de balance de masa para un elemento diferencial del lecho de extracción de altura dh :

$$uV \frac{\partial c}{\partial h} + \varepsilon V \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \varepsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad (4)$$

$$(1 - \varepsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = -A_p K (q_0 - q^*) \quad (5)$$

donde ε es la porosidad del lecho, V es el volumen del extractor, c es la concentración del extracto en la fase fluida, q es la concentración del extracto en la fase sólida, u es la velocidad superficial del disolvente, A_p es la superficie total de partícula, q^* es la concentración en la interfase sólido-fluido que se asume en equilibrio con la fase fluida, h es la coordenada espacial a lo largo del lecho, t es el tiempo de extracción, q_o es la concentración inicial en la fase sólida y K es el coeficiente interno de transferencia de masa.

Para una partícula esférica, el balance para la fase sólida podría proponerse del siguiente modo:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{D_e}{r^2} \frac{\partial \left(r^2 \frac{\partial q}{\partial r} \right)}{\partial r} \quad (6)$$

donde r es la fracción de radio de la partícula y D_e es el coeficiente de difusión intraparticular efectivo. En este caso será posible modelar los perfiles de concentración a lo largo de la partícula.

Las ecuaciones 4 y 5 se pueden resolver con unas condiciones iniciales y de contorno apropiadas, teniendo en cuenta que $q^*(c)$ es conocida. Debido a una falta de datos experimentales del equilibrio de fase se usa una relación lineal en el modelado de los procesos SFE:

$$c = k_p q^* \quad (7)$$

donde k_p es el coeficiente de partición volumétrico del extracto entre la fase sólida y la fase fluida en el equilibrio.

El sistema de ecuaciones diferenciales parciales (ecuaciones 4 y 5 con la relación de equilibrio (ecuación 7), la condición inicial a $t = 0$, $c = 0$ y $q = q_o$ y la condición límite a $h = 0$, $c(0, t) = 0$) puede ser resuelto numéricamente aplicando el método de los característicos. En la ecuación 5, el grupo $A_p K / (1 - \varepsilon) V$ depende de la geometría de las partículas a través de $A_p K$. Este grupo es, dimensionalmente hablando, igual a $1/s$. Por tanto el tiempo de difusión interna se define como $t_i = (1 - \varepsilon) V / A_p K$, donde t_i es un tiempo característico del proceso de extracción. Así, la ecuación 5 se reescribe como

$$\frac{\partial q}{\partial t} = - \frac{1}{t_i (q - q^*)} \quad (8)$$

Si se asume que la extracción es uniforme a lo largo del lecho, la ecuación 4 se transforma en un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias

$$\left(\frac{W}{\rho}\right)c + \varepsilon V \frac{dc}{dt} + (1 - \varepsilon)V \frac{dq}{dt} = 0 \quad (9)$$

$$\frac{dq}{dt} = -\frac{1}{t_i}(q - q^*) \quad (10)$$

donde W es el flujo másico de disolvente y ρ es la densidad del disolvente. En este caso, se puede obtener una solución numérica utilizando el método de Runge-Kutta de cuarto orden. Comenzando con las ecuaciones 9 y 10, se puede obtener una solución analítica sencilla si se desprecia la acumulación de extracto en la fase fluida ($\partial c/\partial t = 0$). Mediante integración de las ecuaciones diferenciales se puede obtener el perfil de concentración en función del tiempo.

A continuación se describe el proceso concreto llevado a cabo para aplicar el modelo de Sovová a los datos experimentales obtenidos en este trabajo. De acuerdo con el protocolo que Sovová presenta en su artículo [65], en primer lugar se determinó el tipo de curva de extracción más apropiado para los experimentos llevados a cabo. Dado que se trata de extracciones supercríticas de aceites de plantas aromáticas, dichos experimentos se adscribieron, a priori, a las curvas de tipo D, caracterizadas por una única sección inicial recta seguida por una línea curva, siendo la transición entre ambas suave por la existencia de interacción soluto-matriz propia de los aceites esenciales. Una vez determinado el tipo de curva, se calcularon los valores de Θ_e y Θ_i resistencias externa e interna adimensionales respectivamente, mediante las ecuaciones 11 a y 11 b.

$$\Theta_e = \frac{\varepsilon}{k_f a_o t_r} \quad (11 a)$$

$$\Theta_i = \frac{1 - \varepsilon}{k_s a_s t_r} \quad (11 b)$$

k_f es el coeficiente de la transferencia de masa de la fase fluida, a_o el área superficial específica por unidad de volumen del lecho de extracción, t_r el tiempo de residencia del disolvente, k_s el coeficiente de la transferencia de masa de la fase sólida y a_s el área específica entre las regiones de células rotas e intactas. En vista de los valores obtenidos para Θ_e , todos inferiores al valor límite de 0,02, se decidió aplicar el modelo de equilibrio siguiendo a Poletto y Reverchon [15]. La segunda parte de la curva de extracción solamente depende de la resistencia a la transferencia interna de masa, así que se utilizaron las fórmulas obtenidas para un modelo de flujo de mezcla ideal, tal como explica Sovová [65]. La primera parte de las curvas de extracción se obtuvo mediante la aplicación de la Ecuación 12 y la segunda parte de las mismas mediante la aplicación de la Ecuación 13.

$$e = q \frac{Kx_u}{1 + K(\gamma/r)} = qy_0 \quad \text{para } 0 \leq q \leq q_c \quad (12)$$

$$e = x_u [1 - C_1 \exp(-C_2 q)] \quad \text{para } q > q_c \quad (13)$$

$$r = 1 - C_1 \exp(-C_2 q_c) \quad (14)$$

En estas ecuaciones es r la eficiencia de la molienda, dada por la ecuación 14, e rendimiento de la extracción, C_1 y C_2 parámetros ajustables y x_u la concentración en el sólido no tratado. Con los valores experimentales de q , cantidad relativa de disolvente pasado, se obtuvieron los valores teóricos de e , rendimiento de la extracción, de acuerdo con las Ecuaciones 12 y 13 dejando dichas expresiones únicamente en función de los parámetros ajustables C_1 y C_2 . Otros parámetros necesarios que han sido determinados y característicos del lecho de extracción son ε , la porosidad, y γ , ratio solvente-matriz en el lecho.

Fraccionamiento con CO₂ supercrítico antidisolvente (SAF)

Los experimentos con esta técnica se realizaron íntegramente en la Università degli Studi di Salerno en las estancias realizadas (2 estancias realizadas, tiempo total 1 año). Después de realizar pruebas con diverso material vegetal, se escogió la *Persea indica* por poseer las características adecuadas para realizar el proceso deseado.

Descripción del equipo y método operativo: Los fraccionamientos anti-disolvente se realizaron en la planta construida a tal efecto en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Fluidos Supercríticos de la Università degli Studi di Salerno (Italia) (figura 15). Un esquema del dispositivo experimental aparece en la figura 16.



Figura 15. Planta de fraccionamiento supercrítico antidisolvente

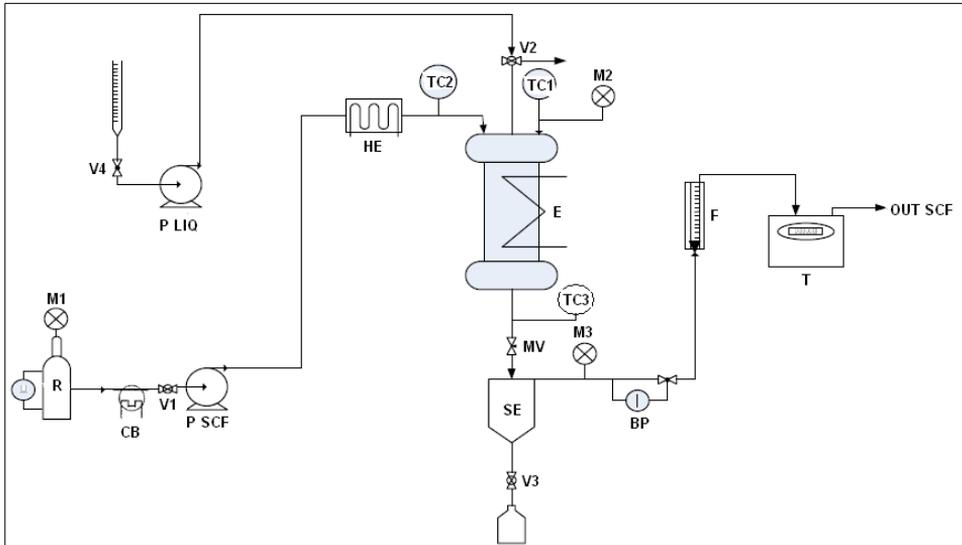


Figura 16. Esquema de la planta de fraccionamiento antidisolvente con CO₂ supercrítico. P-SCF: Bomba de CO₂. P-LIQ: Bomba de líquidos. R: Depósito de CO₂. E: Extractor. CB: Baño refrigerante. HE: Intercambiador de calor. F: Caudalímetro. T: Totalímetro. BP: Regulador de presión. S: Separador. MV: Válvula micrométrica. V1-V4: Válvulas. M1-M3: Manómetros. TC1-TC3: Controladores de temperatura.

Se trata de una planta polivalente donde, además, se pueden realizar trabajos de micronización. La planta está formada por tres partes: un área de bombeo, un área de extracción supercrítica y un área de separación. Incluye una bomba refrigerada por un baño de glicol con regulación micrométrica Lewa Ecoflow LDC-M-2 para impulsar el CO₂ y de una bomba Gilson (modelo 305, pistón 10WSC) para impulsar la disolución. El precipitador SAF es una vasija cilíndrica de acero inoxidable AISI 316. La vasija tiene tres entradas en la parte superior: para el CO₂, para la solución líquida y para el control de la presión y temperatura de la cámara. La temperatura de la vasija se alcanza mediante resistencias, un termopar y un controlador. En la parte inferior de la vasija se encuentra el filtro (porosidad de 0,1 μm). Cuenta a su vez con un separador, situado después de la vasija de reacción, donde se recuperan el disolvente líquido y los compuestos todavía disueltos en la mezcla CO₂-disolvente. Se usan dos separadores, uno convencional y uno ciclónico. Ambos están hechos de acero inoxidable AISI 316 y contienen una válvula todo-nada que permite la purga cada cierto intervalo de tiempo. La presión del separador se mide con un manómetro y se controla con un regulador de presión o back-pressure. La presión se mide por manómetros. La planta cuenta con una válvula micrométrica que regula la presión en la vasija y un regulador de presión back-pressure que regula la presión en el separador. La temperatura se mide por termopares y se muestra con indicadores digitales. El flujo instantáneo se

muestra por medio de un caudalímetro ASA previamente calibrado (modelo N.5-2500, Serval N.115022).

En un experimento típico, en primer lugar se estabilizan la temperatura y la presión en el sistema (temperatura y presión de la vasija, presión del separador, flujo de CO₂). A continuación se estabiliza el flujo del líquido en el sistema mediante inyección de disolvente durante 5 minutos. Una vez estabilizados, se inyecta la solución orgánica de la cual se quieren fraccionar los compuestos deseados (la disolución se ha preparado previamente dejando macerar el material vegetal en etanol absoluto durante 48 horas con agitación a temperatura ambiente). El disolvente líquido junto con las sustancias no precipitadas se recupera mediante purgas en el separador, mientras que el CO₂ gaseoso alcanza la presión atmosférica y sale por la parte superior del separador. Una vez agotado el flujo de la disolución que se quería fraccionar, se debe limpiar el sistema, mediante el paso de una pequeña cantidad de etanol y a continuación con una corriente de CO₂, para arrastrar todas las posibles trazas de etanol que hayan podido quedar. Finalizado el experimento, se recoge el sólido que ha quedado adherido en el filtro en el interior de la vasija y también se recoge el líquido del separador procedente de las purgas realizadas cada cinco minutos durante el experimento. Tanto el sólido recogido en el filtro como el sólido obtenido al evaporar el líquido recolectado en el separador son analizados posteriormente.

Aportaciones del doctorando

En este apartado se especifican las aportaciones realizadas por el doctorando para el desarrollo del plan de trabajo y, por consiguiente, para la consecución de los objetivos concretos.

Aportación 1. Selección del material vegetal y obtención de extractos

Selección del material vegetal y pretratamiento

El material vegetal pretratado incluyó árboles y plantas de diversas familias (*Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Vitaceae* y *Asteraceae*) y de diversos géneros (*Senecio*, *Artemisia*, *Vitis*, *Lavandula*). En concreto, las especies fueron: *Senecio palmensis*, *Senecio hermosae*, *Lavandula luisieri*, *Vitis vinifera*, *Artemisia granatensis*, *Artemisia absinthium*, y *Persea indica*, siendo estas dos últimas especies vegetales las elegidas para realizar los estudios sistemáticos al reunir las características idóneas para el desarrollo y optimización de los bioplaguicidas.

Los detalles del pretratamiento del ajeno pueden verse en las publicaciones 1 y 2, mientras que los detalles del pretratamiento del viñátigo pueden verse en las publicaciones 3 y 4.

Obtención de extractos

Se trabajó con técnicas de extracción diferentes: dos tradicionales (hidrodestilación y extracción Soxhlet con disolventes orgánicos) y una avanzada (extracción con CO₂ supercrítico, SFE).

Las hidrodestilaciones se llevaron a cabo en el hidrodestilador Clevenger. Las extracciones con Soxhlet se realizaron con n-hexano y etanol de purzas superiores al 99%.

Las extracciones supercríticas previas se realizaron con diverso material vegetal: *Artemisia absinthium*, *Persea indica*, *Senecio palmensis*, *Vitis vinifera*, *Senecio hermosae* y *Lavandula luisieri*. Una vez fijado el material vegetal (*Artemisia absinthium* y *Persea indica*) con el que se iba a trabajar, se realizaron diversos experimentos conducentes a la optimización de las condiciones de trabajo para cada material vegetal.

En el caso de la *Artemisia absinthium*, se estudiaron tres presiones (9,0, 13,5 y 18,0 MPa), dos temperaturas (40 y 50 °C), dos caudales de CO₂ (0,80 y 1,08 kg/h) y un tamaño medio de partícula (0,56 mm). La adición de etanol como cosolvente de la extracción supercrítica también fue estudiada. Además de investigar las condiciones operativas de proceso, se realizaron experimentos con material vegetal de diversa procedencia: material de cultivo controlado de campos de cultivo del CITA de diferentes años (2005, 2006, 2008) y de técnica de cultivo aeropónica proveniente del ICA.

En el caso de la *Persea indica*, se estudiaron tres presiones (10,0, 15,0 y 20,0 MPa), dos temperaturas (40 y 50 °C), tres caudales de CO₂ (0,80, 1,08 y 1,44 kg/h) y dos tamaños medios de partícula (0,26 y 0,56 mm). La adición de etanol como modificador de la extracción supercrítica también fue estudiada, así como la influencia del número de etapas en la extracción supercrítica.

Asimismo, durante las pruebas realizadas se mejoraron las prestaciones del dispositivo experimental (versatilidad del sistema de calefacción, aislamiento progresivo de los conductos, sustitución de dos baños calefactores por uno integrado que disminuyera el gasto energético, aumento de presión de trabajo en el reactor...).

Los resultados de las extracciones tanto con técnicas tradicionales como con fluidos supercríticos aparecen en los artículos publicados (artículos 1 y 2 para el ajeno, artículos 3 y 4 para el viñátigo).

Aportación 2. Caracterización de los extractos

Los análisis cromatográficos de los extractos obtenidos en el caso del ajeno se realizaron mediante GC y mediante GC-MS. Los métodos de horno fueron optimizados en ambos casos. Los resultados de dichos análisis aparecen en los artículos publicados 1 y 2, donde se puede ver que los compuestos mayoritarios fueron el Z-epoxiocimeno, el acetato de crisantenilo y el crisantenol entre otros.

Los análisis cromatográficos de los extractos obtenidos en el caso de *Persea indica* se realizaron mediante GC-MS y mediante HPLC-MS. El método de horno en el caso del GC-MS y el gradiente en el caso del HPLC-MS fueron optimizados. Los resultados de dichos análisis aparecen en los artículos publicados 3 y 4, donde se pueden algunos de los componentes mayoritarios como el ryanodol, el cinnzeylanol o la cinnzeylanina.

Los análisis de microscopía del material vegetal aparecen publicados en el artículo 1 en el caso del ajeno y en el artículo 3 en el caso del viñátigo, donde se aprecia la naturaleza de los tricomas de las plantas estudiadas.

Aportación 3. Análisis de la Bioactividad

La familiarización con los procedimientos para realizar los análisis de la bioactividad fue llevada a cabo en las instalaciones del ICA. Los resultados de la actividad antialimentaria sobre *Spodoptera littoralis* de los extractos de *Artemisia absinthium*, así como su actividad inhibidora del asentamiento sobre los áfidos *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi* y su actividad fitotóxica frente *Lactuca sativa* y *Lolium perenne* aparecen en el artículo 2. En el artículo 3 aparecen los resultados de la actividad antialimentaria de los extractos de *Persea indica* sobre *Spodoptera littoralis*.

Aportación 4. Modelado de la Extracción con CO₂ supercrítico

Se aplicaron los modelos de Naik y Sovová obteniéndose buenos resultados y valores útiles para el escalado industrial. Los resultados de la modelización como los coeficientes de transferencia de materia de las fases fluida, k_f , y sólida, k_s , la eficiencia de la molienda, r , o la cantidad total de aceite extraíble, x_u , de nuestros experimentos aparecen con detalle en los artículos publicados (artículo 1 en el caso del ajeno y artículo 3 en el caso de la *Persea indica*).

Aportación 5. Fraccionamiento con CO₂ supercrítico antidisolvente (SAF).

Se ha aplicado la tecnología de fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF) con las especies vegetales seleccionadas previamente, *Artemisia absinthium* y *Persea indica*. Debido al alto contenido en volátiles de *Artemisia absinthium*, la técnica SAF no se mostró apropiada para la realización de un estudio sistemático sobre este material vegetal, por lo que se realizó para el caso de la *Persea indica*. Una vez fijado el material vegetal, se realizaron diversos experimentos conducentes a la optimización de las condiciones de trabajo. Se estudiaron cinco

presiones (8,0, 10,0, 11,0, 13,0 y 15,0 MPa), tres temperaturas (35, 40 y 60 °C), tres flujos de solución (0,5, 1,5, 5,7 mL/min) y dos tipos de material vegetal (tallos y hojas). También se estudió la influencia del diseño del separador (ciclónico y convencional) en la recogida de los diferentes extractos. Los detalles de estos experimentos aparecen reflejados en el artículo 4.

Como resultado de todas estas aportaciones ha surgido la publicación de cuatro artículos que aparecen en el cuerpo de esta Tesis Doctoral como compendio de publicaciones. Como posteriormente se verá, estas aportaciones no sólo han constituido la principal parte dichos artículos de investigación, sino que además han supuesto el inicio de otras líneas investigadoras interesantes que también vendrán expuestas en la Memoria de esta Tesis.

Conclusiones finales

- Para la consecución de los objetivos planteados se ha remodelado la planta de laboratorio de extracción con fluidos supercríticos con el fin lograr una mayor operatividad y un menor consumo energético. Las modificaciones realizadas fueron las siguientes:

- Reducción a la mitad del número de baños termostáticos necesarios.
- Ampliación del sistema de calefacción de la línea de circulación para evitar el depósito de compuestos valiosos. También se ha modificado su conexión para evitar los daños producidos en los procesos de montaje/desmontaje durante la limpieza del dispositivo.

Además, se ha logrado trabajar a presiones de hasta 23,0 MPa, lo que supone un incremento superior al 100 % respecto a las condiciones de trabajo habituales (10,0 MPa).

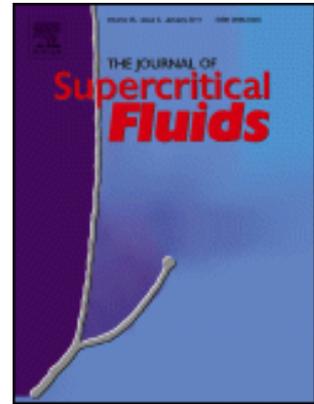
- Después de un screening previo entre distintos materiales vegetales procedentes del CITA y del ICA (*Senecio palmensis*, *Vitis vinifera*, *Senecio hermosae*, *Lavandula luisieri*, *Artemisia granatensis*, *Persea indica* y *Artemisia absinthium*) se establecieron como más adecuadas para la extracción supercrítica las dos últimas: *Artemisia absinthium* y *Persea indica*.
 - Las extracciones supercríticas realizadas sobre *Artemisia absinthium* de distintas cosechas y técnicas de cultivo a diferentes presiones y temperaturas dieron como resultado que las condiciones óptimas para obtener mayores rendimientos fueron 18,0 MPa, 40 °C y caudal de 1,08 kg/h de CO₂. La cosecha del año 2006 fue la que arrojó un mayor rendimiento. La adición de etanol como modificador de la extracción supercrítica determinó un aumento del rendimiento de extracción.

- Las extracciones supercríticas realizadas sobre *Persea indica* a diferentes presiones, caudales, tamaños de partícula y temperaturas dieron como resultado que las condiciones óptimas, en lo que a rendimiento se refiere, fueran 20,0 MPa, 40 °C, caudal de 1,44 kg/h de CO₂ y tamaño de partícula del material vegetal de 0,56 mm. Al igual que se observó en el caso de *Artemisia absinthium*, la adición de etanol como modificador de la extracción supercrítica supuso un aumento del rendimiento de extracción.
- Se han caracterizado los extractos obtenidos en los diferentes procesos de extracción mediante técnicas cromatográficas.
 - Las técnicas más adecuadas para analizar los extractos obtenidos en el caso del ajeno han sido la cromatografía de gases y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los extractos obtenidos arrojaron composiciones variables dependiendo de las condiciones de trabajo. Los compuestos mayoritarios encontrados tanto en los hidrodestilados como en la mayoría de los extractos supercríticos fueron, entre otros, los siguientes: Z-epoxiocimeno, acetato de crisantenilo y crisantenol.
 - En relación al análisis de extractos de *Persea indica*, la técnica más adecuada ha sido la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Los compuestos encontrados en los extractos, independientemente de la técnica de extracción empleada fueron cinnzeylanol, ryanodol y cinnzeylanina en proporciones variables según la técnica utilizada y las condiciones de trabajo utilizadas.
- Se ha determinado la bioactividad de los extractos obtenidos, tanto de manera tradicional (extracción Soxhlet con disolventes orgánicos e hidrodestilación) como con la extracción con fluidos supercríticos.
 - Los extractos supercríticos de *Artemisia absinthium* mostraron, en general, una mayor actividad antialimentaria sobre *S. littoralis* y sobre los áfidos *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi* que los análogos obtenidos con técnicas tradicionales. El porcentaje de inhibición de la alimentación adquirió valores superiores al 90 %. La actividad fitotóxica de los extractos fue moderada, siendo selectiva hacia la mala hierba monocotiledónea *L. perenne*.
 - La actividad antialimentaria sobre *Spodoptera littoralis* de extractos seleccionados de *Persea indica* obtenidos mediante SFE varió en función de la composición de dichos extractos, siendo los más activos los obtenidos con etanol como modificador de la extracción supercrítica.

- Se ha realizado el modelado del proceso de extracción con fluidos supercríticos de las especies vegetales *Persea indica* y *Artemisia absinthium* aplicando el modelo de Sovová. Se han obtenido valores para los diferentes parámetros termodinámicos y de transporte (eficacia en la molienda, constante de reparto y la solubilidad del aceite en el CO₂ supercrítico) que serían útiles para un posterior proceso de escalado. Los valores obtenidos resultan coherentes con las condiciones experimentales impuestas llevando una secuencia lógica con las condiciones de densidad, caudal y tamaño de partícula.
- Utilizando un microscopio electrónico de barrido SEM, se ha caracterizado tanto el material vegetal de partida, como los sólidos obtenidos en el caso del fraccionamiento realizado con la técnica SAF.
 - Se observaron los tricomas del ajeno que resultaron ser de tipo glandulares.
 - En el caso de *Persea indica* se detectaron tanto tricomas no glandulares (denominados también pelos) como tricomas glandulares.
 - Se observaron partículas esféricas micronizadas en los extractos obtenidos mediante SAF.
- Se han logrado concentrar compuestos bioactivos en los extractos mediante la técnica de fraccionamiento supercrítico antisolvente (SAF).
 - El ajeno no resultó adecuado para la concentración de principios bioactivos mediante la técnica SAF debido a la afinidad de los compuestos del extracto tanto con el CO₂ como con las mezclas CO₂ + etanol ensayadas. Esta afinidad impidió la adecuada precipitación de los mismos mediante la técnica de extracción antisolvente.
 - En el caso de la *Persea indica*, se obtuvo el enriquecimiento en ryanodol de diversos extractos. Variando el material de trabajo (hojas y tallos), la densidad del CO₂, la fracción molar de CO₂, así como el diseño de separador (bien convencional, bien ciclónico) se encontró que las condiciones óptimas de enriquecimiento en ryanodol fueron: 15,0 MPa, 35 °C y caudal de la solución etanólica de 5,7 mL/min usando un separador de diseño ciclónico. En estas condiciones, el residuo seco de la solución etanólica de partida, que contenía el 7,5 % de ryanodol, se vio enriquecido en más de un 500 %, puesto que el sólido que se obtuvo después de realizar el proceso SAF contuvo un 37,7 % de ryanodol.

Copia de los trabajos
publicados/aceptados

Supercritical Fluid Extraction of Wormwood (Artemisia absinthium L.)



Extracción con fluidos supercríticos de ajeno (*Artemisia absinthium L.*)

Resumen

El objetivo de este trabajo fue optimizar la extracción de aceite de ajeno cultivado controladamente por medio de la extracción con fluidos supercríticos (SFE). Se investigaron diferentes condiciones de extracción, dos técnicas de cultivo y varias cosechas, y la evolución de la composición del aceite extraído fue monitorizada mediante cromatografía. Se estableció una comparación con técnicas convencionales como la hidrodestilación (HD) o la extracción con disolventes orgánicos. Particularmente, se estudiaron seis densidades de CO₂ (de 285,0 kg/m³ a 819,5 kg/m³) en el rango de 9,0-18,0 MPa y 40-50 °C. Se realizó un estudio sistemático con material vegetal de 2005, mientras que con las cosechas de 2006, 2008 y aeropónica se realizaron SFE a nivel comparativo. El efecto del etanol como modificador de la extracción con fluidos supercríticos también se estudió. Los componentes mayoritarios encontrados en los extractos supercríticos así como en los hidrodestilados fueron Z-epoxiocimeno, crisantenol y acetato de crisantenilo. Se aplicó satisfactoriamente el modelo de Sovová para correlacionar los datos experimentales.

Palabras clave: *Artemisia absinthium L.*; Extracción con Fluidos Supercríticos, Modelo de Sovová, Hidrodestilación, Extracción con Disolventes Orgánicos.

1. Introducción

La necesidad de procesos limpios y productos seguros es la esencia de la Química Verde [1], la cual está vinculada a la protección medioambiental y a la demanda de productos de calidad. Una técnica avanzada de separación como la extracción con fluidos supercríticos (SFE) no solo cumple con estas condiciones a la hora de extraer aceites de productos naturales, sino que además solventa los problemas relacionados con los métodos tradicionales. La hidrodestilación (HD) requiere altas temperaturas operacionales (con su inherente coste energético) que pueden dañar los productos naturales presentes en la matriz. La extracción con disolventes orgánicos (OSE) se relaciona con residuos tóxicos como las emisiones de compuestos orgánicos volátiles y con una cara e incompleta separación soluto-disolvente. Por medio del CO₂ supercrítico, un disolvente inerte, no tóxico, barato y reciclable, se pueden superar estas desventajas.

Los aceites esenciales (obtenidos por HD) y los absolutos (obtenidos mediante OSE) del ajeno (*Artemisia absinthium* L.) han sido usados ampliamente debido a sus propiedades antimicrobianas [2], antiparasíticas [3], antihelmínticas [4] o hepatoprotectivas [5]. Un uso médico documentado del ajeno se remonta al Papiro Ebers, un documento médico egipcio del año 1552 a.C., el documento médico más antiguo [6]. A pesar de sus aplicaciones médicas, el ajeno es mejor conocido como una materia prima usada en la manufactura de la absenta, un licor amargo prohibido en varios países y rehabilitado el siglo pasado. Su toxicidad y por tanto su prohibición estaba basada en el contenido en tuyonas, aunque todavía existe cierta controversia respecto a este dato [7]. De todas maneras, las tuyonas son conocidas por su toxicidad [8] y se han desarrollado métodos para eliminarlas del ajeno [9] o incluso cultivar ajeno libre de tuyonas [10]. Otra característica importante de la planta es su naturaleza como pesticida. Existe un uso documentado de dicha planta en agricultura ecológica como una suspensión acuosa para combatir hormigas, orugas y pulgones [11]. Diferentes extractos de ajeno han resultado eficaces contra plagas tales como el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) [12] o el gorgojo del trigo (*Sitophilus granarius*) [13].

La composición química de los aceites de ajeno determina la quimiotaxonomía de la planta. Se han descrito varios quimiotipos, variando sus componentes mayoritarios dependiendo principalmente en el origen de la planta, pero también, dependiendo de las condiciones de crecimiento y el estado de desarrollo de la planta. Por tanto, el cultivo controlado del ajeno es vital para conseguir material homogéneo cuando se llevan a cabo experimentos sistemáticos [14]. Chialva et al. [15] han descrito cuatro tipos diferentes de quimiotipos conteniendo acetato de sabinilo, epoxiocimeno, tuyonas o acetato de crisantenilo respectivamente como compuestos mayoritarios. Otros autores han descrito aceites esenciales de ajeno cuyos contenidos mayoritarios eran: sabineno + mirceno [16], β -pineno + β -tuyona [17], cis cristantenol [18], acetato de bornilo [19], óxido de cariofileno + p-cimeno +

1,8-cineol [20] y Z epoxiocimeno + acetato de crisantenilo o Z epoxiocimeno [21]. Además de las interesantes propiedades de los aceites de ajeno mencionadas anteriormente, tanto el Z epoxiocimeno como el acetato de crisantenilo muestran actividades antifúngicas [22] y, en el caso del acetato de crisantenilo, actúa como antiprostaglandinas debido a su efecto analgésico al inhibir la enzima prostaglandina sintetasa [23].

El objetivo de este estudio fue optimizar y evaluar la capacidad extractora del fluido supercrítico sobre diferentes ajenos de cultivos controlados. *Artemisia absinthium* es una planta atractiva por sus propiedades insecticidas y porque su extracción con fluidos supercríticos no ha sido investigada en profundidad. Particularmente, se evaluaron seis densidades de CO₂ [24], trabajando a tres presiones y dos temperaturas diferentes en los rangos de 9,0 MPa a 18,0 MPa y 40 °C a 50 °C respectivamente. Se estudiaron tres cosechas (2005, 2006 y 2008). Además, se investigaron dos métodos diferentes de cultivo (cultivo controlado de campo y cultivo aeropónico). El rango de trabajo permitió estudiar bajas (285,5 kg/m³ correspondiendo a 9,0 MPa, 50 °C) y relativamente altas densidades (819,5 kg/m³ correspondiendo a 18,0 MPa y 40 °C). Se realizó una extracción adicional con etanol como modificador de la SFE para estudiar cómo de exhausta quedaba la matriz después de una SFE convencional. La evolución de la composición del aceite para cada experimento se monitorizó mediante análisis cromatográfico (GC-MS y GC) cuantificando los tres compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial y un cuarto compuesto, nonacosano, un compuesto pesado encontrado en los extractos OSE y SFE. Además, se estableció una comparación con los aceites esenciales obtenidos mediante HD y los extractos obtenidos mediante OSE con etanol y hexano.

Es muy importante además aplicar modelos que permiten la correlación y extrapolación de datos experimentales para una posible aplicación industrial del proceso SFE. El modelo usado aquí fue el propuesto por Sovová [25], el más apropiado para describir los datos experimentales recogidos.

2. Materiales y métodos

2.1. Caracterización y preparación de la materia prima

El ajeno de campo se cultivó mediante condiciones controladas por el CITA (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón) en Ejea de los Caballeros (Zaragoza, España), una tierra seca con suelos francoarcillosos en el noreste de la Península Ibérica. La cantidad de biomasa, el diámetro de la planta y su altura fueron registrados. Esta variedad está actualmente siendo patentada bajo el número 20090972 en la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales [26]. También se ha solicitado una patente para el procedimiento de extracción supercrítica [27]. Las plantas se recogieron en plena floración en 2005, 2006 y 2008 y fueron secadas al aire. Con el objetivo de comparar técnicas de cultivo, el ajeno

se cultivó además aeropónicamente (donde no se necesita suelo y se pueden obtener rendimientos mayores [28]). Los individuos para el cultivo aeropónico fueron obtenidos de una población donada por el Parque Nacional de Sierra Nevada (2003, Granada). Cortes de individuos seleccionados fueron multiplicados vegetativamente, enraizados en vermiculita, regados tres días por semana con una solución de nutrientes (Nutrichem 20:20:20 N, P, K - Miller Chemical & Fertilizer Corp.; 3 g/l) y mantenidos en una cámara de crecimiento (25 °C, 70% humedad relativa, 16:8 Luz:Oscuridad) hasta que fueron transferidos a la cámara aeropónica (plantas de 10-15 cm). La cámara aeropónica (Sistema Apollo 3: 33 plantas, 240 litros, 1750 x 1350 x 750mm) se encontró en un invernadero medioambientalmente controlado (20-30 °C). Las plantas de mantuvieron bajo pulverización constante con agua a 26 °C suplementada con 0.2 g/l Nutrichem y 0.03% H₂O₂ (33% w/v Panreac) y luz artificial (16:8, Luz:Oscuridad). Las plantas se cultivaron durante nueve meses, su parte aérea y sus raíces recolectadas periódicamente [29]. En ambos casos, el CITA y el ICA proveyeron material con hojas y flores con un contenido en agua menor del 10% (peso/peso). El contenido en agua se determinó en 7-9 % para los diferentes cultivos y fue controlado apropiadamente por una estufa desecante (Selecta).

Las hojas y las flores fueron molidas en lotes de 0.1 kg en un molinillo eléctrico durante 5 segundos. El material vegetal se enfrió con nitrógeno líquido durante la molienda para evitar la pérdida de volátiles. La selección del tamaño de partícula (0,56mm para todos los experimentos) se realizó mediante un tamizador vibratorio. El tamaño de partícula fue el resultado de la masa recogida entre tamices con diámetros de poro de 0,71 y 0,40 mm. Las muestras fueron almacenadas a -15 °C.

2.2. SFE, extracción con disolventes e hidrodestilación

La planta de extracción SFE presentada en trabajos anteriores de investigación [30,31] fue construida de acuerdo con el esquema de Reis Vasco et al [32]. Los componentes principales son una bomba de compresión, un filtro, una vasija de extracción de 1 L y dos separadores (V: 0,18 L cada uno), uno para la recuperación de ceras [33] y el otro para la recogida de aceite volátil. La temperatura en el extractor y en los separadores fue mantenida con la ayuda de chaquetas termostatzadas con líquidos circulantes de baños controlados térmicamente. Otros elementos importantes son un cilindro refrigerador de 0.5 L, un intercambiador de calor, un regulador back-pressure y un totalímetro-caudalímetro. Numerosas válvulas conectaron las diferentes secciones de la planta piloto. La temperatura y la presión fue medida/controlada por manómetros, un transductor de presión, termopares y controladores de temperatura.

El procedimiento experimental es similar al descrito en otros artículos [28,29]. Aproximadamente 90 g de ajeno triturado se introducen en el extractor con diferentes materiales inertes (esferas de vidrio, esponjas de níquel, filtros de vidrio)

en una disposición simétrica con el material vegetal posicionado en el centro. Los elementos porosos se usaron para conseguir un flujo uniforme del fluido supercrítico. Una vez que el extractor y los separadores alcanzan la temperatura de trabajo, se enciende la bomba con el caudal deseado y las válvulas mantienen la presión deseada. El flujo de CO₂ al segundo separador se manipula abriendo dos válvulas de aguja a intervalos de tiempo fijos para recoger y pesar el aceite. Todos los experimentos se finalizaron después de 11 horas de extracción o cuando la pendiente de la curva de extracción fuera menor del 10 % de la pendiente máxima en los inicios de la misma.

Para determinar el grado de agotamiento de la matriz, se realizó un experimento de SFE similar, pero en este caso el material vegetal ya había sufrido un experimento de SFE (18,0 MPa, 40 °C), y además se le añadieron 50 mL de etanol (99,9% Scharlau) antes de que se le realizara esta segunda extracción. El extractor se despresuriza, se abre y se le añade el modificador antes de la segunda extracción. El experimento también se finalizó siguiendo el mismo criterio expuesto anteriormente. El etanol en las fracciones se retiró usando un rotavapor.

El aceite esencial fue obtenido mediante un hidrodestilador Clevenger hecho en la Facultad de Ciencias, Zaragoza, España. La hidrodestilación se realizó durante 4 horas usando 40 gramos de material vegetal.

Las OSE se realizaron en un Soxhlet con un cuerpo extractor de 0,125 L y un matraz de 0,1 L. Alrededor de 10 g de material vegetal se introdujeron en un cartucho celulósico. Se realizaron dos experimentos de extracción (20 horas cada uno), uno con hexano (99% Panreac) y otro con etanol (99,9% Scharlau). Ambos disolventes se eliminaron del extracto usando un rotavapor.

2.3. Análisis de los extractos

La composición de los extractos fue determinada usando un cromatógrafo de gases (GC) y un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). Se realizaron 3 réplicas de cada análisis, obteniéndose una desviación media menor del 1 % para cada componente. Se usó un GC Trace GC 2000 Series Thermo Quest con detector de llama (FID) y un inyector de Split equipado con una columna capilar de sílica fundida (DB-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). El gas portador fue helio (99,9990%, Abelló Linde) con un caudal de 1,3 mL/min. La temperatura tanto del inyector como del detector fue de 310 °C. La rampa de temperatura fue de 65-300 °C a 6 °C/min, manteniéndose 20 minutos a la temperatura final. Se inyectaron muestras de 0,1 μL con un ratio de Split de 1:50. La identificación de los compuestos fue hecha mediante comparación con tiempos de retención de estándares, con la base de datos del NIST 08 o mediante comparación con Índices de Retención de Kovats [34] de la bibliografía. La proporción de cada compuesto en el aceite fue hecha mediante el porcentaje de área en el cromatograma. Se usó también un cromatógrafo de gases GC Trace GC Ultra equipado con una columna de sílica fundida (DB-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) acoplado a un espectrómetro de masas ITQ. La rampa de temperatura fue de 65-300° C a 6 °C/min

manteniéndose la temperatura final durante 20 minutos. La temperatura de inyección fue de 270 °C. El gas portador fue el helio. Las muestras (0,1 mL) fueron inyectadas con un ratio de 1:50. Las condiciones del MS fueron las siguientes: temperatura de la fuente 230 °C, temperatura del interfaz 230 °C, rango de masas (50-450) u.

3. Resultados y discusión

3.1. Evaluación de rendimientos

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad extractora del CO₂ supercrítico sobre el ajeno. Se eligieron tres parejas de presiones y temperaturas (Tabla 1) para optimizar la SFE del ajeno con densidades en el rango de 285,0 kg/m³ a 819,5 kg/m³.

Tabla 1. Condiciones experimentales y rendimientos de las diferentes extracciones del ajeno

SFE						
Experimento	Material	P (MPa)	T (°C)	ρ_{sc} (kg/m ³)	Caudal (kg/h)	Y (%)
E1	2005	9,0	40	485,5	1,08	0,75
E2	2005	13,5	40	753,6	1,08	2,26
E3	2005	18,0	40	819,5	1,08	2,65
E4	2005	9,0	50	285,0	1,08	0,56
E5	2005	13,5	50	655,5	1,08	2,16
E6	2005	18,0	50	757,1	1,08	2,50
E7	2006	18,0	40	819,5	1,08	1,61
E8	2008	18,0	40	819,5	1,08	3,66
E9	aeropónico	18,0	40	819,5	1,08	1,91
E10	2005 + EtOH	18,0	40	819,5	0,81	1,08

Técnicas convencionales		
Experimento	Material	Y (%)
HD	2005	0,52
OSE etanol	2005	23,81
OSE hexano	2005	8,78

Y (%): rendimiento global de la extracción.
$$Y = \frac{\text{masa de extracto}}{\text{masa de planta seca}} \times 100$$

La optimización se llevó a cabo con material procedente de la cosecha de 2005. Una vez que las condiciones de extracción fueron optimizadas, se realizaron experimentos de SFE sobre material vegetal de 2006, 2008 y material aeropónico con las mejores condiciones para obtener altos rendimientos y comparar cosechas y métodos de cultivo. Se realizó una extracción adicional con etanol para determinar si la extracción había sido completada. Todos los experimentos de SFE, excepto el llevado a cabo con etanol, se realizaron con un caudal de 1,08 kg/h y un tamaño de partícula de 0,56mm, condiciones que se demostraron en experimentos previos. Se estudiaron tres caudales de CO₂ (0,72, 1,08 y 1,32 kg/h) y tres tamaños de partícula (0,26, 0,56 y 0,80 mm) con ajeno y diferentes plantas, concluyendo que las condiciones mencionadas con anterioridad fueron las mejores [35-37]. Cuando se usó etanol como modificador de la SFE, el caudal de CO₂ se disminuyó para favorecer el tiempo de contacto entre modificador, matriz y CO₂. Los rendimientos de las técnicas tradicionales también se incluyen en la Tabla 1 como valores comparativos.

Es deseable separar los compuestos de alto peso molecular de los más pequeños cuando se trabaja con SFE para obtener extractos similares a los obtenidos con HD. Con este objetivo, se usaron dos separadores de condensación para retener los más pesados (nonacosano y análogos) en el primer separador y los volátiles (constituyentes del aceite esencial) en el segundo [38]. La temperatura y las condiciones de presión de los separadores fueron las siguientes: -5 °C, 8,0 MPa en el separador 1 (SP1) y 10 °C, 2,0 MPa en el separador 2 (SP2). El extracto del primer separador sólo se recogió al final del experimento para evaluar la eficiencia en la separación y averiguar su contenido en volátiles. La composición de los extractos recogidos para cada experimento en SP1 se recoge en la Tabla 2. La masa total recogida entre ambos separadores también se muestra.

Tabla 2. Compuestos mayoritarios de los extractos del separador 1 en cada experimento de SFE

Componentes	IK	Experimentos									
		E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
		% Composición (p/p)									
Z-epoxi-cimeno	1130	24,97	13,33	5,96	24,62	6,00	3,39	5,03	9,43	11,59	-
crisantenol	1164	10,83	3,96	3,82	14,26	2,74	0,84	1,97	5,31	4,05	-
acetato de crisantenilo	1263	5,11	5,09	1,55	7,23	1,52	0,42	4,12	0,58	0,85	-
nonacosano	2900	11,34	8,44	13,45	8,96	22,31	35,83	17,53	13,72	26,34	17,40
masa recogida en SP1 (g)		0,0615	0,1479	0,2406	0,0715	0,1132	0,2194	0,1780	0,1970	0,1750	0,2770
masa recogida en SP2 (g)		0,6941	2,0290	2,5237	0,5267	2,029	2,3487	1,5051	3,4282	1,6846	0,9838

IK: Kovats Retention Indexes.

Los resultados indicaron que la cantidad de extracto condensado en el SP1 fue siempre menor del 10 % que la cantidad recogida en el SP2 en los experimentos E1-Eg. Cuando se usó el etanol como modificador de la SFE, esta cantidad resultó ser del 28%. La composición de los extractos recogidos en SP1, mostrada en la Tabla 2, reveló un bajo contenido en volátiles mientras que la proporción de compuestos más pesados es mayor. Además, como se puede observar en la Tabla 2 (composición de los extractos), al aumentar la densidad del disolvente de 285,0 kg/m³ en el experimento 4 a 819,5 kg/m³ en el experimento 3 (se puede ver en la Tabla 1, experimentos y densidad), la proporción de volátiles disminuyó marcadamente, del 46,11% en el experimento 4 al 11,33% en el experimento 3 o incluso al 0% en el experimento llevado a cabo con etanol como modificador.

El rendimiento global del aceite recogido por SFE en el SP2 o mediante técnicas tradicionales fue calculado como Y (%), Ec. (1):

$$Y = \frac{\text{masa de extracto}}{\text{masa de planta seca}} \times 100 \quad (1)$$

La variación del rendimiento de extracción con el tiempo para los diferentes experimentos se representa en la Figura 1. Los valores teóricos calculados con el modelo de Sovová, explicado en la sección 3.3 también se muestran.

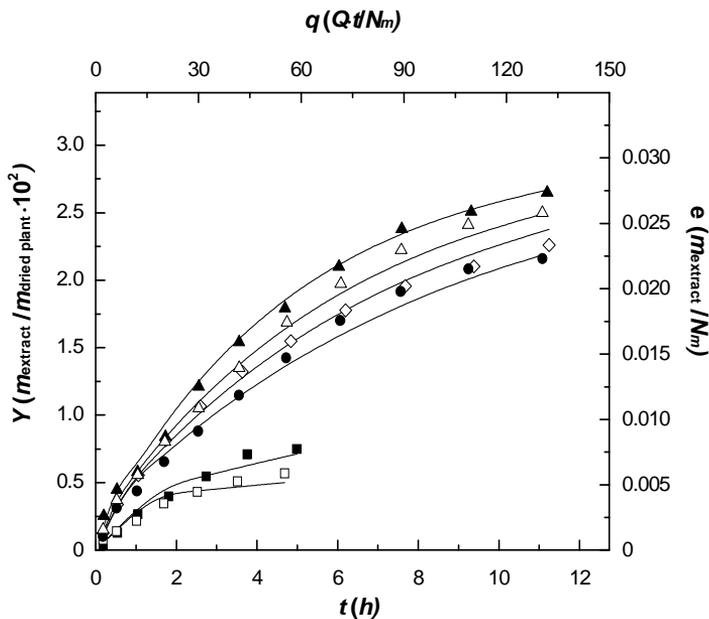


Figura 1. Curvas SFE. Rendimiento global, Y ($m_{\text{extracto}}/m_{\text{planta seca}} * 100$), vs tiempo, t (horas). Rendimiento normalizado de extracción, e (m_{extracto}/N_m) vs cantidad relativa pasada de disolvente, q . E1(□): 9,0 MPa, 40 °C. E2(□): 13,5 MPa, 40 °C. E3(□): 18,0 MPa, 40 °C. E4(◇): 9,0 MPa, 50°C. E5(□): 13,5 MPa, 50 °C. E6(Δ): 18,0 MPa, 50 °C. — modelo de Sovová.

De los datos de la Tabla 1 y de la Figura 1, es evidente que el rendimiento de la SFE aumenta al aumentar la densidad. El incremento del rendimiento es mayor que el correspondiente al aumento de solubilidad correspondiente al aumento de temperatura y ha sido certificado en varias extracciones como en Langa et al. [30,31]. La comparación de las diferentes cosechas de ajeno fue hecha a la mayor densidad para obtener valores altos de rendimientos, similares a los obtenidos en el experimento E₃ (18,0 MPa, 40 °C). 2006, 2008 y cultivo aeropónico tuvieron unos rendimientos de: 1,61%, 3,66% y 1,91% respectivamente. Además, todos los experimentos de SFE consiguieron rendimientos superiores a los obtenidos mediante HD, 0,52%. El rendimiento de la hidrodestilación fue similar a los encontrados en literatura. Sin embargo, en la mayoría de los experimentos de SFE, no se alcanzó la asíntota debido a los largos tiempos de extracción necesarios (los experimentos fueron concluidos después de 11 horas de extracción), lo que conlleva una dificultad añadida comparando con otro tipo de materiales.

El grado de agotamiento de la matriz para la cosecha de 2005 fue investigado mediante la realización de un segundo experimento (E₁₀) sobre material vegetal previamente extraído en E₃. Las severas condiciones (18,0 MPa, 40 °C, 50 mL etanol) de extracción dieron un rendimiento de sólo 1,08%. Añadiendo este valor al del rendimiento obtenido en el experimento E₃, se obtiene un rendimiento global de 3,73% para la SFE. El análisis de la composición de los extractos de estos experimentos será comentado en la sección 3.2.

Los rendimientos globales de las OSE fueron considerablemente mayores como se puede observar en la Tabla 3. La razón para estos rendimientos es que los compuestos extraídos son marcadamente diferentes a los extraídos mediante SFE o HD, y que además de extraer compuestos formadores de los aceites esenciales, otros compuestos más pesados han sido coextraídos. Los compuestos mayoritarios de HD y de dos experimentos SFE (los correspondientes a la mayor y a la menor densidad), junto con la composición de ambos extractos OSE se puede ver en la Tabla 3. Los rendimientos relativos de cada componente en cada extracto (Y_i) y el rendimiento específico de cada componente por 100 gramos de material vegetal (Y_{sp}) también se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial y en algunos extractos SFE (E₃: 18,0 MPa-40 °C (2005); E₄: 9,0 MPa-50 °C (2005)), comparados con su proporción en extractos OSE. Rendimientos relativos (Y_r), específicos (Y_{sp}) y globales (Y)

Compuesto	IK	HD		SFE (E ₃)		SFE (E ₄)		OSE hexano		OSE etanol	
		Y _r (%)	Y _{sp} (g)								
Z-epoxiocimeno	1130	22,14	0,12	17,78	0,47	39,49	0,22	6,01	0,53	0,26	0,06
crisantenol	1164	15,67	0,08	8,82	0,23	9,33	0,05	2,90	0,25	2,94	0,70
acetato de crisantenilo	1263	13,53	0,07	4,58	0,12	7,72	0,04	2,26	0,20	3,23	0,77
nonacosano	2900	-	-	6,81	0,18	-	-	5,65	0,50	13,02	3,09
Y (%)		0,52		2,65		0,56		8,78		23,81	

$$Y_r \text{ rendimiento relativo del compuesto en cada extracto } Y_r = \frac{\text{masa del compuesto}}{\text{masa de extracto}} \times 100$$

$$Y_{sp} \text{ rendimiento relativo de cada compuesto a partir de 100 gramos de material vegetal } Y_{sp} = \frac{Y_r}{100 \text{ gramos de material vegetal}} \times Y$$

$$Y \text{ rendimiento experimental } Y = \frac{\text{masa de extracto}}{\text{masa de planta seca}} \times 100$$

La Tabla 3 muestra que los rendimientos relativos de los compuestos mayoritarios para HD son similares a los de SFE y ambos superiores a los de OSE. Los rendimientos específicos de los extractos SFE son considerablemente mayores a los de HD y similares a los obtenidos mediante OSE. Los experimentos OSE producen rendimientos globales mayores porque extraen más compuestos y más pesados de la matriz vegetal debido a mayores tiempos de residencia del disolvente (20 horas), debido a que el disolvente limpio recircula cada 5 minutos a través de la matriz vegetal, debido al mayor poder disolvente y debido a la polaridad en el caso del etanol.

3.2. Evaluación de la composición

El análisis de las diversas fracciones de SFE recogidas en SP2 en cada experimento fue utilizado para observar la evolución de la composición del extracto supercrítico durante el proceso de la extracción. La cuantificación de los tres compuestos principales del aceite esencial, Z-epoxiocimeno, acetato de crisantenilo y crisantenol, y también el del nonacosano fue realizado. Los compuestos principales encontrados en nuestro aceite esencial se diferencian

incluso de los que se encuentran en ajeno de orígenes geográficos similares (a menos de 200 kilómetros de nuestra plantación) descritos por Arberas y otros [21,40]. El Aceite esencial del ajeno de los Pirineos presentó como compuesto más importante epoxiocimeno [21], mientras que aceite esencial del ajeno de Haro, La Rioja, presentó Z-epoxiocimeno y acetato de crisantenilo como compuestos mayoritarios [40].

Esas diferencias se pueden explicar por el diverso quimiotipo de las plantas del ajeno. El nonacosano, un componente de las ceras, aparece pues cuando las condiciones de SFE son más fuertes o en las fracciones de cola en un experimento de SFE. El estudio de esta evolución es importante si se intenta enriquecer el aceite en ciertos compuestos específicos o si el grado de agotamiento de la matriz se investiga. La co-extracción de compuestos más pesados tales como alcanos de cadena larga no puede explicar completamente el aumento en la producción de SFE puesto que la masa extraída en SP1 no se considera y puesto que los compuestos más pesados se comienzan a obtener al final de la extracción y suponen como máximo, en el caso de las condiciones más severas, un total del 20 % de la masa extraída. La cuantificación de esos cuatro componentes en las fracciones de cabeza y de cola de los experimentos de SFE se muestra en la Tabla 4 donde su cuantificación en el aceite esencial de HD también se presenta. Los componentes principales de los aceites esenciales, Z-epoxiocimeno, acetato de crisantenilo y crisantenol, muestran porcentajes del 22%, el 16% y el 14% respectivamente. En los extractos de SFE, estos tres son también compuestos importantes, sus porcentajes dependiendo de las condiciones de la extracción, el año y la técnica del crecimiento. Para la cosecha 2005, las fracciones principales de los experimentos E1, E2, E4 y E5 se enriquecen, con respecto a los aceites esenciales de HD, en Z-epoxiocimeno (las fracciones de cola también se enriquecen en el caso de los experimentos E1 y E4), mientras que la proporción de crisantenol y acetato de crisantenilo disminuye levemente para cada extracto de SFE de esa cosecha. Conforme los experimentos de extracción van finalizando, los extractos supercríticos se enriquecen en nonacosano y en compuestos más pesados análogos que, en algunas fracciones, constituye el compuesto principal según se puede ver en la Tabla 4. Cabe destacar la ausencia de tuyonas, compuestos tóxicos que aparecen generalmente en el ajeno, evitados usando una técnica de cultivo controlado mencionada en la introducción [10]. La comparación de los extractos de SFE de diversas cosechas del año y de técnicas cada vez mayor demuestra que los compuestos importantes son iguales que éstos a partir de 2005 pero su proporción varía según se ve en la Tabla 4. En el caso de los extractos de 2008, el compuesto principal es el acetato de crisantenilo (13,25%) y en el caso de las plantas cultivadas aeropónicamente, la proporción de Z-epoxiocimeno alcanza un valor de 45,71%, proporción doble a la encontrada en el aceite esencial de 2005.

Tabla 4. Componentes mayoritarios del aceite esencial y de los extractos de SFE recogidos en SP2. Ccabeza (Ccab) indica los puntos iniciales de la extracción, mientras que Ccola indica los últimos.

Compuesto	IK	HD	E1		E2		E3		E4		E5	
			Ccab	Ccola								
Z epoxiocimeno	1130	22,14	39,98	36,76	28,65	14,67	20,94	13,03	42,88	31,59	32,82	7,56
crisantenol	1164	15,67	11,87	12,88	7,06	7,66	9,58	7,69	8,88	10,37	8,16	4,67
ac. de crisantenilo	1263	13,53	9,01	7,04	6,11	4,28	5,25	3,57	7,61	7,96	6,78	2,93
nonacosano	2900	-	0,23	0,31	2,51	4,51	3,78	11,35	0,15	0,26	1,07	14,99
	IK		E6		E7		E8		E9		E10	
			Ccab	Ccola								
Z epoxiocimeno	1130		18,28	12,67	13,05	4,92	28,03	9,59	45,71	13,85	6,18	0,85
crisantenol	1164		9,22	8,81	5,44	2,69	13,42	6,49	15,97	5,93	6,62	0,85
ac. de crisantenilo	1263		6,40	4,26	13,25	5,08	1,80	0,66	2,11	1,09	2,56	0,04
nonacosano	2900		1,46	10,15	1,91	10,84	0,87	6,95	0,42	7,25	1,36	0,02

IK: Índices de Retención de Kovats.

En cuanto al grado de agotamiento de la extracción, después de dos experimentos consecutivos de SFE, la composición de los extractos del experimento E10 demuestra la evolución del aceite. Comparado a los extractos obtenidos por HD, OSE los obtenidos previamente por SFE, el Z-epoxiocimeno no es ahora el componente principal y su proporción en las fracciones de cola es prácticamente inexistente. Es por lo tanto seguro decir que la cantidad total de aceite habría sido extraída. Como será explicado en la sección 3.3, este experimento se podría utilizar para determinar la cantidad total de aceite extractable por SFE (x_u , del modelo de Sovová).

3.3. Modelado del proceso de extracción supercrítica

Siguiendo el modelo de Sovová, donde el aceite es tratado como un solo componente [25], el rendimiento experimental para cada fracción, e_{exp} , fue calculado usando la Ec. (2) y la cantidad de disolvente, q , fue obtenida con la Ec. (3).

$$e_{exp} = E/N_m \quad (2)$$

$$q = Qt/N_m \quad (3)$$

donde E es la cantidad de extracto (kg), N_m la carga de sólido insoluble (kg), Q el caudal de disolvente (kg/s) y t el tiempo de extracción (s). La carga de sólido insoluble, N_m , fue calculada como se describe en las siguientes ecuaciones:

$$N_m = (1 - c_u) \cdot M \quad (4)$$

$$c_u = x_u / (1 + x_u) \quad (5)$$

donde c_u es el contenido de soluto en el sólido sin tratar (kg(soluto)/ kg(sólido)), M , la carga de sólido en el extractor (kg) y x_u la concentración en el sólido sin tratar (kg(soluto)/kg(sólido insoluble)). La variación de e_{exp} con q para los diversos experimentos y los valores teóricos se representan en la Figura 1.

El conocimiento de dónde está situado el aceite esencial en la planta es una cuestión difícil. El ajenojo, como se ve en la Figura 2, tiene tricomas glandulares donde se almacena el aceite esencial. Imágenes del ajenojo después de moler y antes de la extracción fueron obtenidas por medio de un microscopio electrónico de barrido (SEM) Hitachi S3400 en el Instituto de Carboquímica de Zaragoza, España.

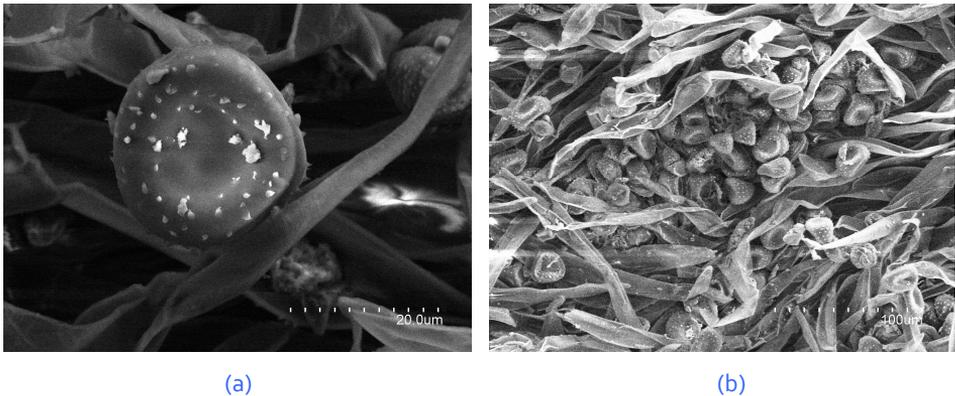


Figura 2. Imágenes SEM del tejido del ajenojo. a) tricoma glandular (2000 X). b) grupo de tricomas glandulares. (400 X).

Sovová [25] ha ideado un modelo para demostrar la distribución de aceite esencial en la estructura de planta para formular el proceso de la extracción. Este modelo propuesto por Sovová nos proveyó resultados satisfactorios. Se basa en varios equilibrios totales en el lecho de la extracción y establece que el material extractable está contenido en una estructura esférica con las células quebradas en una capa externa y las células intactas en el núcleo, donde r es la eficiencia de la molienda (la fracción volumétrica de células quebradas). El soluto se asume distribuido homogéneamente en el sólido sin tratar. El soluto fácilmente accesible de las células quebradas se transfiere directamente a la fase fluida, mientras que el soluto de las células intactas primero se transfiere a las células quebradas y después a la fase fluida. Esto conduce a que las curvas de la extracción (e_{exp} vs q) tengan dos partes, cada una que corresponde a uno de estos procesos de transferencia.

Sovová [25] tomó en consideración varios tipos de patrones del flujo y varias matrices de planta, conduciendo a la descripción de varias situaciones en su modelo. Particularmente, cuando existe una interacción de soluto-matriz, el soluto nunca satura la fase fluida; y aparece una transición suave entre la primera parte de la curva de la extracción y su final.

Según el protocolo propuesto por Sovová y algunos resultados anteriores obtenidos por Coelho et al. [41], las ecuaciones convenientes para la obtención de los datos experimentales del SFE del ajeno fueron las que correspondían al modelo del equilibrio. En este modelo del equilibrio, e_{cal} fue relacionado con el parámetro de q según Ec. (6) para la primera parte de la curva y a la Ec. (7) para la segunda parte.

$$e_{cal} = q \frac{Kx_u}{1 + K(\gamma/r)} = qy_0 \quad \text{para } 0 \leq q \leq q_c \quad (6)$$

$$e_{cal} = x_u [1 - C_1 \exp(-C_2 q)] \quad \text{para } q > q_c \quad (7)$$

Donde K es el coeficiente de partición, x_u es la concentración en el sólido sin tratar, r es la eficiencia en la molienda, γ es el ratio disolvente-matriz en el lecho de extracción, y_0 es la llamada solubilidad del aceite esencial en el CO_2 supercrítico, que es la pendiente de la curva cuando se representa e_{exp} vs q , q_c es la cantidad relativa de disolvente pasado cuando todo el soluto en las células rotas ha sido extraído, y C_1 y C_2 son parámetros de ajuste. K , γ , y r se obtienen simultáneamente con el proceso de ajuste.

Otras propiedades necesarias para aplicar el modelo son la porosidad del lecho, ϵ , la densidad del sólido, ρ_s , y la densidad del lecho ($300,0 \text{ kg/m}^3$), ρ_b . La porosidad del lecho (0,70) fue calculada usando las densidades reales y aparentes de acuerdo con Reis Vasco et al. [32]. La densidad aparente del lecho fue calculada usando el volumen del lecho y la masa de material vegetal en el lecho.

Como se necesitan varios experimentos con el mismo material vegetal para correlacionar procesos de SFE, la correlación de los datos experimentales se llevó a cabo para la cosecha de 2005 usando la herramienta de Excel Solver minimizando la función RSMD^2 definida como

$$\text{RSMD}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{i=N} \left(\frac{e_{exp} - e_{cal}}{e_{exp}} \right)^2}{N} \quad (8)$$

Los valores estimados aparecen en la Figura 1. Se puede observar una buena correlación entre los resultados experimentales y los ajustes. Los valores de los principales parámetros de ajuste se recogen en la Tabla 5 junto con los valores de RSMD^2 .

Tabla 5. Valores de los principales parámetros obtenidos con el modelo de Sovová y de RMSD² para cada experimento

Experimento	ρ_{sc} (kg/m ³)	x_u	y_o	γ	r	$k_s a_s \times 10^6$ (s ⁻²)	$k_f a_o$ (s ⁻²)	q_c	C_1	C_2	RSMD ²
E1	485,5	0,031	0,00026	2,86	0,13	2,08	0,52	12	0,885	0,0026	0,048
E2	753,6	0,031	0,00056	4,46	0,13	9,25	0,52	12	0,938	0,0118	0,0014
E3	819,5	0,031	0,00079	4,85	0,13	10,8	0,52	12	0,970	0,017	0,011
E4	285,0	0,031	0,00025	1,68	0,13	0,649	0,52	12	0,876	0,00097	0,038
E5	655,0	0,031	0,00052	3,90	0,13	7,80	0,52	12	0,924	0,0097	0,0064
E6	757,1	0,031	0,00065	4,48	0,13	10,1	0,52	12	0,9479	0,013	0,003

Los valores de algunos de los parámetros son dignos de un comentario adicional. La concentración en el sólido no tratado, x_u , fue obtenida ajustando los valores experimentales y está de acuerdo con las curvas de la extracción mostradas en los experimentos E1 a E6. El valor obtenido para el x_u es 0,031, constante para todos los experimentos y, según lo esperado, está por encima del rendimiento individual para cada uno de los experimentos de SFE. Cuando los rendimientos de los experimentos E3 y E10 se agregan, y éste valor se transforma en x_u , este valor empírico combinado es el 20 % más alto que los valores que obtuvimos. Esta cifra más alta se puede explicar por la co-extracción de compuestos más pesados que ocurre cuando se usan altas densidades y etanol del CO₂ como entrainer. Sin embargo, nuestro valor del x_u no fue obtenido de forma empírica sino que fue hallado numéricamente inscribiéndolo como ajustable en la función del Solver, considerándose que debía ser igual para todos los experimentos de SFE porque se usó la misma materia prima y el mismo tamaño de partícula [42]. Algunos autores defienden que el x_u representa la cantidad máxima de extracto que se puede recuperar de una materia prima a una presión y una temperatura dadas [43]. Algunos autores incluso utilizan diversos valores del x_u a presión y temperatura fijas pero con tamaños de partícula que varían [44]. Algunos autores han fijado x_u como la cantidad que se puede obtener por hidrodestilación [45], o por extracción convencional usando un disolvente orgánico [46]. Otros autores incorporan x_u como parámetro de entrada sin mencionar su origen [47]. Así, nuestro valor del x_u es absolutamente razonable porque es mayor que los encontrados en cada experimento y no habría sido apropiado obtenerlo con HD u OSE debido a la diversa composición y aspecto de los extractos obtenidos mediante estas técnicas.

La concentración inicial de aceite en la fase fluida, y_o , asumida como la solubilidad en CO₂ supercrítico, sigue el patrón previsto para cada experimento, es decir, a mayor densidad del CO₂, más soluble es el aceite. Las solubilidades del aceite en CO₂ llevan el siguiente orden para los experimentos E4 < E1 < E5 < E2 < E6 < E3 dispuestos en el orden de sus densidades del CO₂. El ratio disolvente- matriz en

el lecho, γ , que depende de la densidad del sólido, de la densidad solvente y de la porosidad, también aumenta con densidad disolvente de la misma forma. La eficiencia en la molienda, r , constante debido a que el proceso de molienda es igual para todos los experimentos, y el coeficiente de transferencia de masa de la fase fluida, $k_f a_o$, constante debido a que el flujo del CO_2 es constante. El coeficiente de transferencia de masa de la fase sólida, $k_s a_s$, se comporta también de la manera prevista, aumentando con la densidad, porque cuanto más alta es la densidad del CO_2 en el experimento, mejor es la transferencia del aceite de las células intactas a las quebradas.

4. Conclusiones

La extracción supercrítica del CO_2 del ajeno fue realizada y la influencia de la presión, de la temperatura, del año de la cosecha, de la presencia de entrainer y de la técnica de cultivo en la producción y de la composición de los extractos fue estudiada. Las mejores condiciones entre las estudiadas para obtener rendimientos más altos fueron 18,0 MPa y 40 °C, siendo la cosecha 2008 la que produjo rendimientos más altos. La SFE usando etanol como modificador fue realizada para investigar el grado de agotamiento de la matriz vegetal después de una extracción típica de SFE. Las técnicas convencionales de extracción, tales como hidrodestilación durante 4 horas o la extracción con disolventes orgánicos durante 20 horas con etanol o hexano fueron realizadas con propósitos comparativos. Los rendimientos del proceso de SFE fueron más altos que para el HD. Los rendimientos de OSE fueron más altos que ambos, pero sus extractos se diferenciaron bastante en la composición y en el aspecto de los obtenidos por HD. Los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de HD y de los extractos de SFE fueron Z-epoxiocimeno, crisantenol y acetato de crisantenilo; su evolución durante los experimentos de SFE fue analizada cromatográficamente.

El modelo propuesto por Sovová fue aplicado exitosamente para correlacionar los datos experimentales. Los parámetros característicos del modelo, como la llamada solubilidad del aceite esencial en el CO_2 supercrítico, y_o , el coeficiente de transferencia de masa de la fase sólida, $k_s a_s$ y la concentración en el sólido sin tratar, x_u , fueron obtenidos.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer el apoyo económico de MICINN-FEDER (CTQ2009-14629-Co2-02), del Gobierno de Aragón (Pl068-08 y grupo E52) y de Gobierno de Aragón-La Caixa-Sumalsa (Proyecto Medio Ambiente Convocatoria La Caixa 2010). A S. Carlin se le agradece la revisión del idioma. L. Martín agradece la concesión de una beca FPU (AP2006-02054) del MICINN.

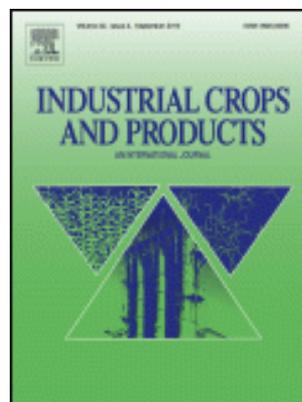
Referencias

- [1] A.P.T. Anastas, J.C. Warner, Green Chemistry: Theory and Practice, USA, Oxford University Press, 2000.
- [2] F. Juteau, I. Jerkovic, V. Masotti, M. Milos, J. Mastelic, J. Bessière, et al., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France, *Planta Medica*. (2003) 158-161.
- [3] G. Rücker, D. Manns, S. Wilbert, Homoditerpene peroxides from *Artemisia absinthium*, *Phytochemistry*. 31 (1992) 340-342.
- [4] K. Tariq, M. Chishti, F. Ahmad, A. Shawl, Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes, *Veterinary Parasitology*. 160 (2009) 83-88.
- [5] A. H. Gilani, K. H. Janbaz, Preventive and Curative Effects of *Artemisia absinthium* on Acetaminophen and CCl₄-induced Hepatotoxicity, *General Pharmacology*. 26 (1995) 309-315.
- [6] Papyrus Ebers 7 (2b, 7-2b, 11). Universitätsbibliothek Leipzig. Available from: http://www.medizinische-papyri.de/PapyrusEbers/1024/HTML/kolumne_ii.htm
- [7] S. Padosch, D. Lachenmeier, L. Kroner, Absinthism: a fictitious 19th century syndrome with present impact, *Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy*. 1 (2006) 14.
- [8] National Toxicology Program of The National Institute of Environmental Health Sciences of the United States. Alpha-Thujone (546-80-5). Available from: <http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=03DB8C36-E7A1-9889-3BDF8436F2A8C51F>
- [9] E. Stahl, D. Gerard, Hochdruck-Extraktion von Naturstoffen mit überkritischen und verflüssigten Gasen, *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*. 176 (1983) 1-4.
- [10] J. Burillo, Cultivo Experimental de Ajenjo *Artemisia Absinthium* L. como Potencial Insecticida de Origen natural, in J. Burillo, A. González-Coloma (Eds.), *Insecticidas y Repelentes de Origen Natural*, CITA, Zaragoza, 2009, pp 19-30.
- [11] J. Labrador, J. L. Porcuna, A. Bello, *Manual de Agricultura y Ganadería Ecológica*, Eumed, Madrid, 2006, p. 209
- [12] U. Uslu, Ó. Ertuerk, Antifeedant, growth and toxic effects of some plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* (say.) (Coleoptera, Chrysomelidae), *Fresenius Environmental Bulletin*. 16 (2007) 601-607.
- [13] S. Kordali, I. Aslan, O. Çalmasur, A. Cakir, Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), *Industrial Crops and Products*. 23 (2006) 162-170.
- [14] I. Parejo, F. Viladomat, J. Bastida, A. Rosas-Romero, N. Flerlage, J. Burillo, et al., Comparison between the Radical Scavenging Activity and Antioxidant Activity of Six Distilled and Nondistilled Mediterranean Herbs and Aromatic Plants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (2002) 6882-6890.
- [15] F. Chialva, P. A. P. Little, G. Doglia, Chemotaxonomy of wormwood (*Artemisia absinthium* L.), *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*. 176 (1983) 363-366.

- [16] A. Orav, A. Raal, E. Arak, M. Müürisepp, T. Kailas, Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin, Proceedings of the Estonian Academy of Sciences Chemistry. 55 (2006) 155-165
- [17] A. Rezaeinodehi, S. Khangholi, Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* Growing Wild in Iran, Pakistan Journal of Biological Sciences. 11 (2008) 946-949.
- [18] A. P. Carnat, M. Madesclaire, O. Chavignon, J. L. Lamaison, cis-Chrysanthenol, a main component in essential oil of *Artemisia absinthium* L. growing in Auvergne (Massif Central), France, Journal of Essential Oil Research. 4 (1992) 487-490.
- [19] J. A. Pino, A. Rosado, V. Fuentes, Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. from Cuba, Journal of Essential Oil Research. 9 (1997) 87-89.
- [20] A. Basta, O. Tzakou, M. Couladis, M. Pavlovic, Chemical composition of *Artemisia absinthium* L. from Greece, Journal of Essential Oil Research. 19 (2007) 316-318.
- [21] A. Ariño, I. Arberas, G. Renobales, S. Arriaga, J. B. Dominguez, Essential oil of *Artemisia absinthium* L. from the Spanish Pyrenees, Journal of Essential Oil Research. 11 (1999) 182-184.
- [22] L. M. D. Badillo, R. E. M. Muñoz, R. S. Garciglia, M. M. M. Pacheco, In vitro antioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora* spp, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 9 (2010) 136-142.
- [23] H. Hendriks, R. Bos, H. J. Woerdenbag, The Essential Oil of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip., Flavour and Fragrance Journal. 11 (1996) 367-371.
- [24] Thermophysical properties of fluid systems, National Institute of Standards and Technologies. Available from: <http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>
- [25] H. Sovova, Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation, The Journal of Supercritical Fluids. 33 (2005) 35-52.
- [26] P. Azagra, A. Gonzalez-Coloma, J. Burillo (CSIC and CITA), European Community Plant Variety Office Patent Application 20090972, 2009.
- [27] A. Gonzalez-Coloma, J. Burillo, J.S. Urieta, J. Sanz, C.E. Díaz, B.M. Fraga, M. Reina, R. Cabrera, R. Martínez, A. M. Mainar, Spanish Patent Application 201031389, 2010.
- [28] Y. Xu, M. T. Marron, E. Seddon, S. P. McLaughlin, D. T. Ray, L. Whitesell, A. A. Gunatilaka, 2,3-Dihydrowithaferin A-3[beta]-O-sulfate, a new potential prodrug of withaferin A from aeroponically grown *Withania somnifera*, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 17 (2009) 2210-2214.
- [29] A. Gonzalez-Coloma, M. Bailen, C.E. Díaz, B.M. Fraga, R. Martínez-Díaz, G. Zuñiga, R. A. Contreras, J. Burillo, Chemical and biological (antifeedant and antioxidant effects) profiles of two chemotypes of *Artemisia absinthium* L. cultivated under different environmental conditions, Industrial Crops and Products. In press.
- [30] E. Langa, G. D. Porta, A. Palavra, J. Urieta, A. Mainar, Supercritical fluid extraction of Spanish sage essential oil: Optimization of the process parameters and modelling, The Journal of Supercritical Fluids. 49 (2009) 174-181.
- [31] E. Langa, J. Cacho, A. Palavra, J. Burillo, A. Mainar, J. Urieta, The evolution of hyssop oil composition in the supercritical extraction curve: Modelling of the oil extraction process, The Journal of Supercritical Fluids. 49 (2009) 37-44.

- [32] E. M. C. Reis-Vasco, J. A. P. Coelho, A. M. F. Palavra, Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation, *Flavour and Fragrance Journal*. 14 (1999) 156-160.
- [33] E. Reverchon, G. Donsi, L. Sesti Osseo, Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 32 (1993) 2721-2726.
- [34] H. van Den Dool, P. Dec. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography A*. 11 (1963) 463-471.
- [35] M. A. Martínez. Memoria para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados, Spain, Universidad de Zaragoza, 2005.
- [36] A. Álvarez. Memoria para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados, Spain, Universidad de Zaragoza, 2005.
- [37] E. Langa. Extracción con CO₂ Supercrítico de Aceites Esenciales de Plantas Aromáticas, Tesis Doctoral, Spain, Universidad de Zaragoza, 2007.
- [38] Q. Lang, C. M. Wai, Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies -- a practical review, *Talanta*. 53 (2001) 771-782.
- [39] D. Lopes-Lutz, D. S. Alviano, C. S. Alviano, P. P. Kolodziejczyk, Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils, *Phytochemistry*. 69 (2008) 1732-1738.
- [40] A. Ariño, I. Arberas, G. Renobales, J.B. Domínguez, Influence of extraction method and storage conditions on the volatile oil of wormwood (*Artemisia absinthium* L.), *European Food Research and Technology*. 209 (1999) 126-129.
- [41] R. L. Mendes, J. P. Coelho, H. L. Fernandes, I. J. Marrucho, J. M. S. Cabral, J. M. Novais, A. F. Palavra, Application of supercritical CO₂ extraction to microalgae and plants, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 62 (1995) 53-59.
- [42] A. Berna, A. Tárrega, M. Blasco, S. Subirats, Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed, *The Journal of Supercritical Fluids*. 18 (2000) 227-237.
- [43] S. Quispe-Condori, D. Sánchez, M. A. Foglio, P. T. V. Rosa, C. Zetzl, G. Brunner, M. A. A. Meireles, Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*. 36 (2005) 40-48.
- [44] N. Mezzomo, J. Martínez, S.R. Ferreira, Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up, *The Journal of Supercritical Fluids*. 51 (2009) 10-16.
- [45] E. M. C. Reis-Vasco, J. A. P. Coelho, A. M. F. Palavra, C. Marrone, E. Reverchon, Mathematical modelling and simulation of pennyroyal essential oil supercritical extraction, *Chemical Engineering Science*. 55 (2000) 2917-2922.
- [46] J. Stastová, J. Jez, M. Bártlová, H. Sovová, Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-III. Extraction from sea buckthorn, *Chemical Engineering Science*. 51 (1996) 4347-4352.
- [47] Y. Gao, B. Nagy, X. Liu, B. Simándi, Q. Wang, Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound, *The Journal of Supercritical Fluids*. 49 (2009) 345-350.

Comparative Chemistry and Insect Antifeedant Action of Traditional (Clevenger and Soxhlet) and Supercritical Extracts (CO₂) of Two cultivated Wormwood Populations



Química comparativa y acción antialimentaria de los extractos tradicionales (Clevenger y Soxhlet) y supercríticos (CO₂) del ajeno (*Artemisia absinthium* L.) cultivado en dos poblaciones

Palabras clave: Extracción con fluidos supercríticos, *Artemisia absinthium*, bioactividad, aeropónico, hidrodestilación y extracción con disolventes orgánicos.

Resumen

Una comparación entre las técnicas tradicionales de extracción (hidrodestilación y extracción con disolventes orgánicos) con la extracción con fluidos supercríticos se ha realizado para dos diversas poblaciones y cosechas de *Artemisia absinthium*, cultivada en el campo y aeropónicamente. La composición de los aceites de los extractos, volátiles y pesados, ha sido analizada por GC-MS y HPLC-DAD respectivamente. La actividad antialimentaria y fitotóxica de los extractos fue probada en insectos (*Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*) y plantas (*Lactuca sativa* y *Lolium perenne*). Los extractos supercríticos demostraron efectos antialimentarios más fuertes que los tradicionales y además mostraron selectividad en los efectos fitotóxicos sobre *L. perenne*.

1. Introducción

El género *Artemisia* consiste en cerca de 500 especies distribuidas a través del mundo. *Artemisia absinthium* L. tiene una amplia gama de actividades biológicas (Bora y Sharma, 2010). El uso crónico de *Artemisia absinthium* tiene efectos neurotóxicos debido a la presencia de la tuyona y de sus derivados (Vogt y Montagne, 1982). Los aceites esenciales destilados de las partes aéreas de *Artemisia absinthium* se han usado como antihongos (Juteau y otros., 2003),(Valdes y otros., 2008), neutralizadores de radicales libres (Canadianovic-Brunet y otros., 2005), hepatoprotectivo (Und Janbaz, 1995 de Gilani), antihelmíntico (Tariq y otros., 2009), antiprotozoario y contra la triquinelosis (Caner y otros., 2008). Los aceites ricos en tuyonas se ha demostrado que tienen actividad acaricida (Chiasson y otros., 2001) e insecticida ((Kordali y otros., 2006),(Kaul y otros., 1978)); los aceites ricos en mirtenol repelen las pulgas, moscas, mosquitos (Ericksen-Brown, 1979) (Jaenson y otros., 2005). Además, los extractos orgánicos de esta especie de planta demostraron efectos antialimentarios y tóxicos frente a *Leptinotarsa decemlineata* (Erturk y Uslu, 2007) y efectos antialimentarios sobre *Rhopalosiphum padi* (Halbert y otros., 2009). Los extractos acuosos resultaron fitotóxicos frente *Lolium perenne* y *Bromus inermis* (Corbu y Cachiță-Cosma, 2009).

Entre los componentes principales presentes en su aceite esencial están las α y β - tuyonas (Carnat y otros., 1992; Chialva y otros., 1983), *cis*- epoxiocimeno (Chialva y otros., 1983), acetato de crisantenilo (Chialva y otros., 1983), acetato de sabinilo (Karp y Croteau, 1982) o una mezcla de las anteriores (Carnat y otros., 1992; Chialva y otros., 1983), dependiendo del origen de planta. La amargura característica del ajeno está causada por lactonas sesquiterpénicas, como por ejemplo, la absintina, el componente amargo mayoritario, y otros tales como la anabsina, cetopelenólido b, y anabsintina. Lignanos, polifenoles y flavonoides están también presentes en los extractos de *Artemisia absinthium* (Aberham y otros., 2010; Ivanescu y otros., 2010).

Artemisia absinthium es abundante en las montañas de España como especie ruderal. Según la composición química de su aceite esencial existen siete quimiotipos descritos en la península ibérica y algunos de ellos no presentan tuyonas (Ariño y otros., 1999). Las poblaciones españolas del ajeno de Teruel (Aragón) y de Sierra Nevada (Granada) se han cultivado experimentalmente (en el campo y bajo condiciones controladas, (Bailén, 2008; Burillo, 2009; González Coloma, a, enviada). La química y los efectos biológicos (acción antialimentaria del insecto y efecto antioxidante) del hidrodestilado (HD) y de los extractos orgánicos de la extracción con disolventes orgánicos (OSE) del ajeno cultivado se han estudiado en función de la población, del tipo de cultivo y del período de recolección (Bailén, 2008; González-Coloma, a enviado, b). En el OSE, la lactona sesquiterpénica hidroxipelenólido fue el componente principal, seguido por las flavonas artemetina y casticina. Las plantas crecidas bajo condiciones ambientales variables demostraron cocientes más bajos del flavonoide sesquiterpénico que las

plantas crecidas bajo condiciones controladas (Bailén, 2008; González-Coloma enviado a). Las concentraciones de casticina se correlacionaron con los efectos antialimentarios y antioxidantes de los extractos del ajenjo. En los extractos de HD los componentes principales fueron el acetato de bornilo y el crisantenol para el cultivo de Sierra Nevada y acetato de Z-epoxiocimeno y acetato de crisantenilo para el cultivo de Teruel. Los efectos antialimentarios y antifúngicos de estos extractos variaron dependiendo de su origen y composición (Bailén, 2008; González-Coloma, b enviado).

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es un método avanzado de separación que entronca con los principios de la química verde y produce resultados ventajosos al extraer compuestos bioactivos de una matriz natural (Reverchon y De Marco, 2006). SFE es una técnica simple, barata, rápida, eficaz y virtualmente sin disolvente durante la extracción. Particularmente, el uso del CO₂ como disolvente supercrítico (SC), permite que las condiciones de extracción sean suaves debido a la temperatura crítica baja (31 °C) y a la presión baja (7,1 MPa) del disolvente, evitando la degradación termal de los compuestos extraídos. (Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007).

La SFE de *Artemisia absinthium* se ha realizado (Martín y otros., 2011) con diversas presiones y temperaturas de extracción, incluyendo seis densidades del CO₂, desde 285,0 a 819,5 kg/m³. En las condiciones estudiadas, se observó que los rendimientos más altos de la extracción fueron obtenidos con 18,0 MPa y 40 °C (correspondientes a la densidad más alta). También una extracción adicional con etanol como modificador del SFE fue realizada para estudiar el grado agotamiento de la matriz después de un SFE convencional. El análisis de GC-MS de la fracción soluble en hexano de estos SFE y de los hidrodestilados demostró la ausencia de tuyonas y la presencia del Z-epoxiocimeno, del crisantenol y del acetato de crisantenilo como los compuestos principales.

En este estudio, la composición química de la fracción soluble en diclorometanol del ajenjo obtenido por HD, de los extractos de OSE y de SFE ha sido analizada por GC-MS y HPLC-DAD. Además se han estudiado sus efectos antialimentarios contra insectos (*Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*) y su fitotoxicidad sobre *Lactuca sativa* y *Lolium perenne*.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal y cultivo

El material vegetal para el cultivo de campo fue seleccionado de las poblaciones salvajes que crecían en Teruel, 2001 (España). Los individuos para dicho cultivo de campo se obtuvieron a partir de las semillas. Los campos experimentales se situaron en Barrio de San Blas (Teruel) y Ejea de los Caballeros (Zaragoza). Una descripción detallada de estos campos y de los parámetros del cultivo se ha publicado previamente (Burillo, 2009). Las muestras de plantas se

seleccionaron aleatoriamente de 30 plantas, se recogieron y se secaron en la sombra durante 8 días.

Los individuos producidos aeropónicamente se obtuvieron de una población donada por el vivero del Parque Nacional de Sierra Nevada (2003, Granada). Esquejes de los individuos seleccionados fueron multiplicados vegetativamente, enraizados con IAA en vermiculita, regados 3 días por semana con una solución de nutrientes (Nutrichem 20:20:20 N, P, K - Miller Chemical & Fertilizer Corp.; 3 g/l) y mantenidos en una cámara de crecimiento (25° C, 70% rh, 16:8 L:O) hasta que se realizó la transferencia a la cámara aeropónica (plantas de 10 a 15 cm). La cámara aeropónica (sistema Apollo 3: 33 plantas, 240 l, 1750 x 1350 x 750mm) se situó en un invernadero medioambientalmente controlado (20-30 °C). Las plantas se mantuvieron bajo constante pulverización de agua a 26 °C suplementada con 0,2 g/l de Nutrichem y 0,03% H₂O₂ (33% w/v Panreac) y con luz artificial (16:8, Luz:Oscuridad). Las plantas fueron cultivadas durante 9 meses, sus partes aéreas y raíces recolectadas periódicamente (de plantas de 20-30 cm), secadas (35°C) y trituradas para la preparación de extractos.

2.2. SFE, HD y OSE

La planta de SFE fue construida según la disposición divulgada por Reis-Vasco y otros., 1999 y se ha descrito en otra parte (Langa y otros., 2009). Los componentes principales son una bomba de compresión, un filtro, un recipiente de extracción de 1 L y dos separadores (0,18 L cada uno), uno para la recuperación de las ceras (compuestos pesados) y el otro para la recuperación del aceite volátil (Reverchon y otros., 1993). Las temperaturas en el recipiente y los separadores de la extracción fueron mantenidas constantes. Aproximadamente 90 g de ajeno pretratado fueron introducidos en el recipiente de la extracción con varios materiales inertes porosos (esferas de cristal, esponjas del níquel y filtros de vidrio) para alcanzar un flujo uniforme del fluido supercrítico. Todos los experimentos de SFE terminaron después de 11 h de extracción o cuando la pendiente de la curva de la extracción fue menor del 10% de la pendiente máxima en los pasos iniciales del experimento. El extracto recogido en el separador 1 se recolecta al final del experimento, mientras que varias fracciones se recogen del separador 2 durante el experimento.

Para determinar el grado de agotamiento de la matriz, un experimento adicional de SFE fue realizado con el material de planta previamente extraído (18,0 MPa 18,0, 40 °C) con la adición de 50ml de EtOH como co-solvente según lo descrito por (Martín y otros., 2011)

Las HD se realizaron sobre 100 g de planta en un aparato tipo Clevenger de acuerdo con el método recomendado por la European Pharmacopoeia.

Las OSE se realizaron en un aparato Soxhlet con etanol y concentrado a vacío.

2.3. Análisis GC-MS

Los aceites esenciales fueron analizados por GC-MS usando un cromatógrafo de gases de Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, California, E.E.U.U.) junto a un detector espectrómetro de masas de Agilent 5973N (ionización electrónica, el eV 70) (Agilent Technologies, Palo Alto, California, E.E.U.U.) y equipado de una columna capilar de 25 m x 0,20 milímetros (espesor del film 0,2 μm) HP-1 (Hewlett-Packard). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: split ratio (30: 1), temperatura del inyector, 260 $^{\circ}\text{C}$; temperatura de la línea de transferencia, 280 $^{\circ}\text{C}$; temperatura de la columna 70 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, luego calentada a 270 $^{\circ}\text{C}$ a 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Los espectros y los datos totales E-I de retención fueron utilizados para determinar la identidad de compuestos comparándolos con los de estándares o con la base de datos espectral de Wiley (2001). Los datos cuantitativos fueron obtenidos de las áreas máximas de TIC sin el uso de factores de la respuesta.

2.4. Análisis HPLC-DAD

La cuantificación de los tres componentes mayoritarios *A. absinthium*: la lactona sesquiterpénica hidroxipelenólido (I) y las flavonas artemetina (II) y casticina (III), se llevó a cabo en un HPLC Agilent 1100 equipado con un detector de diodo y una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (15 x 4,6 cm y 5 μm de tamaño de partícula). Los compuestos fueron eluidos con un gradiente de Acn:1% H_3PO_4 50:100% en 10 min y 100% Acn durante 10 min con un flujo de 1 mL/min y una temperatura de columna de 25 $^{\circ}$ C. Los compuestos se detectaron a 340 nm (artemetina y casticina) y 204 nm (hidroxipelenólido). Se construyeron 3 curvas de calibración con concentraciones conocidas (1,0-0,001 mg/mL) de los compuestos I-III para su identificación.

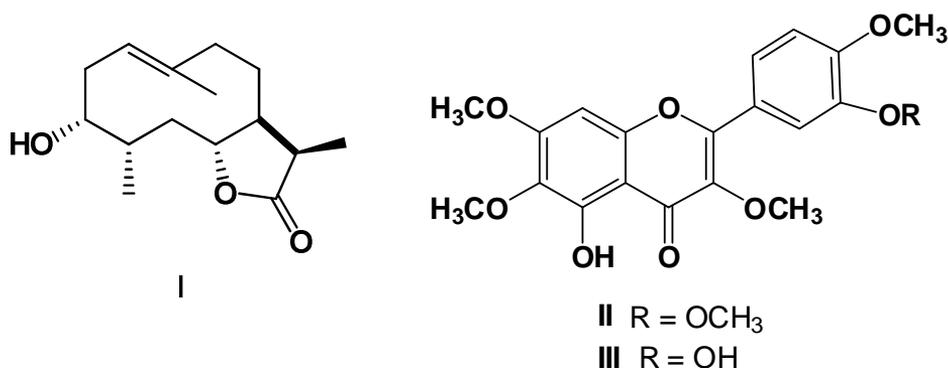


Figura 1. Estructura química de los compuestos I-III. I, hidroxipelenólido. II, artemetina. III, casticina.

2.5. Bioensayos sobre insectos

Colonias de *S. littoralis M. persicae* y *R. padi* fueron alimentadas con dieta artificial, pimienta (*Capsicum annuum*) y cebada (*Hordeum vulgare*), respectivamente y mantenidas a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, $>70\%$ humedad relativa con un fotoperíodo de 16:8 h (L:O) en una celda de crecimiento. Los bioensayos se realizaron con larvas nuevas L6 de *S. littoralis* o con diez adultos de *M. persicae* / *R. padi* como se describe en Burgueño-Tapia et al., 2008.

2.6. Actividad fitotóxica

Los experimentos fueron conducidos con semillas de *Lactuca sativa* cv Teresa (Fito, España) y de *Lolium perenne*. El papel de filtro de 2,5 centímetros de diámetro con 20 μL del compuesto de prueba (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para los extractos y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para los compuestos puros) fue colocado en las placas de 12 pocillos (Falcon). 500 μL H₂O/pocillo y 10/5 semillas (*L. sativa*/*L. perenne* pre-empapados en agua destilada durante 12 horas) fueron agregados y las placas cubiertas fueron colocadas en un compartimento de crecimiento (25 $^\circ\text{C}$, 70% humedad relativa, 16:8 Luz: Oscuridad). La germinación fue supervisada durante 6 días y la longitud de la raíz/de la hoja fue medida al final del experimento (25 plántulas seleccionadas aleatoriamente para cada experimento y digitalizadas mediante el ImageJ 1.43, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Un análisis de la varianza no paramétrico (ANOVA) fue realizado con los datos de crecimiento de las raíces. La juglona (JU) (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) fue incluida como control positivo.

3. Resultados y discusión

3.1. Evaluación de la composición

Muestras representativas de diversos experimentos de SFE fueron seleccionadas para analizar la composición y la actividad. Las condiciones experimentales de los experimentos seleccionados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones experimentales de los experimentos de extracción supercrítica

Experimento	Origen	Cosecha	P (MPa)	T ($^\circ\text{C}$)	ρ_{sc} (kg/m ³)	Caudal (kg/h)
SCA	Teruel	2005	9,0	40	485,5	1,08
SCB		2005	13,5	40	753,6	1,08
SCC		2005	18,0	40	819,5	1,08
SCD		2005 + EtOH	18,0	40	819,5	0,81
SCE		2006	18,0	40	819,5	1,08
SCF	Sierra Nevada	aeropónico	18,0	40	819,5	1,08

Diversas presiones y temperaturas se seleccionaron para estudiar el efecto de la densidad del CO₂ en la composición y la bioactividad del extracto. Además, los extractos obtenidos con la hidrodestilación y la extracción con disolvente orgánico también fueron analizados.

La Tabla 2 muestra los compuestos identificados en la fracción soluble en diclorometano de los diferentes extractos y en la Tabla 3 se muestran sus composiciones. La composición de los hidrodestilados se incluyen a modo comparativo.

Tabla 2. Compuestos identificados en fracción soluble en diclorometano de varios extractos

M+	Pico base	Fragmentos principales	IK	Compuesto	Núm.	Grupo
116	43	59-58-101	815	4-hidroxi-4-metil-2-pentanona ¹	1	
136	71	93-41-43-55-69	1083	linalool ¹	2	
152	79	81-77-41-39-53	1111	<i>cis</i> -epoxiocimeno ¹	3	
152	81	91-109-41-79-39	1144	crisantenol ¹	4	A
170	43	55-59-71-84-82	1220	dimetil-octadienol C ₁₀ H ₁₈ O ₂ isómero ²	5	terpenos menores
170	43	55-71-59-84-81	1232	dimetil-octadienol C ₁₀ H ₁₈ O ₂ isómero ²	6	
170	43	119-43-71-91-109	1263	dimetil-octadienol C ₁₀ H ₁₈ O ₂ isómero ²	7	
170	43	55-74-59-84-81	1266	derivado del isopropanol C ₁₀ H ₁₈ O ₂	8	
194	59	43-81-67-82-79	1242	<i>trans</i> -acetato de crisantenil ¹	9	
204	93	133-91-79-69-41	1409	<i>trans</i> -cariofileno ¹	10	
204	93	41-79-91-105-107	1473	β-Selineno ¹	11	
220	41	79-93-43-69-91	1559	óxido de cariofileno ¹	12	
?	69	41-57-93-68-121	1579	desconocido	13	B
222	43	41-161-67-81-204	1630	alcohol sesquiterpénico C ₁₀ H ₁₈ O ³	14	sesquiterpenos
?	96	41-55-43-81-107	1638	desconocido	15	
248	215	43-159-230-119-91-248	1997	sesquiterpeno tipo absilactona ²	16	
250	232	43-217-162-150-77	1927	isómero del hidroxipelenólido ²	17	
268	43	58-71-41-57-59	1828	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona ¹	18	C
284	119	132-145-41-69-105	1934	diterpeno C ₂₀ H ₃₂ O ³	19	cetonas
284	119	132-145-105-41-123	1986	diterpeno C ₂₀ H ₃₂ O ³	20	y
286	119	121-93-105-41-91	1989	diterpeno C ₂₀ H ₃₀ O ³	21	diterpenos
284	119	132-145-105-91-41	1993	diterpeno C ₂₀ H ₃₂ O ³	22	os

¹ Base de datos de Wiley.

² Bailen, 2008.

³ Ariño et al, 1999.

Tabla 3. Composición química de extractos tradicionales y supercríticos

Compuesto	Teruel											Sierra Nevada										
	HDo5		SCA		SCB			SCC		SCD			HDo6			SCE			HDA	SCF		
	H	T	H	T	W	H ₁	H ₂	H	T	W	H	T	W	H	T	W	H	T	W			
1	-	-	1,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2	-	-	1,40	0,37	-	-	-	-	-	-	1,60	-	-	-	0,44	-	-	-	-	-		
3	1,07	1,44	15,10	5,92	4,07	4,75	-	-	-	-	1,96	-	2,18	-	75,10	0,96	8,38	-	-			
4	9,31	9,44	13,94	4,88	11,90	7,58	2,79	3,38	3,66	8,92	-	19,34	6,89	1,33	5,81	10,56	5,29	5,71	-			
5	-	1,95	-	0,85	-	1,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,53	0,81	1,02	-			
6	-	2,60	-	1,06	-	1,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,03	1,38	-			
7	30,03	3,55	2,78	1,75	2,82	2,90	1,64	2,33	-	-	2,71	54,57	-	1,10	-	0,95	2,08	2,36	-			
8	-	14,97	16,94	9,77	16,74	12,88	7,66	10,49	7,85	13,36	-	-	13,55	3,95	12,13	-	11,37	13,09	4,17			
9	2,37	10,99	12,50	5,02	5,72	5,42	1,67	-	-	-	4,38	-	3,92	-	-	1,97	3,09	-	-			
10	-	3,22	2,73	1,48	-	1,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,76	1,12	2,03	-			
11	-	7,37	6,35	3,21	3,06	3,58	1,92	2,22	-	-	-	-	-	-	-	0,70	1,69	2,06	-			
12	2,60	7,38	4,82	4,97	4,74	5,70	4,63	5,70	-	-	-	5,41	6,65	2,84	-	0,67	4,80	5,25	-			
13	-	2,36	0,58	1,52	-	1,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34	-	-	-			
14	2,67	4,70	4,46	4,62	4,41	4,60	4,70	6,23	4,87	5,57	2,67	4,57	6,61	3,21	-	0,87	5,10	4,85	3,62			
15	-	1,60	-	1,58	-	1,49	1,72	-	-	-	-	-	-	1,20	-	-	1,54	1,33	-			
16	17,72	-	5,82	11,04	11,11	12,29	24,40	24,40	32,07	28,94	39,72	-	21,90	38,77	29,57	-	8,89	15,74	34,07			
17	6,21	1,71	-	3,60	4,51	3,62	7,28	7,23	10,42	9,10	11,56	5,02	8,14	7,44	11,54	-	2,68	2,20	9,74			
18	2,22	1,21	-	1,69	-	1,48	2,58	2,85	3,36	-	2,70	-	3,29	1,71	-	-	1,34	0,98	2,84			
19	-	-	-	1,14	-	1,06	1,59	1,62	-	-	-	-	-	-	13,83	-	-	-	-			
20	7,53	4,24	2,86	6,39	-	5,85	9,50	10,25	12,14	11,13	8,32	-	11,22	5,43	18,59	-	-	-	10,46			
21	-	-	-	1,70	7,26	1,58	2,49	2,84	-	-	-	-	-	3,28	-	-	5,94	3,99	2,63			
22	10,62	5,17	1,62	8,70	-	8,47	13,60	14,51	17,15	15,75	13,01	-	15,43	8,11	-	-	4,70	6,61	15,02			

Los extractos de HD de *Artemisia absinthium* Teruel (HD05-06) se caracterizan por la presencia del monoterpeno dimetil-octadienol (7), aislado previamente de la misma población (M. Bailén, 2008), el crisantenol (4, HD05-06), una absilactona - tipo sesquiterpénica, (16, HD05, Bailén, 2008), dos diterpenos desconocidos (22 y 20, HD05, Ariño y otros., 1999), un isómero del hidroxipelenólido (17, HD05-06) también aislado de *Artemisia absinthium* (Bailén, 2008), óxido de cariofileno (12, HD05-06), acetato de t-crisantenilo (9, HD05-06), y un alcohol sesquiterpénico (14, HD05-06, Ariño y otros., 1999). Todos estos compuestos se han encontrado en los extractos de HD de la misma población cultivada en los años anteriores (2002-2004) (González-Coloma y otros, a). El extracto obtenido de las plantas aeropónicas (población del SN) se caracteriza por la presencia de cis-epoxiocimeno (3) y crisantenol (4).

La evolución de la composición de los extractos supercríticos durante el proceso de extracción demostró que diversas combinaciones de presión y de temperatura afectaron a la composición del extracto. Para la cosecha 2005, el aumento en la presión (de SCA a SCC) dio lugar a menores niveles de monoterpenos (hasta el compuesto 9) y a una extracción mayor del sesquiterpeno isómero del hidroxipelenólido (17) y de los compuestos más pesados (18-22). La adición de EtOH (SCD) dio lugar a una extracción más eficiente de compuestos más pesados (17-22). Las fracciones principales, H (recogido en el separador 2 en las etapas iniciales de la extracción) y las fracciones de cola, T (recogido en separador 2 en las etapas finales de la extracción) fueron más ricas en compuestos volátiles que las llamadas ceras, W, (fracciones recogidas en el separador 1 a lo largo de la extracción entera).

Los extractos de SCA se componen sobre todo de compuestos del grupo A (terpenos menores) con 3, 4, 8 y 9 siendo los principales, de compuestos del grupo B (sesquiterpenos), dominados por 11 y 12 seguidos por 14 y 16 (en la fracción T), mientras que del grupo C había cantidades bajas de 20 y 22 en la fracción H. Los extractos de SCB tenían una composición similar en compuestos del grupo A siendo 8 y 4 los principales; los compuestos del grupo B fueron representados por 16 (el principal), 12 y 14, 11, 17 y cantidades pequeñas de 10 y el grupo C mostrando cantidades más altas de 20 y 22 con la presencia de 21 en la fracción T. Los extractos del SCC son similares en la composición ya que H₁ y H₂ son fracciones consecutivas de extracción (T no estaba disponible), teniendo una composición más simple en compuestos del grupo A, con 8 siendo el principal; su composición en el grupo B tenía 16 como el componente principal seguido por 17, 14 y 12, mientras que el grupo C era similar al de SCB-W con cantidades más altas de 20 y 22. El SCD mostró unos grupos A y B con compuestos mayoritarios (8 y 4) y (16, 17 y 14) respectivamente más simples que el SCC, con concentraciones más altas de 16, 17, 20 y 22 que los extractos supercríticos anteriores. Los extractos de SCE tenían una composición similar a SCD en compuestos del grupo A (con la suma de 9); en el grupo B (con la suma de 12) y en el grupo C (con la suma de 19). Los extractos de SCF tenían una composición similar en el grupo A y compuestos de B

a SCB y una diversa composición en compuestos del grupo C con la presencia de 21 en la fracción de W.

3.2. Cuantificación de los compuestos no volátiles I-III

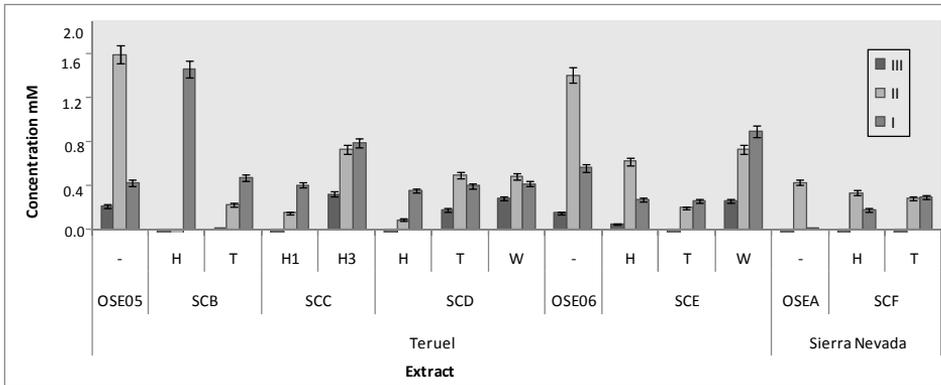


Figura 2. Cuantificación de los compuestos I-III en los diferentes extractos.

La Figura 2 muestra la cuantificación de los compuestos I-III en los diversos extractos. Globalmente, el compuesto II fue el más abundante de los extractos OS. Según lo demostrado previamente, las plantas cultivadas en campo se caracterizan por tener concentraciones más altas de I-III que las plantas crecidas bajo condiciones controladas (OSEA). Estas flavonas son componentes antioxidantes del *Artemisia absinthium* y su síntesis se puede inducir por estrés abiótico (Bailén, 2008; González-Coloma y otros., b enviado).

El compuesto I fue el más abundante de SCB-H, por lo tanto el experimento de SCB tenía las mejores condiciones para extraer selectivamente el sesquiterpeno I. En general, las concentraciones de estos compuestos aumentaron durante el proceso de extracción. Sin embargo, ninguno de los experimentos SC fueron eficaces para extraer selectivamente las flavonas II y III.

3.3. Actividades biológicas

3.3.1. Efectos antialimentarios

Tabla 4. Efecto antialimentario de extractos seleccionados sobre *S. littoralis*, *R. padi*, y *M. persicae*

Extracto	<i>S. littoralis</i> 10µg/cm ²		<i>M. persicae</i> 10µg/cm ²			<i>R. padi</i> 10µg/cm ²		
	FI% ^c	SI% ^d	%C ^e	%T ^f	SI% ^d	%C ^e	%T ^f	
HDo5 ^a	19,8±16,7	30,8±6,8	53±5	47±5	34,7±7,9	40±5	60±5	
OSEo5 ^b	21,3±9,8	16,5±6,3	54±5	46±5	30,7±7,6	59±4	41±4	
SCA-H	82,8±4,7*	79,5±6,1*	84±4	16±4	81,7±4,0*	86±3	14±3	
SCA-T	93,7±4,0*	63,4±7,2*	75±4	25±4	90,6±2,0*	92±2	8±2	
SCA-W	92,0±7,2*	48,1±11,6	67±7	33±7	29,8±6,0	58±3	42±3	
SCB-H	93,5±3,7*	46,0±6,7	66±4	34±4	55,4±6,0	70±3	30±3	
SCB-T	85,6±10,0*	59,6±7,7*	75±4	25±4	40,2±7,2	61±4	39±4	
SCB-W	86,4±8,4*	-	-	-	28,1±7,6	55±5	45±5	
SCC-H1	88,6±4,9*	96,7±3,3*	97±3	3±3	83,1±6,4*	87±5	13±5	
SCC-H2	64,7±9,3	94,3±2,2	95±2	5±2	58,9±7,1	73±4	27±4	
SCD-H	90,9±8,4*	83,1±4,3*	87±3	13±3	68,8±5,8*	78±3	22±3	
SCD-T	85,7±8,7*	78,5±5,2*	84±3	16±3	68,0±4,9*	77±2	23±2	
SCD-W	84,2±9,3*	72,4±3,7*	80±2	20±2	34,8±6,8	61±3	39±3	
HDo6 ^a	21±4,7	34,5±6,2	60±3	40±3	40,2±7,3	63±4	37±4	
OSEo6 ^b	6,4±6,4	35,9±9,2	52±7	48±7	42,6±9,0	56±8	44±8	
SCE-H	94,9±3,1*	64,5±5,8*	76±3	24±3	91,6±4,5*	94±3	6±3	
SCE-T	96,2±2,8*	60,6±6,4*	74±3	26±3	69,9±4,4*	78±2	22±2	
SCE-W	97,7±1,1*	31,2±8,1	55±5	45±5	-	-	-	
HDA ^a	69,9±6,3*	32,0±9,1	55±6	44±6	54,6±6,0	71±3	29±3	
OSEA ^b	52,4±3,3	38,1±7,8	40±5	60±5	72,2±7,5*	80±5	20±5	
SCF-H	96,4±1,7*	76,4±5,6	84±3	16±3	99,4±0,6*	99±1	1±1	
SCF-T	69,7±9,1*	72,3±5,9*	81±3	19±3	87,2±3,1*	90±2	10±2	
SCF-W	49,8±14,4	59,2±8,8*	73±5	27±5	82,9±3,9*	87±3	13±3	

^aHD: hidrodestilación^bOSE:extracción con disolvente orgánico^cFI%: índice de inhibición alimentaria: [1-(consumido con tratamiento/consumido del control)] x 100^dSI%: índice de inhibición del asentamiento: [1-(tratamiento/control)] x 100^e% C: Porcentaje de individuos que permanecen en la superficie del control.^f% T: Porcentaje de individuos que permanecen en la superficie tratada.

SC: extractos supercríticos, condiciones en la Tabla 1. H se refiere a extractos de cabeza, T a extractos de cola, W a ceras.

A: crecimiento aeropónico.

2005, 2006: diferentes cosechas

*P<0.05, Wilcoxon Paired Rank Test

Los extractos supercríticos son considerablemente más activos contra *S. littoralis* que los tradicionales (Tabla 4). Los resultados anteriores mostraron que los extractos de HD y de OSE de *Artemisia absinthium* (población de Teruel) tenían efectos antialimentarios moderado-bajos sobre estos insectos (Bailén, 2008; González-Coloma y otros., a, b enviados).

Casi todos los extractos supercríticos demostraron una actividad antialimentaria mayor del 80%. Un patrón similar fue encontrado para los efectos de estos extractos en *M. persicae* y *R. padi*, siendo los áfidos menos sensibles que *S. littoralis*. Los extractos de SCA y de SCC fueron los más activos contra ambos áfidos, mientras que SCF de las plantas aeropónicas tuvo un efecto selectivo sobre *R. padi*. En general, las fracciones de H y de T fueron más activas que las de W para los experimentos SCC-SCF a excepción de SCE (el más activo), mientras que para los experimentos SCA y SCB no se siguió este patrón. No podemos correlacionar los efectos antifeedant de los extractos del SC con la presencia de ningún compuesto dado.

3.2.2. Bioensayos de fitotoxicidad

Tabla 5. Actividad fitotóxica de extractos seleccionados sobre *L. perenne* y *L. sativa*

extracto	<i>L. Perenne</i>		<i>L. Sativa</i>		
	radicular %C	hoja %C	germinación (%C)		radicular (%C)
			24h	48h	
HDo5	73±0,19*	98±0,13	51±0,58	98±0,40	111±0,11
OSEo5	68±0,20*	91±0,18	100 ± 0	100 ± 0	108±0,09
SCA-H	-	-	30,0±4,1*	87,5±2,5	70±0,07*
SCA-T	-	-	15,0±5,0*	97,5±2,5	106±0,1
SCA-W	88±0,23	99±0,16	30,0±4,1*	97,5±2,5	123±0,13
SCB-H	60±0,22*	80±0,22	20,0±4,1*	90,0±4,1	89±0,10
SCB-T	44±0,18*	61±0,20*	15,0±5,0*	85±6,45	78±0,08*
SCB-W	78±0,13	97±0,12	12,5±4,8*	92,5±4,8	97±0,15
SCC-1	67±0,16*	81±0,13	-	-	-
SCC-2	85,2±0,21	95,4±0,16	-	-	-
SCD-H	80±0,16	78±0,17	52,5±4,8*	100±0,0	97±0,13
SCD-T	88±0,22	99±0,20	46,3±13,8*	100±0,0	109±0,15
SCD-W	-	-	60,0±4,1*	100±0,0	116±0,14
HDo6	67±0,16*	106±0,16	43±1,47	100±0,0	97,6±0,07
OSEo6	76±0,21*	87±0,18	102 ± 2,1	100 ± 0	87± 1,9
SCE-H	84±0,18	85±0,15	85,0±5,0	100±0,0	76±0,09*
SCE-T	72±0,22*	72±0,24*	87,5±2,5	97,5±2,5	101±0,14
SCE-W	-	-	85,0±6,5	100±0,0	115±0,10
HDo8	70±0,1*	87±0,2	12,0±2,5*	95,0±3,0	80,9±0,1
OSEo8	79±0,29	82±0,25	2,5±2,5*	38,0±8,5	117±0,2
SCF-H	40±0,16*	67±0,16*	77,5±4,8*	100±0,0	32±0,08*
SCF-T	52±0,15*	82±0,14	77,5±4,8*	97,5±2,5	53±0,13*
SCF-W	59±0,21*	90±0,24	85,0±2,9	100±0,0	64±0,13*
HDA	84±0,24	113±0,19	-	-	-
OSEA	41±0,13*	35±0,56*	98 ± 1,2	100 ± 0	83 ± 3,6
SCF-H	64±0,21*	72±0,17*	45,0±2,9*	100±0,0	72±0,11*
SCF-T	75±0,24*	84±0,18	45,0±6,5*	100±0,0	120±0,17
SCF-W	83±0,23	88±0,16	60±4,1*	100±0,0	115±0,18

La Tabla 5 muestra los efectos fitotóxicos de los extractos supercríticos, de HD y OSE sobre *L. perenne* y *L. sativa*. Globalmente, los efectos fueron moderados y selectivos hacia *L. perenne*. El crecimiento de raíz de *L. perenne* fue selectivamente afectado por los extractos supercríticos, mientras que el crecimiento de la hoja no cambió significativamente. Sin embargo, algunos extractos como SCB-T, OSEA y SCF-H, afectaron tanto al crecimiento foliar como al radicular.

La germinación de *L. sativa* a las 24 horas se vio afectada por la mayoría de los extractos. Sin embargo, de 48 horas en adelante, dicha germinación no se vio afectada significativamente por ningún tratamiento. Los extractos tradicionales no afectaron al crecimiento de la raíz de *L. sativa*, mientras que algunos de los SC tuvieron un efecto moderado sobre dicho crecimiento (SCA-H, SCB-T, SCE-H y SCF-H).

4. Conclusiones

La extracción con fluidos supercríticos, comparada con las técnicas tradicionales de la extracción, mejoró el rendimiento de 3, de 4, de 8, de 9, de 16, de 17, de 20, de 22 y del I. Además, los extractos supercríticos fueron más activos que los tradicionales sobre *S. littoralis*, y ambos áfidos, alcanzando valores de actividad antialimentaria mayores del 90%. Sus efectos fitotóxicos fueron moderados y selectivos hacia la mala hierba monocotiledónea *L. perenne*. Por lo tanto, el desarrollo de procesos de extracción con CO₂ supercrítico permite el enriquecimiento de compuestos bioactivos en extractos de *Artemisia absinthium* por medio de una técnica medioambientalmente benigna, con independencia del origen de planta puesto que ambas poblaciones (Teruel y Sierra Nevada) cultivadas bajo diversas condiciones dieron lugar a extractos supercríticos más activos que los tradicionales.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido apoyado por MICINN-FEDER (CTQ2009-14629-Co2-01 y CTQ2009-14629-Co2-02), Gobierno de Aragón (PI068-08 y grupo E52) y Gobierno de Aragón-La Caixa-Sumalsa (Proyecto Medio Ambiente Convocatoria La Caixa 2010). L. Martín y L. F. Julio agradecen las becas predoctorales FPU-MICINN (AP2006-02054) y JAE-CSIC. Agradecer a L. Santos y I. Calvillo su asistencia técnica y a S. Carlin su revisión del idioma.

Referencias

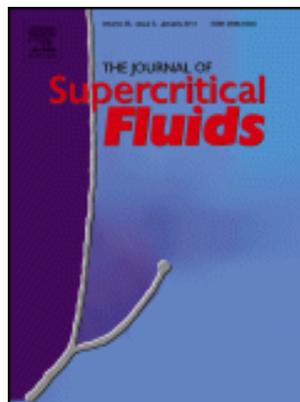
- Aberham, A., Cicek, S., Schneider, P., Stuppner, H., 2010. Analysis of sesquiterpene lactones, lignans, and flavonoids in wormwood (*Artemisia absinthium* L.) using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Mass Spectrometry, reversed phase HPLC, and HPLC-Solid Phase Extraction-Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food. Chem.* 58, 10817-10823.
- Ariño, A., Arberas, I., Renobales, G., Arriaga, S., Dominguez, J.B., 1999. Essential oil of *Artemisia absinthium* L. from the Spanish Pyrenees. *J. Essent. Oil Res.* 11, 182-184.
- Bora, K., Sharma, A., 2010. Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *J. Ethnopharmacol.* 129, 403-409.
- Burgueño-Tapia, E., Castillo, L., González-Coloma, A., Joseph-Nathan, P., 2008. Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene p-benzoquinone perezone and some of its derivatives. *J. Chem. Ecol.* 34, 766-771.
- Bailen, M. 2008. Nuevos agentes de control parasitario y vectorial. (Tesis Doctoral), Universidad Autónoma de Madrid.
- Burillo, J., 2009. Insecticidas repelentes de origen natural, in: Burillo, J., González-Coloma, A. (Eds.), *Insecticidas repelentes de origen natural*. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Zaragoza, pp 19-30.
- Canadanovic-Brunet, J., Djilas, S., Cetkovic, G., Tumbas, V., 2005. Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts. *J. Sci. Food Agric.* 85, 265-272.
- Caner, A., Döskaya, M., Degirmenci, A., Can, H., Baykan, S., Üner, A., Basdemir, G., Zeybek, U., Gürüz, Y., 2008. Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis (*Trichinella spiralis*) in rats. *Exp. Parasitol.* 119, 173-179.
- Carnat, A.P., Madesclaire, M., Chavignon, O., Lamaison, J.L., 1992. cis-Chrysanthenol, a main component in essential oil of *Artemisia absinthium* L. growing in Auvergne (Massif Central), France. *J. Essent. Oil Res.* 4(5), 487-490.
- Chialva, F., Liddle, P.A.P., Doglia, G., 1983. Chemotaxonomy of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Z. Lebensm. Unters. For.* 176, 363-366.
- Chiasson, H., Bélanger, A., Bostanian, N., Vincent, C., Poliquin, A., 2001. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *J. Econ. Entomol.* 94, 167-171.
- Corbu, S., Cachiță-Cosma, D., 2009. Study on the allelopathic action of the watery extract of *Artemisia absinthium* L. upon the germination of the caryopses and of the growth of the plantlets of *Triticum aestivum* L., *Lolium perenne* L. and of *Bromus inermis* L. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii* 19, 295-301.
- Erichsen-Brown, C., 1979. *Use of plants for the past 500 years*, first ed. Breezy Creeks Press, Aurora.
- Erturk, O., Uslu, U., 2007. Antifeedant, growth and toxic effects of some plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* (say.) (Coleoptera, Chrysomelidae). *Fresenius Environ. Bull.* 16, 601-607.
- Gilani, A.H., Janbaz, K.H., 1995. Preventive and curative effects of *Artemisia absinthium* on acetaminophen and CCl₄-induced hepatotoxicity. *Gen. Pharmacol.* 26, 309-315.

- Gonzalez-Coloma, A., Bailen, M., Diaz, C. E., Sanz, J., Martinez-Diaz, R., Cabrera, R., Burillo, J., 2011a. Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L. (Candial® and Sierra Nevada) cultivated under different environmental conditions. *Biochem. Syst. Ecol* (submitted).
- Gonzalez-Coloma, A., Bailen, M., Diaz, C. E., Fraga, B. M., Martinez-Diaz, R., Zuñiga G. E., Contreras R., Burillo, J., 2011b. Chemical and biological (antifeedant and antioxidant effects) fingerprinting of two *Artemisia absinthium* L. populations (Candial® and Sierra Nevada) cultivated under different environmental conditions. *Ind. Crop* (in preparation).
- Halbert, S., Corsini, D., Wiebe, M., Vaughn, S., 2009. Plant-derived compounds and extracts with potential as aphid repellents. *Ann. Appl. Biol.* 154, 303-307.
- Ivanescu, B., Vlase, L., Corciova, A., Lazar, M., 2010. HPLC-DAD-MS study of polyphenols from *Artemisia absinthium*, *A. annua*, and *A. vulgaris*. *Chem. Nat. Compd.* 46, 468-470.
- Jaenson, T.G.T., Palsson, K., Borg-Karlson, A., 2005. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. *Med. Vet. Entomol.* 19, 345-352.
- Juteau, F., Jerkovic, I., Masotti, V., Milos, M., Mastelic, J., Bessièrè, J., Viano, J., 2003. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Med.* 158-161.
- Karp, F., Croteau, R., 1982. Evidence that sabinene is an essential precursor of C(3)-oxygenated thujane monoterpenes, *Arch. Biochem. Biophys.* 216, 616-624.
- Kaul, V., Nigam, S., Banerjee, A., 1978. Insecticidal activity of some essential oils. *Indian J. Pharm.* 40, 22-26.
- Kordali, S., Aslan, I., Çalmasur, O., Cakir, A., 2006. Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Ind. Crops Prod.* 23, 162-170.
- Langa, E., Cacho, J., Palavra, A., Burillo, J., Mainar, A., Urieta, J., 2009. The evolution of hyssop oil composition in the supercritical extraction curve: Modelling of the oil extraction process. *J. Supercrit. Fluids* 49, 37-44.
- Martín, L., Mainar, A., González-Coloma, A., Burillo, J., Urieta, J., 2011. Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *J. Supercrit. Fluids* 56, 64-71.
- Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S., 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A* 1163, 2-24.
- Reis-Vasco, E.M.C., Coelho, J.A.P., Palavra, A.M.F., 1999. Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation. *Flavour Fragrance J.* 14, 156-160.
- Reverchon, E., De Marco, I., 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids* 38, 146-166.
- Reverchon, E., Donsi, G., Sesti Osseo, L., 1993. Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices. *Ind. Eng. Chem. Res.* 32, 2721-2726.
- Tariq, K., Chishti, M., Ahmad, F., Shawl, A., 2009. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Vet. Parasitol.* 160, 83-88.
- Valdes, A., Martinez, J., Lizama, R., Vermeersch, M., Cos, P., Maes, L., 2008. In vitro antimicrobial activity of the Cuban medicinal plants *Simarouba glauca* DC, *Melaleuca leucadendron* L and *Artemisia absinthium* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 615-618.

Vogt, D.D., Montagne, M., 1982. Absinthe: behind the emerald mask. *Int. J. Addict.* 17, 1015-1029.

Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. Mc Lafferty FW & Stauffe DB, New York, 1989.

Supercritical CO₂ Extraction of Persea indica: Effect of Extraction Parameters, Modeling and Bioactivity of its Extracts



Extracción con CO₂ supercrítico de *Persea indica*: efecto de los parámetros de extracción, modelado y bioactividad de sus extractos

Resumen

El objetivo del trabajo fue optimizar la extracción de los compuestos bioactivos de *Persea indica* L. por medio de la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y analizar sus efectos insecticidas. *Persea indica* L. es una de la especies dominantes del bosque de laurisilva canario, una reliquia de la flora terciaria. Diversas condiciones de extracción (presión, tamaño de partícula del material vegetal, temperatura, flujo del CO₂) y la influencia del modificador fueron investigadas y la evolución de los compuestos extraídos analizada por HPLC-MS. Una comparación con técnicas convencionales tales como la hidrodestilación (HD) o la extracción con disolventes orgánicos (OSE) también fue presentada. Particularmente, fueron estudiadas cuatro densidades del CO₂, de 628,61 kg/m³ a 839,81 kg/m³ en el rango de 10,0-20,0 de MPa y 40-50 °C. Los extractos contuvieron ryanodanos insecticidas de gran interés, descritos previamente como componentes insecticidas de *P. indica*. La actividad antialimentaria sobre insectos de extractos seleccionados fue examinada. Un modelo basado en ecuaciones de la transferencia total, el modelo de Sovová, fue aplicado con éxito para correlacionar los datos experimentales.

Palabras clave: *Persea indica*; Extracción con Fluidos Supercríticos; Ryanodanos; Modelo de Sovová; Extracción con Disolventes Orgánicos.

1. Introducción

El objetivo de la química verde es obtener, productos seguros de calidad por medio de procesos limpios y ambientalmente amigables [1]. La necesidad de desarrollar pesticidas ecológicos es urgente, debido al aumento de los requisitos de seguridad de un pesticida. Los pesticidas de origen biológico son muy eficaces, no tóxicos para los animales de sangre caliente y tienen tiempos muy cortos de degradación en presencia de aire y de luz. Los biopesticidas basados en productos naturales son extraídos tradicionalmente con disolventes orgánicos, una fuente de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que contribuyen a los niveles elevados del CO₂ que contribuyen al cambio climático. La extracción con fluidos supercríticos (SFE), una técnica avanzada de separación que cumple con los principios de la Química Verde, representa una alternativa válida a los métodos tradicionales de extracción. SFE puede generar productos de alto valor añadido sin degradación termal como en la hidrodestilación (HD) o sin el uso masivo de disolventes orgánicos, como en la extracción con disolventes orgánicos (OSE) [2], [3], [4]. Se han realizado varias tentativas de obtener biopesticidas con SFE de material vegetal. Las piretrinas, compuestos insecticidas del *Pyrethrum*, han sido extraídos con éxito por medio de SFE por Della Porta y otros. [5] y por Kiriamiti y otros. [6],[7]. Las azadiractinas, tetranortriterpenoides insecticidas encontrados en el árbol del neem, también han sido obtenidos con SFE por Tonthubthimthongs y otros. [8] y Ambrosino y otros. [9].

Persea indica L. es una de las especies dominantes del bosque del laurel de Canarias y es una reliquia de la flora terciaria [10]. Esta planta se ha mostrado como fuente potencial de agentes de control de insectos debido a su contenido en ryanodanos [11], [12].

Los ryanodanos (compuestos similares al ryanodol), comparados con el ryanodine, son tóxicos más selectivos [13] para los insectos que para los mamíferos. El Ryanodine no discrimina entre los insectos y los mamíferos porque afecta un grupo de canales del calcio encontrados en las células esqueléticas y del músculo cardíaco [14].

El objetivo de este estudio fue optimizar y evaluar la capacidad de extracción de compuestos bioactivos de *Persea indica* mediante la extracción con fluidos supercríticos. Se evaluaron cuatro densidades de CO₂ [15] a tres presiones diferentes (entre 10,0 a y 20,0 MPa) y a dos temperaturas (40 y 50 °C). El rango de densidades permitió estudiar medias (628,61 kg/m³ que corresponden a 10,0 MPa y 40 °C) y relativamente altas densidades (839,81 kg/m³ que corresponden a 20,0 MPa, 40 °C). Dos diversos tamaños de partícula y tres flujos de disolvente fueron estudiados. Además, la influencia del etanol como modificador de la SFE también fue investigada. La evolución de la composición del extracto para cada experimento fue monitorizada mediante análisis cromatográfico (GC-MS y HPLC-

MS) y se estableció una comparación con los aceites esenciales obtenidos por HD y los extractos obtenidos por OSE con hexano y etanol.

Es muy importante aplicar modelos que permitan la correlación y la extrapolación de datos experimentales para un posible uso industrial del proceso SFE. Los modelos usados aquí fueron el propuesto por Sovová [16] y el propuesto por Naik [17].

Los efectos antialimentarios de las fracciones de SFE y de los obtenidos por técnicas tradicionales fueron probados contra *S. littoralis*, el insecto más sensible a los ryanodanos [18]. *S. littoralis* es un artrópodo de la orden lepidóptera y es bien conocido por su voracidad extrema y su gregarismo. Se alimentan a base de patata, tomate, y frutas entre otras [19].

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación del material vegetal y caracterización

Las ramas de *Persea indica* fueron recogidas en Monte de las Mercedes, Tenerife, España (2009) y secadas al aire. El contenido en agua fue del 7%, determinado por una estufa desecante (Selecta). Las hojas fueron molidas en lotes de 0,2 kilogramos durante 10 s en un molinillo eléctrico (MKM6000, Bosch). Durante la molienda, el material vegetal fue refrescado con nitrógeno líquido para evitar pérdidas de compuestos volátiles. La selección de tamaño de partícula se realizó mediante un tamiz vibrador (0,56 y 0.26 milímetros). Los tamaños de partícula fueron el resultado de las masas recogidas entre los tamices con diámetros de poro de 0,71 milímetros y 0,40 milímetros para el tamaño más grande y 0,40 milímetros y 0.12 milímetros para el más pequeño. Las muestras molidas fueron almacenadas a -15 °C.

2.2. Aparatos de SFE, extracción con disolventes orgánicos e hidrodestilación

La planta de SFE usada aquí se ha descrito previamente [20],[21]. Fue construida según Reis Vasco y otros [22]. Los componentes principales son una bomba de compresión, un filtro, un recipiente de extracción de 1 L y dos separadores (V: 0.18 L cada uno), uno se enfría para la recuperación de las ceras cuticulares [23] y el otro para la recuperación del aceite volátil. Las temperaturas en el recipiente y los separadores de la extracción fueron mantenidas constantes con la ayuda de chaquetas con líquidos de termostatación. Otros elementos importantes incluyen un cilindro refrigerador de 0,5 L, un intercambiador de calor, un back-pressure y un caudalímetro-totalímetro del CO₂. Existen varias válvulas que conectan las diversas secciones de la planta experimental. La presión y la temperatura fueron medidas y/o controladas con manómetros, un transductor de presión, termopares, y reguladores de temperatura.

El procedimiento experimental se ha descrito previamente [24]. 90 g de hojas trituradas de *Persea indica* se introducen en el recipiente de extracción con varios materiales inertes porosos (esferas de cristal, esponjas del níquel y filtros de vidrio), de forma simétrica con el material vegetal colocado en el centro. Los elementos porosos se usaron para conseguir un flujo uniforme del fluido supercrítico. Una vez que el extractor y los separadores alcanzan la temperatura de trabajo, se enciende la bomba con el caudal deseado y las válvulas mantienen la presión deseada. El flujo de CO₂ al segundo separador se manipula abriendo dos válvulas de aguja a intervalos de tiempo fijos para recoger y pesar el aceite. Todos los experimentos se finalizaron después de 11 horas de extracción o cuando la pendiente de la curva de extracción fuera menor del 10 % de la pendiente máxima en los inicios de la misma.

Para determinar el grado de agotamiento de la matriz, se realizaron varios experimentos de SFE de forma similar, pero en estos casos el material vegetal ya había sufrido un experimento de SFE. En algunos casos se añadieron 50 mL de etanol (99,9 % Scharlau) antes de que se le realizara esta segunda extracción. El extractor se despresuriza, se abre y se le añade el modificador antes de la segunda extracción. El experimento también se finalizó siguiendo el mismo criterio puesto anteriormente. El etanol en las fracciones se retiró usando un rotavapor.

El aceite esencial fue obtenido mediante un hidrodestilador Clevenger hecho en la Facultad de Ciencias, Zaragoza, España. La hidordestilación se realizó durante 4 horas usando 40 gramos de material vegetal.

Las OSE se realizaron en un Soxhlet con un cuerpo extractor de 0,125 L y un matraz de 0,1 L. Alrededor de 10 g de material vegetal se introdujeron en un cartucho celulósico. Se realizaron dos experimentos de extracción (20 horas cada uno), uno con hexano (99 % Panreac) y otro con etanol (99,9% Scharlau). Ambos disolventes se eliminaron del extracto usando un rotavapor.

2.3. Análisis de los extractos

La composición de los extractos fue determinada usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) para el aceite esencial o usando un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS) para los extractos obtenidos con SFE o con OSE.

Se usó un GC Trace GC 2000 Series Thermo Quest con detector de llama (FID) y un inyector de Split equipado con una columna capilar de sílica fundida (DB-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). El gas portador fue helio (99,9990%, Abelló Linde) con un caudal de 1,3 mL/min. La temperatura tanto del inyector como del detector fue de 310 °C. La rampa de temperatura fue de 65-300 °C a 6 °C/min, manteniéndose 20 minutos a la temperatura final. Se inyectaron muestras de 0,1 µL con un ratio de Split de 1:50. La identificación de los compuestos fue hecha mediante comparación con tiempos de retención de estándares, con la base de datos del NIST 08 o mediante comparación con Índices de Retención de Kovats [25] de la

bibliografía. La proporción de cada compuesto en el aceite fue hecha mediante el porcentaje de área en el cromatograma. Se usó un cromatógrafo líquido Finnigan Surveyor Scientific Waters acoplado a un Finnigan LCQ Deca ion trap MS. Las muestras se analizaron en una columna Luna C18(2), Phenomenex® (tamaño de partícula 5 µm, 250 mm × 4,6 mm) a temperatura ambiente. El método usado es similar al que aparece en literatura [26]. El flujo de la fase móvil, 1mL/min, consistió en un gradiente de metanol (pureza HPLC, Sigma Aldrich) y agua (pureza HPLC, Sigma Aldrich) con las siguientes características: gradiente lineal de 10 % MeOH a 100 % MeOH en 45 minutos y después 15 minutos de 10 % MeOH 90 % agua. El voltaje de la fuente fue de 4,5 kV y la temperatura del capilar 325 °C. La recogida de datos se llevó a cabo en modo de escaneo completo en modo positivo (m/z=50-700). La calibración se llevó a cabo con estándares de ryanodol, cinnzeylanol, y cinnzeylanina aislados por el Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC). Se prepararon diferentes disoluciones en MeOH (pureza HPLC) a partir de una disolución de 100ppm (0,5mg de compuesto en 5 ml de MeOH grado HPLC).

2.4. Bioensayos sobre insectos

La colonia de *Spodoptera littoralis* fue alimentada con dieta artificial y mantenida a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, >70% humedad relativa con un fotoperíodo de 16:8 h (Luz:oscuridad) en una cámara de crecimiento. Los bioensayos se llevaron a cabo con ejemplares nuevos de *S. littoralis* en su estado larval L6 como se describe en Burgueño-Tapia et al [27]. Discos de hojas de *Capsicum annum* o *Solanum tuberosum* (1,0 cm²) fueron tratados en su superficie superior con 10 µl del extracto a investigar (5 µg/µl acetona, 99 % Panreac). Tres larvas de *Spodoptera littoralis* se colocaron en una placa Petri con cuatro discos de 1 cm² (dos tratados con extracto y dos controles sólo con disolvente; de 5 a 10 placas Petri en total por extracto testado). Cada extracto fue testado tres veces. Cada ensayo se finaliza después del consumo de alrededor del 50–75% de los discos de control. La inhibición a la alimentación (FI %) fue calculada usando la ecuación 1

$$\% \text{FI} = [1 - (T/C)] \times 100 \quad (1)$$

donde T y C son las áreas consumidas de hojas tratadas y control respectivamente. Estos ensayos de alimentación fueron estadísticamente evaluados mediante el Wilcoxon signed rank test [28].

3. Resultados y discusión

3.1. Evaluación del rendimiento y de la composición

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de extracción de compuestos bioactivos de *Persea indica* mediante el CO₂ supercrítico. Tres diversas presiones, dos temperaturas, dos tamaños de partícula y tres flujos del CO₂ fueron utilizados para optimizar la SFE de hojas de *P. indica*. Además, la presencia o la ausencia de modificador y el uso de una extracción por pasos también fueron

investigados. Las condiciones experimentales y los rendimientos de las diversas extracciones se presentan en la Tabla 1. Para comparar, los rendimientos de las técnicas convencionales tales como HD u OSE también se incluyen.

Tabla 1. Condiciones experimentales y rendimientos (en separador 2) de las diferentes extracciones de *Persea indica*.

Experimento	Material	Entrainer	SFE					
			P (MPa)	T (°C)	Φ (mm)	ρ _{sc} (kg/m ³)	Caudal (kg/h)	Y (%)
E1	nuevo	no	10,0	40	0,56	628,6	1,08	0,40
E2	nuevo	no	15,0	40	0,56	780,2	1,08	0,74
E3	nuevo	no	20,0	40	0,56	839,8	1,08	1,13
E4	nuevo	no	20,0	40	0,56	839,8	1,44	1,08
E5	nuevo	no	20,0	40	0,26	839,8	1,08	1,00
E6	nuevo	no	20,0	50	0,56	784,3	1,08	0,52
E7	extraído en E1	no	20,0	40	0,56	839,8	1,08	0,97
E8	extraído en E7	50 ml EtOH	20,0	40	0,56	839,8	0,80	0,63
E9	extraído en E3	50 ml EtOH	20,0	40	0,56	839,8	0,80	0,31
Técnicas convencionales								
Experimento	Material	Y (%)						
HD	nuevo	0,001						
OSE etanol	nuevo	25,46						
OSE hexano	nuevo	8,47						

$$Y (\%): \text{rendimiento global del aceite recogido. } Y = \frac{\text{mass de extracto}}{\text{mass de planta seca}} \times 100$$

Φ: Tamaño de partícula del material vegetal.

Las hojas de *P. indica*, como se puede observar en la Tabla 2, tienen un bajo contenido en aceites volátiles, con una composición similar a las anteriormente reportadas [29], [30].

Tabla 2. Composición del aceite esencial de *Persea indica*. Comparación de resultados experimentales con los encontrados en literatura.

compuesto	% este trabajo	% Scora et al, ²⁹	% Pino et al, ³⁰
α-cubebeno	0,94	0,21	0,2
β-cariofileno	21,51	17,7	11,0
β-bourboneno	2,08	0,13	0,9
α-humuleno	2,29	1,84	1,7
germacreno D	4,93	14,7	5,8
δ-cadineno	29,02	4,95	3,3
α-muroleno	1,11	1,82	1,5
óxido de cariofileno	6,08	0,86	4,0

²⁹Scora et al.: material recolectado en California, 1991.

³⁰Pino et al.: material recolectado en Madeira, enero 2002.

Independientemente de los bajos rendimientos obtenidos mediante hidrodestilación, los rendimientos de SFE y de OSE alcanzaron valores interesantes. Los OSE tienen los rendimientos más altos debido a que extrae más componentes y más pesados de la matriz de la planta. Esto es causado por el tiempo de residencia mayor de los disolventes, por la recirculación del disolvente puro cada 5 minutos, por el mayor poder disolvente, y en el caso del etanol, por su polaridad.

Al trabajar con SFE es deseable separar compuestos de elevado peso molecular, como las ceras cuticulares, de compuestos más ligeros. Para ello se usan dos separadores, los más pesados precipitan en el primer separador mientras que los más ligeros lo hacen en el segundo [31]. Las condiciones de temperatura y presión de los separadores fueron las siguientes: -5 °C, 8,0 MPa en el separador 1 (SP1) y 10 °C, 2,0 MPa en el separador 2 (SP2). El extracto de SP1 fue recogido solamente al final del experimento completo para evaluar la eficacia del fraccionamiento. Los porcentajes de los compuestos buscados en SP2 se muestran en la Tabla 3 junto con los porcentajes en los extractos obtenidos por técnicas tradicionales. Las estructuras moleculares de los compuestos buscados se muestran en la Figura 1.

Tabla 3. Porcentajes en masa [(g de compuesto/g de extracto)*100] de los compuestos de interés encontrados en los extractos OSE y SFE (recogidos en el separador 2 durante la extracción). Ch indica los puntos iniciales de las curvas de extracción, mientras que Ct indica los últimos.

compuesto	MW	HD	OSE EtOH	OSEHex	E1		E2		E3		E4	
					Ch	Ct	Ch	Ct	Ch	Ct	Ch	Ct
cinnzeylanina	425,4	-	7,39	1,88	-	-	-	-	-	2,95	-	2,62
ryanodol	399,7	-	9,30	0,64	-	-	-	-	-	-	-	-
cinnzeylanol	383,7	-	22,36	8,70	-	0,63	0,97	1,86	1,64	11,19	0,77	10,72

	MW	HD	OSE EtOH	OSEHex	E5		E6		E7		E8		E9	
					Ch	Ct	Ch	Ct	Ch	Ct	Ch	Ct	Ch	Ct
cinnzeylanina	425,4	-	-	3,15	-	-	1,54	6,12	11,19	23,38	9,64	18,97	-	-
ryanodol	399,7	-	-	-	-	-	-	-	2,12	2,54	1,85	2,15	-	-
cinnzeylanol	383,7	-	2,65	12,87	0,75	1,79	4,41	15,11	9,73	9,16	8,36	7,86	-	-

MW: Peso molecular.

HD: Hidrodestilado.

OSE EtOH: Extracción Soxhlet con etanol

OSE Hex: Extracción Soxhlet con hexano

E1-E9: Experimentos con fluidos supercríticos (leyenda en Tabla 1)

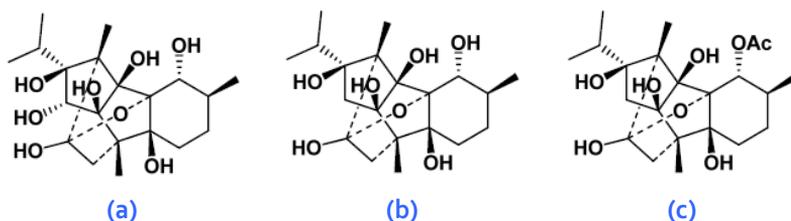


Figura 1. Compuestos bioactivos de los extractos de *Persea indica*. a) ryanodol. b) cinnzeylanol. c) cinnzeylanina.

De los resultados en la Tabla 3, puede ser visto que los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación no contienen los compuestos bioactivos (ryanodol, cinnzeylanol o cinnzeylanine). Esta ausencia se puede explicar por los altos pesos moleculares de los mismos. El contenido volátil de los extractos de OSE y de SFE no fue examinado debido a los bajos rendimientos de la hidrodestilación. El extracto de OSE-EtOH contuvo cinnzeylanol como el compuesto principal. Los extractos de los experimentos E2-E7 también contuvieron este compuesto solamente o conjuntamente con cinnzeylanina en concentraciones más bajas que el extracto de OSE-EtOH. Ryanodol, el diterpeno más polar, apareció en los experimentos E8 y Eg debido a la presencia de EtOH como modificador.

El rendimiento total del aceite obtenido por SFE en SP2 o mediante técnicas tradicionales fue calculado como Y (%), Ec. (2):

$$Y = \frac{\text{masa de extracto}}{\text{masa de planta seca}} \times 100 \quad (2)$$

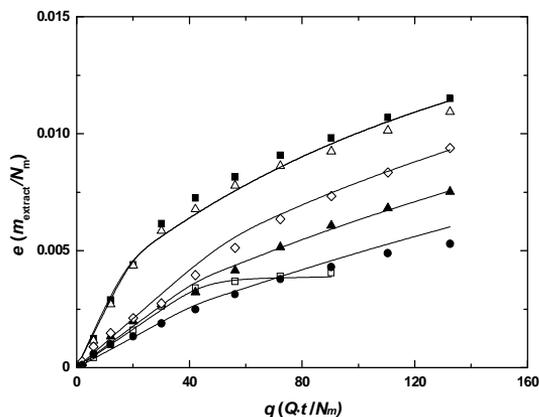


Figura 2. Curvas de SFE para diferentes experimentos. Rendimiento normalizado de extracción, e (m_{extracto}/N_m) vs cantidad relativa de disolvente pasado, q . E1(\square): 10,0 MPa, 40 °C, $\phi=0,56$ mm, 1,08 kg/h. E2(\blacktriangle): 15,0 MPa, 40 °C, $\phi=0,56$ mm, 1,08 kg/h. E3(\blacksquare): 20,0 MPa, 40 °C, $\phi=0,56$ mm, 1,08 kg/h. E4(Δ): 20,0 MPa, 40 °C, $\phi=0,56$ mm, 1,44 kg/h. E5(\diamond): 20,0 MPa, 40 °C, $\phi=0,26$ mm, 1,08 kg/h. E6(\bullet): 20,0 MPa, 50 °C, $\phi=0,56$ mm, 1,08 kg/h.— modelo de Sovová.

La variación del e_{exp} con q para los distintos experimentos se muestra en la Figura 2. Esas magnitudes serán explicadas en la sección 3.3 y corresponden al rendimiento experimental de la extracción y a la cantidad relativa del solvente pasado respectivamente. De los datos vistos en la Tabla 1 y la Figura 2, es evidente que el rendimiento final de SFE aumenta al aumentar la densidad. Langa y otros. [20], [21] han demostrado un patrón similar para varias extracciones. Se puede observar también que una reducción de tamaño de partícula más allá de 0,56 milímetros, como en E5, da lugar a una disminución del rendimiento de extracción, debido al efecto de los canales preferenciales (*caking* o *channelling* en inglés) asociados a los tamaños de partícula pequeños [32]. Un mayor flujo, en el rango estudiado, no afecta al rendimiento de la extracción (E3 y E4). Todos los SFE alcanzan mayores rendimientos que el HD, con un rendimiento del 0,001%, similar a los encontrados en literatura [29], [30]. Sin embargo, en la mayor parte de los experimentos de SFE, no se alcanza la región asintótica debido a que los tiempos de la extracción son largos (los experimentos son finalizados después de 11 horas). Estos tiempos largos de extracción implican una dificultad añadida comparada a otros materiales.

3.2. Agotamiento de la matriz y efecto del cosolvente

El grado de agotamiento de la matriz fue investigado realizando una serie de los experimentos de SFE (E7-E9) sobre material de planta previamente extraído. La influencia de una extracción por etapas fue investigada por los experimentos 7 y 8, mientras que la influencia del cosolvente fue investigada en los experimentos 8 y 9. E7 fue realizado con material vegetal proveniente de E1, pero forzando las condiciones (llevando a cabo un segundo experimento de extracción a 20,0 MPa en lugar de 10,0 MPa).

La Figura 3 muestra la combinación de curvas de extracción de diversos experimentos. La adición de las curvas de extracción de E1 y E7 resulta en un rendimiento global similar al obtenido hipotéticamente si se extrapola el modelo de Sovová (explicado en la sección 3.3) para los resultados experimentales de E3 para la misma cantidad de solvente.

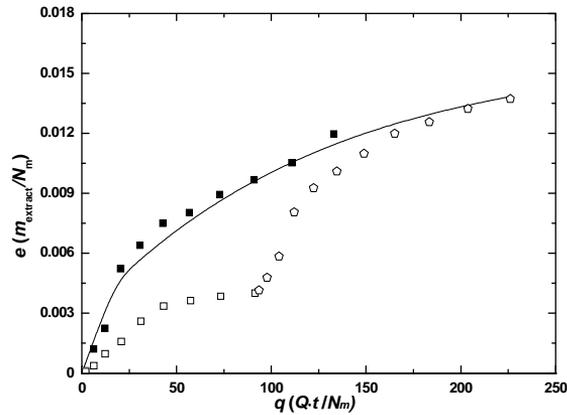


Figura 3. Curvas SFE para varios experimentos. Rendimiento normalizado de extracción, e (m_{extract}/N_m) vs cantidad relativa de disolvente pasado, q . Efecto de la extracción por etapas. E1(\square): 10,0 MPa, 40 °C, $\phi = 0,56$ mm, 1,08 kg/h. E3(\blacksquare): 20,0 MPa, 40 °C, $\phi = 0,56$ mm, 1,08 kg/h. E7(\triangle): 20,0 MPa, 40 °C, 1,08 kg/h, material vegetal de E1. — modelo de Sovová.

Esto es importante porque se ha realizado un fraccionamiento manteniendo el rendimiento global. Según se observa en la Tabla 3, si las composiciones de los extractos de los experimentos 1, 3 y 7 se comparan, las fracciones obtenidas en E7 se enriquecen en los compuestos más pesados y más polares.

Para analizar el efecto del etanol como modificador del SFE, se realizaron dos experimentos adicionales (E8 y E9) con material vegetal previamente extraído. En una mano, en E8, el material de planta había experimentado ya un SFE de dos etapas (E1: 10,0 MPa, E7: 20,0 MPa). Por otra parte, E9 fue llevado a cabo con un material que había experimentado solamente una SFE (E3: 20,0 MPa). En ambos experimentos, 50 ml de etanol fueron agregados antes de la extracción y los experimentos fueron finalizados cuando la región asintótica fue alcanzada. En la Figura 4, los experimentos con el entrainer (E8, E9) se muestran en sólido para distinguirlos de los experimentos normales de SFE.

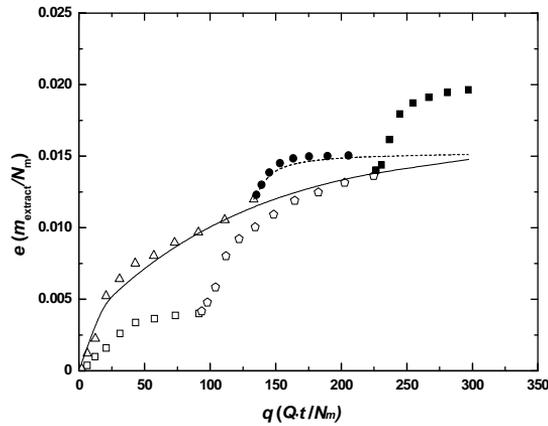


Figura 4. Curvas SFE para varios experimentos. Rendimiento normalizado de extracción, e (m_{extract}/N_m) vs cantidad relativa de disolvente pasado, q . Efecto del etanol como modificador de la SFE. E1(\square): 10,0 MPa, 40 °C, $\phi=0,56$ mm, 1,08 kg/h. E3(Δ): 20,0 MPa, 40 °C, $\phi=0,56$ mm, 1,08 kg/h. E7(\circ): 20,0 MPa, 40 °C, 1,08 kg/h, material vegetal de E1. E8(\blacksquare): 20,0 MPa, 40 °C, 1,08 kg/h, material vegetal de E7, 50 mL etanol. Eg(\bullet): 20,0 MPa, 40 °C, 1,08 kg/h, material vegetal de E3, 50 mL etanol. — modelo de Sovová. --- modelo de Naik.

La Figura 4 muestra que tres extracciones consecutivas, la última de ellas con etanol como entrainer (E1 + E7 + E8) rindió más que una extracción en dos etapas, la última de ellas también con etanol como entrainer (E3 + Eg). La extracción de dos etapas fue extrapolada con el modelo de Naik (explicado en la sección 3.3) para alcanzar la misma cantidad de disolvente con propósitos comparativos. Ambas extracciones por etapas con etanol como modificador obtuvieron rendimientos más altos que la extracción sin el modificador (E3). Para poder comparar extracciones, el modelo de Sovová fue utilizado para extrapolar la curva de E3 para alcanzar la misma cantidad de disolvente. De estos resultados puede ser concluido que la adición del etanol en los primeros compases de la extracción, (como en Eg, con el material de planta de E3) no representa una ventaja al llevar a cabo una extracción. Mientras se extrae el etanol, se extraen algunos compuestos más pesados y más polares, pero también algunos compuestos menos pesados también se co-extraen. Por otra parte, (como en E8, con el material de planta de E1 y de E7), si la adición del etanol se hace cuando se ha extraído la mayoría de compuestos menos pesados, el etanol ayuda al CO_2 a extraer una mayor cantidad de compuestos más pesados, aumentando el rendimiento de la extracción. Para explicar este fenómeno, si una extracción adicional fuera realizada con el material de planta de Eg empapado con etanol, la curva de la extracción mostraría la forma escalonada semicontinua típica, aumentando su rendimiento al de E8, pero teniendo que empapar dos veces el material de planta. Ambas extracciones por etapas con etanol como modificador alcanzaron rendimientos más altos que las

extracciones sin modificador. Se podrían realizar etapas adicionales de extracción si se añadiera consecutivamente etanol para cada una de las mismas.

3.3. Modelado del proceso de extracción supercrítica

Se aplicaron dos modelos para extrapolar los resultados experimentales, Sovová y Naik. El último es un modelo empírico que viene descrito por la siguiente ecuación, Ec. (3).

$$e_{exp} = (e_{\infty} \cdot q) / (B + q) \quad (3)$$

donde e_{exp} es el rendimiento (normalizado por el material vegetal) a cualquier tiempo, e_{∞} es el rendimiento a un tiempo infinito de extracción, q es la cantidad de disolvente pasada (normalizada por el material vegetal) y B un parámetro de ajuste, identificado con la masa de CO₂ necesaria para alcanzar la mitad de e_{∞} . Este modelo solo ha sido aplicado al experimento E_g porque se tenía que modelar un solo experimento que además presentaba unas condiciones especiales (uso de modificador sobre material extraído previamente). Los resultados del modelado se pueden observar en la Figura 4 (línea discontinua).

Siguiendo el modelo de Sovová, en el cual el aceite se trata como un componente único [16], el rendimiento experimental para cada fracción, e_{exp} fue calculado de acuerdo a la Ec. (4) y la cantidad de disolvente pasada, q , se obtuvo mediante la Ec. (5)

$$e_{exp} = E / N_m \quad (4)$$

$$q = Qt / N_m \quad (5)$$

donde E es la cantidad de extracto (kg), N_m la carga de sólido insoluble (kg), Q el flujo de disolvente (kg/s) y t el tiempo de extracción (s). La carga de sólido insoluble, N_m , se calculó como se describe en las siguientes ecuaciones:

$$N_m = (1 - c_v) \cdot M \quad (6)$$

$$c_v = x_v / (1 + x_v) \quad (7)$$

donde c_v es el contenido de soluto en el sólido sin tratar (kg(soluto)/ kg(sólido)), M , la carga de sólido en el extractor (kg) y x_v , la concentración en el sólido sin tratar (kg(soluto)/ kg(sólido insoluble)). La variación de e_{exp} con q para los diversos experimentos y los valores teóricos aparecen en la Figura 2.

El conocimiento de dónde el aceite esencial está situado en la planta es un asunto difícil. La Figura 5 muestra las hojas de *P. indica*, observándose tricomas no glandulares o pelos (Fig. 5a) y tricomas glandulares (Figura 5b). Los pelos ayudan a reducir la evaporación de la hoja mientras que los tricomas glandulares acumulan el aceite. La Figura 5 muestra por medio de un microscopio electrónico de barrido (SEM) Hitachi S3400 del Instituto de Carboquímica de Zaragoza, España, la hoja de *P. indica* después de triturar y antes del proceso de extracción.

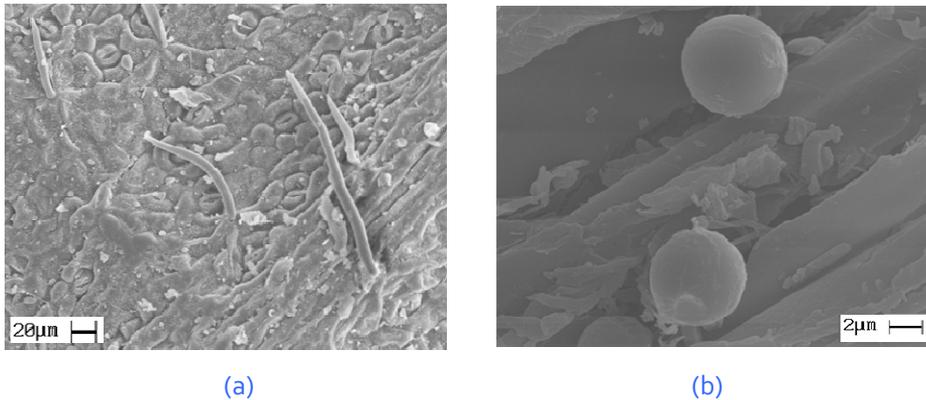


Figura 5. Imágenes SEM images de la superficie de una hoja de *Persea indica* después del triturado y antes de la extracción. a) un grupo de tricomas no glandulares (150 X). b) dos tricomas glandulares (3000 X).

Sovová [16] ha construido un modelo para demostrar la distribución del aceite en la estructura compleja de las plantas para formular el proceso de extracción. Este modelo proveyó resultados satisfactorios para todos los experimentos modelados E1-E6.

Sovová [16] ha ideado un modelo para demostrar la distribución de aceite esencial en la estructura de planta para formular el proceso de la extracción. Este modelo propuesto por Sovová nos proveyó resultados satisfactorios. Se basa en varios equilibrios totales en el lecho de la extracción y establece que el material extractable está contenido en una estructura esférica con las células quebradas en una capa externa y las células intactas en el núcleo, donde r es la eficiencia de la molienda (la fracción volumétrica de células quebradas). El soluto se asume distribuido homogéneamente en el sólido sin tratar. El soluto fácilmente accesible de las células quebradas se transfiere directamente a la fase fluida, mientras que el soluto de las células intactas primero se transfiere a las células quebradas y después a la fase fluida. Esto conduce a que las curvas de la extracción (e_{exp} vs q) tengan dos partes, cada una que corresponde a uno de estos procesos de transferencia.

Sovová [16] tomó en consideración varios tipos de patrones del flujo y varias matrices de planta, conduciendo a la descripción de varias situaciones en su modelo. Particularmente, cuando existe una interacción de soluto-matriz, el soluto nunca satura la fase fluida; y aparece una transición suave entre la primera parte de la curva de la extracción y su final.

Según el protocolo propuesto por Sovová y algunos resultados anteriores obtenidos por Coelho et al. [33], las ecuaciones convenientes para la obtención de los datos experimentales del SFE del ajeno fueron las que correspondían al

modelo del equilibrio. En este modelo del equilibrio, e_{cal} fue relacionado con el parámetro de q según Eq. (8) para la primera parte de la curva y a la Eq. (9) para la segunda parte

$$e_{cal} = q \frac{Kx_u}{1 + K(\gamma/r)} = qy_0 \quad \text{para } 0 \leq q \leq q_c \quad (8)$$

$$e_{cal} = x_u [1 - C_1 \exp(-C_2 q)] \quad \text{para } q > q_c \quad (9)$$

Donde K es el coeficiente de partición, x_u es la concentración en el sólido sin tratar, r es la eficiencia en la molienda, γ es el ratio disolvente-matriz en el lecho de extracción, y_0 es la llamada solubilidad del aceite esencial en el CO₂ supercrítico, que es la pendiente de la curva cuando se representa e_{exp} vs q , q_c es la cantidad relativa de disolvente pasado cuando todo el soluto en las células rotas ha sido extraído, y C_1 y C_2 son parámetros de ajuste. K , γ , y r se obtienen simultáneamente con el proceso de ajuste.

Otras propiedades necesarias para aplicar el modelo son la porosidad del lecho, ϵ , la densidad del sólido, ρ_s , y la densidad del lecho (0,380 y 0,400 kg/m³ para 0,56 y 0,26 mm respectivamente), ρ_b . La porosidad del lecho (0,62 para 0,56 mm y 0,60 para 0,26 mm) fue calculada usando las densidades reales y aparentes de acuerdo con Reis Vasco et al. [22]. La densidad aparente del lecho fue calculada usando el volumen del lecho y la masa de material vegetal en el lecho.

La correlación de los datos experimentales se llevó a cabo usando la herramienta de Excel Solver minimizando la función RSMD² definida como

$$RSMD^2 = \frac{\sum_{i=1}^{i=N} \left(\frac{e_{exp} - e_{cal}}{e_{exp}} \right)^2}{N} \quad (10)$$

Los valores estimados aparecen en la Figura 2. Se puede observar una buena correlación entre los resultados experimentales y los ajustes. Los valores de los principales parámetros de ajuste se recogen en la Tabla 4 junto con los valores de RSMD².

Tabla 4. Valores de los principales parámetros obtenidos con el modelo de Sovová y valores de RSMD² para cada experimento

Experimento	ρ_{sc} (kg/m ³)	x_u	y_0	γ	r	$k_s a_s x$ 10^6 (s ⁻¹)	$k_f a_o$ (s ⁻¹)	q_c	C_1	C_2	RSMD ²
E1	628,61	0,016	0,000082	1,36	0,23	0,205	0,52	40	0,77	0,00020	0,037
E2	780,23	0,016	0,000085	1,69	0,23	9,85	0,52	40	0,92	0,0042	0,028
E3	839,81	0,016	0,00023	1,81	0,23	12,5	0,52	20	0,83	0,0080	1,09
E4	839,81	0,016	0,00022	1,81	0,23	17,6	0,61	20	0,83	0,0080	0,15
E5	839,81	0,016	0,00010	1,72	0,23	17,4	0,52	50	0,89	0,0057	0,019
E6	784,29	0,016	0,000063	1,69	0,23	8,09	0,52	40	0,95	0,0032	0,019

Los valores de algunos de los parámetros son dignos de ser examinados. La concentración en el sólido sin tratar, x_u , fue obtenida mediante ajuste de diferentes resultados experimentales y está de acuerdo con las curvas experimentales mostradas en E1 - E6. El valor obtenido para x_u (0,016) es constante para todos los experimentos y se encuentra por encima de cada experimento individual de extracción. Cuando los rendimientos de los experimentos E3 y E9 se suman y este valor se transforma en x_u , este valor empírico combinado es un 25% mayor al obtenido experimentalmente. Esto se puede explicar por la coextracción de compuestos más pesados con densidades altas de CO₂ y usando etanol como modificador. Si se suman los rendimientos de los experimentos E1, E7 y E8 y este valor transformado en x_u , este valor empírico combinado es considerablemente mayor. Este resultado era esperable debido a la extracción por etapas y al uso de modificador. Sin embargo, nuestro valor de x_u se evaluó de acuerdo con Martín et al. [24], insertándolo como un valor ajustable en la función Solver. Este valor debe ser igual para todos los experimentos de SFE porque el material vegetal utilizado para todos ellos es el mismo [34]. Algunos autores defienden que el x_u representa la cantidad máxima de extracto que se puede recuperar de una materia prima a una presión y una temperatura dadas [35]. Algunos autores incluso utilizan diversos valores del x_u a presión y temperatura fijas pero con tamaños de partícula que varían [36]. Algunos autores han fijado x_u como la cantidad que se puede obtener por hidrodestilación [37], o por extracción convencional usando un disolvente orgánico [38]. Otros autores incorporan x_u como parámetro de entrada sin mencionar su origen [39]. Así, nuestro valor del x_u es absolutamente razonable porque es mayor que los encontrados en cada experimento y no habría sido apropiado obtenerlo con HD u OSE debido a la diversa composición y aspecto de los extractos obtenidos mediante estas técnicas.

La concentración inicial de aceite en la fase fluida, y_o , asumida como la solubilidad en CO₂ supercrítico, sigue el patrón previsto para cada experimento, es decir, a mayor densidad del CO₂, más soluble es el aceite. Sin embargo, hubo dos excepciones; la solubilidad del aceite en el experimento E5 debería haber sido similar a los experimentos E3 y E4, y la solubilidad en E6 debería haber sido más alta. En la primera excepción, la solubilidad habría doblado su valor si no hubiera aparecido el apelmazamiento o el acanalamiento (*caking* y *channelling*). En la segunda excepción, se alcanzó un valor más bajo de la solubilidad que el esperado (debe haber alcanzado un valor comparable al de E2 debido a las densidades de trabajo análogas). El ratio disolvente- matriz en el lecho, γ , que depende de la densidad del sólido, de la densidad solvente y de la porosidad, también aumenta con densidad disolvente de la misma forma. La eficiencia en la molienda, r , constante debido a que el proceso de molienda es igual para todos los experimentos, y el coeficiente de transferencia de masa de la fase fluida, $k_f a_o$, constante para los cinco experimentos en los que el flujo del CO₂ es constante. El coeficiente de transferencia de masa de la fase sólida, $k_s a_s$, se comporta también de la manera prevista, aumentando con la densidad, porque cuanto más alta es la

densidad del CO₂ en el experimento, mejor es la transferencia del aceite de las células intactas a las quebradas. $k_s a_s$ también aumenta al aumentar el flujo, mientras que tamaños de partícula mayores resultan en una peor transferencia de masa, disminuyendo el valor de $k_s a_s$.

3.4. Actividad antialimentaria de los extractos

Tabla 5. Efectos antialimentarios de las fracciones de hoja de *P. indica* sobre larvas L6 de *S. littoralis*

Experimento	Fracción	% FI dosis de extracto ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			EC ₅₀ dosis de extracto ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
		100	20	4	
OSE Etanol		98,6*±0,6	88,8*±4,2	51,5*±10,4	0,35 (0,16, 0,77)
E3	Ch	73,1* ± 14	51,6 *± 8,3	42,6±11,8	0,91 (0,35, 3,68)
	Ct	73,2* ± 18	49,2 ± 15	27,1 ± 19	2,29 (0,89, 5,87)
E5	Ch	82,4* ± 6	68,4*± 12	51,3*± 22	0,57 (0,14, 2,35)
	Ct	94,3*± 4	62,7*± 13	40,8 ± 10	0,77 (0,31, 1,87)
E8	Ch	99,5*± 0,4	85,9*± 5	21,6 ± 15	0,91 (0,48, 1,72)
	Ct	97,6*± 1	98,3*± 2	41,7± 10,8	0,56 (0,26, 1,21)

* Significativamente diferente al control ($p < 0.05$).

% FI: Inhibición de la alimentación. % FI = $[1 - (\text{consume de tratado} / \text{consumo de control})] \times 100$.

EC₅₀: Dosis necesaria para obtener un 50 % de consume foliar (En paréntesis, límites de confianza superior e inferior al 95%)

E3, E5, E8: Experimentos supercríticos, leyenda de las condiciones en la Tabla 1.

La tabla 5 muestra los efectos antialimentarios del OSE-EtOH y de las fracciones de SFE para los experimentos E3, E5 y E8. Estas fracciones se han seleccionado según sus diversas composiciones (véase la tabla 3). El extracto más activo fue el OSE-EtOH con el contenido más alto de cinnzeylanol y de ryanodol, no obstante los efectos sinérgicos con otros componentes del extracto no se pueden eliminar para este extracto complejo. Cuando el cinnzeylanol (fracción de cabeza) o el cinnzeylanol más el cinnzeylanina (cola) estaba presente (E3 y E5) la fracción de cabeza fue más activa que la de cola, siendo E5 más eficaz que E3 (actividad creciente con el aumento de concentraciones de cinnzeylanol). Cuando los tres compuestos estaban presentes (E8) la fracción más activa fue la de cola con un contenido más alto de cinnzeylanina. La alta presencia de cinnzeylanol y las bajas concentraciones de cinnzeylanina dio lugar al efecto antialimentario mayor en presencia de ryanodol (OSE EtOH). Un efecto similar pero más bajo fue observado para las fracciones con cinnzeylanina alto y contenido bajo de cinnzeylanol en presencia de ryanodol (cola E8). Otros experimentos son necesarios para encontrar las condiciones apropiadas de la extracción para la obtención de extractos más activos. Sin embargo, la presencia de ryanodol, como en los extractos OSE y E8, asegura la actividad de los extractos. Por esta razón, algunos estudios en el fraccionamiento supercrítico del ryanodol de *Persea indica* se han realizado [26].

4. Conclusiones

La extracción con CO₂ supercrítico de *Persea indica* fue realizada y fue estudiada la influencia de la presión, de la temperatura, del flujo del CO₂, del tamaño de partícula y de la presencia del entrainer en el rendimiento y en la composición de los extractos. Las mejores condiciones en el rango estudiado para obtener mayores rendimientos resultaron para ser 20,0 MPa, 40 °C, 0,56 milímetros y 1,44 Kg/h. Si se realiza una extracción por etapas o se añade etanol como modificador, los rendimientos de extracción son más altas. Se realizaron experimentos de SFE con etanol como modificador para investigar el grado de agotamiento del material vegetal después de un experimento típico de SFE. Las técnicas convencionales de la extracción, tales como la hidrodestilación durante 4 horas o la extracción con disolventes orgánicos durante 20 horas con etanol o hexano fueron realizadas con propósitos comparativos. Los rendimientos del proceso de SFE fueron mayores que para el HD. Los rendimientos con OSE fueron mayores que en los otros casos pero sus extractos se diferenciaron marcadamente en la composición y en el aspecto de los obtenidos por HD. La actividad biológica de estos extractos varió según su composición.

El modelo propuesto por Sovová fue aplicado exitosamente para correlacionar los datos experimentales. Los parámetros característicos del modelo, como la llamada solubilidad del aceite en el CO₂ supercrítico, y_o , el coeficiente de transferencia de masa de la fase sólida, $k_s a_s$ y la concentración en el sólido sin tratar, x_o , fueron obtenidos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo economic de MICINN-FEDER (CTQ2009-14629-Co2-02) y del Gobierno de Aragón (Pl068-08 y grupo E52). Agradecer a S. Carlin la revision lingüística. L. Martín agradece la beca predoctoral FPU (AP2006-02054) del MICINN.

Referencias

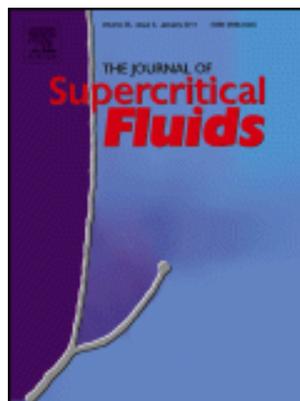
- [1] A.P.T. Anastas, J.C. Warner, Green Chemistry: Theory and Practice, USA, Oxford University Press, 2000.
- [2] E. Reverchon, Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, The Journal of Supercritical Fluids. 10 (1997) 1-37.
- [3] E. Reverchon, I. De Marco, Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, The Journal of Supercritical Fluids. 38 (2006) 146-166.

- [4] Y. Sánchez-Vicente, A. Cabañas, J.A. Renuncio, C. Pando, Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol, *The Journal of Supercritical Fluids*. 49 (2009) 167-173.
- [5] G. Della Porta, E. Reverchon, Supercritical fluids extraction and fractionation of pyrethrins from pyrethrum, in: A. Bertucco (Ed.), *Fourth International Symposium on High Pressure Process Technology and Chemical Engineering*, Venice, Italy, 2002, p. 223
- [6] H.K. Kiriamiti, S. Camy, C. Gourdon, J.S. Condoret, Pyrethrin extraction from pyrethrum flowers using carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*. 26 (2003) 193-200.
- [7] H. Kiriamiti, S. Camy, C. Gourdon, J. Condoret, Supercritical Carbon Dioxide Processing of Pyrethrum Oleoresin and Pale, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (2003) 880-884.
- [8] P. Tonthubthimthong, S. Chuaprasert, P. Douglas, W. Luewisutthichat, Supercritical CO₂ extraction of nimbin from neem seeds - an experimental study, *Journal of Food Engineering*. 47 (2001) 289-293.
- [9] P. Ambrosino, R. Fresa, V. Fogliano, S.M. Monti, A. Ritieni, Extraction of Azadirachtin A from Neem Seed Kernels by Supercritical Fluid and Its Evaluation by HPLC and LC/MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (1999) 5252-5256.
- [10] D. Bramwell, The endemic flora in the Canary Islands, in G. Kunkel (Ed.), *Biogeography and Ecology in the Canary Islands*, Junk, The Hague, 1976, pp 207-240.
- [11] A. González-Coloma, R. Cabrera, A.R. Socorro Monzón, B.M. Fraga, *Persea indica* as a natural source of the insecticide ryanodol, *Phytochemistry*. 34 (1993) 397-400.
- [12] B.M. Fraga, A. González-Coloma, C. Gutiérrez, D. Terrero, Insect Antifeedant Isoryanodane Diterpenes from *Persea indica*, *Journal of Natural Products*. 60 (1997) 880-883.
- [13] A. González-Coloma, C. Gutiérrez, H. Hübner, H. Achenbach, D. Terrero, B.M. Fraga, Selective insect antifeedant and toxic action of ryanoid diterpenes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 4419-24.
- [14] Vais H, Usherwood P, Novel actions of ryanodine and analogues-Perturbors of potassium channels, (1995), *Bioscience Reports*. 15 (1995) 515-530.
- [15] Thermophysical properties of fluid systems, National Institute of Standards and Technologies. Available from: <http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>
- [16] H. Sovova, Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation, *The Journal of Supercritical Fluids*. 33 (2005) 35-52.
- [17] S.N. Naik, H. Lentz, R.C. Maheshwari, Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium conditions, *Fluid Phase Equilibria*. 49 (1989) 115-126.
- [18] A. Gonzalez-Coloma, D. Terrero, A. Perales, P. Escoubas, B.M. Fraga, Insect Antifeedant Ryanodane Diterpenes from *Persea indica*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (1996) 296-300.
- [19] A. S. Balachowsky: *Entomologie appliquee a l'agriculture*, Traite. vol. 1, Coleopteres, France, Maison et Cie Éditeurs, 1963.

- [20] E. Langa, G.D. Porta, A. Palavra, J. Urieta, A. Mainar, Supercritical fluid extraction of Spanish sage essential oil: Optimization of the process parameters and modelling, *The Journal of Supercritical Fluids*. 49 (2009) 174-181.
- [21] E. Langa, J. Cacho, A. Palavra, J. Burillo, A. Mainar, J. Urieta, The evolution of hyssop oil composition in the supercritical extraction curve: Modelling of the oil extraction process, *The Journal of Supercritical Fluids*. 49 (2009) 37-44.
- [22] E. M. C. Reis-Vasco, J. A. P. Coelho, A. M. F. Palavra, Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation, *Flavour and Fragrance Journal*. 14 (1999) 156-160.
- [23] E. Reverchon, G. Donsi, L. Sesti Osseo, Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 32 (1993) 2721-2726.
- [24] L. Martín, A.M. Mainar, A. González-Coloma, J. Burillo, J.S. Urieta, Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.), *The Journal of Supercritical Fluids* (2010), doi:10.1016/j.supflu.2010.11.017
- [25] H. van Den Dool, P. Dec. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography* 11 (1963) 463-471.
- [26] L. Martín, A. González-Coloma, R. Adami, M. Scognamiglio, E. Reverchon, G. D. Porta, J.S. Urieta, A.M. Mainar, Supercritical antisolvent fractionation of ryanodol from *Persea indica*, *The Journal of Supercritical Fluids*, in press
- [27] E. Burgueño-Tapia, L. Castillo, A. González-Coloma, P. Joseph-Nathan, Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene p-benzoquinone perezone and some of its derivatives, *Journal of Chemical Ecology* 34 (2008) 766-771.
- [28] F. Wilcoxon, Individual Comparisons by Ranking Methods, *Biometrics Bulletin*. 1 (1945) 80-83.
- [29] P. Weyerstahl, H. Marschall, R.W. Scora, Constituents of the leaf essential oil of *Persea indica* (L.) K. Spreng., *Flavour and Fragrance Journal* 8 (1993) 201-207.
- [30] J. Pino, P. Fernandes, R. Marbot, A. Rosado, S. Sá Fontinha, Leaf oils of *Helichrysum melaleucum* Rchb. ex Holl., *Oenanthe divaricata* (R. Br.) Mabb. and *persea indica* (L.) Spreng. from Madeira, *Journal of Essential Oil Research*. 16 (2004) 487-489.
- [31] Q. Lang, C.M. Wai, Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies -- a practical review, *Talanta*. 53 (2001) 771-782.
- [32] E. Reverchon, C. Marrone, Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils, *The Journal of Supercritical Fluids*. 19 (2001) 161-175.
- [33] R. L. Mendes, J. P. Coelho, H. L. Fernandes, I. J. Marrucho, J. M. S. Cabral, J. M. Novais, A. F. Palavra, Application of supercritical CO₂ extraction to microalgae and plants, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 62 (1995) 53-59.
- [34] A. Berna, A. Tárrega, M. Blasco, S. Subirats, Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed, *The Journal of Supercritical Fluids*. 18 (2000) 227-237.
- [35] S. Quispe-Condori, D. Sánchez, M. A. Foglio, P. T. V. Rosa, C. Zetzi, G. Brunner, M. A. A. Meireles, Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia*

- annua L leaves using supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*. 36 (2005) 40-48.
- [36] N. Mezzomo, J. Martínez, S.R. Ferreira, Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up, *The Journal of Supercritical Fluids*. 51 (2009) 10-16.
- [37] E.M.C. Reis-Vasco, J.A.P. Coelho, A.M.F. Palavra, C. Marrone, E. Reverchon, Mathematical modelling and simulation of pennyroyal essential oil supercritical extraction, *Chemical Engineering Science*. 55 (2000) 2917-2922.
- [38] J. Stastová, J. Jez, M. Bártlová, H. Sovová, Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂--III. Extraction from sea buckthorn, *Chemical Engineering Science*. 51 (1996) 4347-4352.
- [39] Y. Gao, B. Nagy, X. Liu, B. Simándi, Q. Wang, Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound, *The Journal of Supercritical Fluids*. 49 (2009) 345-350.

Supercritical Antisolvent Fractionation of Ryanodol from Persea indica



Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente de Ryanodol a partir de *Persea indica*

Resumen

El objetivo de este estudio es la extracción y concentración del ryanodol, un compuesto insecticida contenido en una planta endémica de las Islas Canarias, *Persea indica*, mediante el fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF). El pesticida primero se ha extraído de *Persea indica* con etanol y después se ha concentrado la solución etanólica usando la técnica de SAF, en la cual el CO₂ supercrítico se utiliza para precipitar los compuestos insolubles. La cuantificación del ryanodol en los diversos extractos fue lograda usando HPLC-MS. Trabajando a 15,0 MPa y 35 °C (flujos de 2,38 kg/h para el CO₂ y de 5,7 mL/min para la solución etanólica) se obtuvo una fracción con un contenido en ryanodol del 38% w/w a partir del extracto líquido que contenía solamente 8% w/w de este compuesto.

Palabras clave: Fraccionamiento supercrítico antidisolvente, *Persea indica*, ryanodol, fraccionamiento.

Introducción

Los biopesticidas basados en productos naturales son extraídos tradicionalmente con disolventes orgánicos. Esta técnica tiene varias desventajas, principalmente temperaturas altas o presiones reducidas requeridas para retirar el disolvente del extracto natural. Los disolventes orgánicos se pueden sustituir por el dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) en varios procesos de extracción [1-3]. Sin embargo, el CO₂ supercrítico tiene afinidad principalmente por los compuestos lipofílicos y esta característica se convierte en una desventaja cuando se tienen que extraer compuestos polares. Sin embargo, si el scCO₂ es modificado agregando cantidades pequeñas de un solvente polar, tales como etanol, la afinidad por los compuestos polares puede ser aumentada [4]. El carácter lipofílico del CO₂ puede ser una ventaja cuando los compuestos polares tienen que ser fraccionados de una solución orgánica, como en el fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF) [5]. Consiste en el contacto continuo entre scCO₂ y una mezcla líquida en un recipiente presurizado de precipitación. Un aerosol de la solución líquida se produce en el medio supercrítico para favorecer la mezcla de ambos fluidos, si el proceso se realiza en condiciones optimizadas, la solución líquida se puede fraccionar por scCO₂ y parte de los solutos se pueden precipitar como polvo sólido en el fondo del recipiente de alta presión. El CO₂ y la mezcla orgánica residual se pueden recuperar por descompresión en un separador después del recipiente de precipitación, trabajando a una presión menor.

La tecnología SAF ha sido utilizada para el refinado de lecitina cruda, usando una solución en hexano como alimentación en el rango de temperaturas de 283-313 K y en el rango de presiones de 5-6,5 MPa [6]. El valor más alto de enriquecimiento de la lecitina en la fracción recuperada de SAF fue obtenido trabajando a 298 K y 6,5 MPa; mientras que, la selectividad disminuyó bajando la temperatura por debajo de 283 K. Otro ejemplo de los resultados obtenibles por SAF es la purificación de fosfolípidos, descrita por Aro y otros. [7] de yema de huevo disuelta previamente en etanol. La solución inicial tenía un contenido de fosfolípidos del 60% w/w, mientras que, el producto de SAF demostró un contenido de entre 72-99% w/w.

Andersson y otros. [8] aislaron con SAF el di-galactosil-diacil-glicerol de extractos acetónicos del salvado de avena. El producto objetivo, digalactosyldiacylglycerol, fue recuperado en la unidad de la precipitación con una pureza de 95,4% w/w. El fraccionamiento del tinte de própolis también se ha estudiado [9] para obtener fracciones enriquecidas en flavonoides de entre 20-35% w/w. Los flavonoides son prácticamente insolubles en CO₂ puro, pero lo suficientemente solubles en CO₂ más etanol para permitir su separación de compuestos de mayor peso molecular o más polares. La extracción selectiva de polifenoles y de antocianinas de residuos liofilizados de uva fue propuesta recientemente por Floris y otros. [10]. La solución metanólica fue fraccionada en diversas condiciones y el producto recuperado por SAF fue un precipitado

pulverulento libre de disolvente con un contenido de antocianinas de 15542 mg/kg y un contenido de polifenoles de 521 mg/kg.

Persea indica es una de las especies dominantes del bosque de laurisilva canario, una reliquia de la flora terciaria [11]. Las hojas de *Persea indica* se han utilizado tradicionalmente para proteger las patatas almacenadas y algunos de sus extractos se han investigado ya ampliamente [12]. Se ha demostrado que estas hojas son fuente del diterpeno tóxico ryanodol [13-14], cuya importancia radica en la mayor selectividad hacia insectos que hacia mamíferos. El ryanodol se diferencia de otros componentes de la familia de los ryanodanos por su modo de la acción. Ryanodine, un alcaloide insecticida encontrado en *Ryania speciosa*, una planta nativa del Amazonia, también se utiliza como agente de control de parásitos, porque actúa sobre el sistema tubular transversal muscular reduciendo la cantidad de calcio del retículo sarcoplásmico en las células del músculo cardiaco [15]. Sin embargo, su modo de la acción es no selectivo. Al contrario, el ryanodol demuestra una toxicidad baja contra ratones, mientras que resulta un insecticida potente contra las moscas y las cucarachas [16]. Este efecto se puede explicar por diversos sitios de unión del ryanodol y del ryanodine. Además, el ryanodol ha demostrado actividad antialimentaria en análisis con *Spodoptera litura* [17-18], y una acción selectiva [19].

El objetivo de este trabajo es extraer ryanodol de *Persea indica* con etanol y fraccionarlo de los otros compuestos co-extraídos usando la técnica de SAF. El contenido del ryanodol en las fracciones recuperadas será optimizado variando parámetros experimentales tales como el material de planta (tallos y hojas), la densidad de CO₂ (variando la presión y temperatura de trabajo en un rango de 8,0 a 15,0 MPa y 35 a 60 °C, respectivamente), diseño del separador (convencional y tipo ciclónico) y la composición de la mezcla (fracción molar del CO₂ de 0,90 a 0,99).

Materiales y métodos

Preparación y caracterización de la materia prima

Las hojas y los tallos de *Persea indica* se recogieron en Monte de las Mercedes, Tenerife, España y secadas al aire. Tallos y hojas se trituraron separadamente en lotes de 0,2 kg (MKM6000, Bosch). Las muestras trituradas se almacenaron a vacío. Debido a la diferente consistencia del material vegetal, los tallos se trituraron 300 s mientras que las hojas se trituraron durante 120 s.

Maceración

El mismo procedimiento fue utilizado para los tallos y las hojas de *Persea indica*: 50 gramos de material triturado fueron agitados 48 horas a temperatura ambiente (25 °C) en 0,5 L etanol absoluto (Fluka) para obtener la solución de alimentación de la solución para los experimentos de SAF. La maceración fue optimizada supervisando la cantidad de ryanodol en el extracto a intervalos fijos

de tiempo. La concentración más alta fue obtenida después de 48 H. Después de la maceración, la solución fue filtrada y una parte alícuota fue evaporada con un rotavapor (Büchi R-200/205) para determinar la concentración en ryanodol. Para alcanzar las condiciones óptimas del fraccionamiento supercrítico antidisolvente, la solución de la alimentación fue preparada para contener aproximadamente 3% de sólidos: las soluciones de la maceración de tallos y de hoja fueron concentradas con un rotavapor hasta una concentración de los sólidos de 2.95% y 3.21%, respectivamente.

Proceso de Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente (SAF)

Las pruebas SAF fueron realizadas en el "Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Tecnologías con Fluidos Supercríticos" de la Universidad de Salerno, Italia usando la planta ostrada en la Figura 1 [5]. Los experimentos de algún SAF fueron repetidos dos veces y en todos los casos, la misma recuperación del producto y composición fueron obtenidas.

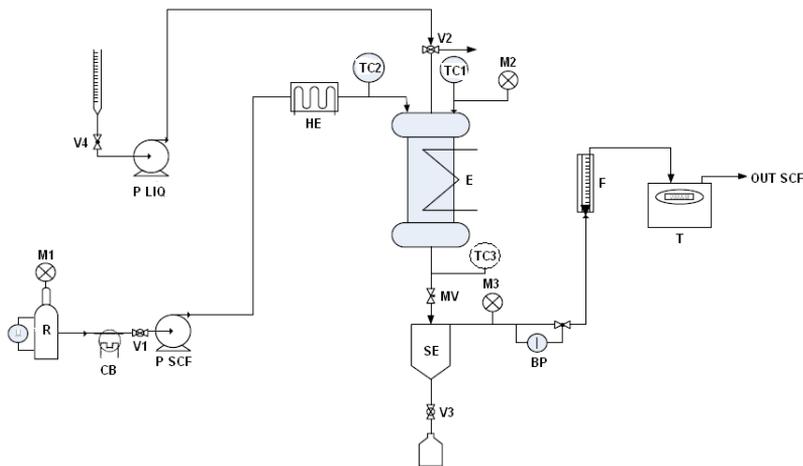


Figura 1. Esquema de la planta SAF. Bomba CO₂ (P-SCF); Bomba del líquido (P-LIQ); depósito de CO₂ (R); Extractor (E); Baño refrigerante (CB); Intercambiador de calor (HE); Caudalímetro (F); Totalímetro (T); Back pressure (BP); Separador (SE); Válvula micrométrica (MV); Válvulas (V); Manómetros (M); Controles de temperatura (TC). (Adaptado de Reverchon & De Marco [5]).

El aparato de SAF está formado por tres partes principales: un área de bombeo, un recipiente de alta presión de extracción y un área de la separación. El CO₂, provisto por SON (Società Ossigeno Napoli, ÉL), se bombea de un depósito usando una bomba Lewa Ecoflow (MOD. LDC-M-2, presión máxima 40,0 MPa). La solución líquida es bombeada por una bomba Gilson (modelo 305, Gilson FR). El extracto, de volumen interno 500 cm³, tiene un filtro en el fondo (0,1 μm de porosidad) para la recolección del material sólido. Un separador que trabaja a presiones más bajas está

situado después del extracto y permite la recuperación del solvente y de los compuestos solubles en las mezclas supercríticas usadas. Diversos separadores pueden ser utilizados: convencional y un tipo separador ciclónico. Ambos separadores están fabricados con acero inoxidable (AISI 316) para permitir la recuperación de líquido a intervalos de tiempo; mientras que, el CO₂ gaseoso sale por la parte superior del separador. La presión del separador se mide con un manómetro y se controla por un back pressure insertado después de la línea de salida del CO₂. El caudal del CO₂ es medido por un rotámetro ASA (MOD. N.5-2500, Serval 115022). Un experimento típico consiste en los pasos siguientes: estabilización de la presión, de la temperatura y del caudal de CO₂ en el sistema; estabilización del caudal del líquido mediante la inyección de disolvente líquido (≈ 10 ml) y después inyección de la solución (40 ml) que será fraccionada. El paso final es la inyección de scCO₂ puro (≈ 30 minutos) para eliminar el disolvente residual. Muestras del separador se recogen cada 5 minutos durante el experimento. En este trabajo, las condiciones de funcionamiento fueron elegidas para trabajar en fase homogénea supercrítica, (experimentos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, tabla 1) o para trabajar en su vecindad, trabajando en fase subcrítica homogénea o en la región bifásica (experimentos 3 y 4). Las condiciones de proceso se calculan con respecto al sistema binario etanol-CO₂. El sc-CO₂ y la solución líquida se inyectan en el compartimento al mismo tiempo, con una ratio CO₂ /etanol y condiciones de presión y de temperatura fijas, para alcanzar las condiciones de trabajo mostradas en la Figura 2. Las condiciones experimentales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de los experimentos SAF

Exp,	Material de trabajo	P (MPa)	T (°C)	ρ (kg/m ³)	X _{CO₂}	caudal (mL/min)
1	tallos	13,0	60	505,62	0,97	1,5
2	tallos	10,0	40	622,64	0,97	1,5
Efecto de la densidad del CO₂						
3	hojas	8,0	40	281,33	0,97	1,5
4	hojas	11,0	60	361,35	0,97	1,5
5	hojas	13,0	60	505,62	0,97	1,5
6	hojas	10,0	40	622,64	0,97	1,5
7	hojas	15,0	35	815,29	0,97	1,5
Efecto de la fracción molar de CO₂						
8	hojas	15,0	35	815,29	0,99	0,5
7	hojas	15,0	35	815,29	0,97	1,5
9	hojas	15,0	35	815,29	0,90	5,7

Exp.: se refiere al número del experimento.

P: presión de trabajo.

T: temperature de trabajo.

ρ : densidad del CO₂.

X_{CO₂}: fracción molar.

caudal: caudal de la solución líquida al extractor.

caudal de CO₂: 2,38 kg/h.

Las condiciones de trabajo fueron seleccionadas en base a los equilibrios líquido-vapor (VLE) del sistema binario etanol-CO₂, tomados de la literatura [20-21] e ilustrados en la Figura 2. Por supuesto, la presencia del extracto vegetal en la mezcla etanol/CO₂ puede cambiar los datos de VLE del sistema binario. Por esta razón, el punto marcado en la Figura 2 indica la condición experimental usada, pero solamente como posición relativa al punto crítico de mezcla y a la laguna de in de los sistemas usados.

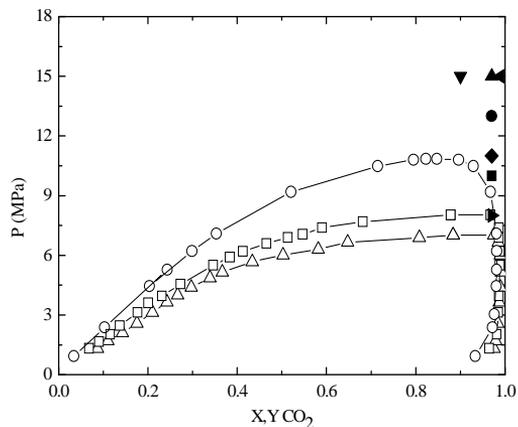


Figura 2. Curvas de equilibrio etanol-CO₂ a temperaturas diferentes reproducidas de Chang et al. [20] y Galicia-Luna et al. [21] (Δ): 35 °C. (\square): 40 °C. (\circ): 60 °C. Puntos sólidos indican las condiciones experimentales de los experimentos SAF. (\bullet): Experimentos 1, 5. (\blacksquare): Experimentos 2, 6. (\blacktriangle): Experimento 7. (\blacktriangleright): Experimento 3. (\blacklozenge): Experimento 4. (\blacktriangleleft): Experimento 8. (\blacktriangledown): Experimento 9.

Análisis de los extractos

Los extractos fueron analizados por cromatografía para cuantificar la cantidad de ryanodol fraccionado en el proceso. Se usó una HPLC Waters acoplada a un MS Micromass ZQ (Milford, Massachusetts, United States) (detector de cuadrupolo con detector de electrospray). Las muestras fueron analizadas con una columna C18 (Luna, Phenomenex; tamaño de partícula de 5 μ m, 250 mm \times 4,6 mm) a temperatura ambiente. El flujo de fase móvil, 1 mL/min, consistió en un gradiente metanol (pureza HPLC, Carlo Erba) agua (pureza HPLC, Sigma Aldrich) con las siguientes características: gradiente lineal de 10 % MeOH a 100 % MeOH en 45 minutos y después 15 minutos de 10% MeOH-90% agua. La ionización con electrospray se realizó en modo positivo. La temperatura de la fuente fue de 100 °C y la temperatura de desolvatación 250 °C. Los flujos de nitrógeno fueron 311L/h para el gas de desolvatación y 30 L/h para el gas del cono. Los voltajes fueron los siguientes: capilar, 3,00 kV, cono, 40 V, y extractor, 5 V. La calibración se

llevó a cabo con un estándar aislado por el Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC) en modo Single Ion Recording (SIR). Varias disoluciones de ryanodol en MeOH de pureza HPLC se prepararon a partir de una solución inicial de ryanodol de 100 ppm (0,5 mg ryanodol en 5 ml de MeOH). La adquisición de datos fue realizada en el modo SIR.

Resultados y discusión

El conocimiento de datos de solubilidad de los disolventes líquidos y de los sólidos en $scCO_2$ es muy relevante para la apropiada selección de la temperatura y la presión del SAF, así como las interacciones entre limitaciones termodinámicas y los mecanismos de transferencia de materia que controlan el funcionamiento del proceso [5]. La elevada transferencia de materia que caracteriza a los fluidos supercríticos supone una ventaja junto con la separación rápida y completa del disolvente líquido. La interacción del líquido con $scCO_2$ puede inducir un aumento en la solubilidad de los compuestos sólidos en $scCO_2$. En este caso, el líquido puede actuar como co-solvente desde el punto de vista de la solubilidad del sólido. Cuando ocurre este fenómeno, la parte del sólido retenida en la fase fluida no se precipita durante SAF y se recupera en el recipiente de separación. Por lo tanto, si varios compuestos están presentes en la mezcla líquida, eligiendo las condiciones de proceso apropiadas de SAF, debe ser posible fraccionarlas selectivamente entre el recipiente de precipitación y el separador.

La primera información necesaria es el equilibrio líquido vapor (VLE) CO_2 /etanol a presión [5], con el objetivo de seleccionar las condiciones de SAF que permiten trabajar en fase supercrítica homogénea. Sin embargo, los VLEs se pueden modificar en gran parte por la solubilidad diferente de cero de los compuestos contenidos en la fase líquida. En la Figura 2 aparecen las diversas curvas de equilibrio CO_2 /etanol a diversas temperaturas, tomadas de la literatura [20-21]. Se presentan junto con las condiciones experimentales adoptadas en este trabajo. Las pruebas SAF realizadas convergieron para indicar que el extracto vegetal (concentración aproximada de 3% w/w en etanol) no influyó sobre el VLE del sistema etanol/ CO_2 . La hipótesis de que la posible solubilidad del soluto en la fase fluida no cambia perceptiblemente la interacción entre el CO_2 y el etanol cuando muchos compuestos están presentes es muy ambiciosa; por lo tanto, el diagrama binario puede dar solamente indicaciones aproximadas de las condiciones de trabajo que deben ser ajustadas con el sistema usado.

Selección del material vegetal

El primer objetivo de nuestro estudio era seleccionar el material vegetal óptimo. Varios experimentos de maceración fueron realizados en diversos lotes de tallos y de hojas; los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones experimentales y resultados de las maceraciones

Material vegetal	Rto. Seco (%)	RY en extracto seco (%)	RY en 100 g de solución (mg)	Rto. en RY (%) en solución de alimentación después de evaporación (si es el caso)
Tallos	0.45±0.01	6.47±0.01	29.1±0.9	2.95
Hojas	2.48±1.03	6.68±1.22	159.6±38.0	3.21

RY: ryanodol.

Rto. Seco (%): (masa de extracto seco/masa de disolución)*100.

RY en extracto seco (%): (masa de ryanodol/masa de extracto seco)*100.

Los experimentos con tallos (1-2) y con hojas (5-6) fueron llevados a cabo con las mismas condiciones experimentales: temperaturas de 60 y 40 °C, presiones de 13,0 y 10,0 MPa, fracción molar de CO₂ de 0,97, caudal líquido 1,5 mL/min y caudal de CO₂ de 2,38 kg/h (tabla 1). Los datos de la Tabla 2 demuestran que los experimentos realizados con los tallos requirieron un paso adicional de preconcentración puesto que las soluciones obtenidas después de la maceración no eran bastante ricas en extracto seco (0,44 y 0,66% para los experimentos 1 y 2 respectivamente). Cuando las hojas fueron extraídas, el paso de la preconcentración fue evitado; de hecho, en los experimentos 3-6 se alcanzó un rendimiento en seco de 3,21% y en los experimentos 7-9 solamente una preconcentración pequeña fue necesario (de rendimiento en seco del 1,76% al 3,21%). Sin embargo, el rendimiento seco, calculado como el cociente entre la masa del extracto seco y la masa de la solución, era muy bajo en el caso de los tallos; mientras que el porcentaje del ryanodol en los extractos secos era similar para ambos material de trabajo. La proporción de ryanodol en las fracciones recuperadas después de los experimentos SAF con los tallos fue similar a la de los experimentos con. Por lo tanto, ya que el trabajo con los tallos requería un paso de preconcentración, y la concentración de ryanodol en el seco era similar para ambos, los experimentos sistemáticos fueron realizados usando hojas.

Influencia de la densidad del CO₂

Como segundo paso en la optimización del proceso, se investigaron varias densidades de CO₂ en extractor y su efecto fue observado en la concentración de principio activo en las muestras recuperadas. Cinco densidades fueron estudiadas en el rango de 281,33 a 815.29 kg/m³ (véase la Tabla 1). Al aumentar la densidad, la concentración del ryanodol disminuyó en el sólido recogido en el extractor y, por consiguiente, el enriquecimiento del ryanodol ocurrió en el producto recuperado en el separador en lugar de en el extractor. Particularmente, para los experimentos en las densidades de 281, 361 y 506 kg/m³, (experimentos 3-5), la concentración de ryanodol en el producto sólido recuperado en el extractor disminuyó del 5,83% al 2,99% w/w; mientras que, su contenido en el separador aumentó del 8,99 a 16,37% w/w. Para el experimento de mayor densidad (densidad 815 kg/m³, experimento 7) la concentración del ryanodol fue menor del 1% w/w en el extractor y 22,65% en el

separador. Por lo tanto, la fracción recuperada en el separador contuvo mucho más ryanodol que el precipitado en el filtro dentro del extractor.

Estos experimentos demostraron que la solubilidad del ryanodol en el CO_2 +etanol no era cero y la tendencia observada cuando la presión de SAF fue aumentada también indicó que la solubilidad del ryanodol en la fase fluida aumenta en gran parte con la presión. A pesar de esto, se produjo un fraccionamiento de los extractos sólidos en todos los casos, puesto que en el extractor precipitaron varios compuestos. Como resultado de estos experimentos iniciales, la estrategia del proceso fue cambiada: la precipitación selectiva del ryanodol en el extractor no fue posible (debido a su solubilidad en CO_2 +etanol), por lo tanto se intentó una optimización del proceso de fraccionamiento precipitando en el extractor la mayoría de compuestos contenidos en el extracto para recuperar el ryanodol en el separador. Por otra parte, puesto que el ryanodol fue recuperado principalmente en el separador, una mejora de su diseño para optimizar la recuperación líquida fue llevada a cabo.

Influencia del diseño del separador

La recuperación del ryanodol ocurrió preferentemente en el separador, pero el separador clásico líquido-gas no fue lo suficientemente eficiente; por lo tanto fue sustituido por un separador ciclónico para obtener una mayor recuperación. Este nuevo separador consistió en un separador ciclónico enfriado, donde el contacto entre el precipitado líquido y el CO_2 se reduce al mínimo, minimizando el arrastre de la solución debido al flujo del gas cuando se descomprime la mezcla. Fue utilizado en los experimentos 7-9, realizados con la mayor densidad del CO_2 : $815,29 \text{ kg/m}^3$ y variando la fracción molar del CO_2 de 0,90 a 0,99 (Tabla 1). Los sólidos se recuperaron del disolvente por evaporación usando un rotavapor. El líquido recuperado en el separador convencional contuvo de un 3,0 a 10,4% de la materia sólida total inyectada, dependiendo de las diversas condiciones experimentales (experimentos 1-6). En el separador de tipo ciclónico, sin embargo, se obtuvieron recuperaciones del 17,5 a 24,2% (experimentos 7-9) de la materia sólida inyectada.

Influencia de la fracción molar de CO_2

Otro parámetro que se puede variar en los experimentos SAF es la fracción molar del CO_2 en la mezcla supercrítica. Las fracciones molares del CO_2 (con respecto al etanol) de 0,90 (experimento 9), 0,97 (experimento 7) y 0,99 (experimento 8) fueron utilizadas a 15,0 MPa de presión y 35 °C de temperatura con un caudal de CO_2 de 2,38 Kg/h. Los resultados (Tabla 3) muestran que al aumentar la fracción molar del CO_2 , aumenta la recuperación en el recipiente del extractor. Sin embargo, el resultado más importante es que al disminuir la fracción molar de scCO_2 en el sistema, la concentración de ryanodol en el producto

recuperado en el separador aumenta hasta un 38%, correspondiendo a una concentración de cinco veces la cantidad original en el material de partida.

Tabla 3. Condiciones experimentales y resultados de los diferentes experimentos de SAF

TALLOS: Efecto de la densidad del CO ₂							
Exp,	Contenido inicial RY (%)	ρ (Kg/m ³)	X _{CO₂}	Recuperación (%)		RY fraccionado (%)	
				F	S	F	S
1	6,47	505,62	0,97	24,0	7,2	3,16	14,38
2	6,47	622,64	0,97	36,7	7,3	< 1	18,34

HOJAS: Efecto de la densidad del CO ₂							
Exp,	Contenido inicial RY (%)	ρ (Kg/m ³)	X _{CO₂}	Recuperación (%)		RY fraccionado (%)	
				F	S	F	S
3	5,81	281,33	0,97	42,5	8,1	5,83	8,99
4	5,81	361,35	0,97	27,9	3,0	6,08	10,92
5	5,81	505,62	0,97	19,4	10,4	2,99	16,37
6	5,81	622,64	0,97	26,3	6,0	3,98	20,77
7	7,54	815,29	0,97	46,2	24,2	< 1	22,65

HOJAS: Efecto de la fracción molar de CO ₂							
Exp,	Contenido inicial RY (%)	ρ (Kg/m ³)	X _{CO₂}	Recuperación (%)		RY fraccionado (%)	
				F	S	F	S
8	7,54	815,29	0,99	56,1	17,5	< 1	13,10
7	7,54	815,29	0,97	46,2	24,2	< 1	22,65
9	7,54	815,29	0,90	23,41	42,9	< 1	37,74

RY: ryanodol.

Exp.: se refiere al número de experimento.

Contenido inicial RY (%): porcentaje en masa de ryanodol en la solución de alimentación (calculado en material seco).

ρ : densidad del CO₂.

X_{CO₂}: fracción molar del CO₂.

Recuperación: (masa total recogida/masa inyectada)*100.

RY fraccionado: porcentaje en masa de ryanodol en las fracciones secas.

F: porcentaje en masa recuperado en el extractor a presión.

S: porcentaje en masa recuperado en el separador (después de evaporación del disolvente).

Estos resultados se explican claramente por el hecho de que a fracciones mayores de etanol aumenta el efecto del co-solvente hacia al ryanodol, induciendo una co-extracción más eficiente de este compuesto. Por otra parte, los compuestos indeseados continuaron siendo recogidos en el extractor de alta presión, aumentando la selectividad total del proceso.

Conclusiones

El fraccionamiento supercrítico antisolvente del ryanodol a partir de extractos etanólicos de hojas de *Persea indica* se ha llevado a cabo con éxito mediante SAF. El ryanodol mostró una solubilidad no despreciable en la mezcla supercrítica CO₂/etanol y, por lo tanto, los procedimientos de recuperación fueron modificados para recogerlo después del extractor en un separador de tipo ciclónico. De este modo, fue posible concentrar el contenido en principio activo de un 7,54 % encontrado en el producto seco de partida hasta un 37,74% w/w, lo que supone una concentración relativa de más del 500%. La adición de un segundo separador en un posible proceso de escalado industrial, podría permitir una recolección más eficiente de la solución final que contiene el principio activo.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico de MICINN-FEDER (CTQ2009-14629-Co2-02) y del Gobierno de Aragón (2010/0341 La Caixa, Plo68-o8 y grupo E52). L. Martín agradece una beca predoctoral FPU (AP2006-02054) del MICINN.

Referencias

- [1] E. Reverchon, Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *The Journal of Supercritical Fluids*. 10 (1997) 1-37.
- [2] Q. Lang, C.M. Wai, Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies -- a practical review, *Talanta*. 53 (2001) 771-782. [2]
- [3] L. Martín, A. M. Mainar, A. González-Coloma, J. Burillo, J. S. Urieta, Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.), *The Journal of Supercritical Fluids*. 56 (2011) 64-71.
- [4] H. Sovová, R.P. Stateva, A.A. Galushko, Solubility of β -carotene in supercritical CO₂ and the effect of entrainers, *The Journal of Supercritical Fluids*. 21 (2001) 195-203.
- [5] E. Reverchon, I. De Marco, Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *The Journal of Supercritical Fluids*. 38 (2006) 146-166.
- [6] M. Mukhopadhyay, S. Singh, Refining of crude lecithin using dense carbon dioxide as anti-solvent, *The Journal of Supercritical Fluids*. 30 (2004) 201-211.
- [7] H. Aro, E. Järvenpää, K. Könkö, M. Sihvonen, V. Hietaniemi, R. Huopalahti, Isolation and purification of egg yolk phospholipids using liquid extraction and pilot-scale supercritical fluid techniques, *European Food Research and Technology*. 228 (2009) 857-863.
- [8] M. B. O. Andersson, M. Demirbüker, L.G. Blomberg, Semi-continuous extraction-purification of lipids by means of supercritical fluids, *Journal of Chromatography A*. 785 (1997) 337-343.

- [9] O. J. Catchpole, J. B. Grey, K. A. Mitchell, J. S. Lan, Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture, *The Journal of Supercritical Fluids*. 29 (2004) 97-106.
- [10] T. Floris, G. Filippino, S. Scrugli, M. Pinna, F. Argiolas, A. Argiolas, M. Murru, E. Reverchon, Antioxidant compounds recovery from grape residues by a supercritical antisolvent assisted process, *The Journal of Supercritical Fluids*. 54 (2010) 165-170.
- [11] D. Bramwell, The endemic flora in the Canary Islands, in G. Kunkel (Ed.), *Biogeography and Ecology in the Canary Islands*, Junk, The Hague, 1976, pp. 207-240.
- [12] A. Gonzalez-Coloma, M. G. Hernandez, A. Perales, B. M. Fraga, Chemical ecology of canarian laurel forest: Toxic diterpenes from *Persea indica* (Lauraceae), *Journal of Chemical Ecology*. 16 (1990) 2723-2733.
- [13] A. Gonzalez-Coloma, R. Cabrera, P. Castañera, C. Gutiérrez, B. M. Fraga, Insecticidal activity and diterpene content of *Persea indica*, *Phytochemistry*. 31 (1992) 1549-1552.
- [14] A. Gonzalez-Coloma, R. Cabrera, A.R. Socorro Monzón, B.M. Fraga, *Persea indica* as a natural source of the insecticide ryanodol, *Phytochemistry*. 34 (1993) 397-400.
- [15] J. Y. Su, Effects of ryanodine on skinned myocardial fibers of the rabbit, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 411 (1988) 132-136.
- [16] A. L. Waterhouse, I. N. Pessah, A. O. Francini, J. E. Casida, Structural aspects of ryanodine action and selectivity, *Journal of Medicinal Chemistry*. 30 (1987) 710-716.
- [17] A. Gonzalez-Coloma, D. Terrero, A. Perales, P. Escoubas, B. M. Fraga, Insect Antifeedant Ryanodane Diterpenes from *Persea indica*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (1996) 296-300.
- [18] B. M. Fraga, A. González-Coloma, C. Gutiérrez, D. Terrero, Insect Antifeedant Isoryanodane Diterpenes from *Persea indica*, *Journal of Natural Products*. 60 (1997) 880-883.
- [19] A. Gonzalez-Coloma, C. Gutiérrez, H. Hübner, H. Achenbach, D. Terrero, B. M. Fraga, Selective insect antifeedant and toxic action of ryanoid diterpenes, *J Agric Food Chem*. 47 (1999) 4419-24.
- [20] C. J. Chang, C. Day, C. Ko, K. Chiu, Densities and P-x-y diagrams for carbon dioxide dissolution in methanol, ethanol, and acetone mixtures, *Fluid Phase Equilibria*. 131 (1997) 243-258.
- [21] L.A. Galicia-Luna, A. Ortega-Rodriguez, D. Richon, New Apparatus for the Fast Determination of High-Pressure Vapor-Liquid Equilibria of Mixtures and of Accurate Critical Pressures, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 45 (2000) 265-271.

Trabajos adicionales y perspectivas de futuro

Como continuación lógica del trabajo planteado para esta Tesis, se ha llevado a cabo una serie de experimentos en los que, por una parte, se ahonda en los bioensayos y por otra se explora el campo de la formulación de un biopesticida, aspecto clave a la hora de ser comercializado. Debido a la importancia que estos ensayos suponen para el posterior desarrollo de esta línea de investigación he creído conveniente incluir aquí algunos de los resultados alcanzados.

1. Microcalorimetría: ensayo de la bioactividad de los extractos.

En primer lugar se ha optimizado un bioensayo calorimétrico que permite el análisis de la bioactividad de los extractos sobre *Spodoptera littoralis*. El desarrollo de este método es interesante porque, además de hallar la toxicidad de un extracto, permite monitorizar en tiempo real la acción del compuesto insecticida.

La microcalorimetría isotérmica se ha mostrado como una de las más útiles en el estudio de actividades metabólicas de sistemas vivos y en medidas de interacciones celulares y biomoleculares. En concreto, Lamprecht [66] señala que los insectos terrestres son los organismos vivos investigados con mayor frecuencia desde el punto de vista calorimétrico puesto que son fáciles de recolectar, de criar, de mantener y de medir en recipientes secos y cerrados. La microcalorimetría presenta las ventajas de ser una técnica muy sensible y no destructiva que permite analizar directamente actividades metabólicas de insectos (incluso en su etapa de desarrollo) bajo condiciones biológicas muy próximas a las del medio. En la literatura de los últimos años aparecen algunos estudios calorimétricos sobre la toxicidad en especímenes diana [67,68], aunque los estudios calorimétricos con extractos obtenidos con fluidos supercríticos son inexistentes, lo que supondría una nueva línea de aportaciones científicas. Los ensayos se realizaron sobre *Spodoptera littoralis*, debido a la importancia económica de sus plagas y a la facilidad de transporte, cría, y manejo.

El suministro de la sustancia exógena en la rosquilla negra se realizó mediante canulación directa (suministro por vía oral) de cada individuo, ya que esta metodología, a diferencia de otras, permite un mejor control y reproducibilidad de las dosis suministradas [69]. Para conseguir una canulación adecuada es preciso disponer de una microjeringa equipada con un dosificador (figura 17) y de una lupa (figura 18).



Figura 17. Microjeringa equipada con dosificador.



Figura 18. Lupa.

La canulación de las larvas requiere de un tanto de paciencia y de cierta práctica que fue adquirida en las instalaciones del ICA. Ha de tenerse en cuenta que las dosis deben suministrarse de forma completa y, que con frecuencia, los especímenes tienden a vomitar y a enroscarse (de ahí su nombre común de rosquilla) como mecanismo defensivo.

Descripción del equipo: La actividad metabólica se registró con un calorímetro *Thermometric 2277 Thermal Activity Monitor (TAM)* (figura 19) con celdas de medida 2277-204. El dispositivo tiene una celda de medida y otra de referencia y es capaz de determinar flujos de calor correspondientes a diferencias de temperatura inferiores a 10^{-6} °C proporcionando una estabilidad de la línea base de $\pm 0,5 \mu\text{W}$ en un intervalo de 48 horas. En las medidas se usaron celdas de acero inoxidable de 4mL de capacidad (Thermometric). El calorímetro se encuentra en un recinto climatizado a una temperatura constante de 25° C, aislado de todo tipo de corrientes térmicas.

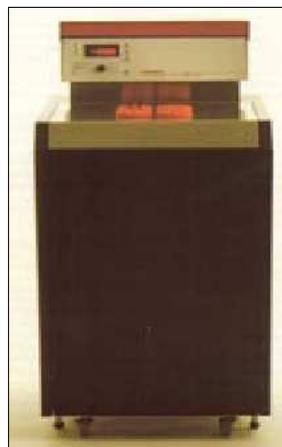


Figura 19. Calorímetro.

Método operativo: En la celda de referencia se introducen 0,2500 g de un material térmicamente inerte y en la de medida un ejemplar vivo de *Spodoptera littoralis* en el estadio de desarrollo L6 y con peso entre 0,2000 y 0,3500 g. Las medidas se realizan a 25 °C y el calor emitido por la larva situada en la celda de medida se registra mediante el programa informático Digitam® 4.1 (Thermometric). El experimento tiene una duración de 24 horas, y consta de tres partes. La primera parte, de 4 horas, consiste en una medición de la actividad metabólica base del individuo. La segunda parte es una corta pausa en la que se retira temporalmente a la larva de la celda para ser canulada con la dosis correspondiente. En la tercera y última parte del experimento, de 20 horas de duración, se registra el calor desprendido por el insecto, una vez que éste ha ingerido la dosis de la sustancia cuya bioactividad se quiere determinar. Este método tuvo que ser optimizado, ya que no se encontró en la literatura ninguno adecuado para el trabajo con *Spodoptera littoralis*. El método de trabajo se estableció de la siguiente manera: en primer lugar se escogieron unos viales con un cierre roscado adecuado que permitiesen la entrada de aire, puesto que uno totalmente hermético causaba la muerte por anoxia de las rosquillas al poco tiempo; a continuación se decidió no añadir dieta en la celda calorimétrica, puesto que el calor generado en su degradación no era reproducible y resultaba superior al desprendido por el individuo; después se fijó el tiempo de duración del experimento (24 horas) y por último se realizó la elección del disolvente adecuado, que por una parte disolviera los extractos, y por la otra, no afectara al metabolismo de la rosquilla. En la figura 20, aparece una gráfica con las tres partes del método

bien diferenciadas, donde además, se puede observar el comportamiento de algunos individuos sometidos a diferentes sustancias exógenas.

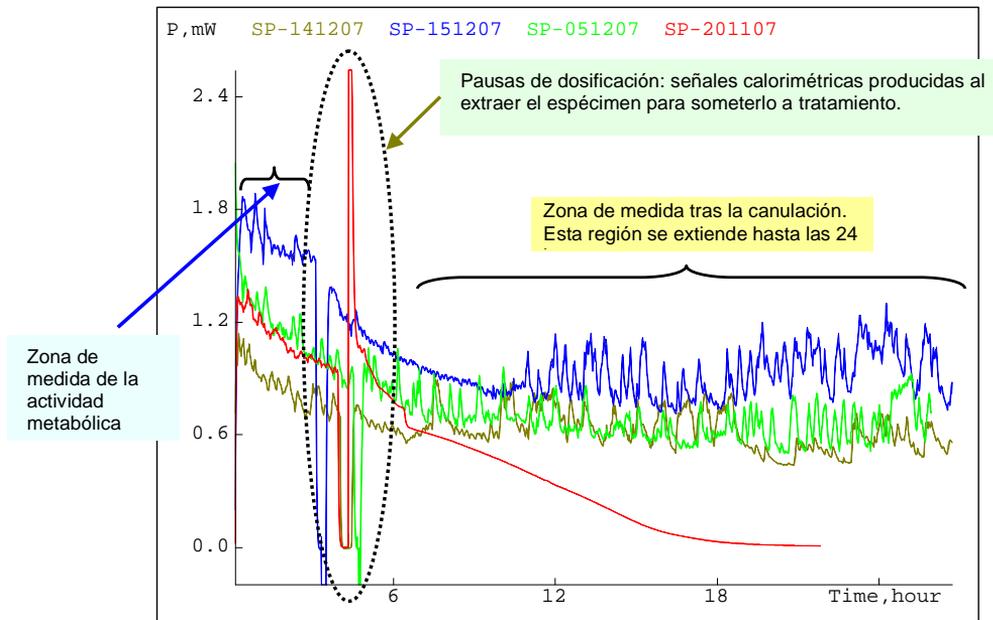


Figura 20. Señales calorimétricas correspondientes al método experimental. ---: espécimen sin canular. --- y ---: especímenes canulados con dimetilsulfóxido. ---: espécimen canulado con extracto supercrítico disuelto.

En verde claro, aparece la señal calorimétrica de un espécimen sin canular, mientras que en verde oscuro y azul, aparecen dos especímenes canulados con sólo dimetilsulfóxido, disolvente empleado para disolver las dosis de extracto supercrítico previamente obtenido. En rojo, aparece la señal calorimétrica de un individuo que fue canulado con disolución de extracto supercrítico de *Artemisia absinthium*. Los extractos elegidos fueron disueltos en DMSO, preparándose mezclas de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de concentración. Para facilitar la disolución de los extractos se empleó un baño de ultrasonidos durante seis minutos. Se realizaron experimentos con diferentes dosis de extractos. Cada experimento fue repetido al menos 5 veces, puesto que la incertidumbre que introduce un ser vivo como material de estudio es muy grande. Además, se desecharon todos aquellos especímenes cuya actividad metabólica media durante las 4 primeras horas fuera anormalmente baja (menor de 600 μW).

Resultados preliminares: En la Tabla 1 aparece un resumen de los bioensayos calorimétricos de toxicidad llevados a cabo con extractos seleccionados de los diferentes experimentos de extracción llevados a cabo con *Artemisia absinthium* L. Estos bioensayos miden la toxicidad de los extractos frente a *Spodoptera littoralis*, y complementan a los ensayos realizados de actividad antialimentaria y fitotóxica ya realizados previamente. Se ensayaron los extractos obtenidos mediante técnicas tradicionales de extracción (hidrodestilación y extracción Soxhlet con disolventes orgánicos) así como los obtenidos mediante extracción con fluidos supercríticos. Los extractos supercríticos ensayados pertenecen a varios experimentos realizados en diferentes condiciones. Cabe destacar la toxicidad de los extractos supercríticos frente a los extractos obtenidos tradicionalmente.

Tabla 1. Resultados preliminares de los ensayos calorimétricos

Ensayo	Muertes de <i>S. littoralis</i>
Blanco	0/15
Sólo disolvente (DMSO)	0/5
Hidrodestilado	0/5
Soxhlet Etanol	0/5
Soxhlet Hexano	0/5
Supercrítico 9,0 MPa, 40 °C, separador 2	1/5
Supercrítico 18,0 MPa, 50 °C, separador 1	2/5
Supercrítico 18,0 MPa, 50 °C, separador 2	2/5
Supercrítico con modificador, separador 1	0/5
Supercrítico con modificador, separador 2	1/5

2. Formulación de biopesticidas: encapsulado mediante atomización asistida con fluidos supercríticos (SAA).

Uno de los procesos de interés para el desarrollo de un insecticida es la presentación final a la hora de ser comercializado. Un compuesto insecticida que se degradara fácilmente con rapidez, o que supusiera un excesivo riesgo para el agricultor, difícilmente podría ser comercializado. Debido a que el objetivo final de la Tesis es el logro de extractos insecticidas para su posterior aplicación comercial, se pensó en otra técnica innovadora, el encapsulado asistido mediante fluidos supercríticos, para completar el ciclo de creación de un pesticida. La necesidad de encapsular o proteger un insecticida puede venir dada entre otras por su rápida degradación. Asumiendo que los extractos obtenidos mediante técnicas supercríticas u obtenidos mediante técnicas convencionales son fácilmente degradables, se buscó un método para protegerlos.

La atomización asistida mediante fluidos supercríticos (SAA, Supercritical Assisted Atomization) es una técnica novedosa en la que el scCO₂ actúa tanto de co-soluto como de agente neumático responsable de la atomización. Este proceso se basa en la utilización de un saturador empacado, en el que mediante el uso de relleno se consiguen altos tiempos de residencia del CO₂ y de la disolución a atomizar. En dicho mezclador se alcanzan condiciones de pseudo-equilibrio entre el scCO₂ y la disolución. Dicha mezcla viene luego inyectada en una cámara de precipitación, lográndose una atomización en dos pasos. El inicial sería una atomización primaria, denominada neumática, debida al descenso brusco de presión, y el siguiente una atomización secundaria, debida a la liberación del CO₂. Las dimensiones de las gotas formadas en la atomización primaria dependen de la presión del saturador, del diámetro y geometría del inyector y de algunos parámetros como el flujo, la viscosidad y la tensión superficial de la mezcla que va a ser atomizada. La atomización secundaria, provocada por la rápida liberación del CO₂, se verifica por la veloz despresurización (del saturador a altas presiones a la cámara de precipitación a presión atmosférica) ya que el CO₂ pasa de la disolución líquida en la cual está disuelto a un estado gaseoso, haciendo que las gotas formadas en la atomización primaria exploten. Estas nuevas gotas creadas en la atomización secundaria se secan por la acción de una corriente de nitrógeno y de la temperatura en la cámara [70].

El proceso SAA ha sido utilizado eficazmente en la atomización de fármacos y sustancias de varios tipos. La obtención de microsferas de ampicilina recubiertas de HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) ha sido conseguida por Reverchon y

Antonacci [71]. Las partículas, de forma esférica, presentaron una granulometría entre $0,2 \mu\text{m}$ y $6 \mu\text{m}$. Dicha granulometría vino determinada principalmente por la concentración del HPMC en la disolución inicial, puesto que con 5 mg/mL , el rango de la granulometría iba desde los $0,3 \mu\text{m}$ hasta los $3 \mu\text{m}$, mientras que a concentraciones de HPMC de $0,5 \text{ mg/mL}$, el rango alcanzaba valores de $0,2\text{-}6 \mu\text{m}$. Análisis posteriores de espectroscopía de rayos X confirmaron que el fármaco estaba uniformemente distribuido en la matriz polimérica.

La técnica SAA también ha sido usada para la producción de micropartículas de proteínas como la albúmina de suero bovino (BSA, Bovin Serum Albumin) o los lisozimas [72]. Se ha mostrado que el proceso SAA, a pesar de desnaturalizar parcialmente la albúmina (debido a la temperatura) es apropiado para producir microsferas compuestas fármaco-portador, ya que mediante la no solubilización en agua de las proteínas, se consigue una liberación controlada del fármaco (a través de la erosión y del hinchado).

Debido al escaso material disponible, se intentó fijar un método reproducible con un insecticida natural, la rotenona, que como se mencionó en la introducción puede ser obtenido a partir de *Derris elliptica*, *Lonchocarpus nicou* y *Tephrosia vogelii*. Además de poder obtenerse de forma natural, es rápidamente degradado a la luz solar. El encapsulado del biopesticida puede representar una ventaja a la hora de aumentar la estabilidad del mismo (aumento de la *shelf-life*), o incluso una mejora de la dispersión en agua (la rotenona es insoluble en agua).

Descripción del equipo y método operativo: La planta de laboratorio con la que se han realizado los experimentos se encuentra en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Fluidos Supercríticos de la Università degli Studi di Salerno, Italia, (figura 21). El esquema del aparato aparece en la figura 22. La planta consta de tres líneas: una para el scCO_2 , otra para la disolución líquida y otra para el nitrógeno; y dos cámaras: un saturador y un precipitador. Existe un baño para el enfriamiento del CO_2 . Cuenta con dos bombas de pistón para la impulsión del CO_2 y de la disolución líquida. Posee un caudalímetro y un intercambiador de calor para el nitrógeno. El saturador es una cámara resistente a la alta presión con un volumen de 25 cm^3 y está cargado con rellenos metálicos perforados. Los rellenos de alta

área superficial permiten un mayor contacto entre el CO_2 y la disolución que va a ser atomizada. Entre el saturador y el precipitador se encuentra un inyector de $100 \mu\text{m}$ de diámetro interno, donde se produce el espray. El precipitador opera a presión atmosférica y está construido en acero inoxidable. En la parte inferior del precipitador se encuentra un filtro sinterizado de acero inoxidable ($0,1 \mu\text{m}$ de



Figura 21. Planta de atomización mediante fluidos supercríticos (SAA).

tamaño medio de poro) para la recogida de polvo. La planta se completa con un totalímetro, termopares, manómetros, controladores de temperatura, tubos, conexiones y válvulas de alta presión.

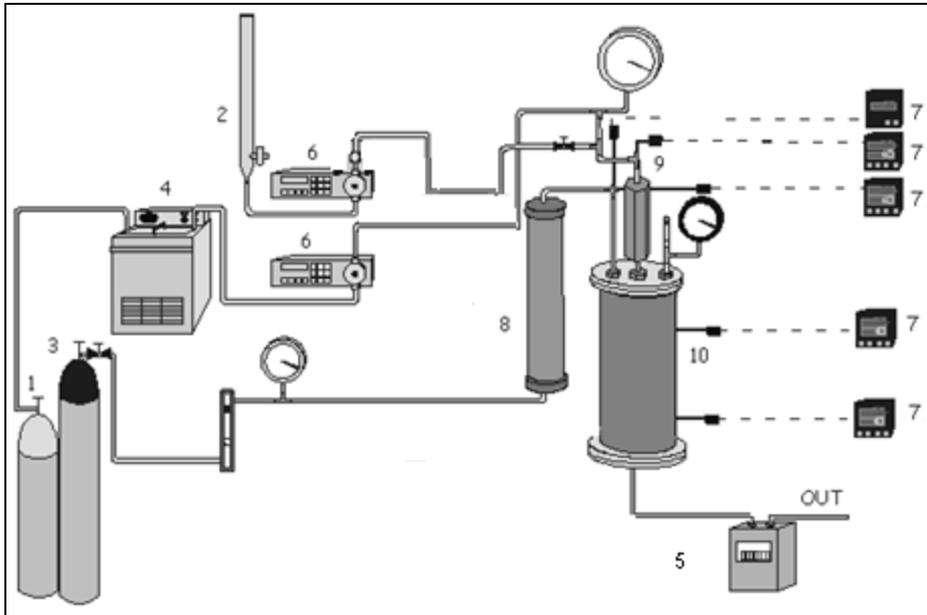


Figura 22. Esquema de la planta SAA 1) Botella de co-soluto (CO₂). 2) Bureta de alimentación de la disolución. 3) Botella del N₂. 4) Baño de refrigeración. 5) Totalímetro. 6) Bombas de pistón (impulsión CO₂ e impulsión disolución). 7) Termopares y controladores de temperatura. 8) Intercambiador de calor del N₂. 9) Saturador. 10) Precipitador.

Un experimento tipo consta de tres fases: estabilización, inyección y lavado. En la fase de estabilización se monitoriza el caudal efectivo del CO₂, mediante el uso del totalímetro. La bomba Gilson y las resistencias llevan al saturador a la temperatura y presión deseadas. A continuación se inicia la alimentación del nitrógeno al precipitador a la temperatura y caudal deseados para evaporar el disolvente y contrarrestar el enfriamiento causado por el efecto Joule-Thompson. Una vez alcanzadas las condiciones de trabajo de temperatura y presión en el saturador, se inicia el bombeo de la solución líquida al saturador, en la denominada fase de inyección. Primero se bombea sólo disolvente, y una vez estabilizado el sistema, se bombea la solución que contenga los compuestos de interés. Una vez inyectada toda la disolución, se comienza la fase de lavado. Ésta consiste en el paso de 50 mL de disolvente por la línea de la solución para arrastrar posibles residuos. El experimento finaliza desactivando la bomba de inyección de la solución, desactivando las resistencias que calientan la cámara, y dejando pasar una corriente de CO₂ y N₂ para eliminar completamente las trazas de disolvente.

Resultados preliminares:

Se ha realizado el encapsulado de la rotenona como insecticida modelo. Los primeros resultados, prometedores, están siendo preparados para presentarlos como publicación científica en el artículo "Rotenone Encapsulation in different biopolymers by Supercritical Assisted Atomization".

Se realizaron varios experimentos con la técnica SAA para la obtención de microesferas de biopolímero cargadas con rotenona. Los biopolímeros ensayados fueron: polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) y alginato de sodio. El rendimiento del encapsulado se obtiene mediante la siguiente relación:

$$\text{Rendimiento de encapsulado (\%)} = \frac{g_{\text{recuperados}}}{g_{\text{inyectados}}} \times 100 \quad (15)$$

La carga efectiva de la rotenona en las microesferas fue evaluada mediante análisis HPLC y las diferentes morfologías de las microesferas obtenidas fueron observadas mediante un microscopio FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscope). La carga efectiva de las microesferas fue hallada mediante la siguiente expresión:

$$\text{Carga efectiva (\%)} = \frac{g_{\text{rotenona}}}{g_{\text{rotenona teóricos}}} \times 100 \quad (16)$$

donde g_{rotenona} son los gramos de rotenona obtenidos en las microesferas SAA, mientras que $g_{\text{rotenona teóricos}}$ son los gramos de rotenona esperados en dichas microesferas en función de la relación polímero/insecticida de la solución de partida.

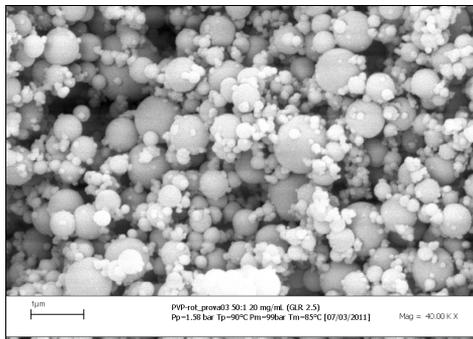
Valores superiores al 100 % de carga efectiva indican una precipitación preferencial de la rotenona respecto al polímero durante el proceso SAA. Teniendo en cuenta que el rendimiento de encapsulado no es completo, valores superiores al 100 % de carga efectiva suponen una ventaja, puesto que se perdería más polímero que rotenona, nuestro compuesto insecticida.

En la Tabla 2, aparecen algunos de los experimentos realizados para el encapsulado de rotenona. Cabe destacar que previamente se realizaron experimentos individuales para cada uno de los polímeros y para la rotenona, ya que se tuvo que verificar la viabilidad del procesado con la técnica SAA.

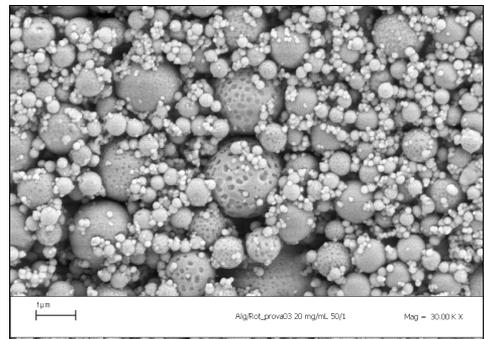
Tabla 2. Resultados experimentales para el encapsulado de la rotenona.

Polímero	Concentración. solución (mg/mL)	Ratio Polímero /Insecticida	Rendimiento de encapsulado (%)	Carga efectiva (%)
PEG	20	2/1	trazas	
PEG	20	8/1	trazas	
PEG	60	8/1	28 %	98 %
PVP	20	100/1	63 %	53 %
PVP	20	50/1	47 %	32 %
PVP	20	25/1	47 %	44 %
Alginato	20	100/1	45 %	130 %
Alginato	20	50/1	41 %	122 %
Alginato	20	50/1	56 %	107 %

En la figura 23 aparecen las distintas morfologías de algunas de las microesferas obtenidas, en función del polímero empleado. En la figura 23 a se observan coprecipitados de PVP/rotenona, en la figura 23 b se observan coacervados porosos de alginato rellenos de rotenona.



(a)



(b)

Figura 23. Morfologías obtenidas en los experimentos de encapsulado. a) coprecipitados PVP/rotenona. b) coacervados alginato/rotenona.

Bibliografía

- [1] A.P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, USA, Oxford University Press, 2000.
- [2] Report of the World Commission on Environment and Development 42/187, United Nations, 1987.
- [3] M. Wackernagel, W.E. Rees, *Our ecological footprint: reducing human impact on the earth*, New Society Publishers, 1996.
- [4] Home | Apparel Coalition <http://www.apparelcoalition.org/>.
- [5] General Assembly Resolution 55/2, United Nations, 2000.
- [6] G. Brunner, Supercritical fluids: technology and application to food processing, *Journal of Food Engineering*. 67 (2005) 21-33.
- [7] C.G. Pereira, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives, *Food and Bioprocess Technology* 3 (2009) 340-372.
- [8] S.M. Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi, Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis, *Journal of Chromatography A*. 1163 (2007) 2-24.
- [9] E. Reverchon, Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *The Journal of Supercritical Fluids*. 10 (1997) 1-37.
- [10] E. Reverchon, I. De Marco, Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *The Journal of Supercritical Fluids*. 38 (2006) 146-166.
- [11] H. Aro, E. Järvenpää, K. Könkö, M. Sihvonen, V. Hietaniemi, R. Huopalahti, Isolation and purification of egg yolk phospholipids using liquid extraction and pilot-scale supercritical fluid techniques, *European Food Research and Technology*. 228 (2009) 857-863.
- [12] M.B.O. Andersson, M. Demirbüker, L.G. Blomberg, Semi-continuous extraction/purification of lipids by means of supercritical fluids, *Journal of Chromatography A*. 785 (1997) 337-343.
- [13] O.J. Catchpole, J.B. Grey, K.A. Mitchell, J.S. Lan, Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture, *The Journal of Supercritical Fluids*. 29 (2004) 97-106.
- [14] T. Floris, G. Filippino, S. Scrugli, M.B. Pinna, F. Argiolas, A. Argiolas, M. Murru, E. Reverchon, Antioxidant compounds recovery from grape residues by a supercritical antisolvent assisted process, *The Journal of Supercritical Fluids*. 54 (2010) 165-170.

- [15] M. Poletto, E. Reverchon, Comparison of models for supercritical fluid extraction of seed and essential oils in relation to the mass-transfer rate, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 35 (1996) 3680-3686.
- [16] U. S Environmental Protection Agency, Pesticides: Regulating Pesticides, <http://www.epa.gov/opbppd1/biopesticides/>
- [17] The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary (Volume 1 of a 6 Volume Series)- Market Research Reports- Research and Markets.
- [18] Council Regulation on organic production and labelling of organic products 834/2007, European Union, 2007.
- [19] Biosociety Glossary of the European Commission, http://ec.europa.eu/research/biosociety/library/glossarylist_en.cfm?Init=B.
- [20] J.S. Kennedy, M.F. Day, V.F. Eastop, A conspectus of aphids as vectors of plant viruses, London, Commonwealth Institute of Entomology, 1962.
- [21] A. S. Balachowsky: Entomologie appliquee a l'agriculture, Traite. vol. 1, Coleopteres, France, Maison et Cie Éditeurs, 1963.
- [22] A. González-Coloma, D. Terrero, A. Perales, P. Escoubas, B.M. Fraga, Insect antifeedant ryanodane diterpenes from *Persea indica*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (1996) 296-300.
- [23] F. Juteau, I. Jerkovic, V. Masotti, M. Milos, J. Mastelic, J.-M. Bessièrre, J. Viano, Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France, *Planta Medica*. (2003) 158-161.
- [24] G. Rücker, D. Manns, S. Wilbert, Homoditerpene peroxides from *Artemisia absinthium*, *Phytochemistry*. 31 (1992) 340-342.
- [25] H. Chiasson, A. Bélanger, N. Bostanian, C. Vincent, A. Poliquin, Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction, *Journal of Economic Entomology*. 94 (2001) 167-171.
- [26] S. Padosch, D. Lachenmeier, L. Kroner, Absinthism: a fictitious 19th century syndrome with present impact, *Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy*. 1 (2006) 14.
- [27] Alpha-Thujone (546-80-5) - United States National Toxicology Program, <http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=03DB8C36-E7A1-9889-3BDF8436F2A8C51F>.

- [28] J. Burillo, Insecticidas repelentes de origen natural, en: *Insecticidas Repelentes De Origen Natural*, 1st ed., Zaragoza, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, 2009.
- [29] E. Stahl, D. Gerard, Hochdruck-Extraktion von Naturstoffen mit überkritischen und verflüssigten Gasen, *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*. 176 (1983) 1-4.
- [30] Herbotecnia - tecnología en producción de plantas medicinales, aromáticas y tintóreas. <http://www.herbotecnia.com.ar/exo-ajenjo.html>
- [31] A. Judþentienė, D. Mockutė, Chemical composition of essential oils of *Artemisiaabsinthium* L. (wormwood) growing wild in Vilnius, *Chemija*. 15 (2004) 64-68.
- [32] P. Blagojevic, N. Radulovic, R. Palic, G. Stojanovic, Chemical composition of the essential oils of Serbian wild-growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (2006) 4780-4789.
- [33] J. Labrador, J.L. Porcuna, A. Bello, *Manual de Agricultura y Ganadería Ecológica*, Eumedia, 2006.
- [34] D. Bramwell, The endemic flora in the Canary Islands, in: *Biogeography and Ecology in the Canary Islands*, Junk, The Hague, G. Kunkel, 1976: pp. 207-240.
- [35] Boletín Oficial de Canarias 61, Ley 7/1991, Santa Cruz de Tenerife, 1991.
- [36] A. González-Coloma, R. Cabrera, A.R. Socorro Monzón, B.M. Fraga, *Persea indica* as a natural source of the insecticide ryanodol, *Phytochemistry*. 34 (1993) 397-400.
- [37] A.L. Waterhouse, I.N. Pessah, A.O. Francini, J.E. Casida, Structural aspects of ryanodine action and selectivity, *Journal of Medicinal Chemistry*. 30 (1987) 710-716.
- [38] B.M. Fraga, A. González-Coloma, C. Gutiérrez, D. Terrero, Insect antifeedant isoryanodane diterpenes from *Persea indica*, *Journal of Natural Products*. 60 (1997) 880-883.
- [39] G. Della Porta, E. Reverchon, Supercritical fluids extraction and fractionation of pyrethrins from pyrethrum, in: A. Bertucco (Ed.), *Fourth International Symposium on High Pressure Process Technology and Chemical Engineering*, Venice, Italy, 2002. p2 23 .
- [40] H. Kiriamiti, S. Camy, C. Gourdon, J.S. Condoret, Supercritical carbon dioxide processing of pyrethrum oleoresin and pale, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (2003) 880-884.

- [41] H.K. Kiriamiti, S. Camy, C. Gourdon, J.S. Condoret, Pyrethrin extraction from pyrethrum flowers using carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*. 26 (2003) 193-200.
- [42] W.H.T. Pan, C.C. Chang, T.T. Su, F. Lee, M.-R.S. Fuh, Preparative supercritical fluid extraction of pyrethrin I and II from pyrethrum flower, *Talanta*. 42 (1995) 1745-1749.
- [43] I. Yamamoto, Mode of action of pyrethroids, nicotinoids, and rotenoids, *Annual Review of Entomology*. 15 (1970) 257-272.
- [44] J.E. Casida, Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides, *Environmental Health Perspectives* 34 (1980) 189-202.
- [45] S.E. Atawodi, J.C. Atawodi, *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities, *Phytochemistry Reviews*. 8 (2009) 601-620.
- [46] P. Tonthubthimthong, S. Chuaprasert, P. Douglas, W. Luewisutthichat, Supercritical CO₂ extraction of nimbin from neem seeds - an experimental study, *Journal of Food Engineering*. 47 (2001) 289-293.
- [47] P. Tonthubthimthong, P.L. Douglas, S. Douglas, W. Luewisutthichat, W. Teppaitoon, L. Pengsopa, Extraction of nimbin from neem seeds using supercritical CO₂ and a supercritical CO₂-methanol mixture, *The Journal of Supercritical Fluids*. 30 (2004) 287-301.
- [48] P. Ambrosino, R. Fresa, V. Fogliano, S.M. Monti, A. Ritieni, Extraction of azadirachtin A from neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (1999) 5252-5256.
- [49] S. Johnson, E.D. Morgan, Supercritical fluid extraction of oil and triterpenoids from neem seeds, *Phytochemical Analysis*. 8 (1997) 228-232.
- [50] K.M. Abdo, Toxicology and Carcinogenesis studies of rotenone (Cas No. 83-79-4) in F344/N rats and B6C3Fi mice, United States National Toxicology Program, Technical Report Series No 320., 1988
- [51] P. Caboni, T.B. Sherer, N. Zhang, G. Taylor, H.M. Na, J.T. Greenamyre, J.E. Casida, Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease, *Chemical Research in Toxicology*. 17 (2004) 1540-1548.
- [52] H.-M. Gao, B. Liu, J.-S. Hong, Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons, *The Journal of Neuroscience*. 23 (2003) 6181 -6187.
- [53] G. Li, A. Chen, Z. Ma, J. Feng, X. Zhang, Study on supercritical fluid extraction technique of rotenone from *Tephrosia vogelii*, *Nogyaoxue Xuebao*. 2 (2005) 144-149.

- [54] J. Huang, L. Zhou, H. Xu, X. Yang, Effects of extraction of rotenone from *Tephrosia vogelii* hook. F with supercritical fluid CO₂, *Huazhong Nongye Daxue Xuebao*. 1 (2006) 43-45.
- [55] A. D'Andrea, A. Aliboni, A. De Santis, S. Mariani, D. Gorgoglione, A. Ritieni, SFE of *Derris elliptica* (Wallich) Benth. roots: influence of process parameters on yield and purity of rotenone, *The Journal of Supercritical Fluids*. 42 (2007) 330-333.
- [56] E. Langa, J. Cacho, A.M.F. Palavra, J. Burillo, A.M. Mainar, J.S. Urieta, The evolution of hyssop oil composition in the supercritical extraction curve: Modelling of the oil extraction process, *The Journal of Supercritical Fluids*. 49 (2009) 37-44.
- [57] E. Langa, G.D. Porta, A.M.F. Palavra, J.S. Urieta, A.M. Mainar, Supercritical fluid extraction of Spanish sage essential oil: Optimization of the process parameters and modelling, *The Journal of Supercritical Fluids*. 49 (2009) 174-181.
- [58] Elisa Langa, Extracción con CO₂ supercrítico de aceites esenciales de plantas aromáticas, Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, 2007.
- [59] H. van Den Dool, P. Dec. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography A*. 11 (1963) 463-471.
- [60] C. Jordà, G. Llácer with Jordà, Lista de virosis descritas en los distintos grupos de plantas cultivadas, in: G. Llácer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello, G. Llácer (Ed.), *Patología Vegetal*, Valencia, Sociedad Española de Fitopatología. Phytoma-España, 1996.
- [61] G. Belli, G. Corbetta, R. Osler, Ricerche e osservazioni sull'epidemiologia e sulle possibilità di prevenzione del «giallume» del riso, *Il Riso*. 4 (s.d.) 359-363.
- [62] E. Burgueño-Tapia, L. Castillo, A. González-Coloma, P. Joseph-Nathan, Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene p-benzoquinone perezona and some of its derivatives, *Journal of Chemical Ecology* 34 (2008) 766-771.
- [63] P. Escoubas, L. Lajide, J. Mizutani, An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants, *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 66 (1993) 99-107.
- [64] S.N. Naik, H. Lentz, R.C. Maheshwari, Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium conditions, *Fluid Phase Equilibria*. 49 (1989) 115-126.

- [65] H. Sovova, Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation, *The Journal of Supercritical Fluids*. 33 (2005) 35-52.
- [66] I. Lamprecht, Calorimetric experiments on social insects, *Thermochimica Acta*. 300 (1997) 213-224.
- [67] Engell-Kofoed Anders E, Single substance and mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*, Master's thesis, Roskilde University, 2005.
- [68] Assegid Garedew, Mikrokalorimetrische und mikrobiologische in vitro Untersuchungen auf akarizide, insektizide und antibiotische Wirkungen von Propolis, Doctoral Thesis, Berlin, 2003.
- [69] A. González-Coloma, A. Guadaño, C. Gutierrez, R. Cabrera, E. de la Peña, G. de la Fuente, M. Reina, Antifeedant Delphinium diterpenoid alkaloids. Structure-activity relationships, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (1998) 286-290.
- [70] E. Reverchon, Supercritical-assisted atomization to produce micro- and/or nanoparticles of controlled size and distribution, *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 41 (2002) 2405-2411.
- [71] E. Reverchon, A. Antonacci, Drug-polymer microparticles produced by supercritical assisted atomization, *Biotechnology and Bioengineering*. 97 (2007) 1626-1637.
- [72] R. Adami, L. Osseo, E. Reverchon, Micronization of lysozyme by supercritical assisted atomization, *Biotechnology and Bioengineering*. 104 (2009) 1162-1170.