

Optimización de la extracción de antioxidantes de *Salvia officinalis* L. con CO₂ supercrítico

Jairo René Martínez^{1,*}, Carlos Ruiz, Ginna Arias, Elena Stashenko

¹Centro de Investigación en Biomoléculas, CENIVAM, Bucaramanga, Colombia

Resumen

Se aplicó un diseño factorial fraccionado 2⁷⁻² para seleccionar las variables con mayor efecto sobre la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles y el rendimiento de la extracción utilizando CO₂ supercrítico como solvente sobre hojas y tallos de *Salvia officinalis* L. El tiempo de extracción, el flujo de CO₂, la presión de la cámara de extracción y la temperatura de separación se modificaron según el procedimiento simplex para hallar empíricamente las condiciones que produjeran extractos de salvia con el valor más alto de la combinación lineal de rendimiento de extracción, capacidad antioxidante y contenido total de fenoles.

Palabras clave: *Salvia officinalis*, supercrítico, optimización simplex, ácido carnósico.

Optimization of the extraction of *Salvia officinalis* L. antioxidants with supercritical CO₂

Abstract

A 2⁷⁻² fractional factorial design was used to select the variables with the greatest effect on the antioxidant capacity, the total phenolic content and the extraction yield using supercritical carbon dioxide as a solvent on *Salvia officinalis* L. leaves and stems. The extraction time, the CO₂ flow, the extraction chamber pressure and the collector temperature were modified according to the simplex method in order to empirically find the conditions resulting in salvia extracts with the highest value of the linear combination of extraction yield, antioxidant capacity and total phenolic content.

Key words: *Salvia officinalis*, supercritical, simplex optimization, carnosic acid.

Introducción

La capacidad antioxidante es una propiedad biológica de gran interés para las diversas aplicaciones de las plantas aromáticas. En la salvia (*Salvia officinalis*) se ha reconocido desde hace mucho tiempo esta propiedad que, junto a su poder microbicida, ha permitido usarla con éxito como preservante de cárnicos y otros alimentos (Meyer, *et al.*, 2002). De la salvia y de otras muchas plantas aromáticas y medicinales se utilizan sus aceites esenciales, sus extractos o sus partes (hojas, flores, raíces) como ingredientes de diversas preparaciones y productos comerciales para el consumo humano. En la búsqueda de una explicación molecular de la actividad biológica de la salvia se ha demostrado que en sus metabolitos secundarios se encuentran varias sustancias que poseen alta capacidad antioxidante, tales como los ácidos fenólicos rosmarínico, salvianólico y ursólico, los flavonoides luteolina y salvicoumarina y los diterpenos fenólicos ácido carnósico, carnosol y rosmanol (Wang, *et al.*, 1998; Lu, *et al.*, 1999a; Lu, *et al.*, 1999b; Lu, *et al.*, 2000; Lu, *et al.*, 2001). Entre estos, los ácidos rosmarínico y carnósico presentan la mayor capacidad antioxidante,

superior a la del 2,6-di-*terc*-butil-*p*-cresol (BHT) y la del *terc*-butil-4-metoxifenol (BHA), antioxidantes de amplio uso en la industria (Sebranek, *et al.*, 2005).

En la elaboración de productos farmacéuticos y alimenticios, o en otras aplicaciones para consumo humano, es importante la eliminación de los residuos de solventes orgánicos utilizados en el proceso de extracción de antioxidantes a partir de material vegetal. Esta es una etapa que agrega costos al proceso productivo y puede causar alguna modificación de los componentes bioactivos debido al tratamiento térmico involucrado. En este contexto, a partir de la década de 1970 se ha venido utilizando cada vez más el CO₂ en estado supercrítico como agente extractivo, ya que su temperatura y su presión críticas (304,25 K, 7,39 MPa) son relativamente bajas, se mantiene como gas en condiciones estándar de temperatura y presión, no es inflamable y no está clasificado como tóxico (Rizvi, 1994).

*Correspondencia:

Jairo René Martínez, rene@tucan.uis.edu.co

Recibido: 6 de mayo de 2014

Aceptado: 19 de junio de 2014

Varios investigadores han estudiado la extracción de hojas de salvia con CO₂ supercrítico como técnica alternativa para la obtención del aceite esencial; en este sentido, la atención se ha centrado en el rendimiento de la extracción, la composición del extracto y su bioactividad. Reverchon, Taddeo y Della Porta examinaron los efectos del tiempo de extracción y la densidad del CO₂ sobre la composición del extracto. Los compuestos livianos y poco polares predominaron al inicio de la extracción y su cantidad relativa se redujo progresivamente a medida que aumentaron las sustancias de mayor masa molecular y polaridad. A 9 MPa y 50 °C se obtuvo el extracto de hojas de salvia con el mayor contenido de monoterpenos oxigenados (Reverchon, *et al.*, 1995). Aleksovski y Sovová encontraron el mayor rendimiento de extracción a 12,5 MPa y 50 °C. El extracto tuvo una composición similar a la del aceite esencial de salvia, pero con un contenido mayor de diterpenos oxigenados (manol, esclareol) (Aleksovski y Sovová, 2007). Glisic y colaboradores variaron las condiciones de extracción de salvia para buscar la selectividad hacia los diterpenos. La mayor selectividad se encontró a 10 MPa, pero el mayor rendimiento de extracción se observó a 30 MPa, 323 K y 37 kg de CO₂ por kg de material vegetal (Glisic, *et al.*, 2010). En los trabajos sobre extracción de salvia publicados por Ivanović y colaboradores (Ivanović, *et al.*, 2007) y Babovic y colaboradores (Babovic, *et al.*, 2010), se incluyó la medición de la capacidad antioxidante del extracto, pero el énfasis se mantuvo en estudiar el rendimiento de la extracción. Se ha estudiado la optimización del proceso de extracción con CO₂ en función de la presión, la temperatura, el tiempo de extracción, el tamaño de las partículas y el flujo o consumo de CO₂. Para aumentar la extracción a escala de manera apropiada y estudiar diferentes condiciones de operación, se recurre a un modelo matemático que explique la relación experimental entre rendimiento y tiempo de extracción. Reverchon encontró que la etapa determinante del proceso de extracción era la transferencia interna de masa (Reverchon, 1996). Además, logró mejores resultados al representar la forma de las partículas de material vegetal como losas en lugar de esferas. Aleksovski y Sovová utilizaron un modelo exponencial sencillo para representar los dos períodos que observaron durante el avance de la extracción, caracterizados por un aumento inicial rápido del rendimiento, que pasó luego a un régimen lento de extracción simultánea de terpenoides, cera cuticular y agua (Aleksovski y Sovová, 2007).

La búsqueda de condiciones para un rendimiento superior de la extracción cuando se trata material vegetal de plantas aromáticas con CO₂ en estado supercrítico, se ha hecho utilizando el método de la superficie de respuesta. Ejemplos representativos de estos procedimientos los constituyen los trabajos publicados sobre *Vetiveria zizanioides* (Danh,

et al., 2009), *Myrtus communis* (Pereira, *et al.*, 2013; Ghasemi, *et al.*, 2011), *Satureja hortensis* (Khajeh, 2011), *Pimpinella affinis* (Dashtianeh, 2013), y *Piper nigrum* (Bagheri, *et al.*, 2014). Debido al gran número de variables a explorar, se requiere una primera etapa de tamizaje para seleccionar un conjunto reducido de factores que optimicen el dato observable de interés, que, usualmente, se trata del rendimiento (Sharif, *et al.*, 2014).

En este trabajo se buscaron las condiciones de extracción de hojas y tallos de *Salvia officinalis* con CO₂ supercrítico que permitieran maximizar un dato observable combinando el rendimiento de la extracción, el contenido de polifenoles (según el método de Folin-Ciocalteu) y la capacidad antioxidante del extracto (según el método ORAC, *oxygen radical absorbance capacity*). Se efectuó una primera etapa de tamizaje basada en un diseño factorial fraccionado 2⁷⁻², seguida de la optimización empírica por el método simplex (Nelder y Mead, 1965) de cuatro factores. Esto permitió obtener un resultado que no depende de un modelo matemático específico para describir la relación entre el rendimiento, la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles y las condiciones de extracción. La composición de los extractos se determinó por cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos y cromatografía de gases con detector selectivo de masas.

Materiales y métodos

Materiales

El material vegetal de la especie bajo estudio se cosechó en el municipio de Sucre, Santander, Colombia. La identificación taxonómica de las especies estudiadas se llevó a cabo en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá) y estuvo a cargo del doctor J. L. Fernández-Alonso. La muestra permanente se registró con el N° 555848.

Se utilizó CO₂ de 99,9 % de pureza (Linde de Colombia, Bogotá, Colombia). El metanol y el etanol empleados como solventes fueron de grado analítico (Mallinckrodt Baker Inc., J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.), al igual que el reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N) y KH₂PO₄ (99 %). Se utilizó agua tipo I obtenida en un equipo Millipore (Millipore S.A., Molsheim, Francia). Además, se usaron los siguientes reactivos y patrones (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EE.UU.): Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; 97 %), a-tocoferol (97 %), butilhidroxianisol (BHA, 99 %), butilhidroxitolueno (BHT, 99 %), ácido gálico (99 %), ácido carnósico (98 %), 1,8-cineol (99 %), *cis*-tujona (97 %), a-humuleno (98,0 %), fluoresceína (FL) y AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano)hidrocloruro). El cloruro de potasio (99 %), el persulfato de potasio (PDS, 97 %), el hidróxido de sodio (NaOH) y el sulfato de sodio (Na₂SO₄) se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

Pretratamiento de la muestra

Las hojas, tallos y flores procedentes de parcelas experimentales ubicadas en el municipio de Sucre, Santander, se secaron bajo condiciones de temperatura y humedad ambientales y protegidos de la luz solar y del agua. Luego se picó el material vegetal manualmente y se pasó por un molino de cuchillas (Wiley Mill, Standard Model N° 3, Pittsburgh, PA, EE.UU.), hasta alcanzar un tamaño promedio de 1 mm. La caracterización por tamaño del material vegetal se llevó a cabo en un tamiz Tyler Portable Sieve Shaker Model RX-24, (Columbus, MI, EE.UU.), equipado con mallas Sargent-Welch Scientific Company, (Buffalo, NY, EE.UU.). El material molido se sometió a un proceso de secado controlado en un horno eléctrico Indumegas (Bucaramanga, Colombia) hasta alcanzar valores de humedad menores de 10 % (base húmeda). De cada tamaño de partícula y temperatura de secado se realizaron extracciones por duplicado para determinar el rendimiento de extracción y así escoger los parámetros adecuados para los experimentos de análisis de variables y de optimización.

Extracción con dióxido de carbono supercrítico

Las extracciones con fluido supercrítico se llevaron a cabo en un equipo Thar SFE-2000-2-FMC50 (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.), equipado con una cámara de extracción con capacidad de $2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$, un sistema de separación y recolección de los extractos de tipo ciclón con capacidad de $5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$, un regulador automático de presión, bomba de alta presión P-200A (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.) para el CO_2 , y bomba P-50 (Thar Instruments, Inc., Pittsburgh, PA, EE.UU.) para el modificador, y un medidor de flujo Sitrans FC Massflo® de tipo MASS 6000 (Siemens AG, Berlín, Alemania). Se seleccionaron siete variables de proceso para estudiar su efecto sobre el rendimiento, la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles del extracto obtenido: tiempo de flujo del CO_2 a través de la cámara de extracción (D), tiempo de residencia del CO_2 en la cámara de extracción cuando se suspendía su flujo (E), flujo de CO_2 (F), presión en el recipiente colector (G), temperatura del colector (H), presión en la cámara de extracción (P), y temperatura de la cámara de extracción (T). La densidad de empaquetamiento del material vegetal en la cámara de extracción se mantuvo relativamente constante ($280 \pm 32 \text{ kg/m}^3$).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó en un lector de microplacas Turner Biosystems Inc., Modulus™ II Microplate Multimode Reader con microplacas de poliestireno de 96 pozos, equipado con un módulo de fluorescencia con filtros para longitudes de onda de 490 nm (excitación) y 510-570 nm (emisión) (Sunnyvale, CA, EE.UU.). La capacidad

antioxidante de las muestras se midió por la inhibición de la disminución de la fluorescencia. Para este propósito, se usó fluoresceína (FL) como indicador molecular y blanco de ataque de los radicales peroxilo generados por AAPH. Las muestras o el Trolox® se disolvieron en una mezcla de metanol y agua (50:50 v/v). Se agregaron tampón fosfato, FL y las soluciones de las muestras en la microplaca, y se agitó e incubó a 310 K. Cuando se alcanzó la temperatura estable, se añadió el AAPH y se inició la medición de la fluorescencia en función del tiempo. Como estándar de control en las mediciones se usó Trolox®, cuantificado mediante la curva de calibración.

Determinación del contenido de fenoles

Los fenoles totales se estimaron como equivalentes del ácido gálico y se expresaron como concentración equivalente (g/l) de ácido gálico. El volumen total de reacción fue de 200 ml. Se mezclaron 50 ml de solución de la muestra con 50 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y luego de 1 minuto, se adicionaron 100 ml de NaOH (0,175 M) y se prosiguió a medir la absorbancia de la mezcla a 750 nm, comparándola con la curva de calibración del ácido gálico elaborada con mediciones realizadas de la misma manera que las de las muestras de los extractos.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La separación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos con CO_2 supercrítico se hizo en un equipo GC Agilent Technologies 6890 Plus (Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies MSD 5975 Network, en una columna capilar con la fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 μm , d_p . Se empleó helio (99,995 %, gas AP, Linde Colombia, Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi y una velocidad volumétrica de flujo de 1 ml/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C, con modo de inyección *split* y un volumen de inyección de 2 μl . En el horno del cromatógrafo, la temperatura inicial fue de 45 °C (5 min), la cual se aumentó luego hasta 150 °C durante 2 minutos (a razón de 4 °C/min), después hasta 250 °C (a razón de 5 °C/min) y, finalmente, hasta 275 °C durante 15 minutos (a razón de 10 °C/min), con una velocidad de flujo de 26 cm/s. La cámara de ionización se mantuvo a 230 °C y el cuadrupolo, a 150 °C. Los iones fragmentados en los espectros de masas se obtuvieron por impacto con electrones de energía de 70 eV y se registraron en un rango de masas (m/z) de entre 45 y 450.

El muestreo de los compuestos volátiles en los extractos se realizó por microextracción en fase sólida, con una fibra de polidimetilsiloxano / divinilbenceno (PDMS/ DVB)

(Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.), la cual se sometió a desorción en el puerto de inyección de un cromatógrafo Agilent Technologies 6890N Network Series GC (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5975 Inert XL. La separación se llevó a cabo en una columna de sílice fundida DB-WAX (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de polietilenglicol de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 μm , d_p , con una presión de entrada de la columna de 20,75 psi. La temperatura del horno se programó en 45 °C durante los 5 minutos iniciales, se aumentó a 150 °C durante 3 minutos (a razón de 3 °C/min), y finalmente se llevó hasta 220 °C durante 5 minutos (a razón de 4 °C/min). Las demás condiciones operativas se mantuvieron iguales a las mencionadas anteriormente.

Cromatografía líquida

El análisis se realizó en un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 (Miami, FL, EE.UU.), el cual consta de una bomba cuaternaria Agilent Technologies G1354A, un inyector manual Agilent Technologies Series 1200 G1328B y un detector UV-Vis de arreglo de diodos G1315B. Se empleó una columna Zorbax-Eclipse C_{18} 150x4,6 mm, tamaño de partícula 3,5 mm; los analitos se eluyeron con una fase móvil conformada por metanol y agua (ácido ortofosfórico al 0,1 %). El procesamiento de los datos se realizó con la aplicación Agilent ChemStation LC.

Resultados y discusión

El procedimiento utilizado para encontrar las condiciones de extracción óptimas constó de una primera etapa de tamizaje de variables, seguida por la búsqueda empírica (método simplex) del punto óptimo dentro del subespacio formado por los factores de mayor efecto significativo. Los experimentos preliminares permitieron seleccionar la temperatura y el tiempo de secado requeridos para reducir la humedad del material vegetal a un valor menor de 10 % (40 °C, 8 h o 50 °C, 7 h). Este contenido bajo de agua se requiere para reducir la competencia entre la fase acuosa y el CO_2 durante el proceso de extracción (Pereira y Meireles, 2010).

Análisis de las variables del proceso de extracción

El tiempo dinámico (D) en cada extracción correspondió al intervalo entre el logro de las condiciones de temperatura en la cámara de extracción y el momento en que se suspendió la operación de la bomba. Se realizaron experimentos preliminares para establecer los niveles inferior y superior de las siete variables de proceso bajo estudio (Tabla 1). Para la etapa de tamizaje de las variables, se empleó un diseño factorial fraccionado 2^{7-2} . La Tabla 2 contiene los resultados de rendimiento (% p/p), de capacidad antioxidante ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mg}$ de extracto) y de contenido de fenoles

Tabla 1. Dominio experimental en la optimización de la extracción de antioxidantes a partir de salvia

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

(g/l de ácido gálico) determinados para los 32 extractos de *S. officinalis* obtenidos con este diseño experimental. El nombre de cada experimento se construyó por yuxtaposición de los nombres de las variables que presentaron niveles altos. Para estimar el efecto de cada variable se aplicó el método del producto vectorial punto entre las columnas de los niveles de las variables y las columnas de los resultados (Montgomery, 2008). Las figuras 1A a 1C contienen los gráficos de distribución normal para los efectos de primero, segundo, tercero y cuarto orden sobre los tres datos observables (rendimiento, capacidad antioxidante y contenido de fenoles). Los puntos alineados corresponden a efectos que por su tamaño no se distinguen del error experimental, mientras que los que se desvían son los efectos que pueden ser significativos. Se aprecia en las figuras 1A a 1C que el tiempo dinámico (D) y el flujo de CO_2 (F) tuvieron efecto sobre todos los datos observables, mientras que la temperatura (T) y la presión (P) de la cámara de extracción modificaron más el rendimiento. Con las variables que presentaron efecto se construyeron modelos polinómicos que se ajustaron por regresión lineal múltiple a los datos experimentales para cada uno de los tres datos observables. Se obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) de alrededor de 0,7, pero no se refinaron los modelos porque solamente se requerían para delimitar la región en donde se realizaría la búsqueda del máximo por el método simplex. Durante esta etapa de análisis de datos se examinaron los efectos significativos y el modelo matemático correspondiente para un dato observable Y, definido como la suma de los tres datos observables, con factores de peso 0,3, 0,4 y 0,3 para rendimiento, capacidad antioxidante y contenido de fenoles, respectivamente. La capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles se trataron como variables independientes debido a su bajo coeficiente de correlación (ver discusión más adelante). Debido a sus escalas diferentes, los valores de estos tres datos observables se normalizaron (división por la resta de los valores máximo y mínimo) y su promedio se desplazó a cero (sustracción del promedio). La figura 1D muestra que las variables que pudieron tener efecto significativo sobre

Tabla 2. Resultados obtenidos a partir del diseño factorial fraccionado 2⁷⁻²

Número de experimento	Código*	Rendimiento, %	Capacidad antioxidante, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{mg}$ de extracto	Contenido total de fenoles equivalentes de ácido gálico, g/l
1	gh	0,7	0,93±0,04	372±4
2	p	0,7	0,92±0,03	456±3
3	t	1,0	0,79±0,01	495±9
4	ghpt	1,3	1,11±0,03	661±18
5	f	1,4	0,95±0,03	669±11
6	fghp	0,6	1,05±0,01	640±10
7	fght	1,2	1,07±0,04	497±14
8	fpt	2,8	0,80±0,01	356±17
9	dh	1,2	0,89±0,03	434±7
10	dgp	1,9	0,89±0,05	461±8
11	dgt	1,5	1,20±0,02	560±10
12	dhpt	1,8	1,76±0,04	663±9
13	dfg	1,4	1,39±0,03	682±3
14	dfhp	2,0	1,66±0,04	668±10
15	dfht	2,2	1,59±0,01	747±8
16	dfgpt	3,3	1,41±0,02	733±4
17	eg	0,5	0,96±0,03	548±13
18	ehp	0,8	1,37±0,03	644±14
19	eht	0,7	0,91±0,02	348±12
20	egpt	1,2	1,09±0,02	463±15
21	efh	1,1	1,15±0,01	334±10
22	efhp	1,1	1,80±0,03	558±13
23	fgt	1,4	1,18±0,02	547±6
24	efhpt	2,4	0,86±0,02	598±7
25	de	1,0	1,57±0,04	587±3
26	degph	1,8	1,32±0,03	629±9
27	deght	2,5	0,83±0,03	434±8
28	dept	2,2	1,00±0,03	534±6
29	defgh	1,3	1,61±0,02	780±9
30	defp	1,9	1,12±0,02	626±8
31	deft	2,7	1,035±0,005	674±9
32	defghpt	3,8	1,70±0,05	620±9

* p: presión de extracción; t: temperatura de extracción; f: flujo del fluido; d: tiempo dinámico; e: tiempo estático; g: presión de separación; h: temperatura de separación

este dato observable Y fueron el tiempo dinámico (D), el flujo de CO₂ (F), la presión (P) y el producto de la presión y la temperatura del colector (H).

Una inspección de los resultados de la Tabla 2 muestra que en aquellos experimentos con nombre corto (pocas variables en nivel alto), los datos observables tuvieron valores bajos; por ejemplo, los experimentos gh, p, t, f, dh y eg tuvieron respuestas menores que las de los experimentos codificados como dfgpt, degph, defgh y defghpt. Esto sugiere que la búsqueda de las condiciones óptimas debe realizarse en la región de niveles altos de los factores.

La evaluación de la correlación lineal entre los tres datos observables produjo valores de $r = 0,372$ para la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles; de $r = 0,04$ para la capacidad antioxidante y el rendimiento, y de $r = 0,07$ para el contenido total de fenoles y el rendimiento. Esto muestra una correlación muy baja entre los tres aspectos determinados en cada experimento.

Puesto que los fenoles son los principales responsables de la capacidad antioxidante de la salvia (**Wang, et al., 1998; Djamarti, et al., 1991**), se esperaría un mayor coeficiente de correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido

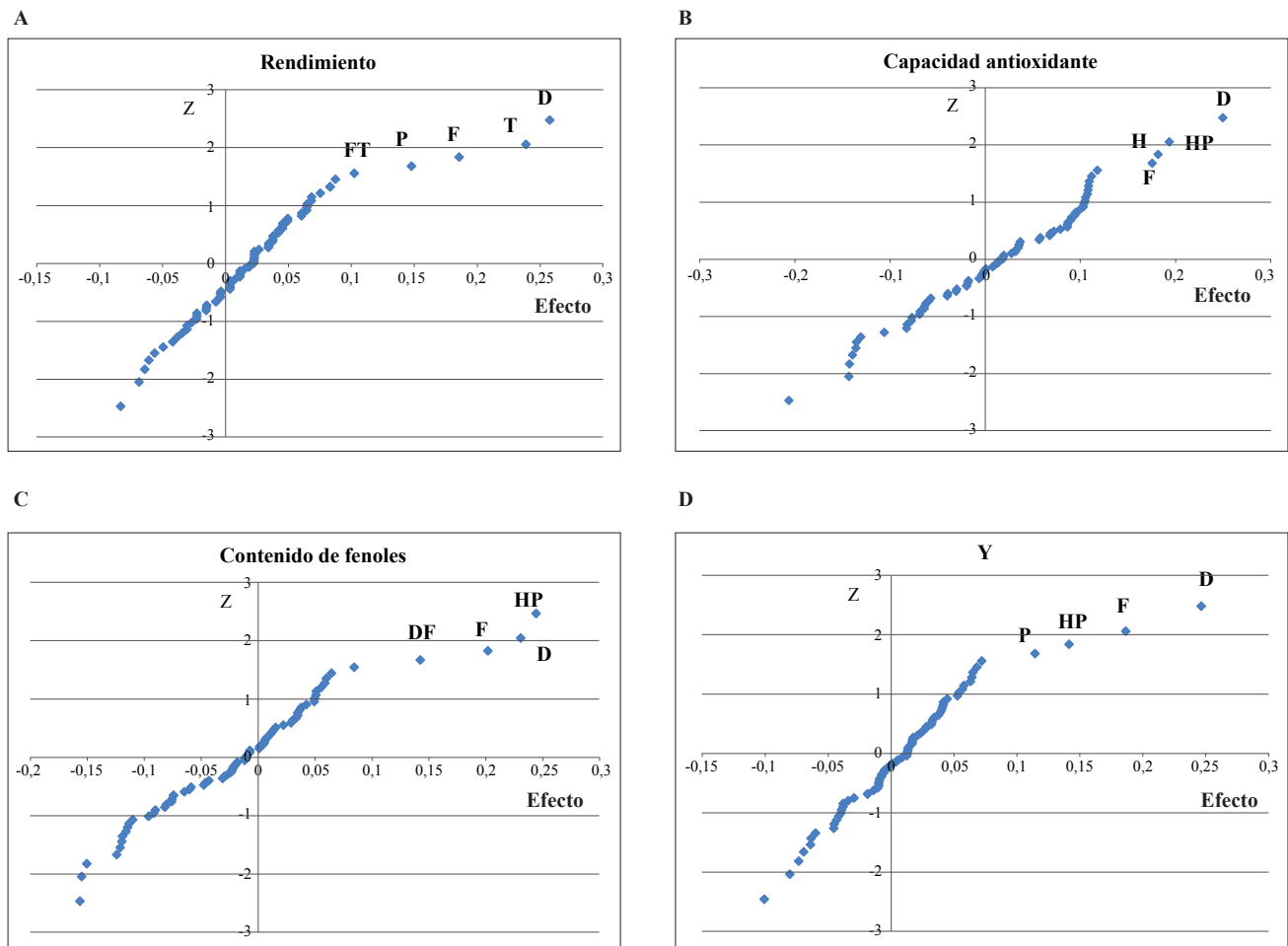


Figura 1. Gráfica de distribución normal para los efectos de primer a cuarto orden calculados con los resultados del diseño factorial fraccionado 2^{7-2} . A. Rendimiento de la extracción. B. Capacidad antioxidante del extracto según determinación ORAC. C. Contenido total de fenoles según el método Folin-Ciocalteu. D. Dato observable Y, combinación lineal de las respuestas de rendimiento (30 %), capacidad antioxidante (40 %) y contenido total de fenoles (30 %).

total de fenoles. Efectivamente, en un estudio de extractos acuosos de plantas medicinales y especias se encontró tal relación lineal ($r = 0,92$) entre la capacidad antioxidante ORAC y el contenido total de fenoles (Zheng y Wang, 2001). De forma similar, el contenido total de fenoles de los extractos en metanol, acetato de etilo o acetona de 12 plantas aromáticas tuvo un coeficiente de correlación de 0,84 con los resultados de la capacidad antioxidante obtenidos mediante el método ABTS (Miliauskas, et al., 2004). Sin embargo, en extractos de romero obtenidos con CO_2 se obtuvo una correlación baja ($r = -0,17$) entre el contenido total de fenoles y la capacidad antioxidante medida por el método de ABTS (TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity) (Celiktas, et al., 2007). La concentración del ácido carnósico, uno de los principales componentes antioxidantes del extracto de salvia, muestra

una correlación no muy alta con métodos como el DPPH ($r = 0,77$) y el del ácido β -linoleico ($r = 0,44$) (Wellwood y Cole, 2004).

Los rendimientos obtenidos fueron similares a los citados en la literatura científica para las extracciones con CO_2 supercrítico de la especie *S. officinalis*. Las extracciones a baja presión, 9-12,8 MPa, con temperaturas entre 298 y 323 K, flujos de 0,021 a 0,95 kg/h y tiempos dinámicos de 3 h, muestran rendimientos de 1,3 a 4,8 %; estos extractos estaban compuestos por terpenos volátiles (Aleksovski y Sovová, 2007; Reverchon, et al., 1995). Las extracciones a presiones más altas, entre 30 y 35 MPa, con temperaturas entre 313 y 373 K, flujos de 0,3 a 0,4 kg/h y tiempos dinámicos de 2,7 a 4,7 h han mostrado rendimientos de 1,3 a 4,6 % (Glisic, et al., 2010; Ivanović, et al., 2009; Babovic, et al., 2010). Las condiciones de extracción empleadas en

el experimento “dh” del presente trabajo fueron similares a las usadas en el trabajo de Ivanović y colaboradores. La presión y la temperatura fueron las mismas (30 MPa y 313 K), el flujo fue cuatro veces mayor (1,2 contra 0,3 kg/h), y el tiempo de extracción en el experimento citado fue menor (2 Vs. 3,7 h). Los rendimientos de extracción no difirieron en más del 10 % (1,2 % en este trabajo y 1,3 % en el de Ivanović, *et al.*, 2009). En el trabajo de Fornari y colaboradores se utilizó un equipo Thar-SF2000, similar al usado en la presente investigación, con presión y temperatura de extracción de 30 MPa y 313 K, tal como en el experimento dh (Fornari, *et al.*, 2012). El rendimiento de extracción global (suma de dos fracciones obtenidas) fue de 3,79 % y de 4,62 % después de 1,5 y 4,5 h de extracción. Este rendimiento mayor puede atribuirse al flujo de 2,4 kg/h, el doble del usado en el experimento dh. De igual manera, el experimento tdg se puede comparar con el trabajo de Babovic y colaboradores (Babovic, *et al.*, 2010), en el que bajo condiciones de 30 MPa, 373 K, 0,3 kg/h y 4,7 h, se obtuvo un rendimiento del 1,5 %, igual al obtenido en el presente trabajo. Babovic y colaboradores emplearon 1,4 kg de CO₂, lo cual representa la cuarta parte del usado en el experimento tdg. Además de las diferencias en las condiciones de extracción, entre los casos discutidos anteriormente las hay también en los tratamientos posteriores a la cosecha, en las condiciones de separación del extracto, en las variables agroclimáticas de cultivo y, parcialmente, en la planta utilizada en la extracción; este último factor es importante, pues los autores referenciados emplearon solo hojas y en el presente trabajo se hizo la extracción en hojas, tallos y flores.

Entre la amplia variedad de ensayos existentes para la evaluación de la capacidad antioxidante, el método ORAC se destaca por su reproducibilidad (Prior, *et al.*, 2005). Aunque se encuentran varios resultados de evaluaciones de la actividad antioxidante de extractos acuosos o hidroalcohólicos de *S. officinalis* con el método ORAC (Zheng y Wang, 2001), actualmente solo hay una publicación que presente esta medición para extractos con CO₂ supercrítico (Ramírez, *et al.*, 2012). El valor ORAC que aparece en este último trabajo (1,90 μmol Trolox/mg de extracto) es cerca de 10 % superior al valor más alto determinado en este trabajo para los extractos obtenidos con el diseño factorial fraccionado. Los valores ORAC que aparecen en la Tabla 2 están expresados por mg de extracto, pero es más común que se refieran a gramo de material vegetal. Al convertirlos a estas unidades, se encontró que los valores medidos para los 32 experimentos ocuparon el intervalo entre 13,4 y 30,6 μmol Trolox/g de material vegetal seco o, lo que es equivalente, 3,73 a 8,50 μmol Trolox/g de material vegetal fresco (con base en una humedad de 75 % medida en el material cosechado). Estos valores son menores que el medido para el extracto acuoso (pH 7) de *S. officinalis*, correspondiente a 13,28 μmol Trolox/g de material vegetal fresco (Zheng y Wang, 2001).

Caracterización cromatográfica

La Figura 2 muestra un perfil cromatográfico representativo de los componentes volátiles y semivolátiles de la fracción soluble en metanol de los extractos obtenidos de *S. officinalis* con CO₂ supercrítico. El sesquiterpeno oxigenado viridiflorol y el diterpeno manol fueron los componentes más abundantes

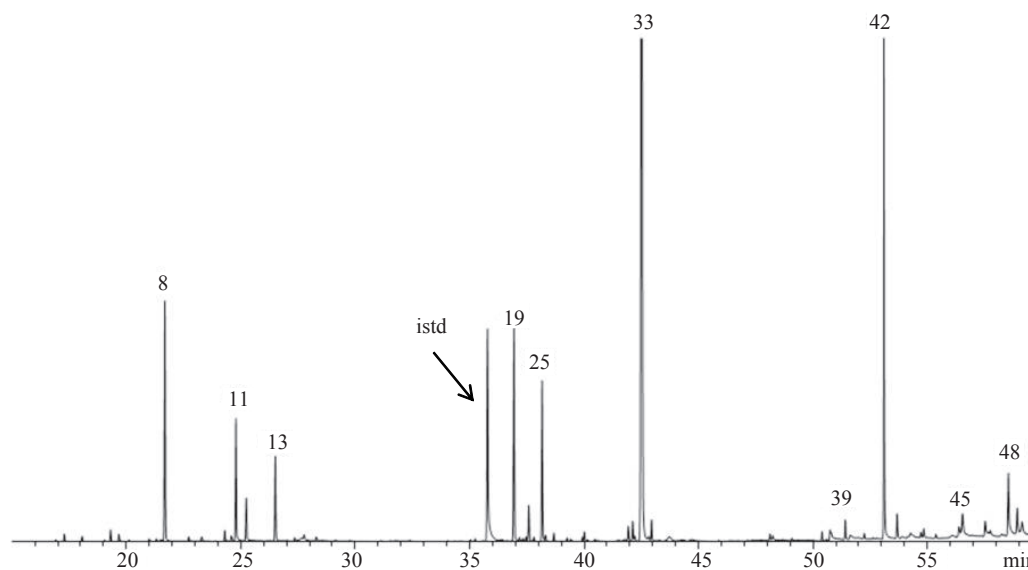


Figura 2. Perfil obtenido por cromatografía de gases y espectrometría de masas de los componentes volátiles y semivolátiles del extracto de *Salvia officinalis* obtenido con CO₂ supercrítico. Columna DB-5MS (60 m), Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).

en esta fracción. Las cantidades relativas y la identificación tentativa (basada en la comparación de los índices de retención y los espectros de masas con datos publicados y registrados en bases de datos) de los componentes con abundancia > 0,1 % aparecen en la Tabla 3. Los perfiles de composición de los experimentos en los que las variables estuvieron principalmente en nivel bajo presentaron más abundancia de los compuestos de mayor masa molecular. Por ejemplo, las cantidades relativas de manol y viridiflorol se duplicaron al pasar del experimento defgpth al experimento eht. Los intervalos de cantidades relativas y los compuestos identificados para las fracciones volátiles mostrados en la Tabla 3 no difirieron mucho de los valores reportados en otras investigaciones sobre extracción de *S. officinalis* con CO₂ supercrítico (Reverchon, et al., 1995; Aleksovski y Sovová, 2007; Ivanović, et al., 2009; Glisic, et al., 2010; Babovic, et al., 2010). La fracción no volátil de los extractos se sometió a un análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia desarrollado para 11 compuestos fenólicos (ácidos caféico, *p*-cumárico, rosmarínico, carnósico y ursólico; apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, naringenina y pinocembrina), los cuales se han reportado como constituyentes del extracto de salvia o de tomillo (Areias, et al., 2000; Lu y Foo, 2001). Solo se detectaron los ácidos carnósico (ACA) y ursólico (AUR), probablemente porque estos terpenos no muy polares poseen mayor solubilidad en CO₂ supercrítico que en agua (Herrero, et al., 2010). En la Figura 3 se muestra el perfil cromatográfico obtenido a partir del extracto con mayor concentración de ácido carnósico y ursólico. Para confirmar la presencia de dichos compuestos se compararon sus tiempos de retención y espectros UV con los de los patrones de referencia certificados. Además, las muestras de los extractos se enriquecieron con los compuestos de interés y se corroboró el aumento en las áreas cromatográficas en cuestión. Con la longitud de onda seleccionada (333 nm), la respuesta del detector fue mayor para el ácido carnósico. Al comparar con otros perfiles cromatográficos de salvia y romero obtenidos en el mismo detector con fases estacionaria y móvil similares a las empleadas en el presente trabajo, se identificó tentativamente como carnosato de metilo el compuesto que eluye inmediatamente después del ácido carnósico. Este se cuantificó utilizando la curva de calibración del ACA. La Tabla 4 presenta la cuantificación de los ácidos carnósico y ursólico y del carnosato de metilo en 12 extractos de *S. officinalis* obtenidos según el diseño factorial 2⁷⁻². Con el fin de aclarar la incongruencia aparente en la correlación entre contenido de fenoles y capacidad antioxidante de los extractos, se calcularon los coeficientes de correlación entre las concentraciones de la Tabla 4 y los valores ORAC de estos extractos. Los resultados (Tabla 5) mostraron que, efectivamente, hubo una marcada correlación entre el contenido de ácido carnósico y la

capacidad antioxidante del extracto. El ACA es considerado el diterpeno con mayor actividad antioxidante entre los detectados en los extractos de salvia; además, la actividad antiinflamatoria de los extractos de salvia y romero se relaciona con el alto contenido de este componente (Peter, 2000); por esta razón, el ACA se considera el componente que le proporciona calidad a los extractos de romero y salvia y que, además, determina su precio. Glisic y colaboradores obtuvieron extractos con una alta proporción de diterpenos y sustancias semivolátiles (~40 % en peso) cuando sometieron el residuo de la extracción con agua asistida por ultrasonidos a extracción con CO₂ supercrítico (Glisic, et al., 2011). Aunque en ese trabajo no se realizó la evaluación de estos extractos, su composición hace esperar que estas fracciones poseen alta capacidad antioxidante.

Búsqueda empírica de las condiciones de extracción óptimas

Con base en el análisis de la varianza de los datos de la Tabla 2 y de las tendencias mostradas en las Figuras 1A – 1D, se seleccionó el espacio formado por las variables D, F, P y H para buscar las condiciones óptimas por medio del método simplex (Nelder y Mead, 1965). Se tomó como vértice inicial el nivel cero de estas cuatro variables. Los siguientes cuatro vértices del simplex de partida se calcularon según la ecuación 1, en la cual V_i es el vértice inicial, κ es una constante y Δ es el tamaño del paso.

$$V_{i+n} = V_i + (\kappa * \Delta) \quad (1)$$

Los valores de Δ empleados fueron de 15 minutos para el tiempo dinámico, 0,48 kg/h para el flujo, 4 Mpa para la presión de extracción y 6 K para la temperatura de separación. Una vez realizados los primeros cinco experimentos, se descartó aquel con el dato observable combinado Y más bajo y se calcularon las coordenadas del vértice nuevo según la ecuación 2 donde V_c es el centroide, el cual corresponde al promedio de las respuestas de los vértices no rechazados, y b es un factor que determina si el siguiente vértice corresponde a una reflexión ($b = 1$), una expansión ($b > 1$), una contracción ($b = 0,5$) o una contracción con cambio de sentido ($b = -0,5$).

$$V_{i+n+j} = V_c + b (V_c - V_p) \quad (2)$$

El vértice 6 se obtuvo por reflexión. Dado que la respuesta (Y) fue inferior a las de los demás vértices, se aplicó una expansión ($b = 2$). Los vértices 8 a 10 se obtuvieron por reflexión. Debido a que las respuestas de los vértices 8, 9 y 10 fueron las más altas obtenidas, se decidió hacer una contracción ($b = 0,5$) para hallar el vértice 11, cuya respuesta nuevamente fue superior. A continuación, se aplicaron reflexiones para obtener los siguientes dos vértices. La respuesta del vértice 12 fue considerablemente más alta que la del 11, y la del vértice 13 fue más baja. Por último, se realizó una expansión ($b = 4$) para obtener de nuevo una

Tabla 3. Reconocimiento, identificación y cantidades relativas (%) de los principales componentes volátiles y semivolátiles solubles en metanol encontrados en los extractos de *Salvia officinalis* obtenidos según el diseño 2⁷⁻²

Número de pico ^a	Compuesto	I _R ^b	Cantidad relativa, %±σ (n=3)						
			Experimento gh	Experimento eht	Experimento egpt	Experimento fgt	Experimento deght	Experimento deft	Experimento defghpt
1	α-Tujeno	933	0,161±0,002	0,205±0,004	0,22±0,01	0,24±0,01	0,25±0,02	0,266±0,005	0,200±0,002
2	α-Pineno	942	0,302±0,005	0,338±0,006	0,189±0,003	0,42±0,02	0,34±0,02	0,427±0,003	0,35±0,01
3	Canfeno	958	0,195±0,001	0,257±0,002	0,145±0,008	0,29±0,02	0,228±0,009	0,279±0,007	0,225±0,005
4	Sabineno	980	0,178±0,004	0,199±0,005	0,227±0,006	0,23±0,02	0,24±0,01	0,251±0,007	0,186±0,008
5	β-Pineno	984	0,455±0,001	0,418±0,005	0,29±0,01	0,50±0,03	0,44±0,01	0,512±0,008	0,421±0,005
7	α-Terpineno	1023	0,175±0,005	0,187±0,008	tr	0,21±0,02	tr	tr	tr
8	1,8-Cineol*	1039	6,74±0,04	6,69±0,03	4,92±0,05	6,41±0,07	5,96±0,07	6,58±0,08	5,0±0,1
11	cis-tujona*	1113	4,37±0,02	4,04±0,05	3,10±0,06	3,39±0,09	2,83±0,06	3,32±0,07	2,26±0,06
12	trans-tujona	1125	1,36±0,06	1,51±0,02	0,94±0,08	1,14±0,03	0,85±0,07	1,06±0,03	0,67±0,04
13	Alcanfor	1157	2,55±0,08	3,06±0,03	2,31±0,03	2,44±0,09	2,05±0,03	2,16±0,01	1,46±0,02
14	δ-Terpineol	1178	0,483±0,003	0,37±0,02	tr	tr	tr	tr	tr
16	cis-cariofileno	1427	0,18±0,01	0,27±0,02	0,19±0,02	tr	tr	tr	tr
17	α-Gurjuneno	1431	0,127±0,008	0,217±0,009	tr	tr	tr	tr	tr
19	trans-β-Cariofileno	1442	6,11±0,03	6,62±0,02	6,11±0,02	5,41±0,09	5,02±0,07	5,48±0,03	3,56±0,05
22	β-Gurjuneno	1459	0,10±0,01	0,125±0,005	tr	tr	tr	tr	tr
23	Aromadendreno	1462	0,71±0,01	0,873±0,008	0,83±0,02	0,75±0,01	0,73±0,03	0,87±0,04	0,58±0,06
24	α-Guaieno	1465	0,16±0,02	0,203±0,007	0,17±0,01	0,17±0,03	0,21±0,02	0,29±0,06	tr
25	α-Humuleno*	1476	4,10±0,02	4,61±0,06	4,38±0,05	3,82±0,08	3,36±0,09	3,84±0,07	2,52±0,04
26	allo-Aromadendreno	1484	0,29±0,03	0,32±0,01	0,28±0,05	0,26±0,04	0,30±0,04	0,36±0,04	0,186±0,003
27	γ-Muuroleno	1494	0,27±0,03	0,226±0,006	0,26±0,05	0,20±0,02	0,24±0,03	tr	tr
28	Valenceno	1517	0,637±0,004	0,85±0,02	0,82±0,03	0,74±0,03	0,82±0,03	0,86±0,08	0,59±0,04
30	δ-Cadineno	1541	0,35±0,02	0,290±0,02	0,292±0,005	0,24±0,02	0,24±0,02	tr	tr
31	Espatuleno	1602	0,324±0,009	0,34±0,01	0,37±0,02	0,301±0,008	0,31±0,01		
32	Óxido de cariofileno	1610	0,49±0,02	0,51±0,02	0,50±0,02	0,435±0,005	0,40±0,01		
33	Viridiflorol	1620	14,0±0,1	14,3±0,8	14,0±0,2	12,2±0,1	12,7±0,2		
35	Epóxido de humuleno II	1638	0,65±0,03	0,73±0,04	0,62±0,04	0,56±0,04	0,56±0,05		
38	Neofitadieno	1957	0,402±0,003	0,415±0,002	0,495±0,007	0,39±0,01	0,43±0,05		
39	Ácido n-hexadecanoico	1968	1,71±0,04	1,42±0,05	2,66±0,05	1,87±0,04	2,29±0,05		
41	Hexadecanoato de etilo**	2012	0,494±0,006	0,52±0,02	0,55±0,04	0,51±0,04	1,30±0,04		
42	Manol	2094	29,0±0,2	29,7±0,8	28,8±0,4	25,8±0,2	27,3±0,4		
43	Ácido cis,cis-9,12-octadecanoico**	2149	0,66±0,04	tr	1,06±0,09	0,59±0,05	1,06±0,09		
44	Octadecanoato de etilo	2166	0,51±0,01	tr	tr	tr	tr		
45	Tricosano	2300	0,55±0,03	0,63±0,06	0,43±0,06	0,473±0,006	0,63±0,09		
46	trans-ferruginol**	2361	0,21±0,04		0,40±0,03	0,42±0,05	0,25±0,06		
47	Tetracosano	2412	1,25±0,02	1,43±0,02	1,7±0,1	2,27±0,07	2,5±0,1		
48	β-Sitosterol**	2843	1,56±0,02	1,50±0,04	1,6±0,1	1,77±0,07	1,55±0,08		
Compuestos reconocidos e identificados %			82,7	83,4	79,0	74,5	75,4		

Hidrocarburos monoterpénicos	1,9	1,6	1,1	1,9	1,5	1,7	1,4
Monoterpenos oxigenados	15,7	15,7	11,3	13,4	11,7	13,1	9,4
Hidrocarburos sesquiterpénicos	13,2	14,6	13,3	11,6	10,9	11,7	7,4
Sesquiterpenos oxigenados	15,4	15,9	15,5	13,5	14,0	12,8	8,2
Diterpenos	29,2	29,7	29,2	26,2	27,6	24,7	16,3
Triterpenos	1,6	1,5	1,6	1,8	1,6	2,7	6,9
Ácidos grasos y ésteres derivados	3,4	1,9	4,3	3,0	4,7	3,7	4,0
Ceras	2,2	2,5	2,6	3,1	3,5	4,2	4,6

^a Número de pico en la figura 2

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

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

** Reconocidos tentativamente

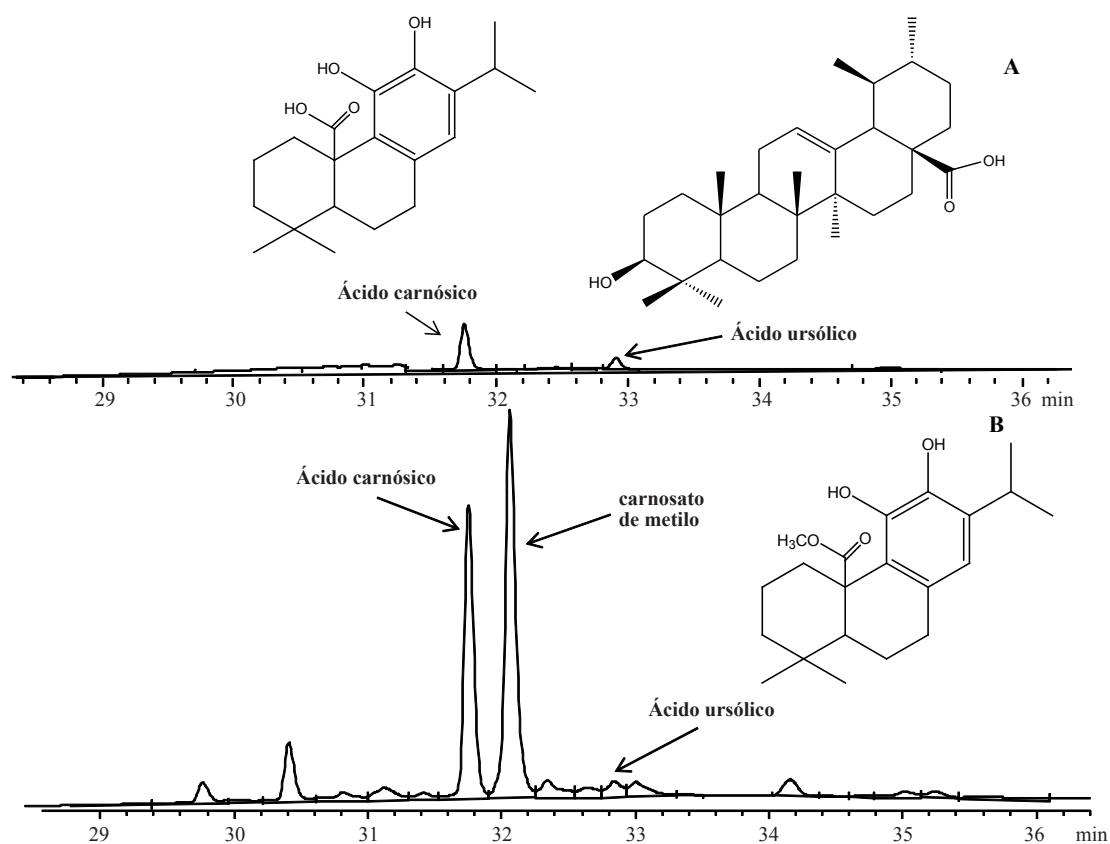


Figura 3. Perfiles obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos de: A. Patrones de referencia certificados, B. Extracto obtenido con fluido supercrítico a partir de salvia (experimento defghpt). Fase móvil conformada por 80 % de metanol y 20 % de agua (ácido ortofosfórico al 0,1 %).

respuesta baja. Se optó por detener la optimización en el vértice 14 y se hizo una réplica del vértice 12, el de valor más alto (punto óptimo). La Tabla 6 contiene los valores de las variables D, F, P y H en los 14 vértices, así como los resultados obtenidos al evaluar el extracto aislado en cada experimento. Se establecieron tres grupos de experimentos según los valores de Y. Los vértices 2, 4, 5 y 6 tuvieron los

valores más bajos de Y (0,062 – 0,154), los vértices 1, 3, 7, 8, 9, 10 y 11 tuvieron valores intermedios (0,294 – 0,374) y los vértices 12 a 14 tuvieron los valores más altos de Y (0,496 a 0,625). Entre estos últimos se tomó el vértice 12 como el punto óptimo. Así, con 65,6 minutos de extracción a un flujo de 2,80 g de CO₂/min, una presión de 47,3 bar en la cámara de extracción y una temperatura de 313 K en el colector, se

Tabla 4. Concentraciones de los terpenos fenólicos detectados en 12 extractos seleccionados

Experimento	Concentración, mg/g de extracto ± s (n=2)		
	Ácido carnósico	Ácido ursólico	Carnosato de metilo
gh	16,4±0,3	46,0±0,6	41±2
dhpt	46,0±0,6	57±1	93,2±0,8
eht	20,4±0,7	64±2	57±2
egpt	28,3±0,4	56,2±0,8	70,56±0,02
efh	18,9±0,1	54,1±0,5	56,8±0,1
gft	19,0±0,4	50±1	54,1±0,5
efhpt	30,1±0,4	60,4±0,4	74±2
degth	18,6±0,5	50±2	54±1
dept	35,1±0,4	52,3±0,9	83,3±0,9
defgh	47,2±0,7	56,9±0,2	92,4±0,2
deft	33,6±0,2	61,7±0,1	93,9±0,8
defghpt	52,7±0,6	72,2±0,9	93±1

obtuvieron extractos con un capacidad antioxidante ORAC de 2,42 μmol de Trolox/mg de extracto (1,27 veces superior al valor reportado por Ramírez, *et al.*, 2012), un contenido total de fenoles equivalente a 753 ± 2 g/l de ácido gálico y un rendimiento de extracción de 1,7 %. En los experimentos del diseño factorial fraccionado hubo condiciones que permitieron obtener un rendimiento de extracción más alto (3,8 %) que el de este vértice. Sin embargo, la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles de estos extractos fueron inferiores. Esto muestra el beneficio de usar como guía para la optimización un componente observable que combine tanto el rendimiento como la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles.

Conclusiones

El tamizaje inicial basado en un diseño factorial fraccionado permitió identificar un conjunto reducido de variables en cuyo subespacio se hallaron condiciones para la extracción de

Tabla 5. Coeficientes de correlación (r) entre capacidad antioxidante, contenido de fenoles y concentración de compuestos activos en extractos de *Salvia officinalis*

	Ácido carnósico	Capacidad ‘antirradicalaria’	Contenido de fenoles	Carnosato de metilo
Capacidad antirradicalaria	0,812			
Contenido de fenoles	0,812	0,610		
Carnosato de metilo	0,924	0,644	0,846	
Ácido ursólico	0,614	0,397	0,345	0,605

Tabla 6. Resultados de la optimización mediante la metodología simplex

Vértice N°	Simplex N°	Vértices retenidos	D*, min	F*, g/min	P*, bar	H*, °C	R**, %	CA**, mmol Trolox/mg de extracto	CTF**, g/l de ácido gálico	Respuesta Y***
1			75	2,40	40,0	316	1,8	1,77±0,04	630±20	0,294
2			90	2,40	40,0	316	1,6	1,44±0,03	602±46	0,127
3			82,5	2,82	40,0	316	2,0	1,79±0,03	618±48	0,312
4			82,5	2,53	43,3	316	1,9	1,29±0,05	553±20	0,062
5	1		82,5	2,53	40,8	321	2,0	1,47±0,03	571±10	0,154
6	2	1,2,3,5	82,5	2,53	37,1	318	1,5	1,35±0,03	578±10	0,066
7	3	1,2,3,5	82,5	2,53	46,3	315	1,6	1,81±0,05	638±7	0,297
8	4	1,3,5,7	71,3	2,76	43,6	318	1,5	1,93±0,02	622±4	0,325
9	5	1,3,7,8	73,1	2,70	44,1	312	1,7	1,75±0,03	699±10	0,324
10	6	3,7,8,9	78,5	2,85	45,3	315	1,6	1,86±0,02	664±18	0,335
11	7	3,8,9,10	73,3	2,89	41,7	315	1,7	1,930±0,006	668±6	0,374
12	8	8,9,10,11	65,6	2,80	47,3	313	1,7	2,42±0,03	753±2	0,625
13	9	9,10,11,12	74,0	2,89	45,6	310	1,7	2,15±0,03	719±17	0,496
14	10	10,11,12,13	71,7	3,44	48,4	319	1,8	2,20±0,03	724±6	0,528

"Las condiciones de extracción consideradas como óptimas aparecen resaltadas en verde".

*D: tiempo dinámico; F: flujo; P: presión; H: temperatura de separación

**R: rendimiento; CA: capacidad antirradicalaria; CTF: contenido total de fenoles

***Combinación lineal Y = (0,3*R)+(0,4*CA)+(0,3*CTF)

metabolitos secundarios de *S. officinalis* con un desempeño superior en la combinación de capacidad antioxidante, contenido de fenoles y rendimiento de extracción. El carácter empírico de la búsqueda eliminó la incertidumbre que puede surgir en torno a la validez del modelo empleado cuando se utiliza el método de la superficie de respuesta para la optimización.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del Patrimonio Autónomo del Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, Contrato RC-572-2012.

Referencias

- Aleksovski, S.A., Sovová, H. 2007. Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. J. Supercrit. Fluid. **40**: 239–245.
- Areias, F., Valentao, P., Andrade, P. B., Ferreres, F., Seabra, R. M. 2000. Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural factors. J. Agric. Food Chem. **48**: 6081-6084.
- Babovic, N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, J., Zizovic, I. 2010. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. Innov. Food Sci. Emerg. **11**: 98-107.
- Bagheri, H., Manap, M. Y., Solati, Z. 2014. Response surface methodology applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Piper nigrum* L. essential oil. LWT - Food Sci. Technol. **57**: 149-155.
- Celiktas, O., Bedir, E., Sukan, F. 2007. In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. Food Chem. **101**: 1457-1464.
- Danh, L.T., Mammucari, R., Truong, P., Foster, N. 2009. Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil. Chem. Eng. J. **155**: 617-626.
- Dashtianeh, M., Vatanara, A., Fatemi, S., Sefidkon, F. 2013. Optimization of supercritical extraction of *Pimpinella affinis* Ledeb. using response surface methodology. J. CO₂ Util. **3-4**: 1–6.
- Djarmati, Z., Jankov, R., Schwirtlich, E., Djulinac, B., Djordjevic, A. 1991. High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO₂ extraction. J. Amer. Oil Chem. Soc. **68**: 731-734.
- Fornari, T., Ruiz-Rodríguez, A., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M., Reglero, G. 2012. Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from Lamiaceae family. J. Supercrit. Fluid. **64**: 1– 8.
- Ghasemi, E., Raofie, F., Najafi, N.M. 2011. Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves. Food Chem. **126**: 1449–1453.
- Glisic, S., Ivanović, J., Ristic, M., Skala, D. 2010. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. J. Supercrit. Fluid. **52**: 62-70.
- Glisic, S., Ristic, M., Skala, D. 2011. The combined extraction of sage (*Salvia officinalis*L.): Ultrasound followed by supercritical CO₂ extraction. Ultrason.Sonochem. **18**: 318–326.
- Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. 2010. Green processes for the extraction of bioactives from rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid. J. Chromatogr. A **1217**: 2512-2520.
- Ivanović, J., Dilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Babović, N., Petrović, S., Žižović, I. 2009. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). J. Serb. Chem. Soc. **7**: 717-732.
- Khajeh, M. 2011. Optimization of process variables for essential oil components from *Satureja hortensis* by supercritical fluid extraction using Box-Behnken experimental design. J. Supercrit. Fluid. **55**: 944–948.
- Lu, Y., Foo, L.Y. 1999a. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. Phytochemistry, **51**: 91-94.
- Lu, Y., Foo, L.Y., Wong, H. 1999b. Sagecoumarin, a novel caffeic acid trimer from *Salvia officinalis*. Phytochemistry. **52**: 1149-1152.
- Lu, Y., Foo, L.Y. 2001. Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. Tetrahedron Lett. **42**: 8223-8225.
- Lu, Y; Foo, L.Y. 2000. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. Phytochemistry, **55**, 263-267.
- Meyer, S., Suhr, K. I., Nielsen, P., Holm, F. 2002. Natural food preservatives, en: Thomas Ohlsson, Nils Bengtsson (editors?). Minimal processing technologies in the food industry. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, 288 p.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P., van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem. **85**: 231-237.
- Montgomery, D. 2008. Design and Analysis of Experiments. 6a Ed. John Wiley and Sons, New York.
- Nelder, J. A., Mead, R. A. 1965. A simplex method for function minimization. Comput. J. **4**: 308-313.
- Pereira, C., Meireles, A. 2010. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. Food Bioprocess. Technol. **3**: 340-372.

- Pereira, P., Bernardo-Gil, M.G., Cebola, M. J., Mauricio, E., Romano, A.** 2013. Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves. Response surface optimization. *J. Supercrit. Fluid.* **83**: 57–64.
- Peter, K. V.** (Ed.). 2000. Handbook of herbs and spices, volume 1. CRC Press LLC: Boca Raton, EE.UU., 269-275 p.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.** 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 4290-4302.
- Ramírez, E. A., Árias, A. J. Vásquez, E. G., Martínez, J. R., Stashenko E. E.** 2012. Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava* obtenidos con CO₂ supercrítico. *Rev. Acad.Colomb.Cienc.* **36**; (140): 305-316.
- Reverchon, E.** 1996. Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil. *AIChE J.* **42**; (6):1765-1771.
- Reverchon, E., Taddeo, R., Della Porta, G.** 1995. Extraction of sage oil by supercritical CO₂: Influence of some process parameters. *J. Supercrit. Fluid.* **8**: 302-309.
- Rizvi, S.** 1994. Supercritical fluid processing of food and biomaterials, Blackie Academic & Professional: Glasgow, UK. 103-113 p.
- Sebranek, J.G., Sewalt, V.J.H., Robbins, K.L., Houser, T.A.** 2005. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Sci.* **69**: 289-296.
- Sharif, K.M., Rahman, M.M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M.H.A., Sahena, F., Zaidul, I.S.M.** 2014. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. *J. Food Eng.* **124**: 105–116.
- Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., Lavoie, E., Huang, T., Ho, C.** 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4869–4873.
- Wei Z., Wang, S.Y.** 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5165-5170.
- Wellwood, C., Cole, R.** 2004. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 6101-6107.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., Frígola, A.** 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* **114**: 310–316.