

Raquel Mur Sánchez

Técnicas de separación avanzada
para la obtención sostenible de
extractos con potencial uso
cosmético o farmacéutico a partir
de plantas aromático-medicinales

Director/es

Urieta Navarro, José Santiago
Mainar Fernández, Ana María

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN AVANZADA PARA LA
OBTENCIÓN SOSTENIBLE DE EXTRACTOS CON
POTENCIAL USO COSMÉTICO O FARMACÉUTICO
A PARTIR DE PLANTAS AROMÁTICO-
MEDICINALES

Autor

Raquel Mur Sánchez

Director/es

Urieta Navarro, José Santiago
Mainar Fernández, Ana María

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

2023



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN AVANZADA PARA LA OBTENCIÓN SOSTENIBLE DE EXTRACTOS CON POTENCIAL USO COSMÉTICO O FARMACÉUTICO A PARTIR DE PLANTAS AROMÁTICO-MEDICINALES

Autor

Raquel Mur Sánchez

Directores

Mainar Fernández, Ana M.
Urieta Navarro, José S.

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

2023



Tesis Doctoral

**Técnicas de Separación Avanzada para la
Obtención Sostenible de Extractos con
Potencial Uso Cosmético o Farmacéutico a
partir de Plantas Aromático-Medicinales**

Raquel Mur Sánchez

2023

Imagen de portada: Plantones de *Melissa officinalis*

ANA MARÍA MAINAR FERNÁNDEZ, Profesora Titular del Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza

JOSÉ SANTIAGO URIETA NAVARRO, Profesor Colaborador Extraordinario Honorífico, Catedrático Emérito de Química Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y Académico de la Real Academia de Ciencias de Zaragoza

CERTIFICAN: que el trabajo presentado como Tesis Doctoral en esta memoria titulada:

“Técnicas de Separación Avanzada para la Obtención Sostenible de Extractos con Potencial uso Cosmético o Farmacéutico a partir de Plantas Aromático-Medicinales” presentado por **RAQUEL MUR SÁNCHEZ** para optar al grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente ha sido realizado en el Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A) y en el Departamento de Química Física, bajo la dirección de dichas personas, autorizando la presentación de la misma para su defensa y calificación por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en Zaragoza a 3 de febrero de 2022

Fdo: Ana M. Mainar Fernández

Fdo: José Santiago Urieta Navarro

*A mi yaya, quién siempre decía “Qué pena es tener reloj y no tener cadena,
pero es pena mayor tener cadena y no tener reloj”*

Agradecimientos

De alguna forma me sorprende a mí misma escribiendo estas líneas porque pensaba que nunca llegaría. Y aquí estoy. Me pregunto si habrá más doctorandos que tengan la misma sensación de que es más difícil escribir estos párrafos que la propia tesis en sí... Y es que tengo tanto que agradecer, que expresar todo lo que siento va a ser difícil.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis. Gracias Ana por tu pasión al hablar y al explicar tu trabajo, ya que fue lo que llamó mi atención y despertó mi curiosidad. Gracias por cambiar mi forma de ver la investigación y por adentrarme en este maravilloso universo de supercríticos y plantas. Pepe, gracias por tu infinita sabiduría y todas las explicaciones y correcciones que me has dado a lo largo de estos años. Por tu perseverancia, por aguantar mi etapa más combativa a la hora de escribir y corregir esta tesis y por resolver siempre mis innumerables dudas. Por supuesto, gracias a ambos por la paciencia y el esfuerzo. Por vuestra dedicación incluso en los tiempos difíciles. Gracias por abrir mi mundo un poquito más. Me doy por satisfecha si me quedase aunque fuera con tan solo una pequeña parte de todo lo que me habéis enseñado, porque sé que incluso eso ya sería mucho.

En segundo lugar, agradecer por supuesto a los miembros del grupo de investigación GATHERS, que me han acompañado durante todos estos años. Gracias José Francisco por las infinitas horas compartiendo laboratorio, por las charlas y por estar ahí cuando surgían problemas en el laboratorio. Gracias Juan por la infinita paciencia y por la maravillosa ayuda que siempre dabas cuando más lo necesitaba. Muchas gracias también a los que fueron en su momento mis compañeros de laboratorio. A Manuel, por compartir el estrés y las risas y por aguantar mis disgustos con la máquina. A Carlota, porque fuiste la que me enseñaste todo desde el día uno con mucha paciencia y sobre todo con mucho cariño y alegría.

En tercer lugar dar las gracias al proyecto EFA188/16/SPAGYRIA por el apoyo económico brindado y a todos los socios del proyecto por las facilidades que han puesto para la realización de este trabajo. Gracias también a Silvia Rueda por su labor facilitadora.

Agradecer al Dr. Norberto Fueyo y a la Dra. Ana Cubero del Grupo de investigación de Fluidodinámica Numérica (GFN), perteneciente a la Universidad de Zaragoza, la colaboración que en estos momentos se está realizando, orientada a un estudio fluidodinámico del proceso SAF.

A todos mis amigos, en especial a Natalia y Víctor. Qué os voy a decir yo a vosotros después de tantos años juntos. Gracias porque, aun siendo tiempos difíciles para los tres, siempre habéis estado dispuestos a escucharme y apoyarme. Gracias por ser como sois. Gracias también a Manu, que aunque llegó hace poquito, ya es uno más en el grupo. Gracias a los tres por ser tan idiotas y sacarme siempre una sonrisa. Y por los Mcflurros. Que sean muchos más.

Gracias, por supuesto, a toda mi familia por los ánimos. A mi hermano Javier porque, a tu manera, has sido una buena distracción en los momentos duros durante la tesis. A mi hermana Noelia, que has estado pendiente de todo el proceso y has intentado ayudarme todo lo posible, que me has apoyado siempre y me has tirado de las orejas cuando hacía falta. A mis sobrinas Valeria y Martina, porque aunque sois unas enanas y no vais a leer esto, quiero agradecerlos por haber sido mi rayito de felicidad y caos día a día. A mi padre Javier, quien siempre me ha alentado a seguir esforzándome un poquito más y a dar siempre un poco más de mí misma. Mentiría si dijera que no fuiste parte de los motivos que me impulsaron a hacer esta tesis. Porque, como una vez me escribiste a mí, *todo lo que tengo que decir...ya te lo he dicho*. A mi madre Beni, por la paciencia, por la no-pacencia y por aguantarme incluso cuando yo no me aguantaba. Gracias porque nunca me han faltado palabras de ánimos. Gracias porque me has enseñado a luchar y no rendirme, a intentar mejorar cada día porque nunca es tarde para ello, y a intentar ver con nuevas perspectivas la vida. Que, a veces, las cosas hay que tomarlas con más calma. "Ma", "Pa", gracias a ambos por habernos sacado adelante siempre, por vuestros valores y por haberme hecho como soy. Gracias por acompañarme en este camino. Espero que estéis un poquito orgullosos.

Gracias también a los que ya no estáis, porque tampoco sería como soy sin vosotros. Gracias a mis abuelos por los recuerdos felices. Gracias a mis yayas, que

siempre cuidasteis de mí. Gracias tío porque, aunque ya no estés, ahora soy yo la que hace de rabiarse a mis sobrinas con una sonrisa en la cara. Aprendí del mejor.

Por último, gracias a ti, Daniel, que has estado apoyándome de forma incondicional todo este tiempo. Gracias por acompañarme durante tantos años y por creer siempre en mí. Gracias por tu manera de ser, por mantenerte siempre positivo por los dos y decirme con toda seguridad que todo saldría bien. Gracias, porque has sido mi luz y mi guía en mis días más oscuros. Gracias por hacer la distancia algo llevable. Gracias por el cariño, la paciencia y por animarme a recorrer mi propio camino. Uno que espero podamos caminar, por fin, juntos. Gracias, D.

Gracias a todos, de corazón.

“La naturaleza es siempre más sutil, más compleja y más elegante de lo que somos capaces de imaginar”

Carl Sagan

Resumen de la tesis.

Uno de los mayores retos a los que actualmente los países desarrollados se enfrentan es al excesivo impacto generado sobre el medio ambiente por el ser humano. Este excesivo impacto genera tal insostenibilidad que ha provocado una crisis social y ecológica sin precedentes lo que ha hecho necesaria la búsqueda de alternativas sostenibles en la producción, fomentada por la creciente conciencia social, y las mayores exigencias legales requeridas para desarrollar procesos cada vez más sostenibles tanto para el ser humano como para el medio ambiente. Sectores como el farmacéutico, el cosmético o el agroalimentario deben lidiar con exigencias aún mayores que el resto debido a que sus productos están enfocados hacia el uso humano. En consonancia con estos hechos, existe una reorientación de las preferencias de los consumidores hacia el uso de recursos naturales como ingredientes para la fabricación de productos cosméticos o medicinales, lo que hace que el interés por los extractos vegetales siga aumentando y las industrias busquen bioactivos naturales que sean seguros, a la vez que eficaces y rentables.

Las plantas aromático-medicinales, en especial las pertenecientes a las familias de las lamiáceas y asteráceas, son importantes para las industrias farmacéuticas y cosméticas por su alto contenido en metabolitos secundarios con un gran rango de bioactividades. Es por ello que, dentro del marco de la Circularidad Económica, este tipo de plantas puede ayudar a la diversificación de cultivos permitiendo un aprovechamiento máximo de recursos. Por otro lado, la aplicación de técnicas supercríticas supone sin duda una mejora en la creación de productos comerciales de corte natural y sostenible. En los últimos años, estas técnicas están siendo ampliamente desarrolladas para el procesamiento de plantas aromático-medicinales al objeto de obtener y concentrar metabolitos secundarios, entre los que presentan un papel muy destacado los compuestos fenólicos por su alto valor terapéutico y cosmético.

En base a la problemática y a las oportunidades señaladas, el objetivo general planteado en esta tesis es estudiar la viabilidad del uso de extractos sostenibles, obtenidos mediante tecnologías supercríticas a partir de plantas aromático-medicinales que, por sus propiedades, sean susceptibles de ser incorporados en formulaciones cosméticas y que además resulten de interés en el sector farmacéutico.

Para alcanzar este fin, se estableció una metodología procedimental, experimental y teórica mediante una selección adecuada de materiales, técnicas experimentales, modelos computacionales y, en su caso, adaptación de protocolos.

En primer lugar se seleccionaron aquellas plantas aromático-medicinales: i) ricas en compuestos fenólicos que destaquen por su actividad antioxidante y por su alta demanda industrial, como lo son los ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico y rosmarínico, ii) idóneas para uso cosmético y farmacéutico y iii) adaptadas al territorio. *Salvia officinalis* L., *Calendula officinalis* L., *Melissa officinalis* L. y *Jasonia glutinosa* (L.) D.C. fueron las plantas seleccionadas para elaborar este trabajo y que cumplen sobradamente los requisitos establecidos.

Para garantizar el cumplimiento de las exigencias en la preparación de formulados ecológicos, se estableció un protocolo de trazabilidad basado en el Reglamento 178/2002, Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) y la Norma ISO 22000. Además, fue necesaria la elaboración de fichas técnicas y de seguridad para los extractos obtenidos en cumplimiento de las normas UNE-EN ISO 21149:2017, ISO 17516:2014 e ISO 16212:2017.

En la obtención de extractos ricos en los compuestos fenólicos mencionados, se emplearon dos tecnologías sostenibles supercríticas, a saber, extracción con CO₂ supercrítico (SCE) y Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente (SAF), para, respectivamente, eliminar los compuestos lipídicos y concentrar los compuestos activos.

La extracción supercrítica con CO₂ para la deslipidización del material vegetal, requirió unas condiciones de trabajo de 350 bar y 40 °C en el extractor, 90 bar y 45 °C en el colector 1 y 30 bar y 30 °C en el colector 2. La relación porcentual masa de extracto lipídico / masa material de partida fue de 4.9% para salvia, 8.3% para caléndula y 1.9% para melisa y jasonia. Una posterior maceración etanólica del material desengrasado proporcionó la disolución de alimentación, al 3% en peso, que contenía los compuestos fenólicos de interés para el proceso SAF.

La concentración de los ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico y rosmarínico mediante SAF se apoyó en el diseño experimental para poder evaluar estadísticamente la influencia de la presión y el caudal de CO₂ en el proceso. En concreto, se utilizó una Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) basada en un Diseño Central Compuesto (CCD) que permitió estudiar y optimizar las condiciones de trabajo dentro de unos rangos prefijados de 80-160 bar y 10-60 g/min y manteniendo temperatura, concentración y flujo de la alimentación constantes (40 °C, 3% en peso y 0.45 mL/min, respectivamente). Además, se implementó una metodología para la identificación y cuantificación de los activos estudiados mediante HPLC-PDA que detectó ácido

clorogénico en salvia, caléndula y jasonia; ácido cafeico en salvia, caléndula y melisa; ácido rosmarínico en salvia y melisa y ácido ferúlico en caléndula.

En general, el proceso SAF permitió recuperar hasta el 95% del material de alimentación, del cual la mayor parte se recogió en la cámara de precipitación (valores comprendidos entre el 47% y el 77%). Esta fracción de cámara, libre de disolventes, resultó enriquecida en un 40% (valor promedio) en los activos de interés. Los ácidos rosmarínico y ferúlico fueron retenidos en esta fracción, mientras que los ácidos cafeico y clorogénico presentaron un reparto que depende ya no solo de las condiciones experimentales, sino también de la naturaleza del extracto de alimentación propio de cada planta.

El análisis estadístico de los resultados de concentración mediante SAF y cuantificación de activos permitió obtener, para cada una de las especies vegetales y dentro del intervalo estudiado, las condiciones óptimas de presión y caudal de CO₂, condiciones que resultaron ser muy próximas para tres de ellas (148 bar, 10 g/min para *S. officinalis*, 140 bar, 12 g/min para *M. officinalis* y 150 bar, 19 g/min para *J. glutinosa*), siendo la excepción *C. officinalis* (153 bar, 42 g/min). Los valores R² para los ajustes de todos los modelos del análisis se situaron entre el 74% y el 97% y resulta destacable que las desviaciones estándar para todos los modelos fuesen inferiores al 5%.

En cuanto a la metodología computacional, se seleccionaron tres herramientas: i) modelos QSAR/COSMO-RS, ii) permeabilidad en piel *in silico* y iii) screening inverso, a fin de, respectivamente, establecer una relación entre la estructura molecular y la actividad antioxidante, estudiar el comportamiento de los activos seleccionados en un modelo de piel computacional y localizar dianas de interés farmacológico sobre las que interaccionan estos mismos activos.

Se desarrollaron dos modelos QSAR/COSMO-RS que correlacionaron el denominado perfil σ y la actividad antioxidante de un grupo de moléculas fenólicas seleccionadas que constituyeron el conjunto de entrenamiento. Los modelos se diferenciaron en la partición del perfil σ de la molécula, en 4 y 10 áreas. Se encontró un mejor ajuste para el modelo de 10 áreas, si bien ninguno de ellos consiguió ajustar suficientemente los datos del conjunto de validación consecuencia, muy posiblemente, de la escasez de datos bibliográficos con calidad contrastable. Pese a ello, la herramienta resulta prometedora para realizar una preselección de activos con actividad antioxidante.

Para el estudio de permeabilidad en piel de los compuestos fenólicos se utilizó el modelo computacional propuesto por Schwöbel et al. que fue implementado con el software COSMOtherm. Las permeabilidades obtenidas para los activos de interés mostraron que todos ellos quedaban retenidos en las capas de la epidermis y por tanto resultaban aptos y seguros para su posible uso cosmético y que la metodología empleada era consistente con la de otros modelos preexistentes.

La aplicación de la herramienta online Similarity Ensemble Approach (SEA), basada en el principio de similitud química, pese a su sencillez, permitió localizar posibles bioactividades asociadas a los activos y por tanto prever sus posibles usos farmacéuticos. *Jasania glutinosa*, por su contenido en ácido clorogénico, se postula como una especie interesante para investigaciones futuras.

En resumen, el presente estudio asienta las bases metodológicas para el desarrollo de futuros trabajos que tengan como finalidad la implementación de formulados con una perspectiva ecológica y sostenible dentro de la industria cosmética, farmacéutica o alimentaria. De hecho, gracias a las aportaciones de este trabajo se ha conseguido generar los ingredientes activos que formaron parte de la formulación final de la crema hidratante facial para el proyecto SPAGYRIA (Interreg-POCTEFA), que fue evaluada y certificada por la Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM-Francia).

Índice

Listado de abreviaturas.....	i
Listado de Figuras	vii
Listado de Tablas	xi

Capítulo 1. Introducción 1

1.1. Economía circular	3
1.2. Plantas aromático-medicinales y su importancia	8
1.2.1. <i>Salvia officinalis</i> L.	15
1.2.2. <i>Calendula officinalis</i> L.....	17
1.2.3. <i>Melissa officinalis</i> L.....	19
1.2.4. <i>Chiliadenus glutinosus</i> (L.) Fourr. = <i>Jasonia glutinosa</i> (L.) DC.	22
1.3. Técnicas de separación avanzada	24
1.3.1. Extracción supercrítica	26
1.3.2. Fraccionamiento supercrítico antidisolvente.....	28
1.3.3. Otras técnicas relacionadas.....	30
1.4. Evaluación computacional	30
1.4.1. Modelos QSAR.....	32
1.4.2. Modelos de permeabilidad en piel	34
1.4.3. Modelos de predicción de dianas	36

Capítulo 2. Objetivos.....39

Capítulo 3. Materiales y métodos43

3.1. Material vegetal y trazabilidad	45
3.2. Obtención de extractos sostenibles.....	48
3.2.1. Extracción Supercrítica con CO ₂ (SCE).....	48
3.2.2. Maceración y Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente (SAF)	50
3.2.3. Análisis HPLC de las fracciones.....	52
3.2.4. Diseño de experimentos y análisis estadístico.....	53
3.3. Herramientas computacionales	55
3.3.1. Aproximación a una metodología QSAR mediante COSMO-RS	55
3.3.2. COSMO-RS: Permeabilidad en piel.....	62
3.3.3. Screening inverso	66

Capítulo 4. Resultados y discusión.....	71
4.1. Extractos obtenidos para cada especie.....	73
4.1.1. <i>Salvia officinalis</i> L.	73
4.1.2. <i>Calendula officinalis</i> L.....	83
4.1.3. <i>Melissa officinalis</i> L.....	92
4.1.4. <i>Jasonia glutinosa</i> L.	101
4.2. Evaluación computacional	108
4.2.1. Resultados QSAR/COSMO-RS.....	108
4.2.2. Permeabilidad en piel de los compuestos	111
4.2.3. Predicción de dianas mediante screening inverso	114
4.3. Contribución a la elaboración de la crema hidratante SPAGYRIA.....	118
4.4. Otras actividades en colaboración	120

Capítulo 5. Síntesis y Conclusiones	121
--	------------

Bibliografía.....	132
--------------------------	------------

Anexos	151
---------------------	------------

Anexo I. Fichas del sistema de calidad.	153
A.I.1. Ficha de trazabilidad.	153
A.I.2. Ficha técnica.....	154
A.I.3. Ficha de seguridad.	155
Anexo II. Coordenadas cartesianas para geometrías optimizadas en fase gas con parametrización bvp86/dga1.....	159
Anexo III. Divisiones del perfil σ en 4 y 10 áreas.	169
Anexo IV. Rectas de calibrado derivadas del análisis HPLC.....	179
A.IV.1. Rectas de calibrado para <i>Salvia officinalis</i>	179
A.IV.2. Rectas de calibrado para <i>Calendula officinalis</i>	180
A.IV.2. Rectas de calibrado para <i>Melissa officinalis</i>	182
A.IV.2. Recta de calibrado para <i>Jasonia glutinosa</i>	183
Anexo V. Ajuste MLR para los dos modelos QSAR propuestos.	185
A.V.1. Ajuste MLR para el modelo de 4 áreas.	185
A.V.1. Ajuste MLR para el modelo de 10 áreas.	186
Anexo VI. Fichas complementadas del sistema de trazabilidad.....	189
A.VI.1. Ficha de trazabilidad del control de material vegetal.	189

A.VI.2. Ficha técnica del extracto de <i>Calendula officinalis</i> obtenido mediante SCE.....	190
A.VI.3. Ficha de seguridad del extracto de <i>Calendula officinalis</i> obtenido mediante SCE.	197
Anexo VII. Informe de los ensayos microbiológicos realizado en extractos supercríticos (SCE) de <i>Salvia sclarea</i>.....	205
Anexo VIII. Listado de publicaciones y congresos.	207
A.VIII.1. Congresos	207
A.VIII.2. Publicaciones	207

Listado de abreviaturas.

Por proximidad al lenguaje científico comúnmente utilizado, todas las palabras más técnicas empleadas en esta tesis se abrevian en inglés.

ABPR	Regulador Automático de Presión <i>Automatic Back Pressure Regulator</i>
ANN	Red Neuronal Artificial <i>Artificial Neural Network</i>
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
ASNM	Agencia Francesa del Medicamento <i>L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé</i>
BPR	Regulador Manual de Presión <i>Back Pressure Regulator</i>
C1	Colector 1
C2	Colector 2
CAF	Ácido Cafeico <i>Caffeic Acid</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CB	Baño de Regrigeración <i>Cooling Bath</i>
CCD	Diseño Central Compuesto <i>Central Composite Design</i>
CE	Comisión Europea
CHA	Ácido Clorogénico <i>Chlorogenic Acid</i>
CosIng	Base de Datos de Ingredientes Cosméticos <i>Cosmetic Ingredient database</i>
COSMO-RS	<i>Conductor-like Screening for Real Solvents</i>

LISTADO DE ABREVIATURAS

DELOS	Despresurización de un Líquido Orgánico Expandido en una disolución acuosa <i>Depressurization of an Expanded Liquid Organic Solution into aqueous solution</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad <i>Density Functional Theory</i>
DV	Colector <i>Downstream Vessel</i>
E	Extractor
EC	Economía Circular
ECFP	<i>Extended-Connectivity Fingerprints</i>
ECHA	Agencia Europea de los productos Químicos <i>European Chemicals Agency</i>
EC50	Concentración efectiva del compuesto antioxidante que reduce al 50% del DPPH inicialmente presente en el ensayo
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria <i>European Safety Authority</i>
$E_{i/PV,DV}$	Ratio de enriquecimiento del compuesto i en la fracción PV o DV
EINECS	Inventario Europeo de Sustancias Químicas Existentes <i>European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances</i>
EIP-AGRI	Asociación Europea para la Innovación Agrícola <i>Agricultural European Innovation Partnership</i>
EMA	Agencia Europea de Medicamentos <i>European Medicines Agency</i>
FA	Ácido Ferúlico <i>Ferulic Acid</i>
FEDER	Fondo Europeo de Desarrollo Regional
FS	Disolución de Alimentación <i>Feed Solution</i>

FSC	Fluido Supercrítico
GMP	Buenas Prácticas de Fabricación <i>Good Manufacturing Practices</i>
HBA	Región aceptora de enlace de hidrógeno <i>Hydrogen Bond Acceptor</i>
HBD	Región donora de enlace de hidrógeno <i>Hydrogen Bond Donor</i>
HE	Intercambiador de calor <i>Heat Exchanger</i>
HMPC	Comité de Medicamentos a Base de Plantas <i>Comitte on Herbal Medicinal Products</i>
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
K_P	Coefficiente de permeabilidad
MD	Simulación de Dinámica Molecular <i>Moleuclar Dynamics</i>
MEDES	Instituto de Medicina y Fisiología Espaciales <i>Institut de Médecine et de Physiologie Spatiales</i>
MLR	Regresión Lineal Múltiple <i>Multiple Linear Regression</i>
PAM	Planta aromático-medicinal
P_c	Presión Crítica
P-CO ₂	Bomba de CO ₂
PDA	Detector de Matriz de Fotodiodos <i>Photo Diode Array</i>
PLS	Mínimos Cuadrados Parciales <i>Partial Least Squares</i>
POCTEFA	Proyecto Interregional España-Francia
PV	Cámara de Precipitación <i>Precipitator Vessel</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i>
QSPR	<i>Quantitative Structure-Property Relationships</i>

LISTADO DE ABREVIATURAS

R	Reservorio de CO ₂
RA	Ácido Rosmarínico <i>Rosmarinic Acid</i>
RE _i	Enriquecimiento relativo para el compuesto i
R _{i,inter}	Resistencia del mecanismo intercelular para el compartimento i
R _{i,trans}	Resistencia del mecanismo transcelular para el compartimento i
R _{SC,SG,SS,SB}	Resistencia de cada estrato (SC, SG, SS, SB)
R _{shunt}	Resistencia de la ruta de los apéndices de la piel
R _{skin}	Resistencia global de la piel
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta <i>Response Surface Methodology</i>
R _{stratified-cells}	Resistencia total de los estratos
Run	Orden experimental
SAA	Atomización Asistida Supercrítica <i>Supercritical Assisted Atomization</i>
SAF	Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente <i>Supercritical Antisolvent Fractionation</i>
SAS	Precipitación Antidisolvente Supercrítica <i>Supercritical AntiSolvent</i>
SB	Estrato Basal <i>Stratum Basale</i>
SC	Estrato córneo <i>Stratum Corneum</i>
sc-CO ₂	CO ₂ Supercrítico
SCE	Extracción con CO ₂ Supercrítico <i>Supercritical Extraction with CO₂</i>
SEA	<i>Similarity Ensemble Approach</i>
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos <i>Supercritical Fluid Chromatography</i>
SG	Estrago granuloso <i>Stratum Granulosum</i>
Shunt	Apéndices de la piel

SS	Estrato espinoso <i>Stratum Spinosum</i>
SVM	Máquina de Vectores de Apoyo <i>Support Vector Machine</i>
T _c	Temperatura Crítica
UE	Unión Europea
wt %	Porcentaje en peso
X _P	Factor Presión
X _{QCO₂}	Factor Caudal de CO ₂
Y _{DV}	Rendimiento de masa obtenida en DV
Y _{EIOH}	Rendimiento de Maceración Etanólica
Y _{PV}	Rendimiento de masa obtenida en PV
Y _{SAF}	Rendimiento total del proceso SAF
Y _{SCE}	Rendimiento de Extracción Supercrítica

Listado de Figuras.

Figura 1. Ejemplos de sistemas de cultivo diversificados (Adaptada de A. Messan et al. [14])

Figura 2. Estructuras de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, así como ejemplos de los mismos.

Figura 3. Imagen y clasificación taxonómica de *S. officinalis* L.

Figura 4. Lámina de *Salvia officinalis*. Autor: Walther Otto Müller.

Figura 5. Compuestos fenólicos de *S. officinalis* y sus estructuras.

Figura 6. Imagen y clasificación taxonómica de *C. officinalis* L.

Figura 7. Lámina de *Calendula officinalis*. Autor: Walther Otto Müller.

Figura 8. Compuestos fenólicos de *C. officinalis* y sus estructuras.

Figura 9. Imagen y clasificación taxonómica de *M. officinalis* L.

Figura 10. Lámina de *Melissa officinalis*. Autor: Walther Otto Müller.

Figura 11. Compuestos fenólicos de *M. officinalis* y sus estructuras.

Figura 12. Imagen y clasificación taxonómica de *J. glutinosa* L. Imagen tomada de “Menuda natura” [131].

Figura 13. Lámina de *Jasonia glutinosa*. Autor: Roberto Roselló.

Figura 14. Compuestos fenólicos de *J. glutinosa* y sus estructuras.

Figura 15. Diagrama de fases simple PT.

Figura 16. Esquema simplificado de un equipo de extracción con sc-CO₂.

Figura 17. Esquema simplificado de un equipo SAF.

Figura 18. Modelos computacionales según escalas de tamaño del sistema simulado y tiempo de simulación para el sistema más sencillo considerado. (Adaptada a partir de G. Saurav et al. [177]).

Figura 19. Imagen del analizador automático Sartorius utilizado para la medición del contenido de humedad.

Figura 20. Imagen de la tamizadora vibratoria CISA y de las cribas utilizadas para tamizar el material vegetal molido.

Figura 21. Imagen del diagrama de laboratorio con cada una de las zonas de trabajo correspondientes a las etapas realizadas desde la llegada del material vegetal.

Figura 22. Esquema de la planta SCE escala laboratorio. Reservorio de CO₂ (R), baño de refrigeración (CB), bomba de CO₂ (P-CO₂), intercambiador de calor (HE), extractor (E),

colector 1 y 2 (C1 y C2), regulador de presión automática (ABPR), regulador manual de presión (BPR), medidores de temperatura (T) y medidores de presión (P).

Figura 23. Preparación de la muestra de alimentación.

Figura 24. Esquema del equipamiento SAF. Reservorio de disolución de alimentación (FS), bomba de líquidos (P-LIQ), reservorio de CO₂ (R), baño de refrigeración (CB), bomba de CO₂ (P-CO₂), intercambiador de calor (HE), cámara de precipitación (PV), colector (DV), regulador de presión automática (ABPR), regulador manual de presión (BPR), medidores de temperatura (T) y medidores de presión (P).

Figura 25. Equipo HPLC-PDA empleado.

Figura 26. Diseño compuesto central (CCD) para el fraccionamiento de *M. officinalis* con dos variables independientes: presión (X_P , bar) y caudal de CO₂ ($X_{Q_{CO_2}}$, g/min) y orden experimental.

Figura 27. Estructura 3D de los compuestos utilizados para el desarrollo del modelo preliminar QSAR y su densidad de carga (en rojo zona electronegativa, en azul zona electropositiva y en verde zona neutral).

Figura 28. Perfil σ , representado como probabilidad ($p(\sigma)$) vs densidad de polarización de carga (σ), de los compuestos ácido rosmarínico (rojo) y ácido clorogénico (azul) y su partición en (a) 4 intervalos y (b) 10 intervalos.

Figura 29. Estratos de la epidermis. (Adaptada de “Meditip” [211]).

Figura 30. Esquema de los compartimentos que conforman la epidermis y sus rutas de permeación. (Adaptado de Schwöbel et al. [175]).

Figura 31. Interfaz de la versión beta del programa COSMOperm para el cálculo de permeabilidad de compuestos.

Figura 32. Interfaz del servidor web SEA.

Figura 33. Estructura 2D y su correspondiente SMILE para (a): ácido clorogénico, (b) ácido ferúlico, (c) ácido rosmarínico y (d) ácido cafeico.

Figura 34. Representación del entorno atómico de hasta dos enlaces. En negro aparece el átomo para el cual se calcula el identificador, en gris clarito los átomos con radio uno y en gris oscuro los átomos con radio dos. Modificada de L. Carlsson et al. [215].

Figura 35. Imágenes correspondientes al experimento 10 de *Salvia officinalis*: (a,b) polvo precipitado en la fracción de cámara y (c) disolución recogida como fracción de colector.

Figura 36. Cromatograma de los extractos de *Salvia officinalis*. CHA ($T_R = 6.94$ min, $\lambda = 324$ nm), CAF ($T_R = 7.98$ min, $\lambda = 324$ nm) y RA ($T_R = 10.79$ min, $\lambda = 324$ nm). Fracciones: PV línea roja, DV línea negra, FS línea azul.

Figura 37. Gráficos de contorno para los rendimientos correspondientes a las fracciones de *S. officinalis*: (a) en DV, $Y_{DV}\%$ y (b) rendimiento global, $Y_{SAF}\%$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , XQ_{CO_2} (g/min).

Figura 38. Gráficos de contorno de las ratios de enriquecimiento de *S. officinalis*: (a) $E_{CHA/PV}$; (b) $E_{RA/PV}$ y (c) RE_{CHA} en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , XQ_{CO_2} (g/min).

Figura 39. Imágenes correspondientes al experimento 3 de *Calendula officinalis*: (a,b) precipitado en la fracción de cámara y (c) disolución recogida como fracción de colector.

Figura 40. Cromatograma de los extractos de *Calendula officinalis*. CHA ($T_R = 7.04$ min, $\lambda = 324$ nm), CAF ($T_R = 7.98$ min, $\lambda = 324$ nm) y FA ($T_R = 10.33$ min, $\lambda = 324$ nm). Fracciones: PV línea roja, FS línea negra, DV línea azul.

Figura 41. Gráficos de contorno para los rendimientos correspondientes a las fracciones de *C. officinalis*: (a) en PV, $Y_{PV}\%$; (b) en DV, $Y_{DV}\%$ y (c) rendimiento global, $Y_{SAF}\%$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , XQ_{CO_2} (g/min).

Figura 42. Gráficos de contorno de las ratios de enriquecimiento de *C. officinalis*: (a) $E_{CHA/PV}$; (b) $E_{FA/PV}$ y (c) $E_{ALL/PV}$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , XQ_{CO_2} (g/min).

Figura 43. Imágenes de las fracciones obtenidas en el experimento 10 de *Melissa officinalis*: (a,b) polvo precipitado correspondiente a la fracción de cámara y (c) disolución recogida como fracción de colector.

Figura 44. Cromatograma de los extractos de *Melissa officinalis*. CAF ($T_R = 6.78$ min, $\lambda = 324$ nm), RA ($T_R = 8.61$ min, $\lambda = 324$ nm). Fracciones: PV línea negra, FS línea azul, DV línea roja.

Figura 45. Gráficos de contorno para los rendimientos correspondientes a las fracciones de *M. officinalis*: (a) en PV, $Y_{PV}\%$; (b) en DV, $Y_{DV}\%$ y (c) rendimiento global, $Y_{SAF}\%$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , XQ_{CO_2} (g/min).

Figura 46. Gráficos de contorno de las ratios de enriquecimiento: de *M. officinalis* (a) $E_{CAF/PV}$; (b) $E_{RA/PV}$ y (c) $E_{CAF/DV}$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , XQ_{CO_2} (g/min).

Figura 47. Imágenes correspondientes al experimento 1 de *Jasonia glutinosa*: (a,b) polvo precipitado en la fracción de cámara y (c) disolución recogida como fracción de colector.

Figura 48. Cromatograma de los extractos de *Jasonia glutinosa*. CHA ($T_R = 5.61$ min, $\lambda = 324$ nm). Fracciones: PV línea roja, FS línea negra, DV línea negra.

Figura 49. Gráficos de contorno para los rendimientos correspondientes a las fracciones de *J. glutinosa*: (a) en PV, $Y_{PV}\%$ y (b) $Y_{SAF}\%$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , XQ_{CO_2} (g/min).

LISTADO DE FIGURAS

Figura 50. Gráficos de contorno de la ratio de enriquecimiento de CHA para *J. glutinosa*, $E_{CHA/PV}$, en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , XQ_{CO_2} (g/min).

Figura 51. Fotografía del producto final cosmético hidratante SPAGYRIA.

Figura 52. Ensayos de la crema SPAGYRIA en voluntarios en el MEDES.

Listado de Tablas.

Tabla 1. Clasificación y subclasificación según ruta biosintética de los metabolitos secundarios, estructura básica y ejemplos.

Tabla 2. Parámetros críticos de algunos FSC. Datos obtenidos a partir del trabajo de G. Gil Chavez et al. [150].

Tabla 3. Técnicas de extracción tradicionales y no convencionales de matrices naturales. (Adaptada de J. Azmir et al. [155]).

Tabla 4. Descriptores moleculares para el modelo de 4 áreas y el modelo de 10 áreas así como sus representaciones basadas en el trabajo de Lemaoui et al. [215].

Tabla 5. Compartimentos que forman la epidermis, sus abreviaciones y una breve descripción de cada capa. Información obtenida de Schwöbel et al. [187].

Tabla 6. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{\text{CO}_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *S. officinalis*, junto con los resultados de rendimientos definidos por las Ecuaciones 4 y 5.

Tabla 7. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{\text{CO}_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *S. officinalis*, junto con los resultados de ratios de enriquecimiento y enriquecimiento relativo, definidas por las Ecuaciones 7 y 14.

Tabla 8. Coeficientes de ajuste de la Ecuación 8 para los rendimientos DV y global (Y_{DV} , Y_{SAF} , respectivamente), ratios de enriquecimiento en PV de los ácidos clorogénico y rosmarínico ($E_{\text{CHA/PV}}$, $E_{\text{RA/PV}}$, respectivamente) y enriquecimiento relativo del ácido clorogénico (RE_{CHA}) junto con sus correspondientes factores de significación de los términos, p . También se consignan los coeficientes de regresión, R^2 , y la desviación estándar, s , para cada ajuste.

Tabla 9. Parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ_H) para los compuestos considerados, EtOH y CO_2 , y solubilidades como fracciones molares, x , en sc- CO_2 y en sc- $(\text{CO}_2 + \text{EtOH})$ para los compuestos considerados.

Tabla 10. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{\text{CO}_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *C. officinalis*, junto con los resultados de rendimientos definidos por las Ecuaciones 4 y 5.

Tabla 11. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{\text{CO}_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *C. officinalis*, junto con los resultados de ratios de enriquecimientos y enriquecimiento global definidos por las Ecuaciones 7 y 15.

Tabla 12. Coeficientes de ajuste de la Ecuación 8 para los rendimientos PV, DV y global (Y_{PV} , Y_{DV} , Y_{SAF} , respectivamente), ratios de enriquecimiento en PV de los ácidos clorogénico y ferúlico ($E_{CHA/PV}$, $E_{FA/PV}$, respectivamente) y enriquecimiento total ($E_{ALL/PV}$) junto con sus correspondientes factores de significación de los términos, p . También se consignan los coeficientes de regresión, R^2 , y la desviación estándar, s , para cada ajuste.

Tabla 13. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *M. officinalis*, junto con los rendimientos definidos por las Ecuaciones 4 y 5.

Tabla 14. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *M. officinalis*, junto con las ratios de enriquecimientos definidas por la Ecuación 7.

Tabla 15. Coeficientes de ajuste de la Ecuación 8 para los rendimientos PV, DV y global (Y_{PV} , Y_{DV} , Y_{SAF} , respectivamente), ratios de enriquecimiento en PV de los ácidos clorogénico y ferúlico ($E_{CHA/PV}$, $E_{FA/PV}$, respectivamente) y enriquecimiento total ($E_{ALL/PV}$) junto con sus correspondientes factores de significación de los términos, p . También se consignan los coeficientes de regresión, R^2 , y la desviación estándar, s , para cada ajuste.

Tabla 16. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *J. glutinosa* junto con los resultados de los rendimientos definidos por las Ecuaciones 4 y 5.

Tabla 17. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *J. glutinosa* junto con las ratios de enriquecimientos definidas por la Ecuación 7.

Tabla 18. Coeficientes de ajuste de la Ecuación 8 para los rendimientos PV y global (Y_{PV} , Y_{SAF} , respectivamente) y ratios de enriquecimiento en PV del ácido clorogénico ($E_{CHA/PV}$) y enriquecimiento total ($E_{ALL/PV}$) junto con sus correspondientes factores de significación de los términos, p . También se consignan los coeficientes de regresión, R^2 , y la desviación estándar, s , para cada ajuste.

Tabla 19. Comparación entre los resultados obtenidos para el caso de *S. officinalis*, *C. officinalis*, *M. officinalis* y *J. glutinosa*.

Tabla 20. Valores experimentales y predichos de EC_{50} y sus logaritmos para cada compuesto utilizado en el modelo QSAR con 4 áreas.

Tabla 21. Valores experimentales y predichos de EC_{50} y sus logaritmos para cada compuesto utilizado en el modelo QSAR con 10 áreas.

Tabla 22. Parámetros detallados del modelo de resistencias y K_p (predicho, calculado, experimental y sus desviaciones) para CAF, CHA, FA y RA para cada compartimento y su ruta de permeación.

Tabla 23. Principales dianas moleculares de CHA obtenidas a través del servidor web SEA, su descripción, el nombre de la diana, las ID de Uniprot y ChEMBL y el valor E y el coeficiente de Tanimoto (Tc).

Tabla 24. Principales dianas moleculares de CAF obtenidas a través del servidor web SEA, su descripción, el nombre de la diana, las ID de Uniprot y ChEMBL y el valor E y el coeficiente de Tanimoto (Tc).

Tabla 25. Principales dianas moleculares de RA obtenidas a través del servidor web SEA, su descripción, el nombre de la diana, las ID de Uniprot y ChEMBL y el valor E y el coeficiente de Tanimoto (Tc).

Tabla 26. Principales dianas moleculares de FA obtenidas a través del servidor web SEA, su descripción, el nombre de la diana, las ID de Uniprot y ChEMBL y el valor E y el coeficiente de Tanimoto (Tc).

Capítulo 1. Introducción



Imagen Capítulo 1: Secado de flores de *Calendula officinalis*

1.1. Economía circular

El modelo económico lineal tradicional “take-make-consume-throw away” basado en un crecimiento continuo con un consumo cada vez mayor de recursos naturales está llegando a un punto de saturación, ya que muchos de estos recursos naturales son finitos. De hecho, el 20% de la población de países industrializados consume el 80% de todos los recursos naturales, lo que supone un ritmo de evolución insostenible [1]. Estos hechos han provocado que la crisis social y ecológica estén alcanzando niveles sin precedentes que imponen un cambio hacia un modelo de desarrollo sostenible [2]. Si bien es cierto que en las últimas décadas el sector industrial está siguiendo ciertas iniciativas de sostenibilidad no resultan suficientes y es preciso acelerar este proceso, para que termine por adaptar a un modelo económico emergente más potente conocido como la Economía Circular (EC) [3]. La EC es un modelo de producción y consumo basado en conservar la mayor utilidad y valor de los productos, componentes y materiales en todo momento mediante la reutilización, reparación, reducción y reciclaje [4]. Esto implica reducir los residuos y polución al mínimo, mantener en uso todo lo posible los productos o bien sus materias primas y promover y regenerar sistemas y procesos naturales [5].

Las instituciones y gobiernos juegan un papel crucial a la hora de proporcionar un marco y unas condiciones que permitan que surja y prospere una EC. En los últimos años diversos responsables políticos han intentado incluir medidas relacionadas con la EC en sus agendas. De hecho, en 2015 la Comisión Europea (CE) adaptó su primer plan de acción para impulsar la transición de la Unión Europea (UE) hacia una economía circular, estableciendo 54 acciones ambiciosas que abarcan todo el ciclo de vida de productos: producción, consumo, gestión de los residuos y del mercado de materias primas, así como una propuesta legislativa revisada sobre residuos [6]. Para 2019 este primer plan estaba totalmente terminado y en marzo de 2020 la UE adaptó un nuevo plan con 35 nuevas acciones interrelacionadas para acelerar la transición de la UE hacia un sistema económico sostenible. Un estudio reciente apunta a que la aplicación de los principios de la EC en la economía de la UE podría aumentar potencialmente el PIB de la UE para 2030 hasta un 0.5% adicional, creando unos 700.000 puestos de trabajo [7]. Este cambio también podría favorecer a las empresas manufactureras, que de media

gastan alrededor de 40% en materiales, ya que un bucle cerrado como la EC podría aumentar su rentabilidad, así como proteger el precio de los recursos de posibles fluctuaciones [8].

El sector agroalimentario también se vería favorecido por el cambio hacia una EC. Dicho sector tiene una gran importancia social y cultural, con gran influencia en las economías rurales y que representa hasta el 36% del presupuesto total de la UE [9]. En los últimos años la industria agroalimentaria se ha visto gravemente afectada por diversos problemas como la pérdida de recursos, la escasez de alimentos y la generación de residuos que contribuyen al cambio climático [10]. Este último problema repercute negativamente no solo en el medioambiente sino también en la propia industria ya que reduce el rendimiento de los cultivos en muchas regiones y aumenta la degradación del suelo, provocando pérdida de cosechas, daños en infraestructuras y disminución de la productividad, lo que puede llevar a un colapso de los agroecosistemas [11].

Frente a los diversos problemas que la industria agroalimentaria afronta, existen dos principales estrategias adaptativas basadas en procesos de simplificación o de diversificación [11]. La primera estrategia es un modelo centralizado que utiliza máximo uno o dos tipos de productos, a corto plazo ofrece beneficios ya que se trata de un modelo más competitivo, pero solo para aquellas empresas con alto poder adquisitivo que les permita obtener las mejores tecnologías. Este modelo permite maximizar la producción, intensificar los rendimientos y de esa forma aumentar los beneficios; sin embargo, reduce la capacidad del ecosistema para responder a factores de estrés, es decir, a la capacidad de hacer frente a diversas condiciones desfavorables (patógenos transmitidos por alimentos, sequías...) [12]. Además, está asociado con prácticas como el uso masivo de pesticidas que generan resistencias de los cultivos y contribuyen con la degradación de la tierra y la contaminación del suelo y el agua [13].

Por otro lado, el modelo de diversificación se centra en la variación de cultivos, incluyendo mayor heterogeneidad tanto dentro de las especies como de la forma de cultivarlas, a escala espacial y temporal [14]. En la Figura 1 se pueden observar ejemplos de sistemas de cultivos diversificados como cultivos intercalados, cultivos múltiples o cultivos múltiples y/o rotaciones ampliadas. Este modelo conduce a un sistema agrícola

más resiliente ante posibles factores de estrés al estar relacionado con una mayor biodiversidad, mejorando la estabilidad y protegiendo los ecosistemas. Además supone una reducción en la necesidad de insumos como fertilizantes y pesticidas, proporcionando resultados satisfactorios tanto para trabajadores como para consumidores [11].

En este contexto de EC y durante 2019, la Asociación Europea para la Innovación Agrícola (EIP-AGRI), estudió la forma de crear nuevas oportunidades de diversificación mediante cadenas de valor innovadoras de productos medicinales y cosméticos fabricados a base de plantas aromático-medicinales (PAMs) [15]. Para ello realizaron un estudio sobre las PAMs, las cadenas de valor existentes de productos generados a partir de ellas y el papel que juegan los agricultores en dichas cadenas. Las PAMs tienen un gran potencial para contribuir en la diversificación e innovación en las zonas rurales, creando por un lado oportunidades de valorización de recursos locales y por otro nuevas dinámicas que conlleven nuevas oportunidades de empleo y por tanto ingresos en regiones rurales despobladas [16]. Esto se debe a que por sus características (se adaptan bien al medio, toleran el sombreado parcial, humedad relativa alta y temperaturas suaves) son una opción ideal para el intercultivo con otras plantaciones como madera y leña, árboles frutales o cultivos de plantación [17]. De esta manera se pueden encontrar sistemas de cultivo en callejones como la plantación de tomillo en huertos de olivo en Murcia o la lavanda en huertos de robles trufados en Francia y España [16]. También se relaciona las PAMs con la apicultura, zonas de amortiguamiento ribereñas o el turismo o educación de la población [16].

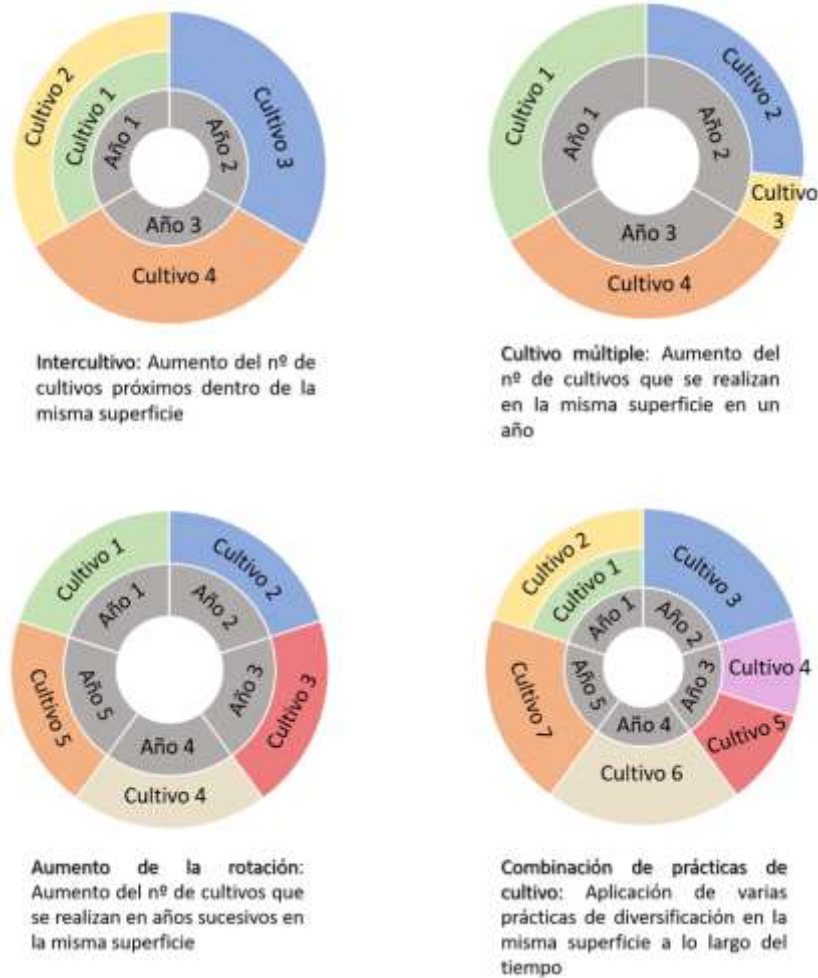


Figura 1. Ejemplos de sistemas de cultivo diversificados. (Adaptada de A. Messan [14]).

Concretando, algunas de las principales ventajas de utilizar PAMs como intercultivo son las siguientes [18]:

- **Fitorremediación y mejora medioambiental.** La plantación de PAMs permite, de forma sostenible, controlar y evitar una mayor degradación del suelo y desertización de las tierras, además de poder utilizarse para reestablecer la vegetación en aquellos lugares en los cuales es inexistente [19]. Además, algunas especies de PAMs son tolerantes e hiperacumuladoras de metales, lo que permite reducir la contaminación e incluso es posible recuperar suelos salinos o sódicos [20].
- **Mitigación del calentamiento global.** Una gran variedad de PAMs se utilizan como fitoextractores ya que permiten secuestrar muchos de los gases de efecto

invernadero, contribuyendo de esta forma a reducir el impacto del calentamiento global [19].

- **Producción de fibra, biodiesel y bioenergía.** Algunas especies son plantas de alto rendimiento en biomasa y fibra, con numerosas aplicaciones industriales como la obtención de biodiesel de forma eficiente [21] fabricación de absorbentes, cuerdas, tejidos, papel de alta eficiencia y materiales de construcción [18]. También es posible generar energía a partir de la biomasa de las PAMs bien mediante quema directa o la producción de biogás mediante la gasificación de la biomasa obtenida tras la fitorremediación [22,23].
- **Obtención de productos de alto valor añadido.** Los productos obtenidos a partir de ciertas PAMs son ampliamente utilizados y de alto valor para las industrias alimentaria, cosmética, farmacéutica y fitosanitaria, ya que tienen diversos usos como suplementos, condimentos, perfumes, cosméticos, medicamentos, nutraceúticos, jabones, detergentes, repelentes de insectos o incluso como bioplaguicidas [24,25].
- **Turismo y conservación.** Las PAMs suponen un alto recurso turístico con enorme potencial, ya que el turismo vegetal es una industria a nivel mundial que mueve miles de millones de dólares al año y que a su vez promueve el empleo [18]. Además, debido a la demanda mundial de los productos provenientes de este tipo de plantas, se ve amenazado su presencia en la naturaleza al ser la fuente que utilizan muchas industrias. Por tanto, el cultivo de PAMs será útil para la conservación de ciertas especies que podrían llegar a extinguirse en la naturaleza [18].
- **Mejora en el aspecto económico.** Además de la rentabilidad de sus productos directos (por ejemplo, se predice que el mercado potencial de los aceites esenciales alcanzará los 5 billones de dólares para el 2050 [26]), ha de considerarse el valor añadidos de todos los aspectos previamente citados.

Sobre la base de estas ideas de EC y revalorización de cultivos mediante PAMs nació el Proyecto SPAGYRIA, en el que nuestro grupo investigador GATHERS ha jugado un papel principal. Se trata de un proyecto interregional España-Francia (POCTEFA) que ha llegado hasta la elaboración final de una crema cosmética,

abordando todo el proceso desde una perspectiva EC, iniciándose con el cultivo de plantas aromáticas como materia prima hasta la fabricación de la crema, pasando por la extracción de principios activos de dichas plantas de una forma sostenible y respetuosa con el medio ambiente. Es un proyecto innovador y solidario que combina la investigación con la inclusión social, contribuyendo de esta forma a mejorar la empleabilidad y calidad de vida de las personas con dificultades de inserción social [27].

1.2. Plantas aromático-medicinales y su importancia

El reino vegetal supone un recurso biológico inagotable de compuestos bioactivos de gran importancia para uso como medicamentos, nutraceúticos, complementos alimentarios, cosméticos o incluso fármacos intermedios [28]. Desde la antigüedad el ser humano ha tenido la necesidad de buscar en la naturaleza una fuente que le permitiera sanar heridas, enfermedades y otras afecciones y ha encontrado en las PAMs el medio perfecto para ello. De hecho, los registros medicinales más antiguos de los que se dispone, encontrados en tablillas de arcilla sumerias de hace 5000 años aproximadamente, albergan la preparación de medicamentos a partir de más de 250 plantas distintas, algunas como la amapola el beleño o la mandrágora [29].

Esto se repite a lo largo de la historia en todo el mundo, distintos países utilizan las plantas autóctonas de su región como medicamentos y recogen sus usos en diversos escritos. De esta forma encontramos tratados de PAMs a lo largo de todo el mundo, como el libro "Pen T'Sao" (China, 2500 a.C.) en el que se explica cómo utilizar hasta 365 partes secas de plantas medicinales, el Papiro de Ebers (Egipto, 1500 a.C.) que contiene una descripción de cómo tratar distintas enfermedades mediante el uso de 700 especies de plantas y fármacos, las obras de Hipócrates (Grecia, 459-370 a.C.) que recogen el uso y la acción fisiológica de 300 plantas medicinales o los libros "*De Causis Plantarum*" y "*De Historia Plantarum*", escritos por Teofrasto (Grecia, 371-287 a.C.) en los que se encuentra la clasificación de más de 500 plantas medicinales [29].

Sin embargo, la obra más destacada a lo largo de la historia es la del ilustre Dioscórides, quien es conocido como "padre de la farmacognosia". Dicha obra, compuesta por 5 libros y titulada "*De Materia Medica*" (Grecia, 70 d.C.), supuso una gran

influencia en el campo de las PAMs y sus aplicaciones médicas, llegando a ser considerada como precursora de la farmacopea moderna. A lo largo de los libros Dioscórides describe alrededor de 600 plantas medicinales proporcionando el nombre popular de cada especie, la distribución geográfica en el caso de disponer de dicha información, la descripción de la parte de la planta utilizada, así como el método de recolección, preparación y administración. Además, también refiere las indicaciones terapéuticas y la dosis a utilizar [30].

Si bien uno de los mayores usos de las PAMs a lo largo de la historia, tal y como se ha indicado, ha sido el medicinal y terapéutico, este tipo de plantas también han sido ampliamente utilizadas como saborizantes, conservantes, ornamentos o como fragancias y cosméticos [31]. Desde tiempos inmemoriales el ser humano ha buscado modificar su aspecto externo como forma de socialización y para aumentar su autoestima, lo que ha llevado a diferentes civilizaciones a utilizar una amplia variedad de minerales, productos animales y, por supuesto, plantas, con este fin. Ya en el paleolítico existen evidencias del uso de aceites perfumados y colorantes vegetales en rituales o como camuflaje [32], los sumerios y asirios desarrollaron la cosmética con uso tópico para “eliminar los espíritus de la piel” [33] y los babilonios comerciaron perfumes y esencias aromáticas [34]. Pero sin duda alguna la importancia de las plantas como uso cosmético destaca en el antiguo Egipto, hecho constatable por las numerosas colecciones recogidas en los museos de egiptología. La base de la mayoría de productos cosméticos eran aceites, que se utilizaban para proteger y suavizar la piel en el clima seco, y ungüentos que le daban elasticidad a la piel, frenando el envejecimiento y previniendo las arrugas [35]. El uso de los aceites se realizaba bajo diferentes presentaciones como bálsamos o en forma líquida y se conocían hasta más de 30 tipos. Algunos ejemplos de aceites utilizados eran de linaza, ricino, alholva, incienso, moringa, almendras y oliva [36].

A lo largo del tiempo, tanto la medicina como la cosmética han progresado continuamente y han ido evolucionado hacia la obtención de nuevos compuestos bioactivos mediante síntesis. Sin embargo, la creciente preocupación por los aditivos sintéticos, potencialmente perjudiciales, tanto para la salud humana como para el medio ambiente, está reorientando las preferencias de los consumidores hacia el uso de productos que contengan ingredientes naturales. Se explica así el incremento del interés

de determinados sectores industriales en la búsqueda de activos naturales que sean seguros, eficaces y rentables, provocando un aumento en el mercado mundial de productos botánicos que llegó a valorarse en 108.000 millones de dólares en 2015, siendo el 48% de medicina herbal, el 17% de cosméticos y el 35% de suplementos y alimentos funcionales [37]. Este renovado interés por las PAMs junto con los cambios en el estilo de vida de la población hacia la elección de productos más naturales, hace que la fitoterapia constituya la primera estrategia terapéutica para el 80% de los países desarrollados y que hasta el 87.5% de la población mundial utilice la medicina tradicional a base de plantas para tratar diversos problemas de salud [38].

Tal es el impacto de las PAMs sobre la salud humana que diversos países cuentan con regulaciones sobre sustancias y preparados a base de plantas, así como información sobre los usos recomendados y condiciones de seguridad. De esta forma, las empresas y autoridades competentes cuentan con una referencia a la hora de elaborar y comercializar productos a base de plantas. En particular, en Europa existe el Comité de Medicamentos a Base de Plantas (HMPC) que se creó en 2004 en la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y que se centra en dos tareas principales [39]:

- Elaborar monografías que cubran los usos terapéuticos establecidos y/o tradicionales tanto de las plantas como de sus preparados.
- Elaborar una lista comunitaria de sustancias y preparados vegetales y sus combinaciones para su uso en medicamentos tradicionales a base de plantas.

Además de la EMA, en Europa se cuenta con la Agencia Europea de los productos Químicos (ECHA) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), encargadas respectivamente de velar por la aplicación de la legislación en materia de sustancias químicas y de alertar y detectar problemas relacionados con la seguridad alimentaria. Todas estas agencias trabajan en conjunto con CE para asegurar una legislación que garantice la seguridad de los productos dirigidos hacia consumo humano, incluidos aquellos constituidos a base de plantas. En concreto, la Directiva 2004/24/CE [40], que modifica la Directiva 2001/83/CE anterior, regula la comercialización de medicamentos a base de plantas; el Reglamento CE No 1333/2008 [41] armoniza el uso de aditivos alimentarios entre los que se encuentran compuestos de

origen natural y el Reglamento CE 1223/2009 [42], que es el principal marco regulador de los productos cosméticos, cubre la seguridad de los ingredientes cosméticos, incluidos aquellos provenientes de plantas, como el caso de aceites esenciales o extractos. Como resultado, existe un mercado perfectamente regularizado de diversos medicamentos, cosméticos e incluso suplementos a base de plantas comercializados.

Queda por tanto clara tanto la utilidad de las PAMs como su proyección futura; sin embargo, al margen de la potencialidad de los PAMs, nada se ha indicado aún sobre el motivo de sus propiedades terapéuticas o cosméticas. Las PAMs son plantas que contienen compuestos que poseen actividades medicinales y aromáticas, que pueden ejercer un efecto beneficioso o perjudicial sobre un organismo vivo [43]. Esto se debe a que estas plantas generan unos compuestos químicos denominados metabolitos secundarios que resultan ser compuestos estructuralmente variados con actividades biológicas diversas, es decir, compuestos bioactivos [44]. Estos compuestos tienen un inmenso potencial terapéutico convirtiéndose así en “minas de oro químicas” de nuevos productos y aplicaciones en industrias farmacéuticas, cosméticas y de perfumería [45].

No existe una única forma para clasificar los metabolitos secundarios de las PAMs, ya que pueden seguirse distintos criterios en función de su estructura química (según las unidades que conforman los compuestos), composición, solubilidad en agua o en disolventes orgánicos y ruta biosintética.

La gran diversidad estructural, capacidad funcional o biosíntesis de estos metabolitos secundarios dificulta enormemente su clasificación. Aun así, una de las formas más consensuadas de clasificarlos es según su ruta biosintética, que establece tres grandes grupos: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados [44]. La Tabla 1 ilustra con algunos ejemplos esta clasificación, así como la estructura química básica de los compuestos pertenecientes a cada clase.

Tabla 1. Clasificación y subclasificación según ruta de biosíntesis de los metabolitos secundarios [44], su estructura básica y algunos ejemplos.

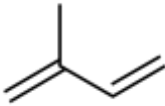
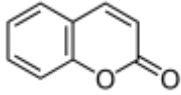
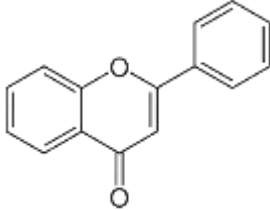
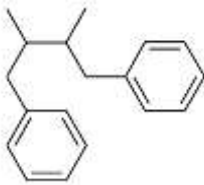
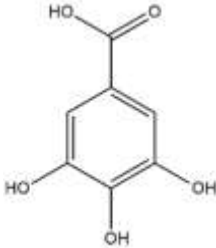
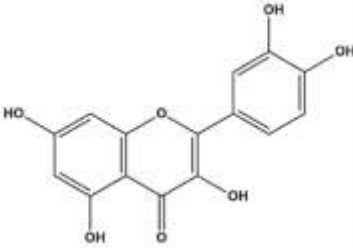
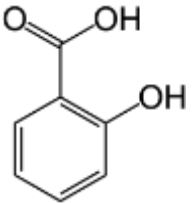
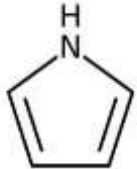
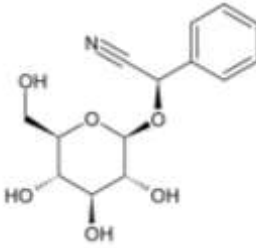
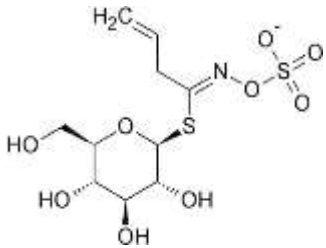
Clasificación	Subclasificación	Estructura básica	Ejemplos	
Terpenos	Hemi-, mono-, sesqui-, di-, sester-, tri- y tetraterpenos		D-limoneno, geraniol, citronelol, cineol, borneol, etc.	
Compuestos fenólicos	Cumarinas		Cumarina, rutaretin, etc.	
	Flavonoides		Quercitina, apigenina, catequin, etc.	
	Lignanós		Lariciresinol, pinoresinol, matairesinol, etc.	
	Taninos	Taninos hidrolizables		Floroglucino, procianidina B ₁ .
		Taninos condensados		

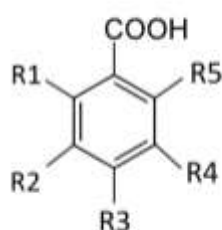
Tabla 1. Clasificación y subclasificación según ruta de biosíntesis de los metabolitos secundarios [44], su estructura básica y algunos ejemplos – Continuación.

Clasificación	Subclasificación	Estructura básica	Ejemplos
Compuestos fenólicos	Ácidos fenólicos		Ácido cafeico, ácido salicílico, ácido p-cumárico, etc.
Compuestos nitrogenados	Alcaloides		Atropina, cafeína, etc.
	Glucósidos cianogénicos		Prunasina, amigdalina, etc.
	Glucosinolatos		Sinigirina, glucorafanina, etc.

De las tres grandes familias de compuestos químico activos que componen esta clasificación, ha de destacarse el papel de los compuestos fenólicos en la bioquímica de las plantas. Estos metabolitos secundarios están relacionados con los mecanismos de defensa de las PAMs mediante procesos importantes como la coloración y esencias para la protección contra herbívoros, así como actividades antibacterianas y antifúngicas [46]. Además, diversos estudios han mostrado una fuerte correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y el potencial antioxidante de plantas, frutas y vegetales [47–49], lo que les confiere parte de sus propiedades farmacológicas: reducción del proceso de envejecimiento, disminución del riesgo de inflamación y estrés oxidativo, etc. [50,51]. Estos compuestos fenólicos pueden dividirse principalmente en dos grupos: polifenoles (cumarinas, flavonoides, lignanos, antocianinas y taninos) y ácidos fenólicos [52].

El grupo de los ácidos fenólicos o ácidos fenolcarboxílicos comprenden aquellos compuestos con un anillo fenólico unido a un ácido carboxílico orgánico, pudiéndose subclasificarse como ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos [53]. En la Figura 2 se pueden observar las estructuras de las dos subclases mencionadas, así como ácidos fenólicos que pertenecen a cada una de ellas. El principal desempeño de estos compuestos está relacionado con funciones importantes en las plantas tales como alelopatía, actividad enzimática, absorción de nutrientes, fotosíntesis o síntesis de proteínas y componentes estructurales [44]. Estos metabolitos tienen un tremendo valor terapéutico ya que actúan como agentes antidiabéticos (desempeñan un papel clave en la reducción de los niveles de lípidos y del colesterol en sangre), antimicrobianos, antioxidantes, antialérgicos, anticancerígenos, antiinflamatorios y antivirales, entre otras [53–55]. Se entiende, por tanto, que durante los últimos años haya habido un auge de estudios centrados en la obtención de este tipo de compuestos.

Ácidos hidroxibenzoicos



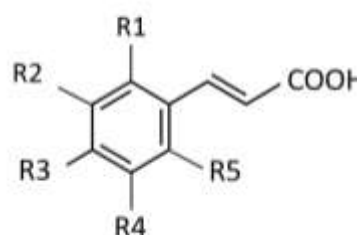
Ácido salicílico

R1 = OH; R2 = R3 = R4 = R5 = H

Ácido vanílico

R1 = R4 = R5 = H; R2 = OCH₃; R3 = OH

Ácidos hidroxicinámicos



Ácido p-cumárico

R1 = R2 = R4 = R5 = H; R3 = OH

Ácido ferúlico

R1 = R2 = R5 = H; R3 = OH; R4 = OCH₃

Figura 2. Estructuras de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, así como ejemplos de los mismos.

Las diversas bioactividades de estos ácidos fenólicos, arriba indicadas, resultan de gran interés en industrias cosméticas y farmacéuticas, por consiguiente, los compuestos bajo estudio en esta tesis pertenecen a este grupo. En concreto, se han seleccionado el ácido clorogénico (CHA), ácido cafeico (CAF), ácido ferúlico (FA) y ácido rosmarínico (RA) ya que destacan por su elevada actividad antioxidante y sus diversas propiedades farmacológicas de alto valor terapéutico y cosmético. Además, actualmente estos

compuestos están altamente demandados por el mercado, que cuenta con una previsión de gran crecimiento en los próximos años [56–63], y resulta muy interesante concentrarlos a partir de fuentes naturales.

De las diversas especies clasificadas como PAMs, esta tesis se centra en cuatro de ellas, cuya elección viene determinada principalmente por su extendido uso cosmético y/o farmacéutico, por ser potencial fuente para la concentración de los compuestos de interés seleccionados, además de por su carácter autóctono, lo que resulta de gran interés desde un punto de vista de la Economía Circular. A continuación se describe con más detalle la importancia y usos de *Salvia officinalis*, *Calendula officinalis*, *Melissa officinalis* y *Jasonia glutinosa*.

1.2.1. *Salvia officinalis* L.

1.2.1.1. Clasificación taxonómica

En la Figura 3 se puede observar la clasificación taxonómica de la especie *Salvia officinalis* L.

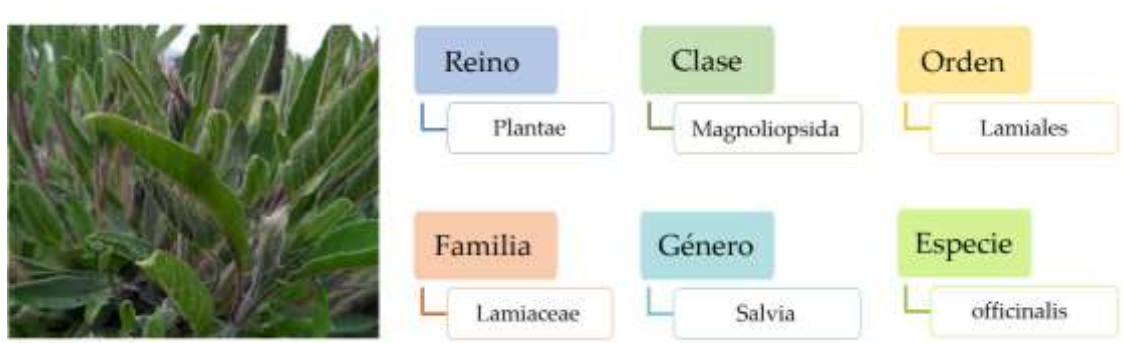


Figura 3. Imagen y clasificación taxonómica de *S. officinalis* L.

1.2.1.2. Descripción morfológica y distribución

Salvia officinalis (Linneo) fue nombrada así en 1753 por el naturalista sueco Carl Von Linné. Comúnmente conocida como salvia, salvia real o verdecillo es una especie herbácea perenne caracterizada por tener tallos tetragonos, hojas simples óvalo-lanceoladas y rugosas, cubiertas por pelos glandulares y flores blanco-violáceas (Figura 4). Tradicionalmente es una especie nativa de la región mediterránea, aunque debido a su extenso uso se ha naturalizado en diversos lugares a lo largo del mundo. Se encuentra disponible principalmente en sitios rocosos y herbazales secos, tanto en zonas

de mar como de montaña, ya que se adapta a condiciones ambientales xerófilas de clima cálido, sobre suelos arenosos y secos de origen calcáreo [64].

1.2.1.3. Usos tradicionales

Tradicionalmente, a lo largo de la historia, las partes aéreas de *S. officinalis* han sido utilizadas tanto como fines culinarios, en la preparación de muchos alimentos gracias a sus propiedades aromáticas, como medicinales. Esta planta ha sido utilizada para tratar diversas afecciones y trastornos como convulsiones, mareos, temblores, gota, reumatismo, parálisis, diarrea, faringitis, gingivitis, galactorrea e hiperglucemia [64,65]. Además, *S. officinalis* se utilizaba como medicamento tradicional para el alivio de inflamaciones leves de la piel o de la garganta.



Figura 4. Lámina de *Salvia officinalis*.
Autor: Walther Otto Müller.

También se le atribuyen propiedades carminativas, antisépticas, antihidrólicas y de mejora de la memoria [66,67]. Otro de los usos más extendidos de *S. officinalis* es como cosmético o perfume, tanto es así que sus extractos poseen número CAS (Chemical Abstracts Service), 8022-56-8/84082-79-1, y números EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances) 282-025-9/282-025-9, que recogen la información identificativa [68].

1.2.1.4. Composición química

El análisis fitoquímico de las hojas secas reporta un contenido variable en base al origen geográfico, época de cosecha y cultivo [69]. En general el aceite esencial está compuesto principalmente por los compuestos volátiles α - y β -tujonas (entre 35-50%, principalmente α -) además de contener también 1,8-cineol, borneol, alcanfor, cariofileno en altas cantidades [66]. En cuanto a otro tipo de extractos, obtenidos con distintos disolventes (etanol, metanol, etc.), son más ricos en compuestos pesados como flavonoides (quercetina, rutina, kaempferol...) o ácidos fenólicos (ácido cafeico,

clorogénico, rosmarínico, elágico...) [69–71]. En la Figura 5 se muestran las estructuras de algunos de los compuestos fenólicos que posee esta especie.

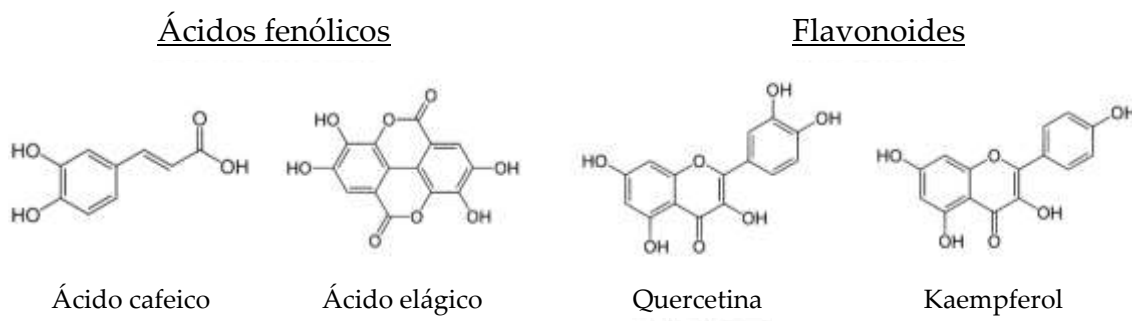


Figura 5. Compuestos fenólicos de *S. officinalis* y sus estructuras.

1.2.1.5. Actividades farmacológicas

Debido al gran interés que suscita *S. officinalis*, en los últimos años se han realizado diversas investigaciones que han revelado una amplia gama de bioactividades tales como actividad antioxidante [72,73], antimicrobiana y antiviral [66,74,75], anticancerosa [76,77], antiespasmódica [66], antiinflamatoria [78], antimutagénica [72], hipoglucemiante [66] y anticolinesterásica [66,73,79]. También se han descrito actividades de tipo cosmético recogidas por la base de datos europea de ingredientes cosméticos (CosIng) como antiseborreico, antimicrobiano, antioxidante, astringente, limpiador, desodorante, acondicionador y protector de la piel, calmante y tónico [80].

1.2.2. *Calendula officinalis* L.

1.2.2.1. Clasificación taxonómica

En la Figura 6 se puede observar la clasificación taxonómica de la especie *Calendula officinalis* L.

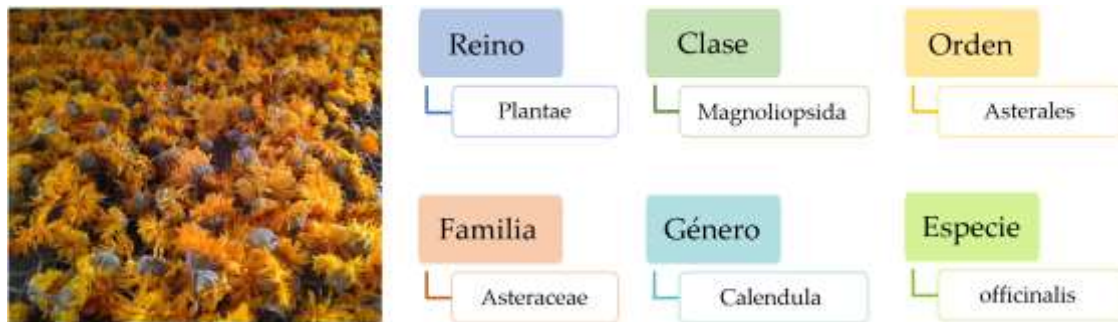


Figura 6. Imagen y clasificación taxonómica de *C. officinalis* L.

1.2.2.2. Descripción morfológica y distribución

Calendula officinalis (Linneo, 1753), también conocida como caléndula o maravilla, es una planta herbácea perenne o anual con tallos angulosos más o menos ramificados, hojas con un tono verde claro, onduladas o denticuladas, pelos glandulares que cubren tanto tallo como hojas y flores de color amarillo-anaranjado (Figura 7). Su origen concreto es desconocido pero se supone nativa de los países mediterráneos principalmente del sur de Europa, siendo cultivada también en el resto de Europa y en otras partes del mundo [81].

1.2.2.3. Usos tradicionales

Dentro de las 25 especies que componen el género *Calendula*, *C. officinalis* es la



Figura 7. Lámina de *Calendula officinalis*. Autor: Walther Otto Müller.

única que se utiliza ampliamente con fines médicos de forma mundial. El uso tradicional de sus flores es de los más conocidos y más versátiles ya que han sido empleadas como antiinflamatorio tanto de úlceras como de la mucosa oral y faríngea diaforético, analgésico, antiséptico y como tratamiento para la ictericia [82,83]. Sin embargo, el uso principal y más extendido de esta especie es como remedio cutáneo para problemas dermatológicos como piel inflamada, enrojecimiento, quemaduras menores así como para el acné o las erupciones fúngicas [66,84]. La UE

también recoge el uso cosmético de los extractos de esta planta mediante los números CAS 84776-23-8/70892-20-5 y los números EINECS 283-949-5/615-192-7 [85].

1.2.2.4. Composición química

El aceite esencial de *C. officinalis* está compuesto principalmente por mono- y sesquiterpenos tales como cariofileno, α - y β -amirinas, α -cadinol, δ -cadinene, 1,8-cineol o limoneno, entre otros [81,84]. Otros compuestos importantes presentes en esta planta responsables de su bioactividad, son los carotenoides (luteína, β -caroteno) [86], saponinas triterpénicas (calendulósidos) [81,84], flavonoides (quercetina, rutina, isoquercetina...) [87] y ácidos fenólicos (ácido ferúlico, clorogénico, cafeico, vanílico...) [81,84,88]. También están presentes en su composición esteroides, mucílago o resinas [89,90]. En la Figura 8 se pueden observar las estructuras de algunos compuestos fenólicos.

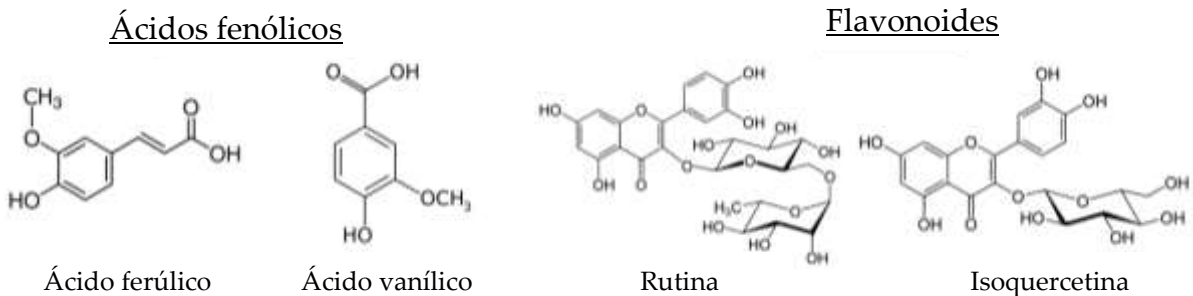


Figura 8. Compuestos fenólicos de *C. officinalis* y sus estructuras.

1.2.2.5. Actividades farmacológicas

A lo largo de los años y conforme han aparecido nuevos estudios, se han descrito distintas bioactividades para *C. officinalis*, tales como actividad antimicrobiana [66,91,92], antioxidante [92–94], neuroprotectora [95], cardiovascular [96], cicatrizante de heridas y quemaduras [97,98], fotoprotector [99], antiinflamatorio y analgésico [100,101], citotóxico e inmunológico [87,102]. Al ser una especie de uso cosmético, la base de datos europea CosIng recoge algunas funciones de esta especie en dicho sector como acondicionador y protector de la piel, emoliente, fragancia e incluso como saborizante [103–105].

1.2.3. *Melissa officinalis* L.

1.2.3.1. Clasificación taxonómica

En la Figura 9 se puede observar la clasificación taxonómica de la especie *Melissa officinalis* L.

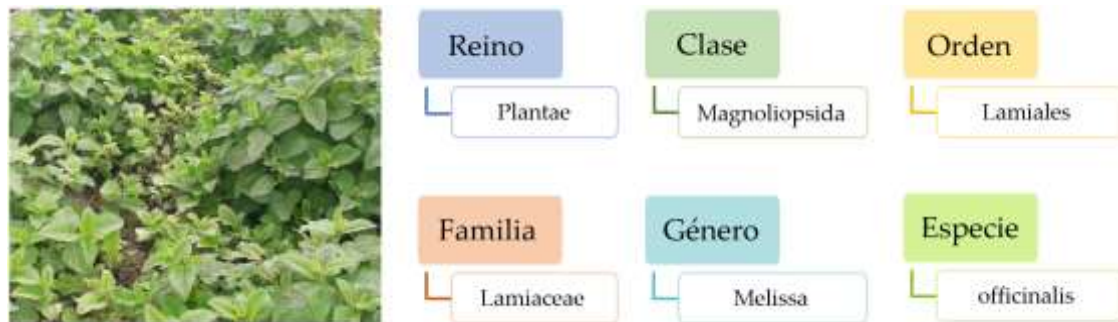


Figura 9. Imagen y clasificación taxonómica de *M. officinalis* L.

1.2.3.2. Descripción morfológica y distribución

Melissa officinalis (Linneo, 1753), también conocida como melisa, limoncillo o toronjil, es una hierba perenne caracterizada por tener tallos de sección cuadrangular con hojas opuestas pecioladas y superficie pilosa con un fuerte aroma a limón (Figura 10). Florece en verano dando lugar a flores diminutas con color blanquecino y tubulares. Si bien esta especie es nativa de la cuenca del Mediterráneo y de Asia Menor, actualmente se cultiva en todo el mundo, creciendo de forma natural en suelos arcillosos ricos en materia orgánica que retienen el agua y los nutrientes [81,82].



Figura 10. Lámina de *Melissa officinalis*. Autor: Walther Otto Müller.

1.2.3.3. Usos tradicionales

Los usos tradicionales de *M. officinalis*, registrados sobre todo en países europeos de la región mediterránea y países de Oriente Medio, son diversos y comprenden desde el uso culinario de sus hojas como potenciador y saborizante hasta el uso del bálsamo como espasmolítico y antibacteriano [66,106]. También se afirma que esta planta tiene propiedades carminativas, diaforéticas y antipiréticas y se ha utilizado para dolores de cabeza, trastornos gastrointestinales, reumatismo y nerviosismo. Su principal uso ha sido como calmante, ya que mejora la ansiedad, la depresión leve e incluso la irritabilidad [82,107]. También se ha empleado para mejorar la memoria, para mejorar los trastornos nerviosos del sueño y de forma tópica contra el herpes labial [66,107]. Los

extractos de *M. officinalis* también se han utilizado con fines cosméticos, recogidos por la UE mediante el número CAS 84082-61-1 y el número EINECS 282-007-0 [108].

1.2.3.4. Composición química

El análisis fitoquímico del aceite esencial de *M. officinalis* revela que está compuesto por monoterpenos ($\approx 40\%$) y sesquiterpenos ($\approx 35\%$), incluyendo principalmente citronelal, geraniol, nerol y linalool [66,81]. Otros compuestos mayoritarios que destacan en la composición química de las hojas de esta especie son los flavonoides (apigenina, glucósidos de luteolina, quercetina...) y especialmente ácidos fenólicos (ácido cafeico, p-cumárico, hidroxicinámico...) siendo el ácido rosmarínico el compuesto predominante de este último grupo ($\approx 4\%$), cuya estructura puede observarse en la Figura 11 [66,81,106,107].

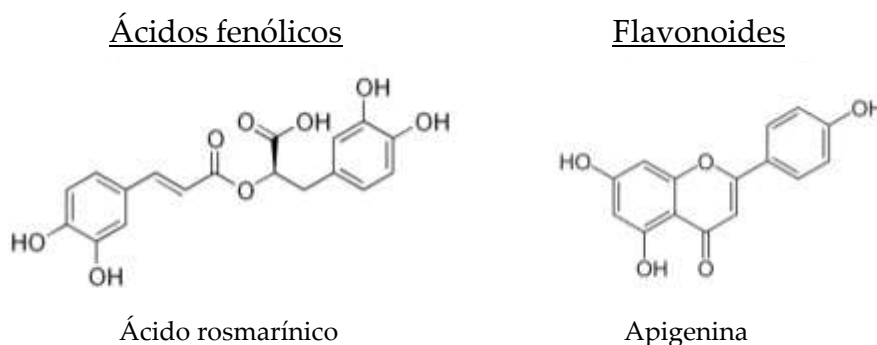


Figura 11. Compuestos fenólicos de *M. officinalis* y sus estructuras.

1.2.3.5. Actividades farmacológicas

M. officinalis ha sido ampliamente estudiada en los últimos años y son numerosos los estudios que han demostrado sus diversas bioactividades antioxidantes [109–111], neuro-protectoras [112–114], ansiolíticas y antidepresivas [115], antivirales [116], antidiabéticas [117,118], antimicrobianas [119,120], cardio-protectoras [121], antiinflamatorias [106,122], anticancerígenas [123,124] y su actividad para combatir el insomnio [125]. De hecho, estudios recientes sugieren incluso una posible actividad anti-SARS-CoV-2 [126,127]. Sus extractos también poseen actividades de interés cosmético recogidas por la base de datos CosIng tales como calmante, tónico, aromatizante, fragancia y acondicionador de la piel [128–130].

1.2.4. *Chiliadenus glutinosus* (L.) Fourr. = *Jasonia glutinosa* (L.) DC.

1.2.4.1. Clasificación taxonómica

En la Figura 12 se puede observar la clasificación taxonómica de la especie *Jasonia glutinosa* L.



Figura 12. Imagen y clasificación taxonómica de *J. glutinosa* (L.) Imagen tomada de “Menuda natura” [131].

1.2.4.2. Descripción morfológica y distribución



Figura 13. Lámina de *Jasonia glutinosa*. Autor: Roberto Roselló.

Jasonia glutinosa fue descrita como *Erigeron glutinosus* por Carl Von Linné, atribuyéndose posteriormente al género *Jasonia* por Augustin de Candolle (D.C.) en 1836 y al género *Chiliadenus* por Jules-Pierre Fourreau (Fourr.) en 1869. Si bien existe esta discrepancia en cuanto al género, ambos nombres son aceptados [132]. Esta planta perenne también es conocida como té de roca o té de Aragón y posee un tallo leñoso con hojas lanceoladas y puntiagudas, con pelos glandulares en ambas superficies y unos capítulos amarillos tubulares (Figura 13). Nativa de la

zona mediterránea occidental, se distribuye por la mitad oriental de la Península Ibérica, la zona sur de Francia y la zona norte de Marruecos e isla de Malta [133].

1.2.4.3. Usos tradicionales

Gran parte de los usos tradicionales de *J. glutinosa* hacen referencia a su nombre común “té de montaña” debido al uso habitual de esta planta como tisana por sus propiedades digestivas [134,135]. También posee otros usos culinarios ya que, dentro de la península ibérica, se considera una “delicatessen”, vendiéndose en mercados locales,

tiendas e incluso restaurantes como bebidas o helados [134]. Tradicionalmente se ha utilizado para tratar diversas afecciones del sistema digestivo tales como cólicos o indigestión ya que posee propiedades carminativas y antiespasmódicas. También se ha utilizado para mejorar la circulación y bajar la tensión arterial, para resfriados o dolores de garganta, para contusiones e inflamaciones, como antidepresivo o tranquilizante y como remedio para el dolor de cabeza. En cuanto al uso cosmético-higiénico, se ha utilizado tradicionalmente para friccionar la superficie de los dientes consiguiendo así blanquear la dentina [134,136,137].

1.2.4.4. Composición química

Los estudios sobre el análisis de la composición química de *J. glutinosa* se centran especialmente en el aceite esencial, siendo sus componentes mayoritarios el alcanfor ($\approx 30-40\%$) y el borneol ($\approx 14-20\%$) y encontrándose en menores cantidades 1,8-cineol, farnesol o nerodiol [137]. Otros compuestos presentes de forma natural en las hojas de esta planta son sesquiterpenos (lucinona, glutinona...), flavonoides (quercetina, kaempferol, isorhamnetina...) y ácidos fenólicos, especialmente ácidos cafeilquínicos como el ácido clorogénico [137–141], cuya estructura se incluye en la Figura 14.

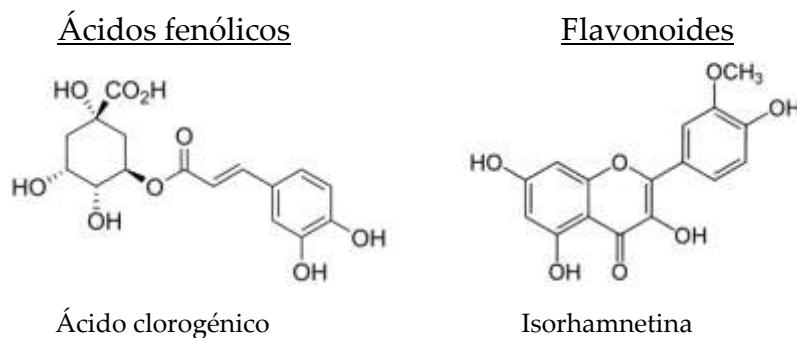


Figura 14. Compuestos fenólicos de *J. glutinosa* y sus estructuras.

1.2.4.5. Actividades farmacológicas

Si bien *J. glutinosa* ha sido menos estudiada en comparación con las especies anteriormente descritas, debido a su relativa escasez, varios estudios científicos han demostrado su actividad antioxidante [138,141,142] y antiinflamatoria [141,143] así como su eficacia contra trastornos del sistema digestivo [134,136], como neuro-protector y como potenciador de la memoria, estimulante y antidepresivo [133,140,144].

1.3. Técnicas de separación avanzada

En los últimos años existe un progresivo interés dentro de la industria química por desarrollar procesos y productos cada vez más sostenibles y seguros tanto para el ser humano como para el medioambiente. Dicho interés está impulsado por la creciente conciencia social y las cada vez mayores exigencias legales que demandan técnicas, tecnologías y procesos que cumplan con estas características. En concreto, sectores como el farmacéutico, el cosmético o el agroalimentario deben lidiar con exigencias aún mayores que el resto ya que sus productos están enfocados hacia el consumo humano, siendo por tanto los sectores más interesados en emplear técnicas que cumplan con las características ya mencionadas.

Dentro de estas técnicas destacan aquellas que utilizan fluidos supercríticos al ser considerados como “disolventes sostenibles o alternativos” y estar enmarcados dentro de lo que se conoce como “Química Sostenible” [145,146]. Los principios por los que se rige este movimiento, nacido a finales de la década de los 90, fueron detallados por P. Anastas J. y Warner y se basan en el diseño de nuevos procesos energéticamente eficientes que minimicen la producción de residuos y el uso de disolventes u otras sustancias con impacto tanto en la salud humana como en el medioambiente [147].

Por definición, un fluido supercrítico (FSC) es aquel que se encuentra por encima de su temperatura y presión críticas (T_c , P_c) tal y como se puede observar en el diagrama de fases representado en la Figura 15. Esto hace que el fluido cuente con propiedades intermedias entre las de un gas y un líquido, presentando la difusividad, viscosidad y tensión superficial del primero y la capacidad de solvatación del segundo. Además, la densidad de estos FSC depende fuertemente de la presión y la temperatura, de tal forma que pequeñas variaciones en estos parámetros pueden suponer cambios drásticos en la densidad, pudiéndose modificar su capacidad de solvatación.

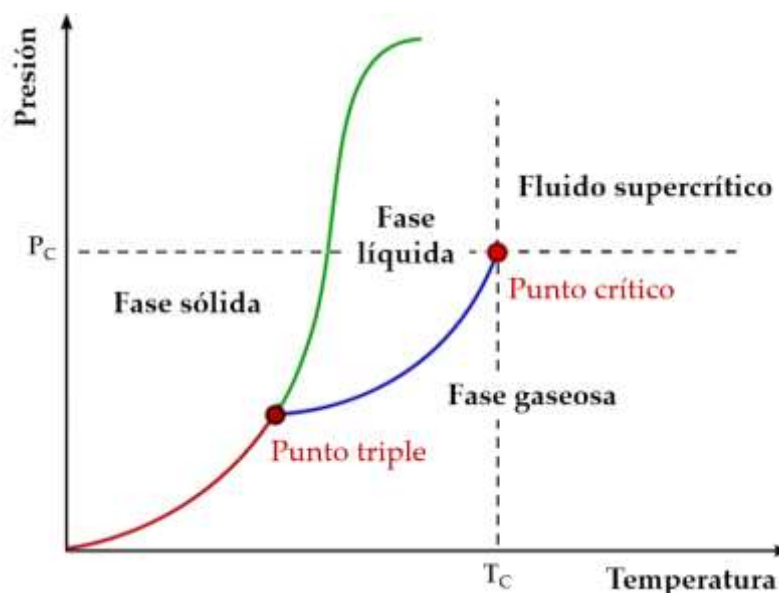


Figura 15. Diagrama de fases PT para un compuesto puro.

Esta combinación de propiedades: baja viscosidad, muy baja tensión superficial, elevada difusividad y alta capacidad de solvatación, hace que los FSC presenten una alta penetrabilidad en matrices porosas y una mayor capacidad de transporte que los disolventes líquidos convencionales [148]. Esto ha permitido desarrollar procesos alternativos a aquellos que utilizan disolventes orgánicos, reduciendo el consumo energético y la generación de residuos tóxicos, lo que supone un menor impacto ambiental, y un aumento en la calidad y seguridad de los productos finales [149]. Algunas de las sustancias más utilizadas como FSC aparecen observadas en la Tabla 2 junto con sus parámetros críticos.

Tabla 2. Parámetros críticos de algunos FSC. Datos obtenidos a partir del trabajo de G. Gil Chavez et al. [150].

Sustancia	T _c (°C)	P _c (bar)	ρ (kg/m ³)
Acetona	235	47	278
Agua	374	220.90	322.60
Dióxido de carbono	31	73.86	467.6
Etano	32	48.71	135.75
Etanol	240.4	61.40	276.00
Metano	-83	45.95	161.43
Metanol	239.4	80.90	272.00

Entre los compuestos químicos arriba consignados, el CO₂ es sin duda alguna el fluido más habitualmente empleado como supercrítico (sc-CO₂) debido a que destaca

entre el resto por sus numerosas ventajas que hacen que su implementación en la industria sea posible de forma más sencilla. De hecho, fue de los primeros FSC en ser empleados para trabajar a escala industrial como sustituto de disolventes orgánicos más tóxicos en la industria alimentaria. Existe también un auge a nivel de investigación del sc-CO₂ como alternativa sostenible para procesos de extracción o separación a partir de fuentes naturales además de para otros procesos debido a sus características [151].

El CO₂ es inocuo, inerte, no inflamable, muy abundante, accesible y económico y de fácil adquisición. Al ser un subproducto asociado al efecto invernadero su utilización junto con el resto de propiedades lo convierten en un disolvente sostenible. Como se ha indicado, el sc-CO₂ posee baja viscosidad, una tensión superficial nula y su difusividad es dos o tres veces mayor que la de otros fluidos, lo que facilita el contacto entre fases y aumenta por tanto la transferencia de masa. Tal y como se observa en la Tabla 2, su temperatura y presión críticas ($T_c = 31\text{ °C}$, $P_c = 73.86\text{ bar}$) son moderadas y sencillas de alcanzar, lo que supone un ahorro energético y permite trabajar con temperaturas bajas o moderadas [152]. El empleo de temperaturas moderadas supone una ventaja de gran importancia en industrias como la farmacéutica o la alimentaria, ya que previene la degradación de compuestos termolábiles. Al ser gas en condiciones ambientales el sc-CO₂ puede separarse fácilmente de las sustancias extraídas sin dejar trazas disminuyendo la presión, siendo innecesarios pasos de purificación posteriores. Si bien el CO₂ carece de la polaridad necesaria para extraer sustancias polares, este inconveniente suele soslayarse utilizando como cosolvente un alcohol de cadena corta [151].

1.3.1. Extracción supercrítica

Existen diversas técnicas que utilizan el sc-CO₂, pero sin duda alguna la más utilizada y estudiada con diferencia es la extracción con CO₂ supercrítico (SCE). Actualmente existen varios procesos industriales que utilizan SCE para la obtención de productos de alto valor añadido como es la muy conocida extracción de cafeína o teína, el refinado de ácidos grasos o las extracciones de nicotina, aceites esenciales, especias o aromas [153,154].

A escala de laboratorio o de planta piloto también existen numerosas investigaciones sobre la extracción supercrítica de activos naturales. La extracción de compuestos bioactivos a partir de matrices naturales se realiza mediante distintas técnicas, como las que están recogidas en la Tabla 3.

Tabla 3. Técnicas de extracción tradicionales y no convencionales de matrices naturales. (Adaptada de J. Azmir et al. [155]).

Técnicas tradicionales	Extracción mecánica	Por Expresión
		Por Incisiones
	Destilación	Hidrodestilación
		Por arrastre de vapor
	Extracción con disolventes	Maceración
		Infusión
		Decocción
Percolación		
Técnicas no convencionales	Otros métodos de extracción	Extracción continua con el Soxhlet
		Extracción asistida por ultrasonidos
		Extracción asistida por microondas
		Extracción con fluidos supercríticos

Las técnicas convencionales más utilizadas son la hidrodestilación (que puede generar hidrólisis o de alteración de compuestos termolábiles) o extracciones que implican la utilización de disolventes orgánicos potencialmente perjudiciales. La SCE es una técnica no convencional que, debido a las ventajas del sc-CO₂, resulta de gran interés como alternativa a las técnicas tradicionales, pudiéndose obtener extractos naturales libres de disolventes con interés en industrias farmacéutica, cosmética o agroalimentaria. Esta técnica ha sido aplicada a diversas plantas que son fuente de un gran número de sustancias bioactivas [156]. Así, mediante SCE, en nuestros laboratorios se han obtenido extractos ricos en compuestos bioactivos a partir de *Hyssopus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Persea indica* o *Lippa alba* entre otras [157–160].

En esta técnica, el sc-CO_2 actúa solo o acompañado de un cosolvente para la extracción de compuestos apolares o ligeramente polares. El proceso de extracción usualmente se realiza en semicontinuo. El material a extraer se carga en un recipiente comúnmente llamado extractor, al que posteriormente se bombea CO_2 en unas condiciones de trabajo por encima de su temperatura y presión críticas. En la Figura 16 se puede observar un esquema simplificado de un equipo de extracción con CO_2 supercrítico. Los compuestos solubles se incorporan a la masa de sc-CO_2 que, a continuación, es bombeada hacia unos recipientes denominados separadores o colectores, donde por, reducción de presión y temperatura, se produce una precipitación fraccionada de los compuestos disueltos. La despresurización en los colectores supone una disminución la densidad del CO_2 y por tanto de su poder de solvatación, lo que provoca la precipitación de solutos. Este tipo de tecnología puede incluir uno o más colectores en los que se opera a distintas condiciones de trabajo para provocar una precipitación fraccionada. La implementación de estos procesos a distintas escalas suele incluir también un tanque reservorio de CO_2 al final del sistema con las correspondientes unidades de filtrado y condensación del fluido.

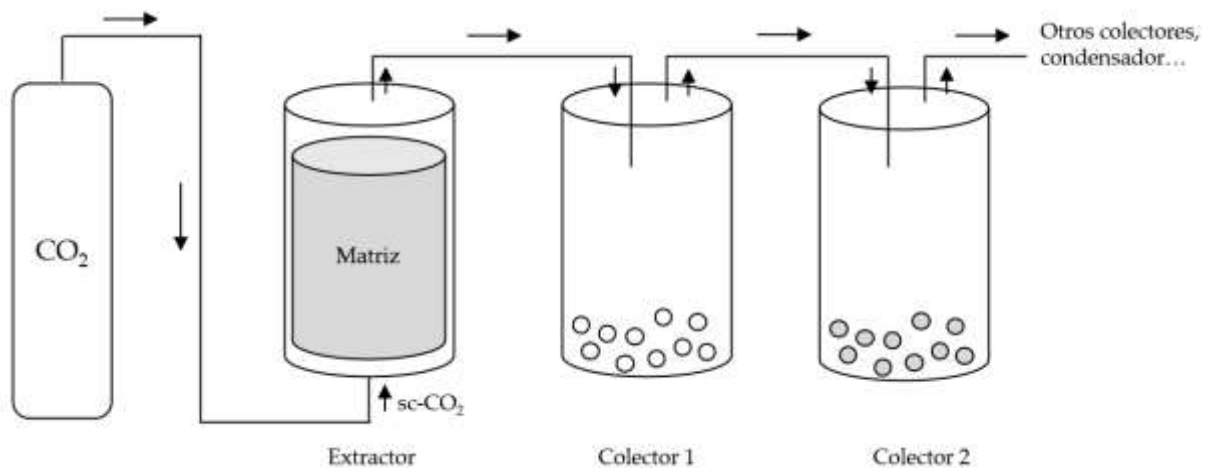


Figura 16. Esquema simplificado de un equipo de extracción con sc-CO_2 .

1.3.2. Fraccionamiento supercrítico antidisolvente

Otra técnica interesante y de uso menos extendido que la anterior es el fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF) en la que el sc-CO_2 se utiliza como antidisolvente en vez de como agente extractante. Esta técnica aprovecha el carácter

apolar del CO_2 para precipitar algunos compuestos de una disolución multicomponente, normalmente orgánica, mientras que el resto permanecen disueltos, obteniéndose así dos fracciones enriquecidas en diferentes componentes. La separación se lleva a cabo en el recipiente principal, denominado precipitador (Figura 17), el cual se presuriza inicialmente con sc-CO_2 . A continuación se pulveriza la disolución orgánica multicomponente a través de un inyector. Este proceso genera unas pequeñas gotículas que favorecen la disolución del disolvente orgánico en el sc-CO_2 , lo que provoca un cambio en la solubilidad de los compuestos al modificarse el medio. Los compuestos insolubles en la mezcla supercrítica CO_2 + disolvente orgánico que se forma precipitarán en partículas sólidas cuya forma y diámetro pueden controlarse según las condiciones operativas [151,161] mientras que el resto de compuestos que continúen siendo solubles serán arrastrados a través de un filtro situado en el fondo del precipitador hasta un segundo recipiente llamado colector. En dicho recipiente el CO_2 se libera por despresurización obteniéndose una segunda fracción (líquida) con los compuestos más solubles contenidos en la disolución orgánica de partida.

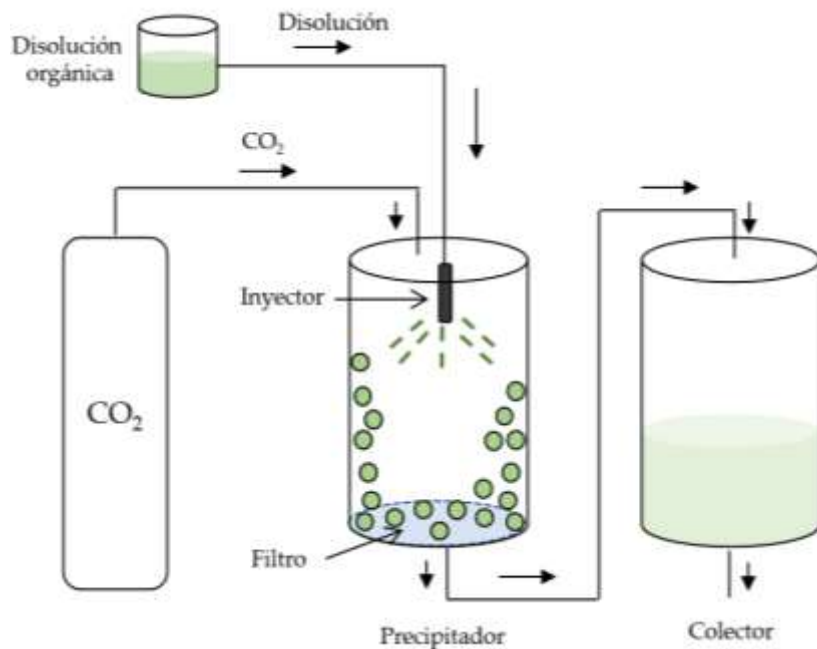


Figura 17. Esquema simplificado de un equipo SAF.

Debido al interés de esta técnica, se han realizado desarrollos para su aplicación industrial. Uno de ellos es el fraccionamiento de propóleo para obtener un producto enriquecido en compuestos fenólicos, flavonoides y artepillín C con alta actividad

antioxidante [162]. Otras son la obtención de “carajurin”, un pigmento de *Arrabidaea chica* [163], el fraccionamiento selectivo de antioxidantes o compuestos anticancerígenos a partir de mango [164,165] o la obtención de una fracción con propiedades farmacológicas a partir de extractos de *Rosmarinus officinalis* [166].

1.3.3. Otras técnicas relacionadas

Como ya se ha indicado, las propiedades del CO₂ hacen que destaque y sea considerado como fluido supercrítico para el desarrollo de otras técnicas además de las ya descritas. Debido a su capacidad como agente de extractante el sc-CO₂, ha permitido implementar técnicas analíticas como la Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC) que permiten no solo analizar extractos complejos sino también separar y purificar productos naturales líquidos. Algunas aplicaciones de esta técnica son la separación de compuestos quirales, de gran interés para la industria farmacéutica [167] o el análisis de vitamina, lípidos e incluso hormonas en muestras bioquímicas [168,169].

El secado, la limpieza, esterilización y la impregnación de materiales porosos son otros campos de aplicación del sc-CO₂, en concreto para el secado de aerogeles, limpieza de semiconductores o eliminación de disolventes residuales en productos farmacéuticos, deposición de colorantes en poliéster o la deposición de fungicidas en la madera [154,170].

Existen otras técnicas que emplean sc-CO₂ para la formación de partículas de tamaño controlado y encapsulado de principios activos en polímeros como lo son la Atomización Supercrítica Asistida (SAA) o la Despresurización de un Líquido Orgánico Expandido en una disolución acuosa (DELOS), que puede ser de gran interés en la industria farmacéutica [154,171,172].

1.4. Evaluación computacional

Junto a las técnicas experimentales, el desarrollo de modelos teóricos es de vital importancia para la comprensión del comportamiento de los sistemas bajo estudio. En las últimas décadas, el interés por la investigación computacional, también llamada investigación *in silico*, ha aumentado de forma exponencial, ya que facilita el estudio

simulado de diversos fenómenos más o menos complejos. Sin duda, nos encontramos en la era de la bio- y la quimioinformática como estrategias de predicción y análisis de diversos datos en los campos de medicina, medioambiente e ingeniería. Estos métodos permiten obtener, de una forma racional, datos sin necesidad de una experimentación en laboratorio larga y costosa, o incluso generar resultados que de otra forma no serían alcanzables. Estas características suponen una ventaja frente al uso de modelos *in vivo* o *in vitro*.

Estas herramientas han jugado un papel muy destacado en estos recientes periodos de confinamiento derivados de la pandemia por COVID-19, ya que han facilitado poder continuar con la labor investigadora que no podía realizarse de forma presencial en los laboratorios, permitiendo contribuir específicamente a los esfuerzos de investigación del presente trabajo. En las siguientes secciones se va a hablar con más detalle de alguna de estas herramientas *in silico* que han sido utilizadas para la realización de esta tesis.

La experimentación *in silico* se basa en el uso de técnicas computacionales que permiten acercarse a la realidad mediante la simulación de sistemas químicos más o menos complejos mediante aproximaciones con modelos multiescala [173]. El inicio de estos modelos comenzó por el estudio de los sistemas más sencillos, moléculas simples como son los gases, en los que las aproximaciones se realizaban con ecuaciones de estado basadas en la ecuación de Van der Waals [174]. Estos modelos evolucionaron hacia el estudio de sistemas más complejos mediante ecuaciones de estado basadas en modelos moleculares de tipo empírico, pero que resultaban todavía muy sencillos al no tener en cuenta los electrones de las moléculas.

A medida que los estudios en computación avanzaban, se diseñaron nuevos modelos moleculares basados en la química cuántica, concretamente en la ecuación de ondas de Schrödinger. Algunos de estos modelos, como los semi-empíricos, resultan aún sencillos ya que en sus cálculos desprecian parte de los electrones de las moléculas [175]. Por el contrario, tanto los modelos *ab initio* como los de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) tienen en cuenta todos los electrones de las moléculas [175]. La diferencia entre estos dos tipos de modelos, es que mientras en los primeros se realiza

un tratamiento riguroso y sistemático de los efectos de la correlación de electrones, en los DFT se utiliza un atajo a través de la densidad electrónica para llegar a obtener las propiedades químicas del sistema [176].

En la química computacional existe una gran variedad de modelos, cuya aplicación viene determinada por el nivel de aproximación deseada, así como del tipo de tamaño y del sistema. El tiempo de simulación necesario viene determinado por estas características, tal como se esboza en la Figura 18. En este trabajo nos vamos a centrar en unos modelos de aplicación relativamente sencilla que permiten unos cálculos bastante rápidos, como son los modelos QSAR, los modelos de permeabilidad en piel y los modelos de predicción de dianas.

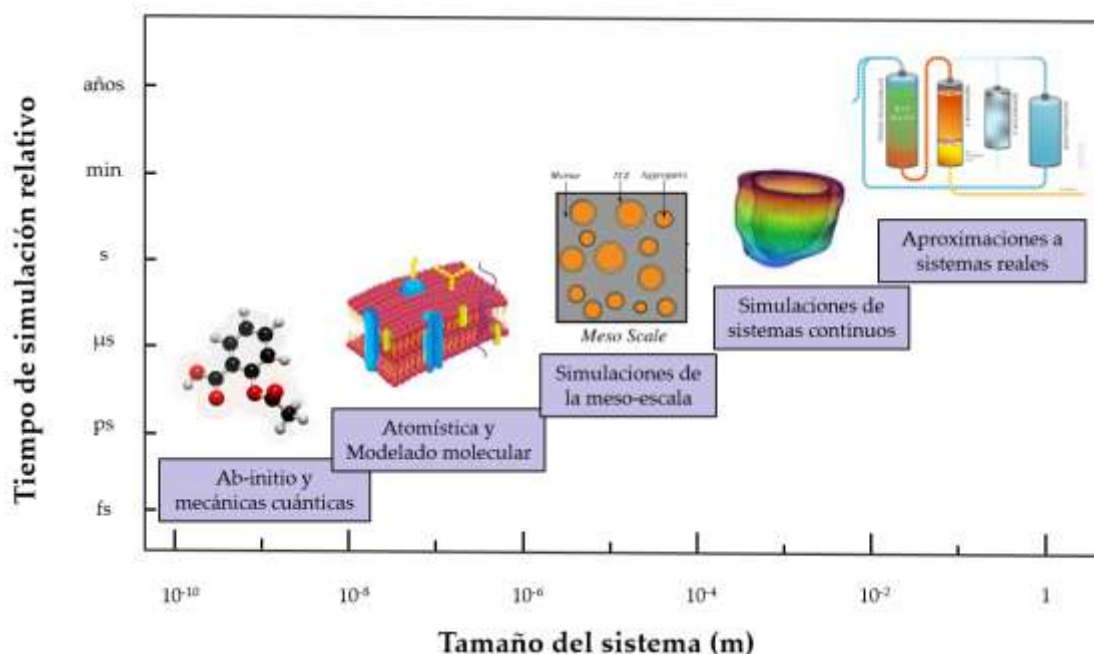


Figura 18. Modelos computacionales según escalas de tamaño del sistema simulado y tiempo de simulación para el sistema más sencillo considerado. (Adaptada de G. Saurav et al. [177]).

1.4.1. Modelos QSAR

Dentro de las diversas herramientas *in silico* existen unos modelos de regresión que pueden utilizarse para predecir de forma cualitativa o cuantitativa propiedades fisicoquímicas, biológicas y ambientales partiendo del conocimiento de estructuras químicas. Estos modelos, llamados modelos (Q)SAR ((Quantitative) Structure-Activity Relationships) o (Q)SPR ((Quantitative) Structure-Property Relationships) relacionan las

actividades bioquímicas con los llamados “descriptores moleculares” de una estructura química, basándose en el principio de que variaciones en dichas estructuras causan diferentes actividades biológicas [178]. Tales descriptores contienen una información fundamental de las sustancias químicas que controlan la respuesta estudiada, es decir, la actividad biológica, ya que el comportamiento de cualquier sustancia química puede explicarse por sus propiedades fisicoquímicas que representan la naturaleza molecular intrínseca. Los descriptores por tanto son estas propiedades fisicoquímicas obtenidas de forma teórica o experimental que describen numéricamente a cada una de las moléculas, pudiendo ser simples, como el peso molecular, o más complejos, como la distribución de carga eléctrica [179].

De forma general, los modelos QSAR pueden agruparse en cuatro grupos:

- **QSAR basado en fragmentos (contribución de grupos).** Este tipo de modelos se basan en fragmentos o grupos de una molécula a los que se le asigna un determinado valor [180].
- **3D-QSAR.** Se establece una correlación entre las actividades biológicas de una serie de compuestos con su estructura tridimensional [181].
- **QSAR basado en descriptores químicos.** Se utilizan como descriptores diversas propiedades (electrónicas, geométricas, estéricas...) calculadas para una molécula [182].
- **Modelos combinados** [183].

Para construir un modelo QSAR primero es necesario seleccionar un número de moléculas con valores conocidos de la actividad biológica bajo estudio y posteriormente calcular los descriptores de dichas moléculas. Dado que se desarrolla una relación matemática entre los descriptores y la actividad biológica, estos estudios permiten predecir el comportamiento de nuevas sustancias químicas o incluso de moléculas hipotéticas. Consecuentemente, la técnica QSAR puede representarse matemáticamente de forma general mediante la Ecuación 1:

$$\text{Actividad biológica} = f(\text{Descriptores}) \quad (1)$$

El desarrollo de esta ecuación matemática puede realizarse mediante modelos lineales o modelos no lineales. La regresión lineal múltiple (MLR) y los mínimos cuadrados parciales (PLS) son las técnicas más representativas de los modelos lineales, mientras que la red neuronal artificial (ANN) o la máquina de vectores de apoyo (SVM) son los enfoques más comunes de los modelos no lineales [179].

Finalmente es necesario aplicar herramientas de validación al modelo QSAR desarrollado para comprobar su capacidad de predicción. La validación suele ser de dos tipos [179]:

- **Validación interna.** Se realiza a partir de las moléculas utilizadas en el desarrollo del modelo e implica la predicción de la actividad de dichas moléculas. Esto permite juzgar la calidad y la bondad de ajuste del modelo, pero no permite evaluar si el modelo es válido frente a un nuevo conjunto de datos.
- **Validación externa.** Divide el conjunto inicial de datos disponibles en dos conjuntos, llamados conjunto de entrenamiento y conjunto de prueba. Se desarrolla el modelo QSAR con el conjunto de entrenamiento y a continuación se valida el modelo con el conjunto de prueba que ha quedado fuera del desarrollo de dicho modelo. Esta validación externa asegura la predictibilidad y aplicabilidad del modelo QSAR desarrollado para la predicción de moléculas no probadas.

1.4.2. Modelos de permeabilidad en piel

Un aspecto importante a contemplar en relación con la actividad biológica de los compuestos considerados en esta tesis es la de su interacción con membranas biológicas. La experimentación *in silico* hace posible el estudio de toxicidad de compuestos mediante varios modelos predictivos de su bioactividad usando para ello modelos QSPR (Quantitative Structure-Permeability Relationship), similares a los modelos QSAR descritos anteriormente, simulación de dinámica molecular (MD), o modelos derivados de principios como el de balance de masas junto con suposiciones adicionales como las leyes de difusión de Fick [184].

Dentro del estudio de interacción de compuestos con biomembranas destaca el estudio de los mecanismos moleculares relacionados con la permeación cutánea, ya que es una herramienta que permite identificar ingredientes inadecuados que pueden ser peligrosos en una formulación cosmética [185,186]. Uno de los modelos más innovadores es el propuesto por Schwöbel et al. [187] que se basa en el uso del modelo COSMO-RS (Conductor-like Screening for Real Solvents). Dicho modelo, propuesto por primera vez por Klamt [188] y posteriormente refinado en un trabajo en 2018 [189], es un modelo de solvatación continua que combina la teoría químico-cuántica y la termodinámica estadística.

El modelo COSMO-RS permite calcular diversas propiedades termodinámicas, generando una distribución tridimensional de densidades de carga de polarización superficial, σ , a partir de estructuras 3D optimizadas de las moléculas [188,189]. Estas densidades de carga, σ , permiten calcular el potencial químico para cada segmento superficial de polaridad en un disolvente concreto, denominado potencial- σ , utilizando para ello un modelo termodinámico estadístico de las interacciones moleculares superficiales por pares. A partir de la suma de estos segmentos, junto con una corrección mediante un término combinatorio, se puede calcular el potencial químico de un compuesto en un disolvente o en una mezcla [188], lo que puede aplicarse, por ejemplo, para calcular el coeficiente de reparto, K , de un soluto entre dos fases líquidas [190].

Existen diversas extensiones del modelo COSMO-RS que, en conjunto, permiten realizar cálculos de permeabilidad en sistemas complejos como la piel. COSMOperm es una de estas extensiones que aplica todos los cálculos del modelo COSMO-RS a sistemas no homogéneos como las biomembranas. El método COSMOmic, incluido dentro de COSMOperm, permite simular las membranas que conforman la piel mediante un cálculo de los coeficientes de reparto de las membranas y micelas y de los potenciales químicos y las energías libres de los compuestos de un sistema estratificado, permitiendo así obtener su distribución dentro de la membrana [191–195]. La distribución de los diferentes compuestos que componen una biomembrana puede obtenerse mediante otra extensión del modelo COSMO-RS llamada COSMOplex. Esta extensión genera capas líquidas diferenciadas de composición variable como representación de una biomembrana a partir de la información sobre su estructura [196]. Con ello se genera un

modelo computacional de piel con el que COSMOperm trabaja para calcular la resistencia de las membranas, la permeabilidad de los compuestos individuales, así como su posición de los activos en ellas y la vía de permeación [187].

1.4.3. Modelos de predicción de dianas

Otra de las herramientas computacionales que permite valorar rápidamente las posibles bioactividades de los compuestos químicos, reduciendo la necesidad de experimentación *in vitro* e *in vivo*, facilitando el desarrollo y la formulación de nuevos fármacos [197], es la predicción *in silico* de dianas, es decir, de aquellos componentes biológicos sobre los que tienen efecto específico los compuestos bioactivos bajo estudio. Este tipo de herramienta se basa en enfoques computacionales de la interacción ligando-proteína y de las estructuras de los posibles ligandos.

Una de las técnicas más utilizadas es el cribado virtual (en inglés virtual screening), la cual permite la preselección de compuestos que pueden ser potenciales fármacos mediante la predicción de la interacción de dichos compuestos con una proteína objetivo, utilizando para ello una base de datos de compuestos. A diferencia de esta técnica, el cribado inverso (en inglés reverse screening) o “pesca computacional de dianas” permite identificar posibles dianas para una molécula específica, pudiendo predecirse la bioactividad de la molécula o incluso su mecanismo de acción [198,199]. Dentro de esta última técnica se han desarrollado diversos métodos computacionales que pueden clasificarse inicialmente en cuatro grupos: búsqueda de similitudes químicas, minería de datos/aprendizaje automático, “panel docking” y análisis de espectros de bioactividad [200,201].

Los métodos de similitud química o basados en la “estructura” son los más sencillos ya que se basan en los conocimientos actuales sobre la bioactividad de millones de moléculas y en el “principio de similitud química”, que afirma que es probable que moléculas similares tengan propiedades similares [202]. Estos métodos cuentan con la ventaja de que solo requieren el cálculo de similitud entre compuestos, resultando así los más rápidos y sencillos de realizar.

Para realizar este cálculo se necesita obtener la huella digital (fingerprint), de la molécula deseada para poder compararla con las huellas digitales de las moléculas de consulta y comprobar su similitud. Dichas huellas vienen a ser un código de la estructura de la molécula, siendo la forma más común una serie de dígitos binarios (bits) que representan la presencia o ausencia de subestructuras particulares en la molécula [199]. Una vez obtenidas las fingerprints tanto de la molécula de consulta como la molécula bajo estudio, se realiza la comparación entre ambas mediante un criterio de similitud, siendo el más típico el coeficiente de Tanimoto: cuanto más se acerque dicho coeficiente a 1, más parecidos serán los dos compuestos, mientras que cuanto más se acerque a 0 será lo contrario [203]. Una vez establecido que la molécula deseada y la molécula de consulta son similares, se puede concluir que la molécula deseada actuará como ligando para las mismas dianas que la molécula de consulta.

Capítulo 2. Objetivos

Imagen Capítulo 2: Cámara de precipitación

La presente investigación se encuentra alineada con la del Proyecto SPAGYRIA (EFA188/16/SPAGYRIA, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)), que pretende, desde una perspectiva social, sostenible y respetuosa con el medio ambiente y la salud humana, obtener concentrados naturales mediante la utilización de técnicas avanzadas de separación con fluidos supercríticos.

Así, el objetivo general de esta tesis es estudiar la viabilidad de utilizar extractos sostenibles obtenidos mediante tecnologías supercríticas a partir de plantas aromático-medicinales que, por sus propiedades, sean susceptibles de ser incorporadas en formulaciones cosméticas y que puedan resultar de interés en el sector farmacéutico. Con este objetivo se busca contribuir a una mejora de productos comerciales de corte natural y sostenible.

En concreto, se ha obtenido, concentrado y evaluado computacionalmente compuestos bioactivos de interés de cuatro especies vegetales distintas: *Salvia officinalis*, *Calendula officinalis*, *Melissa officinalis* y *Jasonia glutinosa* mediante el uso de tecnologías sostenibles basadas en la utilización de CO₂ supercrítico.

Para alcanzar este fin, se establecieron los siguientes objetivos específicos que permitieron evaluar la viabilidad de los extractos:

- De la gran variedad de plantas aromáticas-medicinales existentes se buscarán y seleccionarán aquellas que destaquen por sus propiedades y adaptación al territorio.
- Adaptación de un protocolo de trazabilidad simple en el laboratorio para garantizar el cumplimiento de los requisitos necesarios para lograr un producto final comercializable. Se propone la realización de fichas de trazabilidad para cada una de las etapas de procesado realizadas en el laboratorio así como la elaboración de fichas técnicas y de seguridad de los extractos obtenidos.
- Secuenciación de dos tecnologías sostenibles supercríticas para la extracción y concentración de compuestos bioactivos de interés a partir de las especies seleccionadas: *Salvia officinalis*, *Calendula officinalis*, *Melissa officinalis* y *Jasonia glutinosa*. Dichas tecnologías son:
 - Extracción con CO₂ supercrítico (SCE).

- Fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF).
- Evaluación estadística del proceso SAF utilizando el modelo del diseño central compuesto (CCD) basado en la metodología de superficie de respuesta (RSM) y posterior optimización de dicho proceso para cada una de las especies estudiadas.
- Caracterización analítica HPLC de los extractos SAF obtenidos de las cuatro especies seleccionadas.
- De los extractos analizados se realizará una evaluación computacional de aquellos compuestos bioactivos que resulten especialmente interesantes por sus propiedades. En concreto se aplicarán las siguientes técnicas computacionales:
 - Metodología QSAR mediante COSMO-RS
 - Estudio de permeabilidad en un modelo de piel computacional.
 - Búsqueda de posibles acciones farmacológicas mediante el estudio de dianas de interés.

Capítulo 3. Materiales y métodos



Imagen Capítulo 3: Precipitado en el filtro de la cámara

3.1. Material vegetal y trazabilidad

La selección de plantas aromático-medicinales viene determinada principalmente por tres factores de interés: su extendido uso cosmético y/o farmacéutico, la posibilidad de utilizarlas como fuentes naturales para la concentración de compuestos de interés y su carácter autóctono. En concreto se estudian las siguientes cuatro especies vegetales: *Salvia officinalis*, *Calendula officinalis*, *Melissa officinalis* y *Jasonia glutinosa*.

Los lotes para el estudio de las plantas salvia, melisa y jasonia fueron proporcionados por el proveedor navarro de productos ecológicos *Josenea Bio* mientras que el lote de caléndula utilizado fue recolectado de un cultivo ecológico en Huesca por Valentia, dentro del Proyecto SPAGYRIA ya citado.

El material vegetal recibido fue sometido, en primer lugar, a una medición del contenido de humedad, utilizando para ello un analizador automático Sartorius (modelo 40) que aparece en la Figura 19. El material original es pesado por el equipo donde es sometido a un calentamiento adecuado, determinándose la masa final y por tanto la pérdida de agua de la muestra. El proceso se repite al menos nueve veces más y se halla el valor medio y su desviación estándar. El material vegetal se considera apto para el tratamiento posterior cuando la humedad no supera por mucho el 15%.



Figura 19. Imagen del analizador automático Sartorius MA40 utilizado para la medición del contenido de humedad.

Posteriormente, el material vegetal seco fue sometido a una molienda fina utilizando para ello un molinillo eléctrico modelo BOSCH TSM6A013B y a un cribado mediante una tamizadora vibratoria (CISA modelo BA 300N) y unos tamices con un paso de luz comprendido entre 0.074 mm y 0.9 mm. En la Figura 20 se puede observar una imagen tanto de la tamizadora utilizada como de algunas de las cribas empleadas. Se ajustó el tamaño de las partículas a una distribución normal en torno a 0.5 mm aplicando la norma ASAE S319.3.



Figura 20. Imagen de la tamizadora vibratoria CISA y de las cribas utilizadas para tamizar el material vegetal molido.

Al objeto de evaluar la posibilidad de incorporar los extractos en formulaciones cosméticas, que puedan resultar de interés en el sector farmacéutico, es necesario el cumplimiento de ciertos requisitos que permitan llevar los extractos a una formulación final. El Reglamento (CE) 1223/2009 del Parlamento Europeo es encargado de regular la materia de productos cosméticos y resulta de directa aplicación en todos los países de la Unión Europea, quienes además hacen una regulación a nivel nacional. Así, en España el Real Decreto 85/2018 es el encargado de regular en lo que concierne a productos cosméticos [204].

Uno de los puntos destacados de ambas regulaciones son las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de Productos Cosméticos, las cuales proporcionan directrices para la producción, control, almacenamiento y calidad y seguridad de productos cosméticos. Existen diversas normas *auditables* internacionales que certifican el cumplimiento de dichas prácticas, como pueden ser la ISO 22716:2008 o la EFfCI GMP, y que proporcionan herramientas específicas para la gestión de calidad de productos cosméticos [205,206]. En general, una parte importante de las GMP es la documentación que permita asegurar la calidad y trazabilidad durante todo el proceso de producción.

Para poder asegurar el cumplimiento de estos requisitos de calidad en el laboratorio, en este trabajo, por una cuestión de oportunidad y de mayor exigencia, se optó por utilizar un protocolo procedente del aseguramiento de la calidad en la industria alimentaria. Silvia Rueda, consultora de I+D+i de Venttus Consultoría y especialista en la materia, nos proporcionó las guías para la adaptación a nuestro laboratorio de un protocolo de trazabilidad, basado en el Reglamento 178/2002, Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) y en la Norma ISO 22000 de Seguridad Alimentaria. Con este propósito el laboratorio se distribuyó en cinco zonas diferenciadas (recepción/almacenamiento, zona de pretratamiento, zona de maceración, zona de extracción y zona de secado), adecuadas para las distintas etapas del proceso de obtención de los activos. Para cada una de las etapas se generaron las correspondientes fichas de trazabilidad.

En la Figura 21, se muestran diagramas de flujo de las etapas cubiertas en el proceso, desde la llegada del material vegetal hasta la salida de las muestras o su almacenamiento. A modo de ejemplo, en el Anexo I, se incluye un modelo de ficha de trazabilidad correspondiente a la etapa de entrada de material.

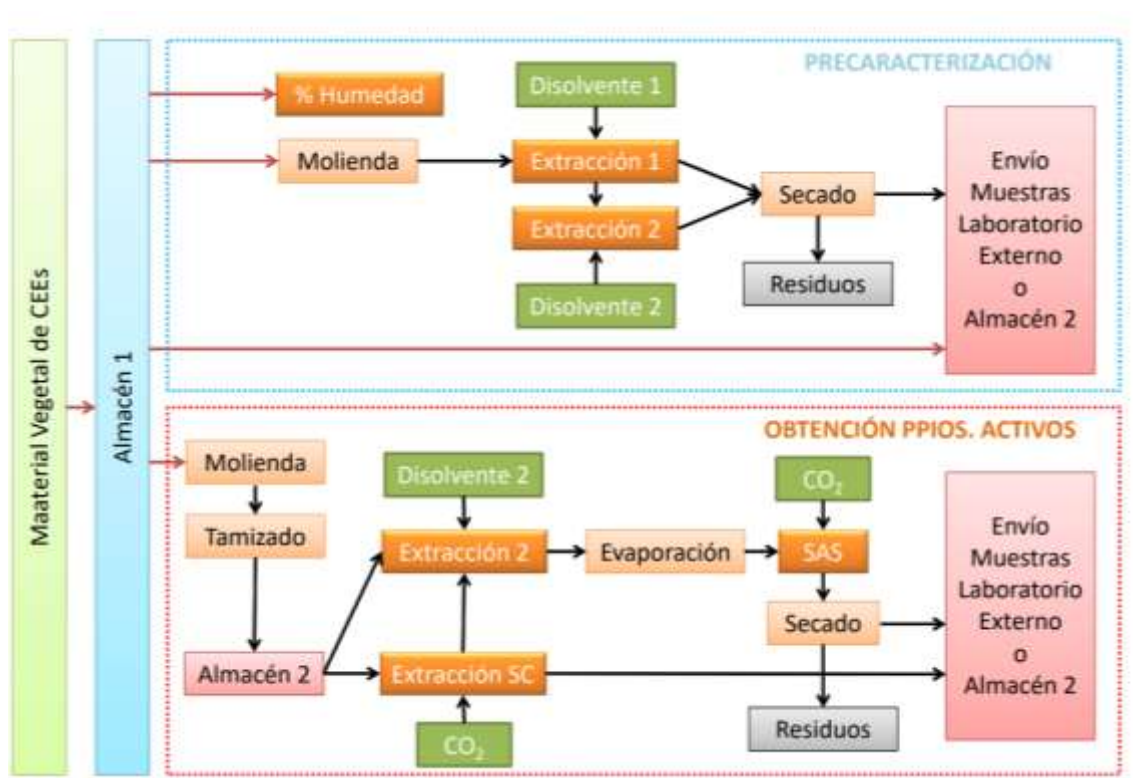


Figura 21. Imagen del diagrama de laboratorio con cada una de las etapas realizadas desde la llegada del material vegetal.

Adicionalmente, es necesario evaluar la seguridad de los extractos obtenidos destinados a una formulación final. Siguiendo la normativa del Real Decreto y las normas UNE-EN ISO 21149:2017, ISO 17516:2014 e ISO 16212:2017, se generaron las fichas técnicas y de seguridad de los extractos destinados a la formulación cosmética final, y los análisis microbiológicos de bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras y microorganismos totales aerobios mesófilos, que certifiquen tanto la estabilidad como la seguridad frente al paso del tiempo de los extractos utilizados. Para la realización de los ensayos microbiológicos se dispuso el envío de los extractos a laboratorios externos autorizados para efectuar las analíticas pertinentes. A modo de ejemplo, en el Anexo I se incluyen un modelo de ficha técnica y de seguridad.

3.2. Obtención de extractos sostenibles

3.2.1. Extracción Supercrítica con CO₂ (SCE)

Una vez realizado el pretratamiento del material vegetal, éste se somete a un proceso SCE para eliminar compuestos no polares como ceras cuticulares. En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio este procedimiento de desengrasado era realizado ocasionalmente mediante una maceración con hexano; sin embargo y bajo la premisa de obtener extractos sostenibles, en la realización de esta tesis, se implementó de forma sistemática como paso previo la extracción SCE debido a las ventajas de tipo técnico y ecológico que este proceso supone.

Esta etapa preliminar se realizó en una planta Waters de escala laboratorio (SFE-100F-2-FMC10 Systems), Figura 22, gestionada por el grupo de investigación GATHERS en el laboratorio de Química Sostenible del Instituto de Investigación I3A. Sus componentes principales son un recipiente de extracción de 1 L (E) y dos colectores de 0.5 L (C1 y C2), todos ellos provistos de camisas con resistencias eléctricas y sensores para su control térmico, la bomba de compresión (P-CO₂) y un intercambiador de calor (HE). El procedimiento de trabajo es el siguiente: el CO₂ almacenado en botellas de 50 L (reservorio R) se hace pasar por un baño de refrigeración (CB) para mantenerlo líquido e impulsarlo mediante la bomba de compresión hacia el extractor a través del intercambiador de calor que eleva la temperatura del CO₂ por encima de la temperatura crítica, T_c. Tanto la temperatura como el caudal, así como la presión en E se controlan

automáticamente. En cambio, la presión en C1 y C2 se controla mediante reguladores manuales de presión (BPR).

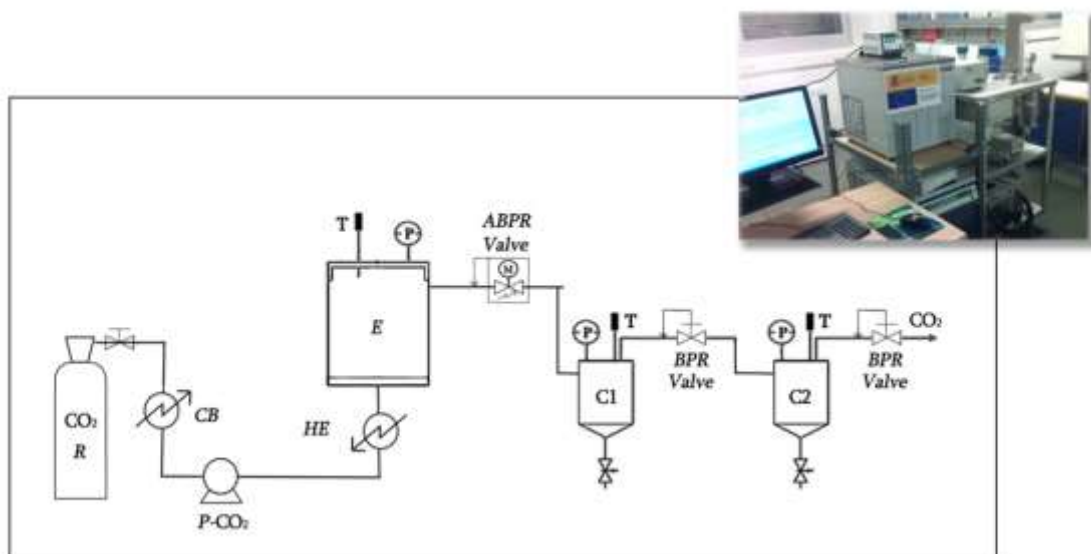


Figura 22. Esquema de la planta SCE escala laboratorio. Reservorio de CO₂ (R), baño de refrigeración (CB), bomba de CO₂ (P-CO₂), intercambiador de calor (HE), extractor (E), colector 1 y 2 (C1 y C2), regulador de presión automática (ABPR), regulador manual de presión (BPR), medidores de temperatura (T) y medidores de presión (P).

Para cada extracción se cargó el extractor con el material vegetal mezclado previamente con perlas de vidrio inerte para permitir un mejor contacto CO₂-sólido y facilitar así una mejor extracción. El proceso de extracción completo consistió en cuatro ciclos estáticos y dinámicos alternos en los que se bombea CO₂ hasta alcanzar en la vasija de extracción, E, una presión de 350 bar y una temperatura de 40 °C, en función de experiencias previas del grupo investigador. Una vez alcanzadas condiciones estacionarias, se inicia la primera fase estática, similar a una maceración, deteniéndose el flujo de CO₂ durante 30 minutos. Después de dicho tiempo, se inicia una etapa dinámica de otros 30 minutos durante la cual se bombea sc-CO₂ con un flujo de 60 g/min que arrastra el macerado del extractor, E, a los colectores C1 y C2. Las condiciones de C1 y C2 fueron 90 bar, 45 °C y 30 bar, 30 °C respectivamente. La extracción continua hasta completar tres ciclos estático-dinámicos adicionales. Finalmente, tras la completa despresurización de la máquina, se recogieron los extractos obtenidos en los colectores y el material vegetal que queda en el extractor se retira de la vasija y se almacena en un congelador hasta su posterior maceración.

El rendimiento de extracción supercrítica (Y_{SCE}) se calculó utilizando la Ecuación 2:

$$Y_{SCE}(\text{wt } \%) = \left(\frac{\text{masa (g)}_{C1} + \text{masa (g)}_{C2}}{\text{masa (g)}_{\text{material vegetal}}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

donde masa(g)_{C1} y masa(g)_{C2} son las masas en gramos del extracto depositado en los colectores C1 y C2 respectivamente, y $\text{masa(g)}_{\text{material vegetal}}$ es la masa inicial del material vegetal cargado en el extractor. Por su parte, el rendimiento para el material vegetal desengrasado o exhausto puede obtenerse por diferencia.

3.2.2. Maceración y Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente (SAF)

La extracción de los compuestos polares del material vegetal previamente desengrasado se realiza mediante una maceración en etanol. Para ello se utiliza una proporción aproximada de material vegetal (g):etanol (mL) de 1:10 durante 48 h a temperatura ambiente. A continuación el extracto se lleva a sequedad para posteriormente reconstituir la disolución etanólica (3% en peso) que se utilizará como disolución de alimentación (FS) en el proceso SAF. Antes de introducirla en el equipo, la disolución se hace pasar a través de un filtro de acetato de celulosa con un tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$, tal y como se muestra en la Figura 23.



Figura 23. Preparación de la muestra de alimentación.

El rendimiento de la maceración se calculó utilizando la Ecuación 3:

$$Y_{\text{EtOH}}(\text{wt } \%) = \left(\frac{\text{masa}_{\text{extraída}} (\text{g})}{\text{masa}_{\text{material vegetal}} (\text{g})} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

donde la $\text{masa}_{\text{extraída}}$ es la masa del extracto obtenido tras la rotavaporización y la $\text{masa}_{\text{material vegetal}}$ es la masa inicial del material sujeto a maceración.

El proceso SAF se realizó en la planta de fraccionamiento anexa a la de extracción supercrítica ya descrita, cuyo esquema se recoge en la Figura 24. Dicha planta está equipada con una cámara de precipitación (PV), que contiene un filtro y un inyector, y un colector (DV). El equipo incluye una bomba de CO₂ (P-CO₂), una bomba de líquidos (P-LIQ) y medidores de temperatura y presión (T y P). Las temperaturas y los caudales tanto del CO₂ como de la FS se controlan automáticamente, al igual que la presión en cámara (ABPR). Por el contrario, la presión en el colector se controla mediante un regulador manual (BPR).

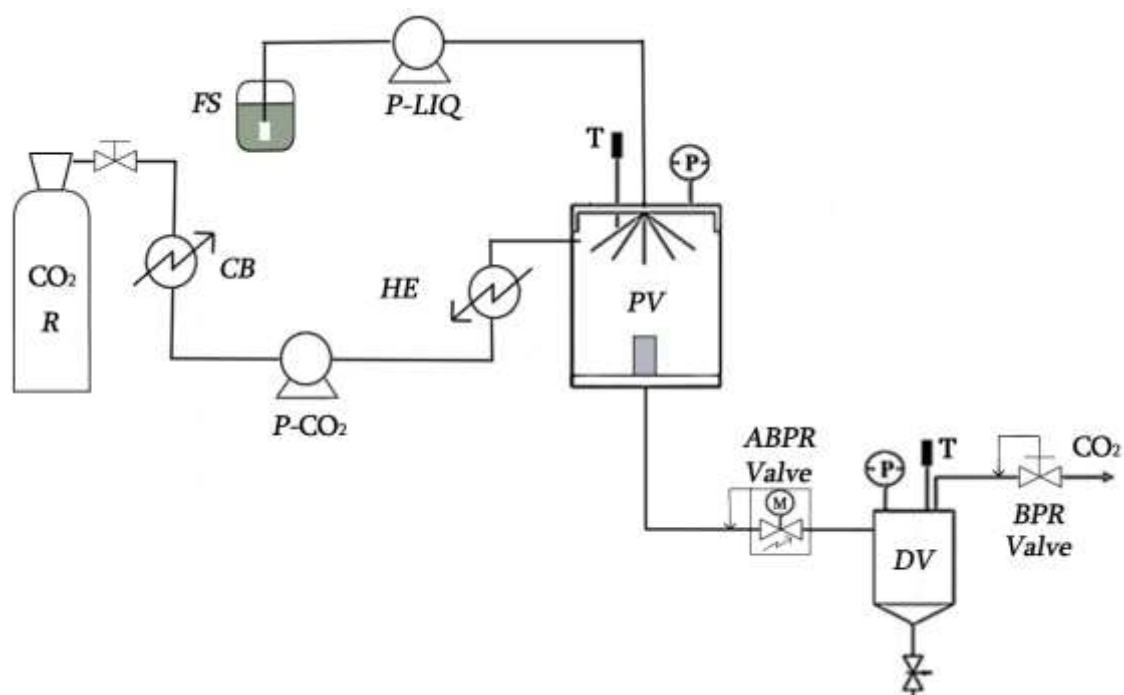


Figura 24. Esquema del equipamiento SAF. Reservorio de disolución de alimentación (FS), bomba de líquidos (P-LIQ), reservorio de CO₂ (R), baño de refrigeración (CB), bomba de CO₂ (P-CO₂), intercambiador de calor (HE), cámara de precipitación (PV), colector (DV), regulador de presión automática (ABPR), regulador manual de presión (BPR), medidores de temperatura (T) y medidores de presión (P).

El procedimiento SAF se inicia con el bombeo de CO₂ supercrítico a través de la planta. Una vez las condiciones seleccionadas de presión, temperatura y caudal en la cámara de precipitación, PV, y el colector, DV, se estabilizan, se hace pasar la disolución de alimentación, FS, hacia la cámara de precipitación a través de un inyector, con un diámetro boquilla de 100 μm . Esto hace que la disolución de alimentación sea pulverizada en gotas de pequeño tamaño que se disuelven rápidamente en el sc-CO₂, dando lugar así a la mezcla supercrítica (CO₂ + etanol). Los compuestos insolubles en

esta mezcla precipitan en la cámara mientras que los compuestos que permanecen solubles pasan a través del filtro colocado en el interior de la misma hacia el colector, donde se recogen. Concluido el paso de la disolución se procede al arrastre completo de la disolución de alimentación haciendo pasar 30 mL de etanol, tras los cuales se procede al secado durante 30 min del precipitado en la cámara con una corriente de CO₂.

Para calcular el rendimiento de la masa obtenida tanto en la cámara de precipitación, Y_{PV} , como en el colector, Y_{DV} , se utilizó la Ecuación 4:

$$Y_i(\text{wt } \%) = \left(\frac{\text{masa de la fracción recogida}_i}{\text{masa del extracto en FS}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

donde i hace referencia a la fracción cuya masa de que se trate en cada caso. El rendimiento total del proceso, Y_{SAF} , se calculó utilizando la Ecuación 5:

$$Y_{SAF}(\text{wt } \%) = Y_{PV}(\text{wt } \%) + Y_{DV}(\text{wt } \%) \quad (5)$$

3.2.3. Análisis HPLC de las fracciones



Figura 25. Equipo HPLC-PDA empleado.

Se efectuó la identificación, cuantificación y seguimiento de los compuestos de interés (ácido clorogénico, CHA, ácido cafeico, CAF, ácido ferúlico, FA, y ácido rosmarínico, RA) tanto de la alimentación como de las dos fracciones recogidas en el proceso SAF, para los 13 experimentos realizados, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El equipo empleado fue un HPLC Waters® Alliance 2695,

Figura 25, equipado con una columna de fase reversa C18 CORTECS® C18 2.7 μm (4.6 × 150 mm) y una precolumna CORTECS® Pre-column VanGuard C18 2.7 μm (2.1 × 5 mm). Como detector se utilizó un detector de matriz de fotodiodos (PDA) Waters® 2998.

Se prepararon disoluciones con una concentración de 100 ppm que posteriormente fueron filtradas (filtro de jeringa ACRODISC Ø 13 mm con tamaño de poro de 0.2 μm).

Para realizar el seguimiento analítico de los compuestos bajo estudio se trabajó en todos los casos en un método en gradiente. Para realizarlo se utiliza, de forma general los siguientes disolventes: (A) 0.1% ácido fórmico en agua Mili-Q, (B) agua Mili-Q y (C) acetonitrilo, siendo distintas las proporciones para cada uno de los extractos de las especies analizadas y que se especifican en las secciones § 4.1.1.2, 4.1.2.2, 4.1.3.2 y 4.1.4.2. del capítulo 4. El caudal de bombeo utilizado fue 0.8 mL/min, la temperatura 30 °C y la longitud de detección $\lambda = 324$ nm.

La concentración de cada compuesto en las muestras analizadas se calculó utilizando la Ecuación 6:

$$C_{i/j}(\text{wt } \%) = \left(\frac{\text{masa del compuesto } i \text{ en la fracción } j}{\text{masa de la fracción } j} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

donde i es el compuesto analizado y j hace referencia a la fracción analizada, es decir, FS, PV o DV. Una vez se calculan las concentraciones de dichos compuestos para cada una de las muestras, puede estimarse la denominada ratio de enriquecimiento $E_{i/j}$ mediante la Ecuación 7:

$$E_{i/j} = \frac{C_{i/j}}{C_{i/FS}} \quad (7)$$

donde, de nuevo, i hace referencia al compuesto analizado y j es PV o DV. Esta ratio indica cuando la fracción PV o DV está enriquecida un compuesto i , siendo la fracción j rica en el compuesto i si $E_{i/j} > 1$ y lo contrario si $E_{i/j} < 1$.

3.2.4. Diseño de experimentos y análisis estadístico

Uno de los objetivos específicos de esta tesis es la evaluación estadística del proceso SAF, en concreto se evaluó la influencia de la presión y del flujo de CO₂ en dicho proceso. Posteriormente se optimizaron las condiciones para obtener los mejores resultados en cuanto a rendimientos y enriquecimiento de compuestos de interés. Para realizar esta evaluación estadística se utilizó una metodología de superficie de respuesta (RSM) basada, en el diseño central compuesto (CCD). Este diseño provee un modelo matemático cuadrático de dos variables que permite correlacionar, mediante la Ecuación

8, una variable dependiente o respuesta, Y , con dos variables independientes o factores X_i y X_j :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \quad (8)$$

En esta ecuación β_0 es el término independiente, β_1 y β_2 son los coeficientes lineales, β_{11} y β_{22} son los coeficientes cuadráticos y β_{12} es el coeficiente cruzado o “de interacción”. En esta tesis las variables dependientes Y hacen referencia tanto a los rendimientos obtenidos en el proceso SAF como al enriquecimiento de los compuestos de interés estudiados, mientras que las variables independientes, X_i y X_j , son los factores a estudiar: la presión en la cámara de precipitación, denominada en lo que sigue X_P y el flujo de CO_2 , denominado $X_{Q\text{CO}_2}$. Los valores de estas variables se fijan entre 80 y 160 bar para la presión, X_P , y 10 y 60 g/min para el flujo de CO_2 , $X_{Q\text{CO}_2}$, teniendo en cuenta tanto experiencias previas con esta técnica como las condiciones mínimas y máximas de trabajo del equipo empleado. El resto de parámetros en los experimentos SAF (temperatura en PV y flujo de FS) se mantuvieron constantes de acuerdo con experiencias previas del grupo, para asegurar las condiciones supercríticas de la mezcla CO_2 -etanol [207].

El software utilizado para realizar el diseño CCD fue *Minitab*® 18 que permite tanto crear el diseño de experimentos como analizar estadísticamente los resultados experimentales obtenidos. El número de experimentos que se programan es igual a $2^k + 2k + \eta_0$, siendo k el número de variables independientes y η_0 el número de repeticiones del punto central necesarias para lograr la estimación de la denominada varianza del error experimental.

Con este software y aplicando el modelo CCD se generaron 13 experimentos aleatorizados incluyendo cuatro puntos factoriales, cuatro axiales y cinco puntos centrales que son réplicas de las condiciones centrales según el rango de las variables utilizadas. En la Figura 26 se muestra, a modo de ejemplo, el diseño CCD creado para el fraccionamiento de la especie *Melissa officinalis* y el orden experimental del mismo. Este software también permitió determinar los valores de cada coeficiente β de la Ecuación 8 y si resultan estadísticamente significativos (significancia estadística $p < 0.05$).

Finalmente, con *Minitab*® 18 también es posible obtener las condiciones óptimas para alcanzar el máximo rendimiento y enriquecimiento de las sustancias bajo estudio en el proceso SAF de cada una de las especies vegetales estudiadas.

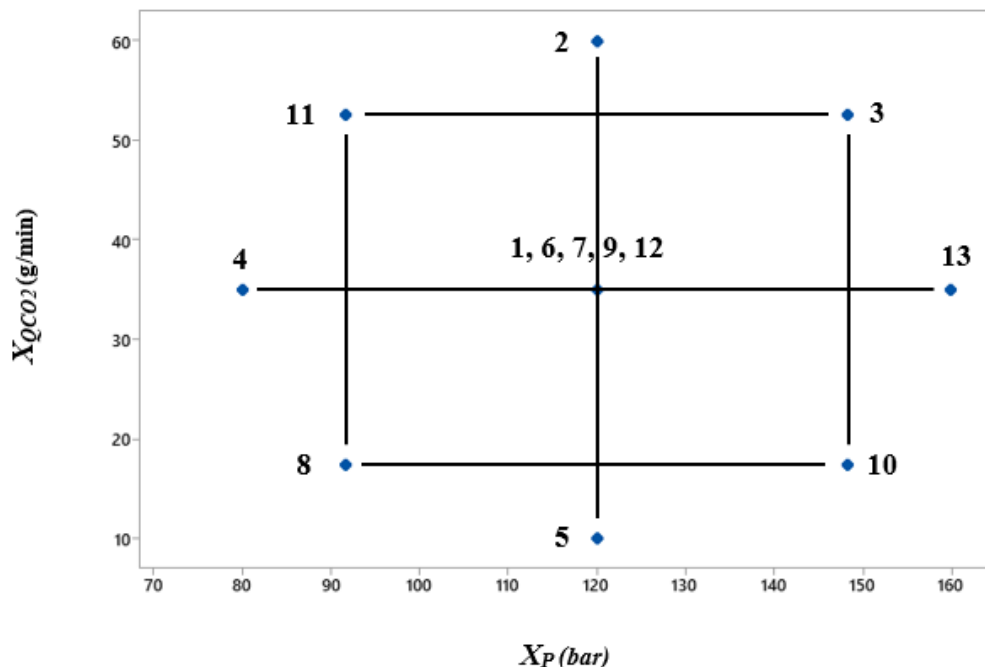


Figura 26. Diseño compuesto central (CCD) para el fraccionamiento de *M. officinalis* con dos variables independientes: presión (X_P , bar) y caudal de CO_2 ($X_{Q_{CO_2}}$, g/min) y orden experimental.

3.3. Herramientas computacionales

3.3.1. Aproximación a una metodología QSAR mediante COSMO-RS

Tal y como se ha indicado en la sección § 1.4.1, los modelos QSAR pueden ser de mucha utilidad para predecir la actividad biológica de los compuestos a partir de su estructura, ahorrando el tiempo y coste asociado a las medidas experimentales, sobre todo en estudios iniciales de la investigación como herramienta de preselección. Así, en este trabajo se explora la posibilidad de implementar un modelo tipo QSAR para estimar la actividad antioxidante de compuestos presentes en extractos de plantas con el objetivo de que pueda ser utilizado como posible herramienta futura de un screening previo para antioxidantes de interés a concentrar en procesos de separación tales como SAF. Si bien, ya existen modelos QSAR que relacionan la actividad antioxidante con diversos descriptores, y modelos QSAR que relacionan otras actividades con descriptores

obtenidos mediante COSMO-RS, hasta el momento no existe un modelo QSAR que relacione la actividad antioxidante con los descriptores obtenidos a partir de COSMO-RS.

Esto ha llevado a explorar la aplicación de un modelo QSAR mediante el uso de descriptores moleculares derivados de los perfiles σ de compuestos antioxidantes proporcionados por el modelo COSMO-RS (Conductor-like Screening Model for Real Solvents, COSMO-RS). Este modelo, propuesto por primera vez por Klamt [188] y luego mejorado por el mismo autor [189], es un modelo continuo de solvatación que combina la química cuántica y la termodinámica estadística. Este modelo es capaz de generar una distribución 3D de las densidades de carga de polarización superficial, σ , a partir de las estructuras tridimensionales optimizadas de las moléculas. A partir de σ se obtienen los correspondientes perfiles σ bidimensionales, que son histogramas que proporcionan la cantidad relativa de la superficie molecular que presenta una determinada densidad de carga de polarización σ . Este histograma representa cuanta superficie de la molécula posee una polaridad comprendida en un determinado intervalo [188]. El uso de estos perfiles σ como descriptores se ha inspirado en estudios previos que aplicaron COSMO-RS en modelos QSAR [208–210].

El modelo COSMO-RS se concibió originalmente para calcular las propiedades de fluidos y mezclas a presión atmosférica, diagramas de fase de equilibrio vapor-líquido o líquido-líquido, presiones de vapor o coeficientes de actividad. A partir de los coeficientes de actividad se podrían predecir las propiedades de las mezclas reales. Sin embargo, además de este objetivo original, también ha demostrado ser una herramienta útil para establecer modelos QSPR (relación estructura-propiedad) para propiedades físicas como densidad [211,212], viscosidad [212–214], conductividad eléctrica [215] y polaridad [216] de diferentes compuestos o mezclas, así como fenómenos de adsorción [217,218]. Además, se han desarrollado modelos QSAR basados en COSMO-RS para estudiar bioactividades, a saber, citotoxicidad en el tratamiento de la leucemia [208], rendimiento de reacciones enzimáticas [209] y actividad antimicrobiana de líquidos iónicos [210].

Para la selección de los compuestos que conformen el modelo QSAR se realiza una búsqueda bibliográfica sobre actividades antioxidantes de compuestos puros presentes en extractos de plantas, dado que el modelo se debe alimentar con compuestos similares si se pretende usar como screening previo de futuras especies vegetales bajo estudio. Sin embargo, aunque hay muchos trabajos sobre la actividad antioxidante de extractos naturales obtenidos a partir de plantas, los trabajos sobre la actividad antioxidante de compuestos puros son comparativamente muy escasos. Además, incluso para determinados métodos de medición de actividad antioxidante, existen modificaciones del método que no siempre proporcionan los mismos resultados para un compuesto determinado. Por otra parte, la actividad antioxidante puede expresarse de varias formas y no todas ellas pueden interconvertirse fácilmente debido a la falta de información química [219]. En este trabajo únicamente se consideraron aquellos compuestos cuya actividad antioxidante recogida en bibliografía resultó fiable mediante comparativa con la proporcionada en otras fuentes.

Las estructuras químicas tridimensionales preoptimizadas de los compuestos se obtuvieron de la base de datos PubChem y posteriormente fueron refinadas utilizando la versión 9.0 de Gaussian con una parametrización DFT bvp86/dga1. Finalmente, se utilizó COSMO-RS para generar los perfiles σ de los compuestos. Esta parametrización se seleccionó porque cumple con las severas restricciones impuestas por el uso posterior de COSMO-RS para obtener los perfiles σ . En la Figura 27 se recogen las estructuras 3D de los compuestos utilizados junto con su densidad de superficie de carga, indicada mediante colores. Además, en el Anexo II recoge las coordenadas cartesianas de las optimizaciones de cada molécula.

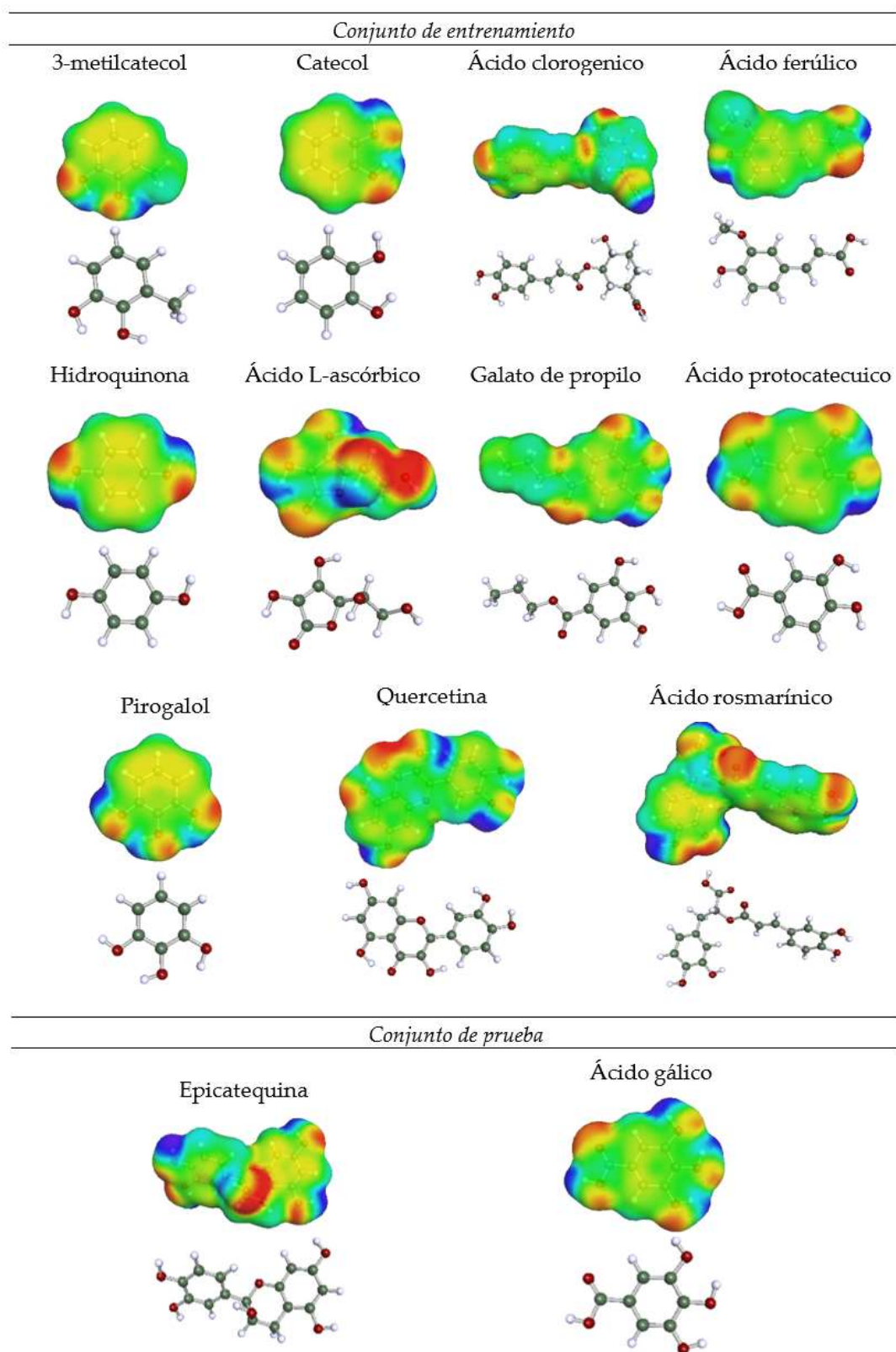


Figura 27. Estructura 3D de los compuestos utilizados para el desarrollo del modelo preliminar QSAR y su densidad de carga (en rojo zona electronegativa, en azul zona electropositiva y en verde zona neutra).

Para traducir la información del perfil σ en descriptores, es decir, en variables numéricas, se hicieron dos particiones distintas de las curvas del perfil σ con el objetivo de evaluar la idoneidad de las mismas: una primera división más gruesa en cuatro intervalos [210,220] y una partición más fina en diez intervalos diferentes [212–215]. En la Figura 28 se puede observar un ejemplo de los dos tipos de particiones del perfil σ para el caso del ácido rosmarínico y el ácido clorogénico. En el Anexo III se recogen las particiones para el resto de moléculas empleadas en el modelo QSAR. Los descriptores fueron calculados identificándolos con el área bajo la curva del perfil σ , S_i , para cada uno de los intervalos i del histograma, de S_1 a S_4 para el modelo con cuatro divisiones y de S_1 a S_{10} para el modelo con diez divisiones. La Tabla 4 muestra los valores de los descriptores moleculares utilizados para cada molécula, el rango de densidad de carga y su significado basado en el trabajo de Lemaoui et al. [215].

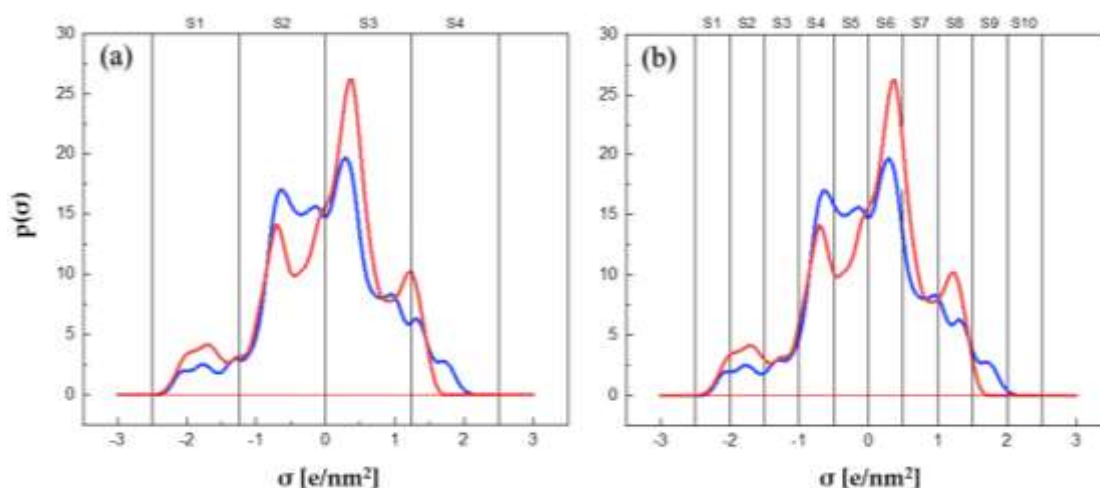


Figura 28. Perfil σ , representado como probabilidad ($p(\sigma)$) vs densidad de polarización de carga (σ), de los compuestos ácido rosmarínico (rojo) y ácido clorogénico (azul) y su partición en (a) 4 intervalos y (b) 10 intervalos.

Tabla 4. Descriptores moleculares para el modelo de 4 áreas y el modelo de 10 áreas así como sus representaciones basadas en el trabajo de Lemaoui et al. [215].

Modelo de 4 áreas		Modelo de 10 áreas		Representación
Descriptor Molecular	Rango de densidad de carga de detección (e/nm)	Descriptor Molecular	Rango de densidad de carga de detección (e/nm)	
S ₁	$-2.5 < \sigma < -1.25$	S ₁	$-2.5 < \sigma < -2.0$	Región HBD
		S ₂	$2.0 < \sigma < -1.5$	
		S ₃	$-1.5 < \sigma < -1.0$	
S ₂	$-1.25 < \sigma < -0.0$	S ₄	$-1.0 < \sigma < -0.5$	Región no polar con densidad de carga negativa
		S ₅	$-0.5 < \sigma < 0.0$	
S ₃	$0.0 < \sigma < 1.25$	S ₆	$0.5 < \sigma < 1.0$	Región no polar con densidad de carga positiva
		S ₇	$0.0 < \sigma < 0.5$	
S ₄	$1.25 < \sigma < 2.5$	S ₈	$1.0 < \sigma < 1.5$	Región HBA
		S ₉	$1.5 < \sigma < 2.0$	
		S ₁₀	$2.0 < \sigma < 2.5$	

Las moléculas utilizadas en este trabajo son compuestos de tipo fenólico y muestran picos característicos en torno a $\sigma = \pm 0.5$, correspondientes a los anillos aromáticos, picos que pueden aparecer desplazados debido a la presencia de otros grupos en la molécula. Además, hay picos en la región donora de enlace de hidrógeno (HBD) de $-2.5 < \sigma < -1.0$, que son característicos de los átomos de hidrógeno en enlaces O-H, y algunos picos en la región aceptora de enlace de hidrógeno (HBA) de $1.0 < \sigma < 2.5$, característica de los átomos aceptores de hidrógeno como los átomos de oxígeno.

En cuanto a la actividad antioxidante, como ya se ha indicado, cabe resaltar que existen diversos métodos químicos para su determinación que implican distintos mecanismos de reacción [219,221]. En este caso se seleccionaron aquellas referencias bibliográficas basadas en el ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), expresado como el valor de la concentración efectiva del compuesto antioxidante que reduce al 50% del DPPH inicialmente presente en el ensayo (EC₅₀, μM), ya que es ampliamente utilizado

[219]. Para trabajar con valores estandarizados, la EC50 se transformó de μM a mol de sustancia/mol de DPPH.

El desarrollo de la ecuación matemática del modelo QSAR se calculó mediante regresión lineal múltiple (MLR), estableciendo una relación lineal entre los descriptores moleculares de los compuestos y su actividad antioxidante, representada como $-\log(\text{EC}_{50})$, tal y como puede observarse en la Ecuación 9.

$$-\log(\text{EC}_{50}) = a_0 + a_1S_1 + a_2S_2 + a_3S_3 + \dots + a_nS_n \quad (9)$$

donde $a_0, a_1, a_2, \dots, a_n$ son los coeficientes de regresión y $S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$ son los descriptores moleculares. El cálculo de los coeficientes de la Ecuación 9 así como los parámetros estadísticos asociados se realizó utilizando el software *Minitab*® 18.

De los 16 compuestos encontrados en bibliografía, se eliminaron tres compuestos con el propósito de disponer de una base de datos más homogénea que permita evaluar la aplicabilidad del modelo QSAR: el alfa-tocoferol por tener una estructura muy diferente, el trolox, por no ser un compuesto presente en fuentes naturales como las plantas, y el ácido cafeico. Se descartó este último a posteriori por su capacidad dimerización y su falta de ajuste a un modelo QSAR preliminar.

Para desarrollar el modelo se siguieron las directrices dadas por A. Tropsha et al. [222], dividiendo el conjunto de los 13 compuestos finalmente seleccionados (Figura 27) en un conjunto de entrenamiento del 80% y un conjunto de prueba del 20%, que permitiera realizar una validación externa (11 y 2 compuestos respectivamente). La selección de los compuestos del conjunto de prueba siguió los siguientes criterios: (i) se excluyen los datos de máxima y mínima actividad antioxidante, (ii) se excluyen los datos que se agrupan en el extremo superior o inferior de la actividad antioxidante y (iii) se excluyen las moléculas que tienen el mismo grupo funcional [222].

Es evidente que la escasez de datos fiables disponibles en bibliografía hace que el modelo propuesto sea una primera aproximación que deberá mejorarse de forma más definitiva cuando se disponga de más datos experimentales.

3.3.2. COSMO-RS: Permeabilidad en piel

Con el objetivo de verificar la utilidad de las herramientas computacionales para evaluar la seguridad de principios activos concentrados en el proceso SAF, como posibles componentes de formulaciones cosméticas, se realizó un estudio *in silico* de su permeabilidad en piel. El modelo computacional de piel que se ha utilizado es el propuesto por Schwöbel et al. [187]. El modelo considera que la epidermis, parte más externa de la piel, está dividida en varios compartimentos (estratos o capas) cada una de ellas con estructura y composición celular propias [184]. La Figura 29 y la Tabla 5 recogen los compartimientos en los que tradicionalmente se encuentra dividida la epidermis.

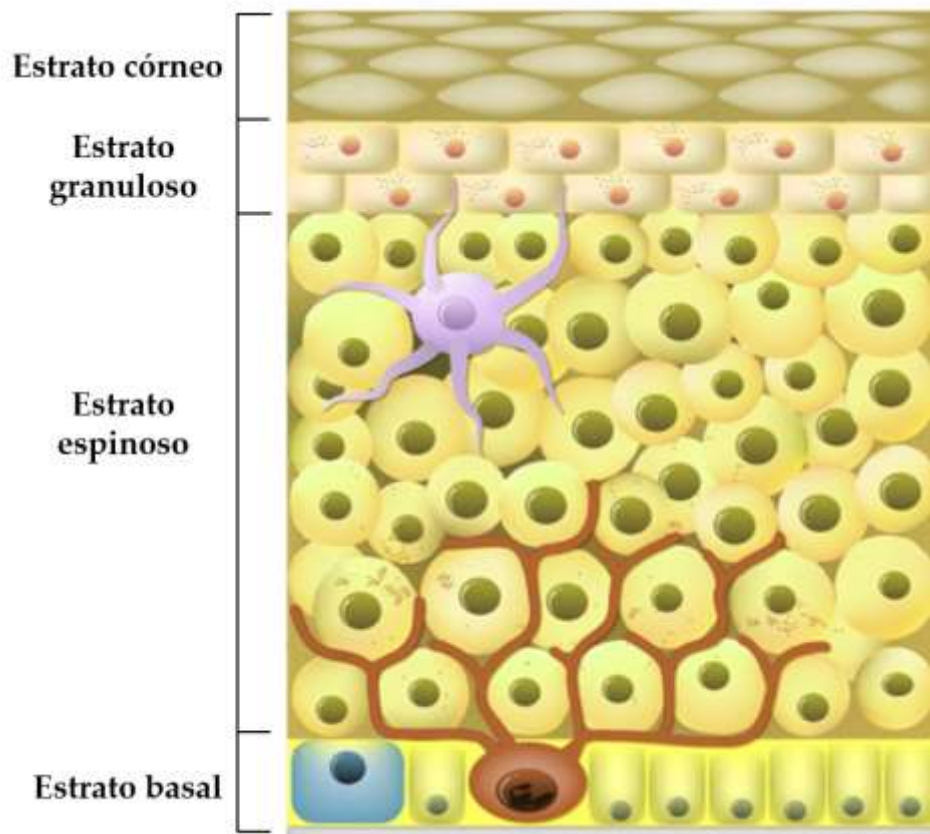


Figura 29. Estratos de la epidermis. (Adaptada de “Meditip” [223]).

Tabla 5. Compartimentos que forman la epidermis, sus abreviaciones y una breve descripción de cada capa. Información obtenida de Schwöbel et al. [187].

Compartimento	Abreviación	Descripción
Estrato córneo	SC	Capa córnea, la más externa y principal barrera de permeabilidad dentro de la piel
Estrato granuloso	SG	Capa granular
Estrato espinoso	SS	Capa espinosa o de Malpighi, filamentosa
Estrato basal	SB	Capa más interna metabólicamente activa
Estructuras anexas	Shunt	Responsable del transporte de sustancias químicas a través de folículos pilosos y glándulas sudoríparas y sebáceas.

El modelo de Schwöbel et al. calcula el coeficiente de permeabilidad, K_p , a partir de las llamadas resistencias, R , [224] que corresponden a cada capa, de forma que se cumple la siguiente ecuación:

$$K_p = \frac{1}{R_{skin}} \quad (10)$$

donde R_{skin} es la resistencia total de la piel que se obtiene combinando las resistencias de los distintos compartimentos. Por un lado se obtiene la resistencia total de las capas, $R_{stratified-cells}$, tal y como se indica la Ecuación 11:

$$R_{stratified-cells} = R_{SC} + R_{SG} + R_{SS} + R_{SB} \quad (11)$$

donde R_{SC} , R_{SG} , R_{SS} , y R_{SB} son las resistencias de los estratos descritos en la Tabla 5, SC, SG, SS, y SB respectivamente. Esta resistencia se combina con la que corresponde a la ruta paralela de las estructuras anexas de la piel, también llamada vía “shunt” o de derivación. La Ecuación 12 muestra cómo se combinan estas resistencias para obtener R_{skin} :

$$\frac{1}{R_{skin}} = \frac{1}{R_{stratified-cell}} + \frac{1}{R_{shunt}} \quad (12)$$

donde R_{shunt} es la resistencia de la vía “shunt” que se mantiene constante $1/R_{shunt} = 2 \cdot 10^{-11} \text{ m/s}$.

Las resistencias de cada uno de los estratos que aparecen en la Ecuación 11, es decir, la que corresponde al transporte de los compuestos, se calculan mediante la Ecuación 13:

$$\frac{1}{R_i} = \frac{1}{R_{i,trans}} + \frac{1}{R_{i,inter}} \quad (13)$$

donde i es el compartimento específico (SC, SG, SS o SB), $R_{i,trans}$ hace referencia al mecanismo de absorción transcelular (a través de los corneocitos de queratina) y $R_{i,inter}$ hace referencia al mecanismo de absorción intercelular (a través de la matriz lipídica intersticial). La Figura 30 muestra una representación de los compartimentos y las rutas de permeación según el modelo propuesto.

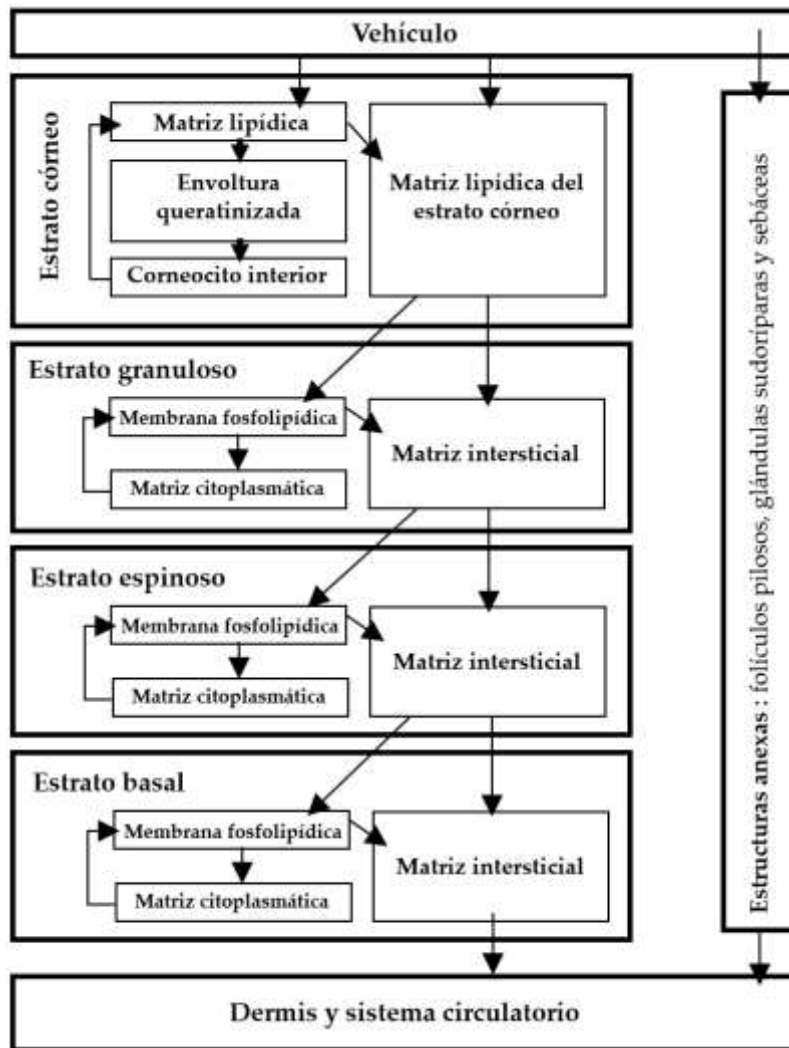


Figura 30. Esquema de los compartimentos que conforman la epidermis y sus rutas de permeación. (Adaptado de Schwöbel et al. [187]).

Para poder aplicar el modelo a los compuestos seleccionados, se obtuvieron primero las estructuras químicas 3D preoptimizadas de la base de datos PubChem y posteriormente se refinaron utilizando la versión 9.0 de Gaussian con una parametrización DFT bvp86-TZVP.

Tras esta parametrización, los archivos obtenidos se transformaron en archivos compatibles con el paquete informático COSMOtherm. Una vez obtenidos los archivos compatibles, se inicia mediante comandos en el ordenador, la versión beta (Figura 26) del programa COSMOperm para proceder al cálculo de permeabilidades de cada compuesto.

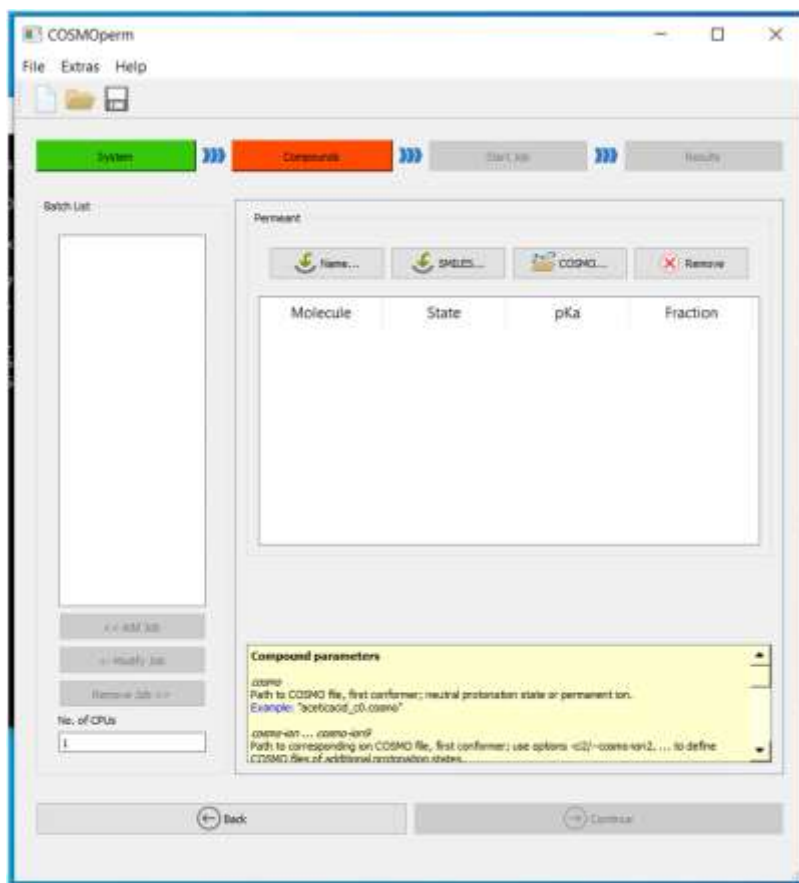


Figura 31. Interfaz de la versión beta del programa COSMOperm para el cálculo de permeabilidad de compuestos.

3.3.3. Screening inverso

Además de la incorporación de principios activos en formulaciones cosméticas, también puede ser interesante conocer si estos compuestos pueden ser útiles por sus aplicaciones farmacológicas. Resulta entonces de utilidad la aplicación de herramientas computacionales que permitan determinar la interacción de dichas sustancias con dianas moleculares bien establecidas. Una diana molecular se define como la estructura molecular (proteínas, enzimas, genes...) sobre la que tienen efecto los principios activos.

Para localizar dianas, en concreto enzimas, con las que los compuestos de interés tengan interacción, se utilizó un modelo *in silico* basado en el cribado inverso, concretamente en la similitud química, mediante la herramienta online Similarity Ensemble Approach (SEA), Figura 32, la cual utiliza una base de datos derivada de la ChEMBL [225,226]. Esta herramienta es un servidor web que se apoya en los filtros de similitud 2D, mediante los que se valora la similitud entre dos moléculas utilizando para ello huellas digitales ECFP4 y el coeficiente de Tanimoto (Tc) [225,226].

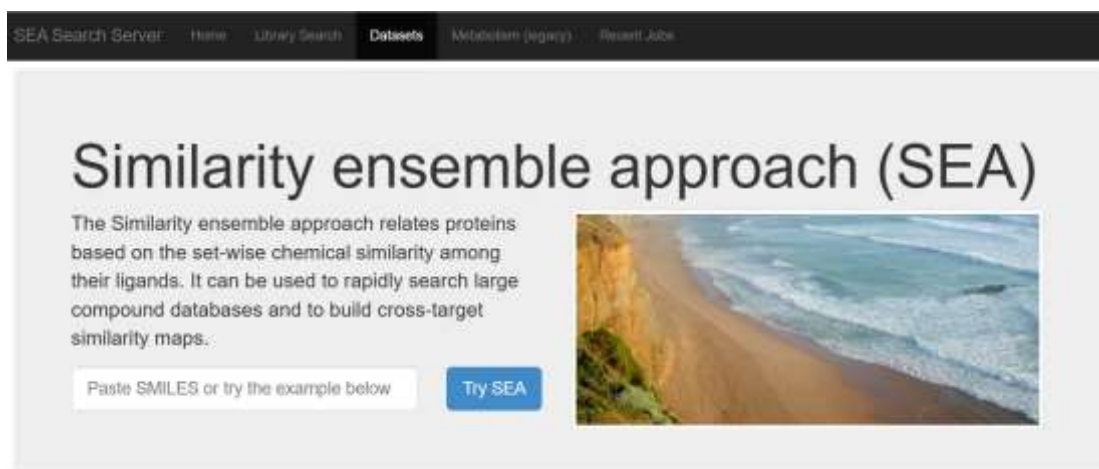


Figura 32. Interfaz del servidor web SEA.

Para que la web SEA pueda calcular las similitudes pertinentes, en primer lugar es necesario subir la molécula de estudio a la web SEA. Para ello, se debe proporcionar las representaciones SMILE del compuesto, es decir, la codificación lineal sin ambigüedades de su estructura. Las representaciones SMILES de las moléculas bajo estudio, ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico y rosmarínico, se obtuvieron a partir de la

base de datos PubChem. En la Figura 33 se recogen las estructuras 2D y las SMILES para los compuestos químicos estudiados.

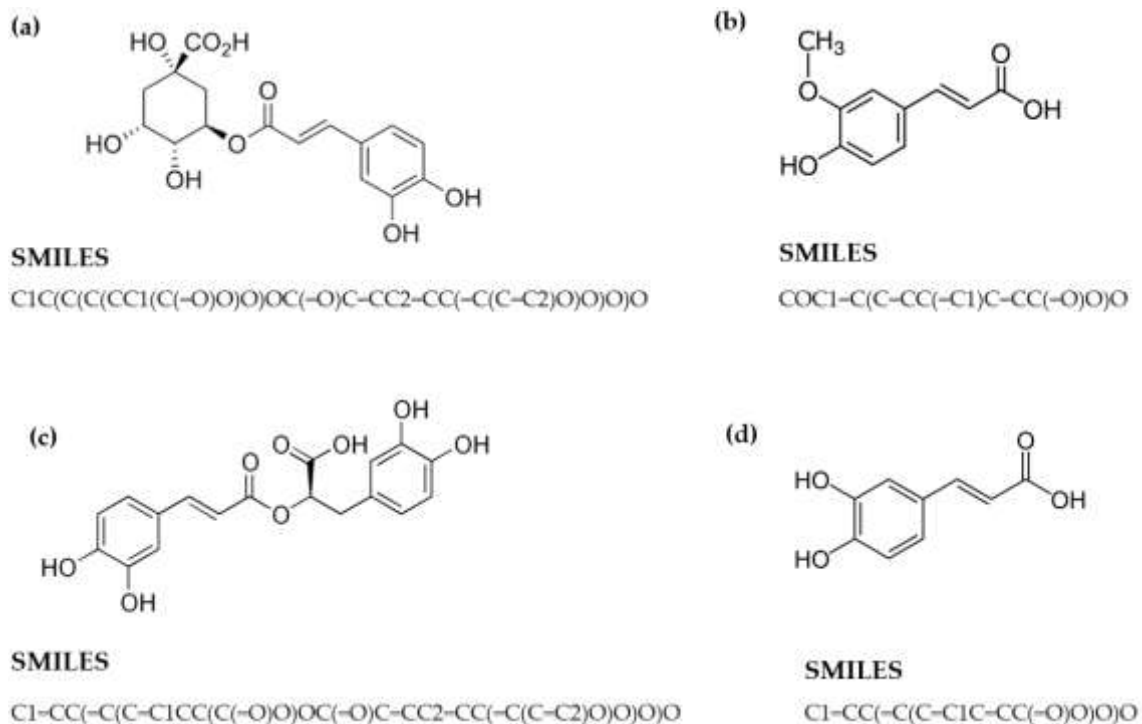


Figura 33. Estructura 2D y su correspondiente SMILE para (a): ácido clorogénico, (b) ácido ferúlico, (c) ácido rosmarínico y (d) ácido cafeico.

En segundo lugar, la web SEA calcula las huellas digitales de los compuestos. Las ECFPx (Extended-connectivity fingerprints) son huellas circulares que permiten caracterizar una molécula especificando el entorno de cada átomo mediante círculos concéntricos con radios crecientes correspondientes a una distancia de un número de enlaces x [203]. De forma general, existen cuatro etapas para generar estas huellas circulares [203]:

1 – A cada átomo de la molécula se le asigna un identificador único calculado a partir de la combinación de varias propiedades (números atómicos, masa atómica, etc.).

2 – A continuación se genera un nuevo identificador teniendo en cuenta los átomos vecinos a una distancia de enlace 1, que sustituye al identificador inicial. Este proceso se realiza de forma iterativa, aumentando la distancia de enlace sucesivamente hasta la elegida por el usuario. En nuestro caso, al ser ECFP4, la distancia de enlace será de cuatro enlaces.

3 – En ocasiones, varios átomos terminan por generar tras los cálculos el mismo identificador, con lo que en esta etapa se eliminan aquellos duplicados por estructuras similares.

4 – Se forma la combinación de dígitos binarios (bits): Una vez calculados todos los identificadores para cada átomo, se transforman en una serie de bits mediante cálculos computacionales, obteniéndose la huella circular de la molécula.

Este proceso se repite para todos los átomos de la molécula, considerando cada átomo como un centro. Una vez completado el proceso, se obtiene una huella dactilar que contiene la información estructural de toda la molécula. En la Figura 34 aparece la representación del cálculo de una de las etapas del átomo de C señalado en negro con un radio de dos enlaces (ECFP2).

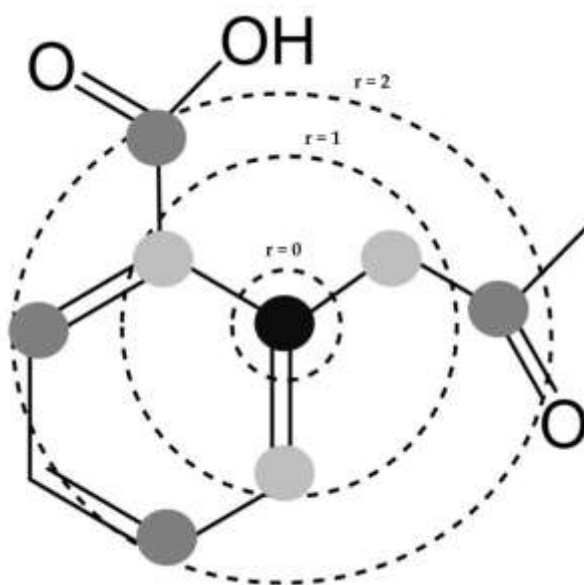


Figura 34. Representación del entorno atómico de hasta dos enlaces. En negro aparece el átomo para el cual se calcula el identificador, en gris claro los átomos con radio uno y en gris oscuro los átomos con radio dos. Modificada de L. Carlsson et al. [227].

Una vez obtenida la huella de la molécula, se puede comparar con las existentes en la base de datos, mediante el coeficiente T_c . Para $T_c = 1$ se tiene la máxima semejanza mientras que $T_c = 0$ corresponde a la ausencia de la misma. Por otro lado, cada diana incluida en la base de datos se encuentra asociada a diversas moléculas que actúan como

posibles ligandos. La SEA calcula, las huellas de los ligandos presentes en la base de datos, las huellas de las moléculas bioactivas bajo estudio y el coeficiente de Tanimoto, junto con la probabilidad de que la similitud observada se deba a una coincidencia expresada como valores E. Usualmente, suele ser razonable descartar aquellas moléculas con valores de $T_c < 0.65$ y valores $E > 10^{-10}$.

Capítulo 4. Resultados y discusión



Imagen Capítulo 4: Extractos supercríticos de *Salvia sclarea*

Con el propósito de facilitar una mejor comprensión de los resultados obtenidos, el **Capítulo 4** se va a estructurar en dos grandes bloques. En el primer bloque se presentan los resultados de los procesos de obtención de extractos sostenibles a partir de cada una de las especies vegetales estudiadas, junto con la identificación y cuantificación de las especies de interés y el análisis estadístico del diseño experimental correspondientes al proceso de Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente (SAF). Para los procesos de obtención de extractos se han incluido los rendimientos correspondientes a la primera etapa de desengrasado del material vegetal con CO₂ supercrítico (SCE) y a la maceración etanólica posterior, que permite obtener una fracción polar, rica en los principios activos de interés, a saber, ácido clorogénico (CHA), ácido cafeico (CAF), ácido ferúlico (FA) y ácido rosmarínico (RA). Después se detallan los resultados experimentales de aplicar el diseño central compuesto (CCD) para optimizar el proceso de concentración de activos SAF mediante la evaluación de la influencia de la presión y caudal de CO₂ en los rendimientos del fraccionamiento y en las ratios de enriquecimiento obtenidas por HPLC.

El segundo bloque contiene los resultados obtenidos en la evaluación de algunas herramientas computacionales para la preselección de principios activos útiles en cosmética y farmacia: modelos QSAR, permeabilidad en piel *in silico* y screening inverso.

4.1. Extractos obtenidos para cada especie

4.1.1. *Salvia officinalis* L.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para la concentración de activos a partir de extractos de hojas de la especie *S. officinalis*, cuyo contenido en agua fue 15.77 ± 0.96 wt %.

4.1.1.1. Extracción SCE y maceración

Con el objetivo de desengrasar el material vegetal se realiza una primera etapa de Extracción Supercrítica con CO₂ (SCE). Las condiciones de trabajo en el extractor, ya indicadas en la sección § 3.2.1., fueron de 350 bar, 40 °C. El rendimiento de esta extracción supercrítica, Y_{SCE} , calculado según la Ecuación 2 fue de 4.9 ± 0.8 wt %. Este resultado es comparable a los obtenidos por S. A. Aleksovski et al. (2.4-4.8%) [228] y A. Dapkevicius et al. (5.02%) [229] en condiciones de extracción similares a las utilizadas en este trabajo.

Tras la realización de la SCE, el material vegetal exhausto se maceró en etanol para obtener la fracción polar, siendo el rendimiento de este proceso según la Ecuación 3 del $10.9\% \pm 0.1 \text{ wt } \%$.

4.1.1.2. Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente (SAF)

A partir del extracto etanólico obtenido mediante maceración, se prepararon las correspondientes disoluciones de alimentación del proceso SAF (sección § 3.2.2.) y se realizaron los 13 experimentos generados por el software *Minitab*® 18 (sección § 3.2.4), en el orden aleatorio que aparece en la Tabla 6.

En todos los experimentos SAF se obtuvo, en la cámara (PV) un precipitado verde en polvo y se recogió en el colector (DV) una disolución verde-amarillenta, Figura 35.

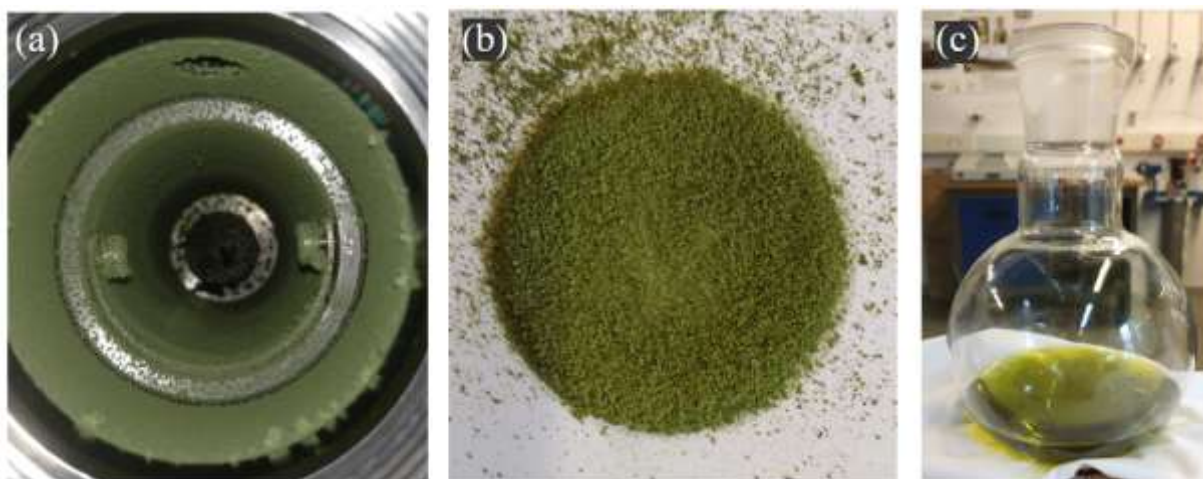


Figura 35. Imágenes correspondientes al experimento número 11 de *Salvia officinalis*: (a,b) polvo precipitado en la fracción de cámara y (c) disolución recogida como fracción de colector.

En la Tabla 6 muestra, junto con el número de experimentos y su orden de ejecución, las condiciones de trabajo para cada uno de ellos, así como los rendimientos alcanzados en cámara, colector y global, Y_{PV} , Y_{DV} , Y_{SAF} , respectivamente.

Tabla 6. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *S. officinalis*, junto con los resultados de rendimientos definidos por las Ecuaciones 4 y 5.

N° Exp.	Run	X_P (bar)	$X_{Q_{CO_2}}$ (g/min)	Y_{PV} (wt %)	Y_{DV} (wt %)	Y_{SAF} (wt %)
1	8	80	35	61.9	7.1	69.0
2	5	92	17	64.8	17.5	82.3
3	1	92	53	53.0	12.9	65.9
4	4	120	10	56.0	27.8	82.4
5	2	120	35	62.8	15.4	78.3
6	6	120	35	64.8	17.4	82.2
7	11	120	35	62.6	22.5	85.1
8	12	120	35	60.0	20.8	80.8
9	13	120	35	61.7	19.9	81.6
10	3	120	60	50.5	16.3	75.8
11	10	148	17	55.8	28.5	84.3
12	7	148	53	57.2	17.8	75.0
13	9	160	35	57.4	20.6	78.0

Como puede observarse en la Tabla 6, los valores de Y_{PV} son mayores que los valores de Y_{DV} para todos los experimentos, independientemente de las condiciones de presión y el flujo de CO_2 utilizados. De hecho, los rendimientos de Y_{PV} son de 2 (exp. 4) a 8.7 (exp. 1) veces mayores que los rendimientos de Y_{DV} . Y_{PV} osciló entre el 53.0% (exp. 3; 92 bar - 17 g/min) y el 64.8% (exp. 2; 92 bar - 17 g/min y exp. 6; 120 bar - 35 g/min) mientras que Y_{DV} varió entre el 7.1% (exp. 1; 80 bar - 35 g/min) y el 28.5% (exp. 11; 148 bar - 17 g/min). Por otra parte, el rendimiento global Y_{SAF} estuvo comprendido entre el 69.0% y el 85.1% (exp. 1 y exp. 11 respectivamente). No es posible una recuperación completa de toda la masa de los solutos contenidos en la disolución de alimentación debido al arrastre de los componentes más volátiles a través de la válvula de ventilación [230] y la deposición de los materiales en los espacios muertos.

4.1.1.3. Análisis HPLC de los extractos obtenidos en SAF

La identificación y cuantificación de los principios activos de interés se llevó a cabo utilizando un método de gradiente en HPLC (sección § 3.2.3). Los disolventes empleados fueron (A) 0.1% ácido fórmico en agua Mili-Q, (B) agua Mili-Q y (C) acetonitrilo.

El gradiente de elución aplicado fue: 10% A, 90-40% B, 0-50% C (0-15 min); 10% A, 40-10% B, 50-80% C (15-20 min); 10% A, 10-90% B, 80-0% C (20-25 min) y 10% A, 90% B, 0% C (25-30 min). En la Figura 36 pueden observarse los picos correspondientes a tres de los compuestos de interés que se identificaron en los extractos de esta planta: ácido clorogénico (CHA), ácido cafeico (CAF) y ácido rosmarínico (RA), así como sus tiempos de retención. La cuantificación de estos compuestos se realizó mediante rectas de calibrado que se recogen en el Anexo IV.1.

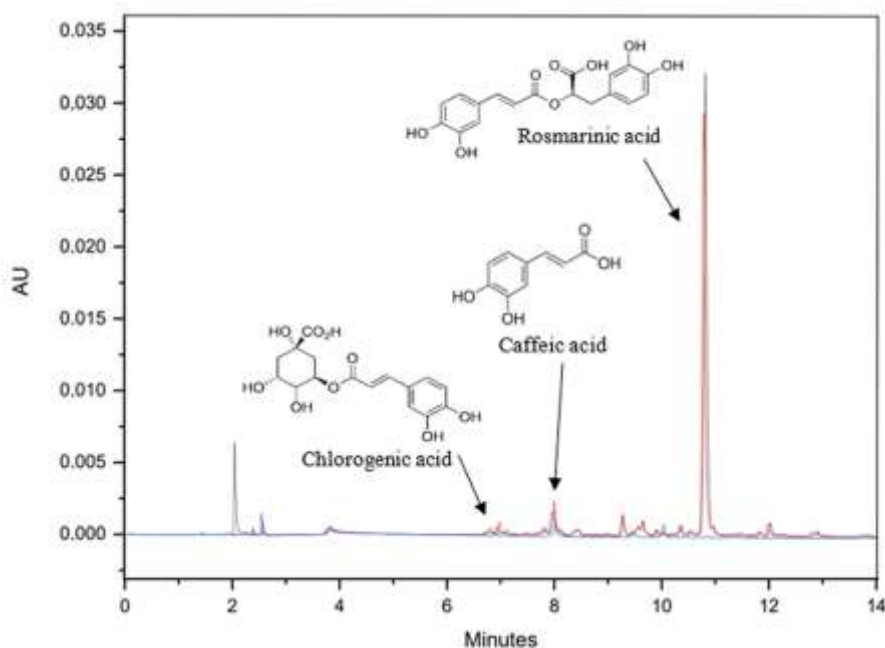


Figura 36. Cromatograma de los extractos de *Salvia officinalis*. CHA ($T_R = 6.94$ min, $\lambda = 324$ nm), CAF ($T_R = 7.98$ min, $\lambda = 324$ nm) y RA ($T_R = 10.79$ min, $\lambda = 324$ nm). Fracciones: PV línea roja, DV línea negra, FS línea azul.

Par esta especie además de las ratios de enriquecimiento en cámara ($E_{i/PV}$), o en colector ($E_{i/DV}$) definidas en la Ecuación 7, se calcularon también los valores de enriquecimiento relativos, RE_i , según la Ecuación 14:

$$RE_i = \frac{E_{i/PV}}{E_{i/DV}} \quad (14)$$

Este enriquecimiento relativo muestra si un compuesto i se enriquece más en la fracción de cámara o en la de colector. Si $RE_i > 1$, significa que dicho compuesto está enriquecido en PV, mientras que si $RE_i < 1$, significa que lo está en la fracción de DV.

Los parámetros de Enriquecimiento, E_{ij} y los parámetros de Enriquecimiento relativo, RE_i , obtenidos para los extractos de *S. officinalis* aparecen en la Tabla 7. El análisis cromatográfico reveló que el ácido rosmarínico (RA) queda completamente retenido en PV y, por tanto, ni $E_{RA/DV}$ ni RE_{RA} se incluyen en los resultados. Para el ácido clorogénico (CHA) y para el ácido cafeico (CAF), los valores de $E_{i/PV}$ son significativamente superiores a los de $E_{i/DV}$, lo que significa que estos dos compuestos están más concentrados en la fracción de PV que en la de DV.

Tabla 7. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *S. officinalis*, junto con los resultados de ratios de enriquecimiento y enriquecimiento relativo, definidas por las Ecuaciones 7 y 14.

N° exp.	Run	X_P (bar)	$X_{Q_{CO_2}}$ (g/min)	$E_{CHA/PV}$	$E_{CAF/PV}$	$E_{RA/PV}$	$E_{CHA/DV}$	$E_{CAF/DV}$	RE_{CHA}	RE_{CAF}
1	8	80	35	0.81	0.57	0.77	0.32	0.31	2.53	1.84
2	5	92	17	1.18	0.75	0.91	0.37	0.34	3.19	2.21
3	1	92	53	1.20	0.98	1.05	0.32	0.12	3.75	8.17
4	4	120	10	1.33	0.75	1.15	0.33	0.66	4.03	1.14
5	2	120	35	1.19	0.94	1.06	0.33	0.25	3.61	3.76
6	6	120	35	1.21	0.95	1.11	0.34	0.23	3.56	4.13
7	11	120	35	1.19	1.11	1.14	0.32	0.21	3.72	5.29
8	12	120	35	1.24	0.91	1.11	0.36	0.45	3.44	2.02
9	13	120	35	1.47	1.17	1.29	0.33	0.26	4.45	4.50
10	3	120	60	1.20	0.79	0.90	0.34	0.25	3.53	3.16
11	10	148	17	1.61	1.04	1.51	0.31	0.47	5.19	2.21
12	7	148	53	1.19	1.09	1.32	0.34	0.25	3.50	4.36
13	9	160	35	1.32	1.04	1.32	0.33	0.53	4.00	1.96

Los valores de RE_{CHA} muestran que la concentración de CHA en PV fue de 2.5 a 5.2 mayor que la concentración del mismo compuesto en DV. El mayor valor se alcanzó en el

exp. 11 (148 bar - 17 g/min) mientras que el valor más bajo fue para el exp. 1 (80 bar - 35 g/min). Por otra parte, los valores de RE_{CAF} muestran que la concentración de CAF en PV fue aproximadamente de 1.1 (exp. 3, 92 bar - 53 g/min) a 8.2 (exp. 4, 120 bar - 10 g/min) mayor que la concentración de dicho compuesto en DV. En este caso, se alcanzaron los valores más altos de RE_{CAF} a presiones medias y caudales altos de CO_2 .

4.1.1.4. Análisis estadístico del proceso SAF para *Salvia officinalis*

Tras la obtención de los resultados experimentales, se realizó su evaluación estadística con el mismo paquete informático al objeto de optimizar el proceso de concentración de los principios activos CHA, CAF y RA.

De los tres rendimientos considerados, solo Y_{DV} e Y_{SAF} se ajustaron con éxito al modelo matemático CCD que aparece la Ecuación 8. Los coeficientes de esta ecuación se encuentran en la Tabla 8 junto con el nivel de significación correspondiente, p , el coeficiente de regresión, R^2 y la desviación estándar, s . Según el análisis estadístico realizado, Y_{DV} depende de todos los términos, aunque solo el coeficiente de la presión (β_1), el del término cuadrático de la presión (β_{11}) y el del caudal de CO_2 (β_2) son estadísticamente significativos ($p < 0.05$). En cambio, Y_{SAF} solo depende los términos lineales de presión (β_1) y caudal de CO_2 (β_2) junto con el término cuadrático de la presión (β_{11}), siendo estos coeficientes estadísticamente significativos.

Tabla 8. Coeficientes de ajuste de la Ecuación 8 para los rendimientos DV y global (Y_{DV} , Y_{SAF} , respectivamente), ratios de enriquecimiento en PV de los ácidos clorogénico y rosmarínico ($E_{CHA/PV}$, $E_{RA/PV}$, respectivamente) y enriquecimiento relativo del ácido clorogénico (RE_{CHA}) junto con sus correspondientes factores de significación de los términos, p . También se consignan los coeficientes de regresión, R^2 , y la desviación estándar, s , para cada ajuste.

	$Y_{DV} / wt \%$		$Y_{SAF} / wt \%$		$E_{CHA/PV}$		$E_{RA/PV}$		RE_{CHA}	
	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p
β_0	-40.1	0.000	8.8	0.000	-1.17	0.000	-0.341	0.000	-4.84	0.000
β_1	0.982	0.001	1.239	0.019	0.0326	0.013	0.01305	0.000	0.1019	0.008
β_2	-0.242	0.002	-0.2465	0.002	0.0141	0.136	0.0168	0.210	0.0964	0.122
β_{11}	-0.003	0.026	-0.00472	0.008	-0.000083	0.200	-	-	-0.000191	0.315
β_{22}	0.00549	0.082	-	-	0.000114	0.466	-	-	0.000353	0.455
β_{12}	0.00303	0.217	-	-	-0.000218	0.117	-0.000164	0.150	-0.001116	0.019
R^2	90.95	-	80.58	-	73.85	-	79.61	-	79.84	-
s	2.2	-	2.9	-	0.12	-	0.10	-	0.37	-

Los gráficos de contorno correspondientes a las superficies definidas por la Ecuación 8 para Y_{DV} e Y_{SAF} , en función de la presión, X_P , y el caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, se representan en la Figura 37a,b respectivamente. Según se muestra en la Figura 37a, Y_{DV} aumenta con la presión para un caudal de CO_2 determinado, excepto cuando dicho caudal de CO_2 se encuentra entre 35 y 38 g/min, en cuyo caso Y_{DV} aumenta con el aumento de la presión y después disminuye. Este efecto (excluyendo el intervalo de excepción) se acentúa con caudales más bajos. Por otro lado, a una presión fija, Y_{DV} aumenta en general a medida que el caudal de CO_2 disminuye. Para los rangos estudiados el mayor Y_{DV} se encuentra a unos valores de presión alta (entre 130 y 160 bar) y caudal de CO_2 bajo (entre 10 y 14 g/min). Es previsible que puedan encontrarse valores de Y_{DV} mayores a presiones más elevadas y caudales más reducidos de CO_2 .

Por otra parte, tal y como se observa en la Figura 37b, Y_{SAF} aumenta a medida que disminuye el caudal de CO_2 para un valor fijo de presión, mientras que para un valor dado de caudal de CO_2 , en general, Y_{SAF} primero aumenta y después disminuye con la presión. En consecuencia, los valores máximos de Y_{SAF} se obtienen en condiciones bastantes similares a las de Y_{DV} , es decir, a valores altos de presión (109-155 bar) y los valores más bajos de caudal de CO_2 (entre 10 y 20 g/min).

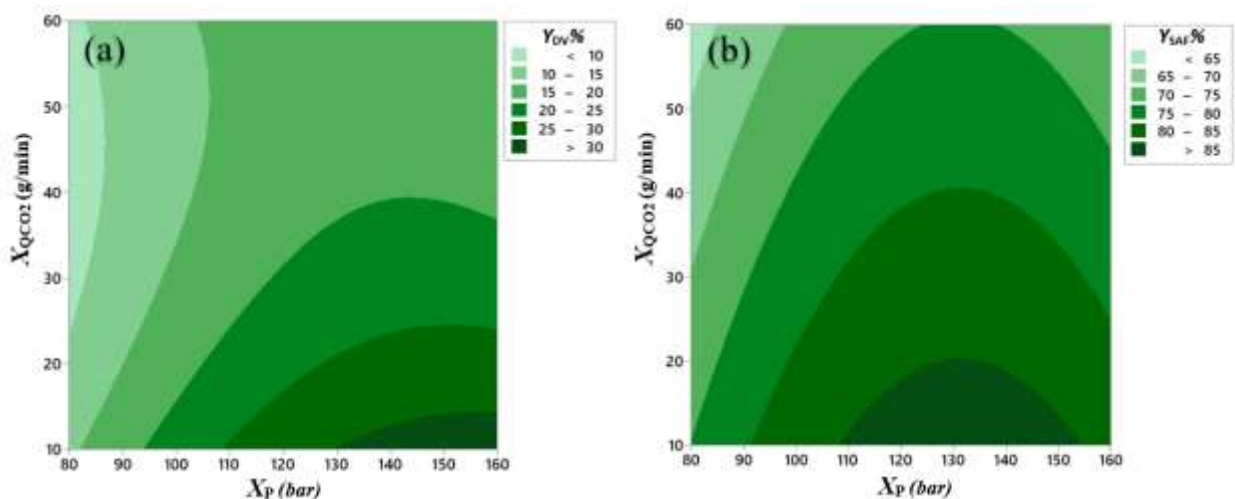


Figura 37. Gráficos de contorno para los rendimientos correspondientes a las fracciones de *S. officinalis*: (a) en DV, $Y_{DV}\%$ y (b) rendimiento global, $Y_{SAF}\%$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$ (g/min).

En cuanto a las ratios de enriquecimiento y enriquecimientos relativos de las especies activas $E_{i/PV}$, $E_{i/PV}$ y RE_i , solo pudieron ajustarse $E_{CHA/PV}$, $E_{RA/PV}$ y RE_{CHA} , que aparecen en la Tabla 8 junto con los coeficientes de ajuste correspondientes a la Ecuación 8.

Como puede apreciarse, $E_{CHA/PV}$ depende de todos los términos, pero solo el coeficiente lineal de la presión (β_1) resultó estadísticamente significativo. $E_{RA/PV}$ no depende de ninguno de los términos cuadráticos y solo el término lineal de la presión (coeficiente β_1) fue estadísticamente significativo. RE_{CHA} depende de todos los términos, siendo estadísticamente significativos solo los coeficientes de la presión (β_1) y del cruzado (β_{12}).

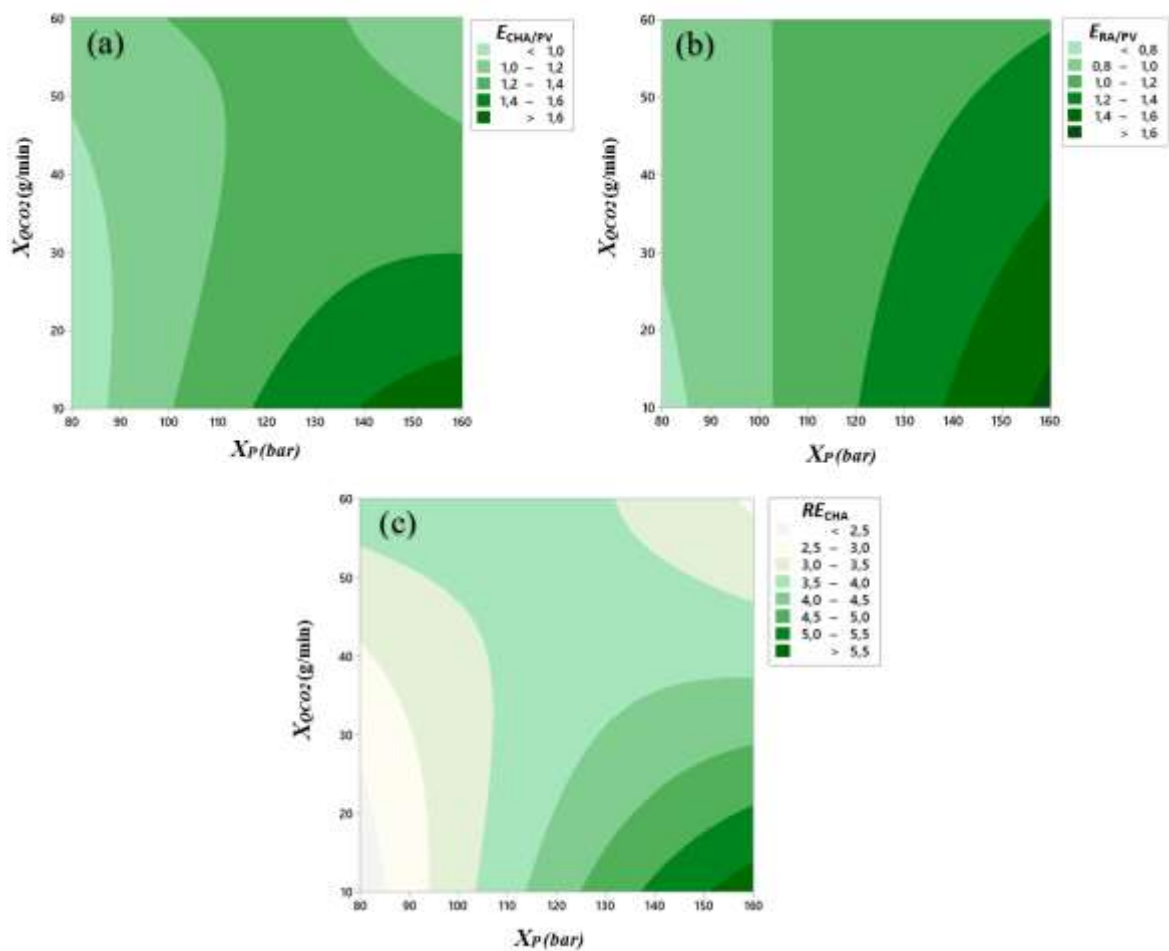


Figura 38. Gráficos de contorno de las ratios de enriquecimiento de *S. officinalis*: (a) $E_{CHA/PV}$; (b) $E_{RA/PV}$ y (c) RE_{CHA} en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO₂, X_{QCO_2} (g/min).

En las Figuras 38a-c se representan los gráficos de contorno correspondientes a las superficies definidas por la Ecuación 8 para estas ratios de enriquecimiento en función de la presión X_P , y del caudal de CO₂, X_{QCO_2} . Como puede observarse en la Figura 38a, a presiones superiores a 116 bar, $E_{CHA/PV}$ disminuye conforme aumenta el caudal de CO₂, sin embargo, a

valores de presión inferiores el caudal apenas tiene influencia en este rendimiento relativo. En cuanto a la influencia de la presión, para caudales inferiores a 46 g/min, $E_{CHA/PV}$ aumenta con la presión, siendo el efecto más pronunciado cuanto menor es el caudal de CO_2 . Entre 46 y 60 g/min, para valores crecientes de presión, $E_{CHA/PV}$ aumenta y posteriormente disminuye. El máximo de este enriquecimiento se obtuvo a valores altos de presión (138-160 bar) y valores bajos de caudal de CO_2 (10-16 g/min).

En la Figura 38b, el gráfico de contorno muestra que por debajo de 120 bar el caudal de CO_2 no tiene ninguna influencia en $E_{RA/PV}$, excepto en los valores de presión más bajos, en los que un aumento de caudal provoca un aumento en $E_{RA/PV}$. A partir de 120 bar, un aumento del caudal conduce a una disminución de $E_{RA/PV}$. Para un determinado caudal de CO_2 , cuanto mayor sea la presión, mayor será $E_{RA/PV}$. Al igual que en el caso de $E_{CHA/PV}$, el máximo de $E_{RA/PV}$ se sitúa en los valores más altos de presión (155-160 bar) y en los más bajos de caudal de CO_2 (entre 10 y 15 g/min).

Analizando la Figura 38c se observa que, hasta 113 bar, al aumentar el caudal de CO_2 RE_{CHA} aumenta. Sin embargo, a valores más altos de presión, se aprecia una disminución al aumentar el caudal. En cuanto a la influencia de la presión, conforme ésta aumenta, RE_{CHA} se incrementa para caudales de CO_2 por debajo de 47 g/min, siendo el efecto más pronunciado cuanto menor es el caudal. Lo contrario ocurre a caudales de CO_2 superiores a 54 g/min. Entre 47 y 54 g/min, RE_{CHA} aumenta para después disminuir. El RE_{CHA} máximo se alcanzó para valores de presión elevados (entre 151 y 160 bar) y valores más bajos de caudal (10-14 g/min).

Siendo que CHA y CAF se encuentran en mayor proporción en PV que en DV y teniendo en cuenta que el ácido rosmarínico solo precipita en PV, se puede concluir que la técnica SAF puede utilizarse para obtener un sólido seco altamente enriquecido en estos tres compuestos antioxidantes. A reserva de las inexactitudes experimentales, el análisis estadístico para el modelo RSM aplicado nos permite obtener mediante *Minitab*® 18 las condiciones de trabajo óptimas para conseguir los máximos valores de $E_{CHA/PV}$, $E_{RA/PV}$, RE_{CHA} e Y_{SAF} . Estas condiciones de trabajo resultaron ser de 148 bar y 10 g/min de caudal de CO_2 .

La justificación de los resultados obtenidos considerando los diversos factores implicados en el proceso de precipitación es muy compleja, especialmente para estos sistemas multicomponentes [151]. La precipitación de compuestos es un proceso cinético

gobernado por una fuerza impulsora [231], que se identifica como la diferencia entre el potencial químico de una solución sobresaturada, μ , y el potencial químico en solución saturada μ_{eq} . El signo de esta diferencia indica si se produce precipitación ($\mu - \mu_{eq} > 0$) o si se produce la disolución en su lugar ($\mu - \mu_{eq} < 0$). Para que se produzca la precipitación es necesario que tengan lugar los procesos primarios de nucleación y crecimiento junto con los procesos secundarios de agregación y ruptura. Es en estos procesos primarios y secundarios donde afecta el flujo.

Centrándonos en la fuerza impulsora del fenómeno de precipitación, es evidente que la solubilidad juega un papel determinante. Específicamente, para los compuestos de interés estudiados, solo existen en la literatura datos experimentales de solubilidad del ácido cafeico en CO₂ y en la mezcla sc-CO₂-EtOH [232,233], tal y como puede observarse en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ_H) para los compuestos considerados, EtOH y CO₂, y solubilidades como fracciones molares, x, en sc-CO₂ y en sc-(CO₂ + EtOH) para los compuestos considerados.

	δ_H	Solubilidad en sc-CO ₂ ^c 10 ⁷ ·x	Solubilidad en sc-(CO ₂ + ethanol) ^c 10 ⁷ ·x
Ácido cafeico	27.3 ^a	0.008 ^d (150 bar) 0.020 ^d (200 bar)	5.8 (200 bar; y _{EtOH} = 0.0223)
Ácido clorogénico	31.8 ^a	-	-
Ácido rosmarínico	33.8 ^a	-	-
EtOH	25.7 ^a	-	-
CO ₂	6.8 – 17.8 ^b	-	-

a Calculado mediante el programa COSMOquick para la aproximación QSRP

b Referencia [234]

c a 313.15 K y presión atmosférica

d Referencia [232]

f Referencia [233]

Teniendo en cuenta las condiciones de trabajo, la sobresaturación del ácido cafeico está garantizada. Con respecto a los ácidos clorogénico y rosmarínico, la sobresaturación es aún mayor debido a su mayor concentración en la alimentación (FS), y a que sus solubilidades son inferiores a las del ácido cafeico según se deduce del parámetro de solubilidad de Hildebrand [89], δ_H , recogido en la Tabla 9. La precipitación completa de RA en la cámara de precipitación (PV) es un fenómeno que ha sido descrito previamente en la

literatura [161,230]. Este hecho podría explicarse principalmente por dos efectos, por un lado, una menor solubilidad en la mezcla de CO₂-EtOH, y por otro lado, la gran sobresaturación del compuesto que favorece el proceso de nucleación y posterior crecimiento de las partículas en comparación con los otros dos compuestos considerados.

Las condiciones óptimas alcanzadas para la máxima recuperación del material inicial y la concentración de ingredientes activos (148 bar, 10 g/min) se pueden explicar de forma similar. El valor del caudal corresponde al extremo inferior del intervalo estudiado, hecho que podría explicarse en base a que esta situación permite, por un lado, una mayor recuperación del rendimiento másico debido a un menor efecto de arrastre, y por otro lado, una mayor precipitación al favorecerse la nucleación. En cuanto a la presión, se puede considerar que, para un flujo determinado, existen dos factores que contribuyen de forma opuesta a la fuerza impulsora: la nucleación y la solubilidad. Ambos factores aumentan con la presión generando un máximo dentro del intervalo considerado [90].

4.1.2. *Calendula officinalis* L.

En los apartados siguientes, se presentan los resultados obtenidos para la concentración de principios activos a partir de extractos de flores de la especie *C. officinalis*, cuyo contenido en agua fue 11.29 ± 0.48 wt %.

4.1.2.1. Extracción SCE y maceración

Las condiciones de trabajo para la realización de la primera etapa de desengrasado mediante SCE, fueron las mismas para todas las especies estudiadas, siendo 350 bar, 40 °C (apartado § 3.2.1.). En el caso de esta especie, el rendimiento de la extracción supercrítica, Y_{SCE} , resultó de 8.3 ± 1.0 wt %, similar al obtenido por D. Baumann et al. (5.5-8.3%) [235] y A. López-Padilla et al. (4.6-7.4%) [236] bajo condiciones de trabajo similares.

También se obtuvo la fracción polar de *Calendula officinalis* por maceración etanólica del material vegetal exhausto tras realizar el desengrasado con CO₂ supercrítico (SCE). El rendimiento de la maceración, Y_{EtOH} , fue del 7.2 ± 0.1 wt %. Otros autores [237] obtuvieron un rendimiento de extracción similar (8.0%), aunque el material vegetal no fue previamente desengrasado y la proporción de masa vegetal (g): EtOH (mL) fue de 1:6 en lugar de 1:10, que es la utilizada en este trabajo.

4.1.1.2. Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente (SAF)

La Tabla 10 muestra los 13 experimentos aleatorizados, generados por el software *Minitab*® 18 (apartado § 3.2.4).

Las fracciones obtenidas en los experimentos SAF de *C. officinalis* fueron diferentes a las del resto de especies vegetales en cuanto a morfología y color. En la fracción de cámara se obtuvo un precipitado pastoso de color marrón-verde oscuro y difícil de recoger por su textura pegajosa, mientras que en la fracción de colector se recogió una disolución de color verde oscuro. En la Figura 39, a modo de ejemplo, se muestran las fracciones obtenidas para el experimento n° 6.

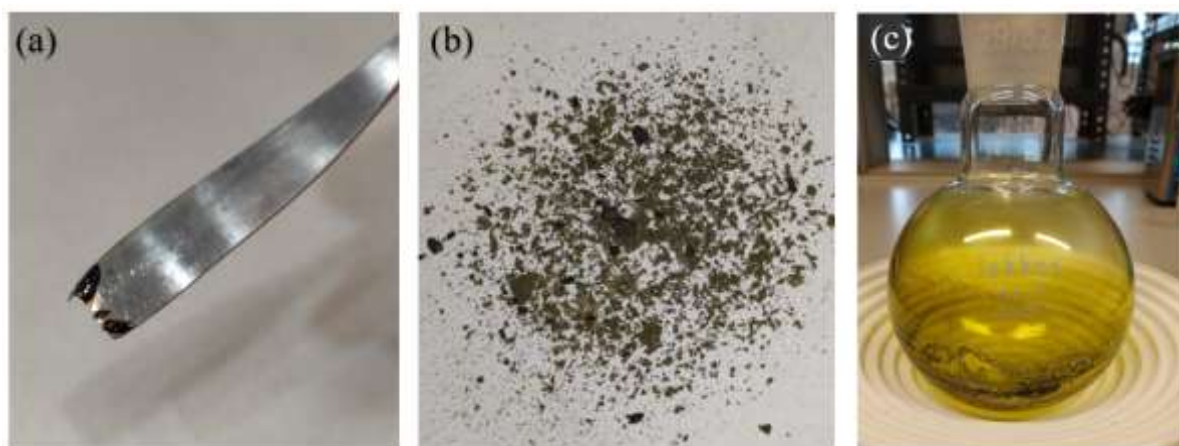


Figura 39. Imágenes correspondientes al experimento número 6 para *Calendula officinalis*: (a,b) precipitado en la fracción de cámara y (c) disolución recogida como fracción de colector.

Los valores experimentales de los rendimientos del proceso SAF, Y_{PV} (wt %), Y_{DV} (wt %) e Y_{SAF} (wt %) en cada uno de los experimentos realizados aparecen en la Tabla 10, junto con el número de experimentos, su orden de ejecución y las condiciones de trabajo para cada uno de ellos. Se observa que Y_{PV} varió de 12.3%(exp. 10; 120 bar - 60 g/min) a 47.0% (exp. 1; 80 bar - 35 g/min), mientras que Y_{DV} osciló entre 1.3% (exp. 1; 80 bar - 35 g/min) y 42.8% (exp. 12; 148 bar - 53 g/min). Además, se puede apreciar que, a bajas presiones, los rendimientos en PV son más altos que los rendimientos en DV, aunque este efecto se va reduciendo a medida que aumenta la presión, llegando a invertirse. La mayor diferencia se

encuentra en el exp. 1, donde Y_{PV} es 36 veces el rendimiento DV. Los rendimientos globales, Y_{SAF} , cambiaron entre 31.1% (exp. 3; 92 bar - 53 g/min) y 73.7% (exp. 12; 148 bar - 53 g/min).

Tabla 10. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *C. officinalis*, junto con los resultados de rendimientos definidos por las Ecuaciones 4 y 5.

N° Exp.	Run	X_P (bar)	$X_{Q_{CO_2}}$ (g/min)	Y_{PV} (wt %)	Y_{DV} (wt %)	Y_{SAF} (wt %)
1	9	80	35	47.0	1.3	48.3
2	4	92	17	41.0	21.5	62.5
3	10	92	53	16.1	15.0	31.1
4	13	120	10	26.0	32.2	58.2
5	2	120	35	26.1	20.3	46.4
6	3	120	35	22.0	25.8	47.8
7	6	120	35	18.5	30.0	48.5
8	7	120	35	15.1	30.5	45.6
9	11	120	35	13.6	29.6	43.2
10	12	120	60	12.3	30.4	42.7
11	8	148	17	23.4	31.3	54.7
12	5	148	53	30.9	42.8	73.7
13	1	160	35	31.1	34.3	65.4

4.1.2.3. Análisis de los extractos obtenidos en SAF

El gradiente de elución aplicado para *C. officinalis* fue el mismo que el empleado con la especie *S. officinalis*: 10% A, 90-40% B, 0-50% C (0-15 min); 10% A, 40-10% B, 50-80% C (15-20 min); 10% A, 10-90% B, 80-0% C (20-25 min) y 10% A, 90% B, 0% C (25-30 min). En la Figura 40 pueden observarse los cromatogramas HPLC para las muestras de FS, PV y DV correspondientes al proceso SAF, con tres picos bien identificados para tres de los compuestos estudiados: ácido clorogénico, CHA, ácido cafeico, CAF, y ácido ferúlico, FA, así como sus tiempos de retención. La cuantificación de estos compuestos se realizó mediante rectas de calibrado que se recogen en el Anexo IV.2.

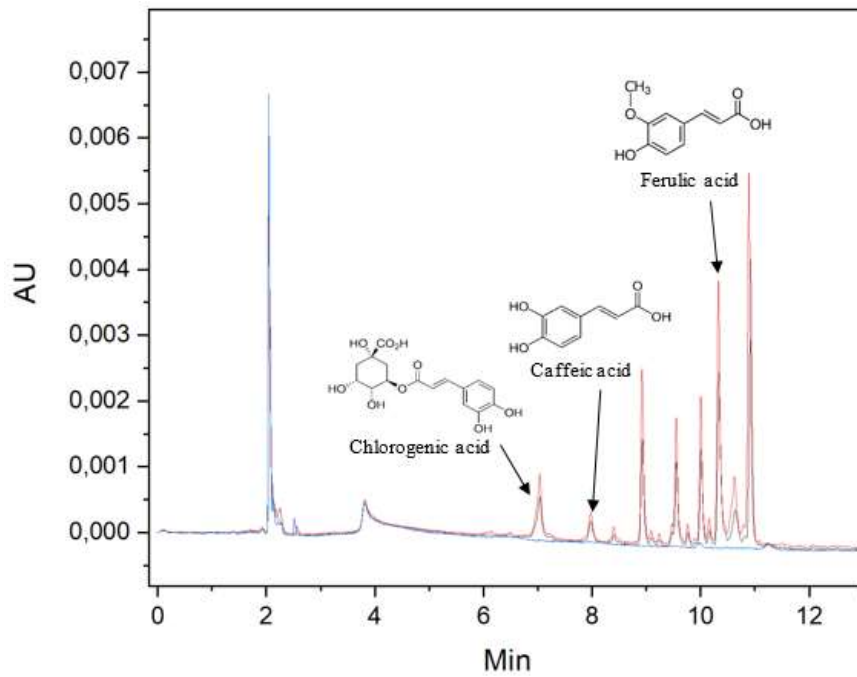


Figura 40. Cromatograma de los extractos de *Calendula officinalis*. CHA ($T_R = 7.04$ min, $\lambda = 324$ nm), CAF ($T_R = 7.98$ min, $\lambda = 324$ nm) y FA ($T_R = 10.33$ min, $\lambda = 324$ nm). Fracciones: PV línea roja, FS línea negra, DV línea azul.

Para esta especie vegetal además de las ratios de enriquecimiento en cámara ($E_{i/PV}$), o en colector ($E_{i/DV}$) definidas en la Ecuación 7, se calculó también el enriquecimiento global en la fracción PV correspondiente a los tres compuestos fenólicos considerados. Ampliando la Ecuación 7, resulta la Ecuación 15:

$$E_{ALL/PV} = \frac{C_{CHA/PV} + C_{CAF/PV} + C_{FER/PV}}{C_{CHA/FS} + C_{CAF/FS} + C_{FER/FS}} \quad (15)$$

donde C (wt %) hace referencia a la concentración de los tres compuestos analizados, CHA, CAF y FER y PV, FS a la fracción analizada.

Los enriquecimientos E_{ij} y $E_{ALL/PV}$ calculados mediante las Ecuaciones 7 y 15, se recogen en la Tabla 11 para todos los experimentos realizados. No se incluye $E_{i/DV}$ ya que la ninguna de las cantidades de los tres compuestos analizados (FA, CAF, CHA) alcanzó el límite de detección cromatográfico, lo que indica que se encuentran esencialmente en PV.

Tabla 11. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *C. officinalis*, junto con los resultados de ratios de enriquecimientos y enriquecimiento global definidos por las Ecuaciones 7 y 15.

N° Exp.	Run	X_P (bar)	$X_{Q_{CO_2}}$ (g/min)	$E_{CHA/PV}$	$E_{CAF/PV}$	$E_{FA/PV}$	$E_{ALL/PV}$
1	9	80	35	0.86	1.19	0.69	0.79
2	4	92	17	1.04	1.25	1.10	1.09
3	10	92	53	1.08	1.33	1.16	1.21
4	13	120	10	1.51	1.48	1.67	1.64
5	2	120	35	1.53	1.36	1.55	1.52
6	3	120	35	1.52	1.37	1.54	1.52
7	6	120	35	1.40	1.44	1.56	1.66
8	7	120	35	1.59	1.40	1.73	1.66
9	11	120	35	1.72	1.39	1.70	1.67
10	12	120	60	1.14	1.30	1.25	1.27
11	8	148	17	1.18	1.40	1.32	1.32
12	5	148	53	1.33	1.41	1.52	1.46
13	1	160	35	1.28	1.37	1.55	1.46

4.1.2.4. Análisis estadístico del proceso SAF para *Calendula officinalis*

Se desarrollan a continuación los resultados derivados de la evaluación estadística del proceso SAF con el objetivo de optimizar el proceso de concentración de los compuestos bioactivos CHA, CAF y FA.

Los coeficientes de la Ecuación 8 obtenidos para Y_{PV} , Y_{DV} e Y_{SAF} aparecen consignados en la Tabla 12, junto con su nivel de significancia p , el coeficiente R^2 y las desviaciones s correspondientes al modelo matemático aplicado. El análisis estadístico revela que Y_{PV} depende de todos los términos (β_1 , β_2 , β_{11} y β_{12}), exceptuándose el término cuadrático del flujo de CO_2 (β_{22}) y todos ellos son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) a excepción del término de presión (β_1). Y_{DV} e Y_{SAF} dependen de que todos los términos, siendo todos ellos estadísticamente significativos únicamente para el caso de Y_{SAF} . Para Y_{DV} los términos estadísticamente significativos son la presión (β_1), el término cuadrático de presión (β_{11}) y el término cruzado (β_{12}).

Tabla 12. Coeficientes de ajuste de la Ecuación 8 para los rendimientos PV, DV y global (Y_{PV} , Y_{DV} , Y_{SAF} , respectivamente), ratios de enriquecimiento en PV de los ácidos clorogénico y ferúlico ($E_{CHA/PV}$, $E_{FA/PV}$, respectivamente) y enriquecimiento total ($E_{ALL/PV}$) junto con sus correspondientes factores de significación de los términos, p . También se consignan los coeficientes de regresión, R^2 , y la desviación estándar, s , para cada ajuste.

	$Y_{PV} / wt \%$		$Y_{DV} / wt \%$		$Y_{SAF} / wt \%$		$E_{CHA/PV}$		$E_{FA/PV}$		$E_{ALL/PV}$	
	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p
β_0	284.3	0.000	-40.3	0.000	242.6	0.000	-3.889	0.000	-4.11	0.000	-3.840	0.000
β_1	-3.594	0.075	1.241	0.000	-2.343	0.000	0.0796	0.026	0.0835	0.003	0.0802	0.004
β_2	-2.204	0.019	-1.691	0.833	-3.835	0.003	0.0253	0.381	0.0160	0.454	0.0166	0.479
β_{11}	0.01215	0.000	-0.00493	0.035	0.00717	0.001	-0.000314	0.001	-0.000315	0.002	-0.000308	0.001
β_{22}	-	-	0.00898	0.105	0.00812	0.040	-0.000395	0.034	-0.000262	0.189	-0.000264	0.125
β_{12}	0.01620	0.006	0.00900	0.058	0.02520	0.000	-	-	-	-	-	-
R^2	88.28	-	91.26	-	96.74	-	83.00	-	82.91	-	84.54	-
s	4.42	-	4.00	-	2.66	-	0.13	-	0.15	-	0.13	-

En la Figura 41, se muestran las gráficas de contorno correspondientes a las superficies definidas por la Ecuación 8 para todos los rendimientos (Y_{PV} , Y_{DV} e Y_{SAF} como 39a, 39b y 39c respectivamente). En la Figura 41a se observa que para caudales superiores a 12 g/min e inferiores a 24 g/min, Y_{PV} disminuye a medida que aumenta la presión, mientras que para caudales de CO_2 fuera de este rango, Y_{PV} primero disminuye y después aumenta a medida que aumenta la presión. Para una presión fija, un aumento en el caudal hace que Y_{PV} disminuya, excepto para altas presiones, para las cuales un mayor valor del caudal de CO_2 supone un aumento en Y_{PV} . Para los rangos estudiados de presión y caudal, el rendimiento Y_{PV} más alto se encuentra a bajas presiones (80-83 bar) y a bajos caudales de CO_2 (10-16 g/min). Otro máximo en el rendimiento Y_{PV} se puede encontrar a altas presiones y caudales de CO_2 (133-160 bar, 51-60 g/min).

De acuerdo con la Figura 41b, Y_{DV} aumenta a medida que aumenta la presión para un caudal de CO_2 establecido. Por otro lado, para una presión fija, se observa un comportamiento diferente si la presión es inferior o superior a 133 bar: para presiones bajas a medida que aumenta el flujo, Y_{DV} disminuye, mientras que el efecto contrario se observa a presiones más altas. De hecho, el valor de Y_{DV} más alto se encuentra para altas presiones y caudales de CO_2 (133-160 bar, 47-60 g/min). Esto puede deberse a una mayor solubilidad de los componentes y un mayor efecto de arrastre de los solutos hacia DV. Analizando la Figura 41c se puede observar que Y_{SAF} sigue un comportamiento similar al de Y_{PV} , es decir, la recuperación global de solutos de la solución de alimentación es mínima a bajas presiones y

altos caudales de CO₂, mientras que Y_{SAF} es máximo cuando las dos variables alcanzan sus máximos (158-160 bar, 59-60 g/min) o mínimos (80-83 bar, 10-12 g/min) valores simultáneamente, en los intervalos considerados.

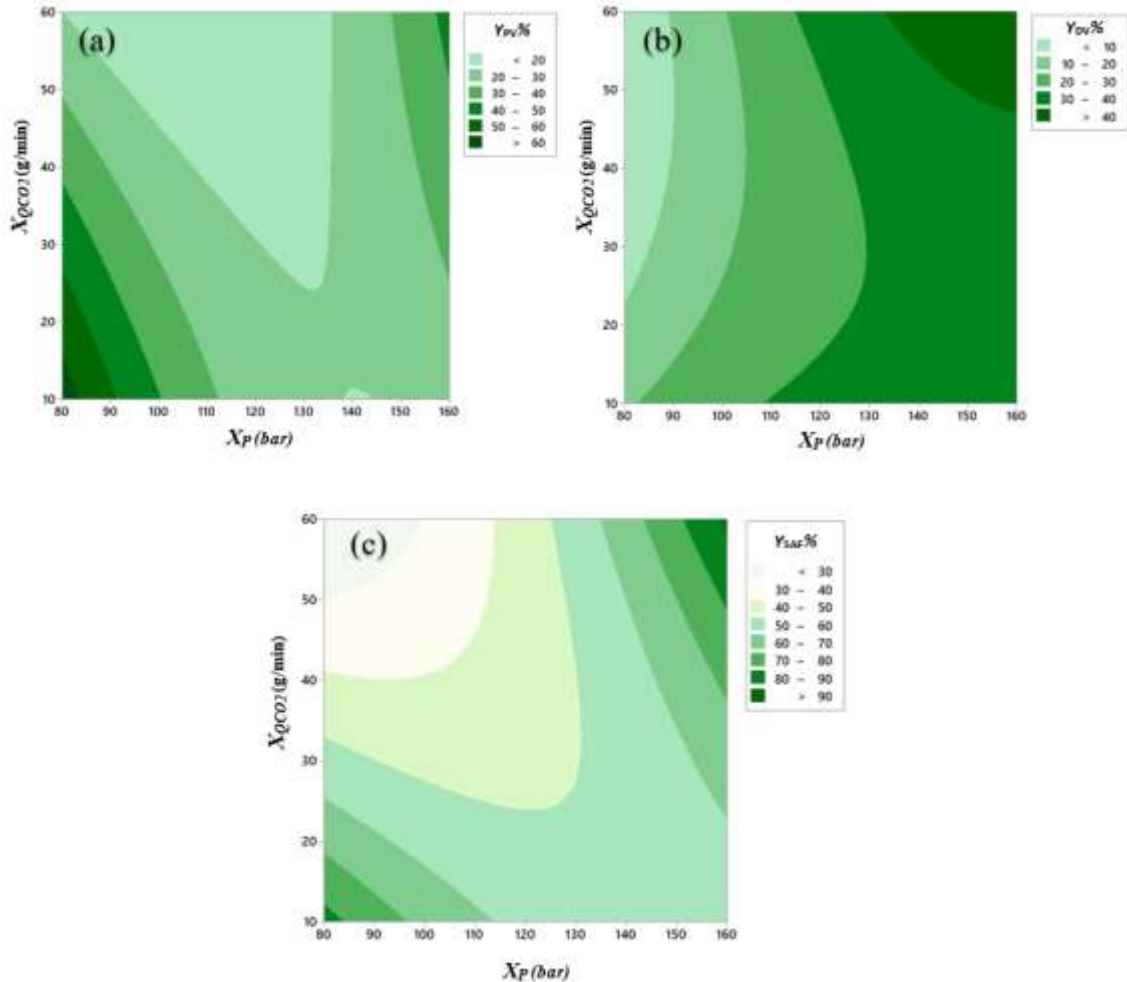


Figura 41. Gráficos de contorno para los rendimientos correspondientes a las fracciones de *C. officinalis*: (a) en PV, $Y_{PV}\%$; (b) en DV, $Y_{DV}\%$ y (c) rendimiento global, $Y_{SAF}\%$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO₂, X_{QCO_2} (g/min).

En lo referente a las ratios de enriquecimiento y enriquecimiento global, solo $E_{CHA/PV}$, $E_{FA/PV}$ y $E_{ALL/PV}$ se ajustaron correctamente a la Ecuación 8. Los coeficientes de ajuste de esta ecuación se muestran en la Tabla 12, donde se puede apreciar que $E_{CHA/PV}$ depende de todos los términos excepto del cruzado (β_{12}), siendo todos ellos significativos ($p < 0.05$) a excepción del término lineal del caudal de CO₂ (β_2). $E_{FA/PV}$ y $E_{ALL/PV}$ también dependen de todos los términos, excepto del cruzado (β_{12}), aunque solo los términos de presión lineal y cuadrático (β_1, β_{11}) son significativos.

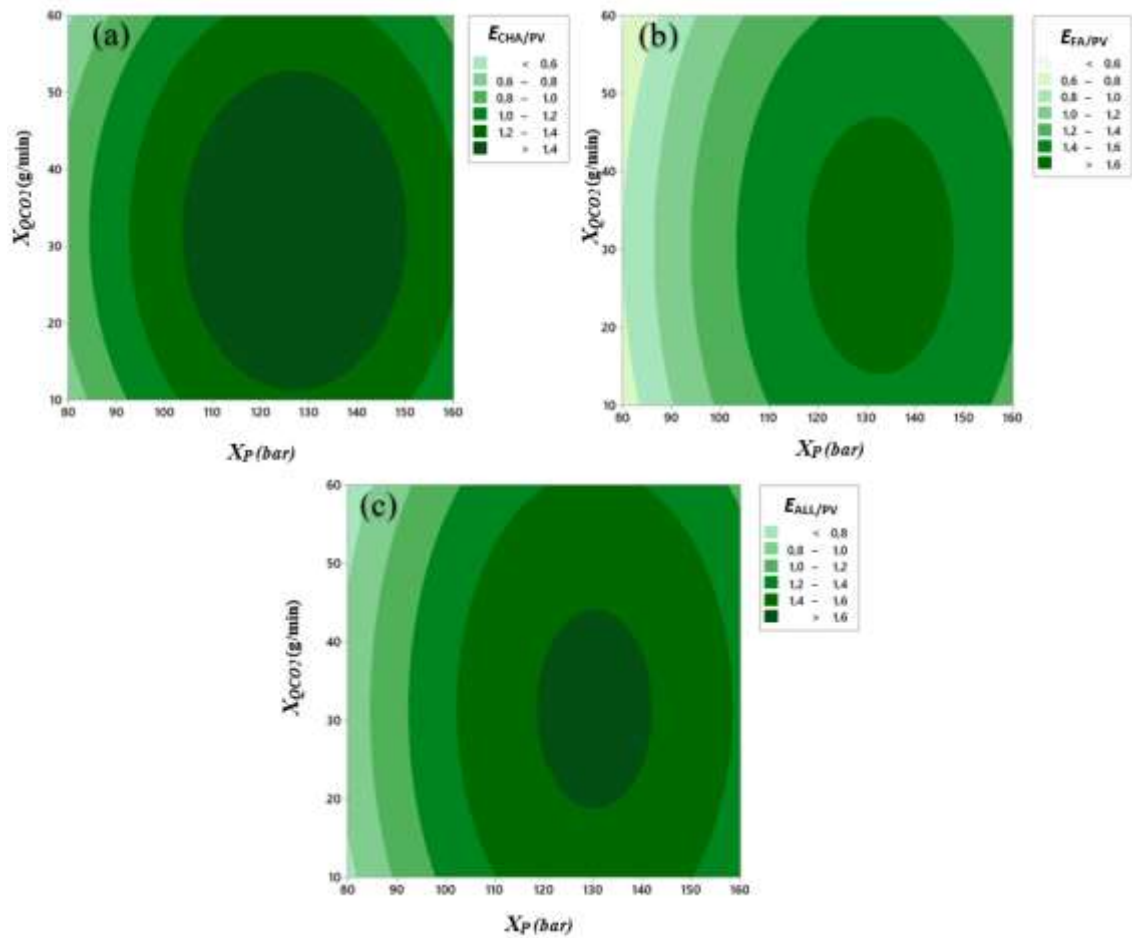


Figura 42. Gráficos de contorno de las ratios de enriquecimiento de *C. officinalis*: (a) $E_{CHA/PV}$; (b) $E_{FA/PV}$ y (c) $E_{ALL/PV}$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO₂, X_{QCO_2} (g/min).

Las Figuras 42a a 42c muestran las gráficas de contorno correspondientes a la superficie definida por la Ecuación 8 para las ratios de enriquecimiento $E_{CHA/PV}$, $E_{FA/PV}$ y $E_{ALL/PV}$. Como muestra la Figura 42a, $E_{CHA/PV}$ aumenta a medida que aumenta la presión y luego disminuye a valores de presión más altos. Para una presión fija, la ratio $E_{CHA/PV}$ se comporta de manera similar a medida que aumenta el caudal de CO₂. Por tanto, el máximo se ubica en la zona central, con valores de presión entre 104-150 bar y caudales de CO₂ de 12-53 g/min. $E_{FA/PV}$ y E_{ALL} tienen un comportamiento similar tal y como se puede observar en las Figuras 42b y 42c. El máximo de $E_{FA/PV}$ se encuentra para valores de presión medio-alto (117-147 bar) y valores intermedios de caudal de CO₂ (14-47 g/min) dentro de los intervalos considerados. Para el enriquecimiento de los tres antioxidantes, $E_{ALL/PV}$, su zona máxima se encuentra en valores intermedios tanto de presión como de caudal de CO₂ (118-142 bar, 18-44 g/min).

El hecho de que todos los compuestos analizados, CHA, FA y CAF se queden retenidos en PV hace que la técnica SAF sea perfecta para obtener una fracción enriquecida en estos compuestos antioxidantes. Dentro de la cautela derivada de las inexactitudes experimentales, el modelo CCD aplicado proporciona las condiciones de trabajo adecuadas para lograr un enriquecimiento significativo de los compuestos de interés. Los valores óptimos de rendimiento y enriquecimiento, proporcionados por el modelo CCD aplicado, se pueden obtener trabajando en condiciones de 153 bar y 42 g/min.

En relación con el tratamiento físico-matemático del proceso SAF considerado, se puede indicar que existen similitudes cercanas con los conocidos procesos de precipitación antidisolvente supercrítica (SAS) adecuados para la producción de polvos finos, o incluso compuestos que incluyen una sustancia bioactiva y un polímero. Sin embargo, el modelado SAF aquí aplicado resulta ser mucho más complejo porque en los extractos naturales estudiados en este trabajo se manejan mezclas que consisten en un alto número de componentes. Tentativamente, la mayoría de los desarrollos para los diferentes pasos implícitos en SAS podrían adaptarse a SAF [151]. Existen diversos artículos especializados en el proceso SAS, tanto sobre el modelado de todo el conjunto de mecanismos involucrados [238–240], como de aquellos específicos, tales como la ruptura del *jet* de solución de alimentación en la corriente de CO₂ supercrítico [241–243], transferencia de masa entre gotas de solución orgánica y el antidisolvente comprimido [244–246], tasa de sobresaturación y nucleación [231,247,248], mecanismo de crecimiento [249], o la influencia de las variables en la precipitación [250]. Sin embargo, y tal como se ha indicado, una modelización detallada del proceso SAF es una tarea tan compleja, por el alto número de componentes que se procesan, que el estudio teórico riguroso se hace prácticamente inextricable. Además, pueden ocurrir procesos de reacción o asociación entre los diferentes componentes. Por lo tanto, y de acuerdo con nuestro conocimiento, hasta la fecha, no hay publicaciones sobre un modelado teórico detallado de SAF.

En relación con esta especie vegetal, se puede señalar que las disoluciones de alimentación presentan cierto carácter pastoso que puede deberse a que componentes como resinas o mucílago [89,90] no están completamente solubilizados. La presencia de este material sólido podría inducir un proceso muy eficaz de nucleación heterogénea [231]. Es así como se produce una precipitación prácticamente completa de las especies menos solubles y

que, en nuestro caso, generaría la precipitación total en PV de los ampliamente sobresaturados CAF, CHA y FA.

Las condiciones de trabajo para un rendimiento y valores de enriquecimiento óptimos (153 bar, 42 g/min) se sitúan cerca del valor extremo del intervalo de presión considerado. Como en el caso de *S. officinalis*, esto podría explicarse por los efectos opuestos que tienen lugar tanto para el aumento del caudal de CO₂ como para la presión. Un aumento del caudal de CO₂ implica un mayor efecto de arrastre, pero también favorece una mejor mezcla y nucleación. Por su parte, el aumento de la presión aumenta la solubilidad, pero favorece la nucleación de los solutos.

4.1.3. *Melissa officinalis* L.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para la concentración de activos a partir de extractos de hojas de la especie *M. officinalis*, cuyo contenido en agua fue 10.60 ± 0.74 wt %.

4.1.3.1. Extracción SCE y maceración

El rendimiento de la etapa de desengrasado mediante SCE, Y_{SCE} , de esta especie fue de 1.9 ± 0.8 wt %, ligeramente superior a los rendimientos obtenidos por A. Bogdanovic et al. (0.8-1.4%) [251] bajo condiciones de extracción similares.

Una vez eliminados los compuestos no polares del material vegetal mediante esta extracción SCE, se realiza una maceración en etanol para obtener la fracción polar, rica en compuestos antioxidantes de interés. El rendimiento etanólico, Y_{EtOH} , de esta maceración fue del 5.2 ± 0.1 wt %.

4.1.1.2. Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente (SAF)

Los 13 experimentos generados por el software *Minitab*® 18, junto con su orden de ejecución y las condiciones de trabajo para cada uno de ellos, se recogen en la Tabla 13.

En el caso de *M. officinalis*, para la mayor parte de los experimentos del proceso SAF la fracción de la cámara PV consistió en un polvo verde-amarillento, mientras que la fracción del colector DV fue una disolución verde oscuro, tal como se muestra en la Figura 43.

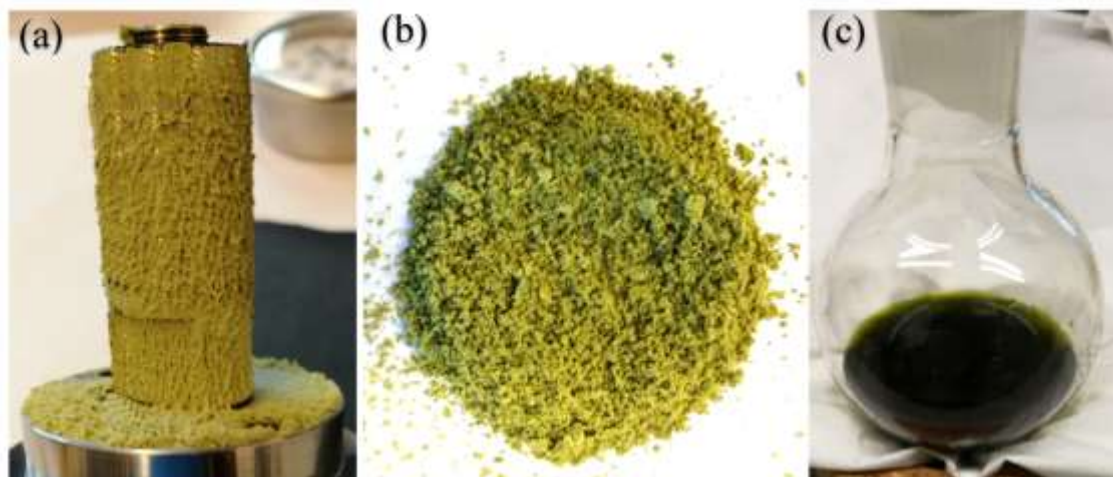


Figura 43. Imágenes de las fracciones obtenidas en el experimento número 11 de *Melissa officinalis*: (a,b) polvo precipitado correspondiente a la fracción de cámara y (c) disolución recogida como fracción de colector.

Además de los parámetros propios del diseño experimental aplicado, en la Tabla 13 se muestran también los valores experimentales de los rendimientos de SAF Y_{PV} (wt %), Y_{DV} (wt %) e Y_{SAF} (wt %) para cada una de las experiencias realizadas.

Se observa que Y_{PV} varió de 50.8% (exp. 1; 160 bar - 35 g/min) a 77.9% (exp. 5; 120 bar - 35 g/min) y es mayor que Y_{DV} en todos los experimentos. En el caso del exp. 13 Y_{PV} es sólo 2.9 veces mayor que Y_{DV} , pero para el exp. 4, Y_{PV} alcanza a ser 8 veces mayor que Y_{DV} , lo que significa que la mayoría de los compuestos contenidos en *Melissa officinalis* principalmente precipitan en fracción PV. Y_{DV} alcanzó valores entre el 7.4% (exp. 1; 80 bar - 35 g/min) y el 22.6% (exp. 4; 120 bar - 10 g/min). Por otra parte, el rendimiento global, Y_{SAF} , osciló entre el 66.7% y el 95.1%. Cabe destacar que este último valor es singularmente alto en comparación con el resto de las especies vegetales estudiadas con el equipo SAF utilizado.

Tabla 13. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{\text{CO}_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *M. officinalis*, junto con los rendimientos definidos por las Ecuaciones 4 y 5.

N° Exp.	Run	X_P (bar)	$X_{Q_{\text{CO}_2}}$ (g/min)	Y_{PV} (wt %)	Y_{DV} (wt %)	Y_{SAF} (wt %)
1	4	80	35	59.2	7.4	66.7
2	8	92	17	71.6	19.4	91.0
3	11	92	53	64.1	12.5	76.6
4	5	120	10	72.5	22.6	95.1
5	1	120	35	73.1	9.7	82.8
6	6	120	35	67.9	14.9	82.9
7	7	120	35	77.9	12.3	90.2
8	9	120	35	74.3	15.3	89.6
9	12	120	35	72.3	11.7	84.0
10	2	120	60	52.8	15.1	67.8
11	10	148	17	60.9	18.7	79.6
12	3	148	53	50.9	16.3	67.2
13	13	160	35	50.8	17.6	68.4

4.1.3.3. Análisis HPLC de los extractos obtenidos en SAF

Para la identificación y cuantificación mediante HPLC de los compuestos seleccionados en las fracciones del proceso SAF de *Melissa officinalis*, se utilizó un gradiente diferente del utilizado con las especies anteriores. Este gradiente de elución fue el siguiente: 10% A, 90-0% B, 0-90% C (0-18 min); 10% A, 0% B, 90% C (18-20 min); 10% A, 0-90% B, 90-0% C (20-25 min) y 10% A, 90% B, 0% C (25-30 min).

En la Figura 44 puede observarse los picos correspondientes a los compuestos identificados para esta especie, ácido cafeico (CAF) y ácido rosmarínico (RA) para las muestras de la disolución de alimentación (FS) representada con color azul, y las fracciones de cámara (PV), en negro, y del colector (DV), en rojo, así como sus tiempos de retención. Tal y como se observa en el cromatograma, el pico correspondiente al RA es muy acusado para FS y PV con respecto al resto de picos que aparecen, lo que indica que esta especie vegetal es rica en dicho compuesto en comparación con las otras especies estudiadas. Este hallazgo está en consonancia con los datos bibliográficos [252,253]. La cuantificación de los compuestos

identificados, CAF y RA se llevó a cabo mediante las rectas de calibrado que aparecen en el Anexo IV.3.

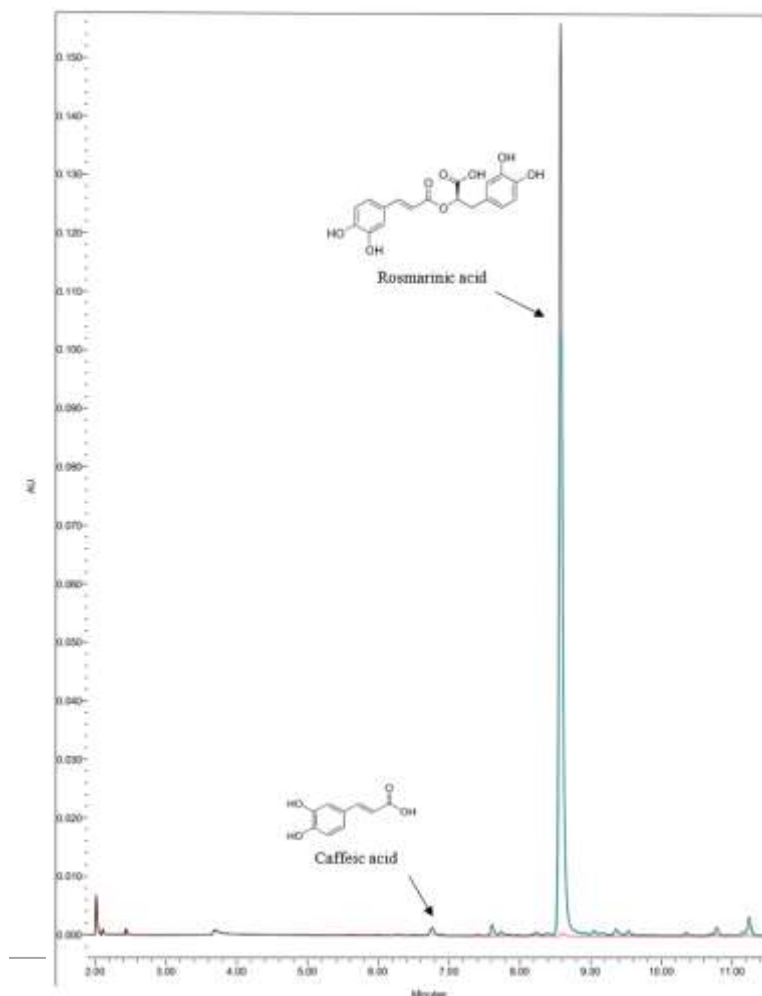


Figura 44. Cromatograma de extractos de *Melissa officinalis*. CAF ($T_R = 6.78$ min, $\lambda = 324$ nm), RA ($T_R = 8.61$ min, $\lambda = 324$ nm). Fracciones: PV línea negra, FS línea azul, DV línea roja.

Los parámetros de enriquecimiento E_{ij} definidos por la ecuación 7 se recogen en la Tabla 14 para todos los experimentos del diseño CCD. Se puede observar que no aparecen valores de $E_{i/DV}$ para el ácido rosmarínico (RA) ya que su escasa cantidad es difícilmente cuantificable. Además, también se observa que para la mayoría de los experimentos, el ácido cafeico (CAF) está más concentrado en la fracción PV que en la fracción DV, llegando a alcanzar valores de hasta 5.4 veces (exp. 10). Estos efectos también se pudieron observar para *Salvia officinalis*, para la que RA se retuvo completamente en la fracción PV y CAF se distribuyó entre las fracciones PV y DV [254].

Tabla 14. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *M. officinalis*, junto con las ratios de enriquecimientos definidas por la Ecuación 7.

N° Exp.	Run	X_P (bar)	$X_{Q_{CO_2}}$ (g/min)	$E_{CAF/PV}$	$E_{RA/PV}$	$E_{CAF/DV}$
1	4	80	35	0.81	0.93	0.00
2	8	92	17	0.65	0.98	1.01
3	11	92	53	1.19	1.14	0.00
4	5	120	10	0.62	1.11	1.74
5	1	120	35	0.78	1.13	0.36
6	6	120	35	0.87	1.18	0.52
7	7	120	35	0.77	1.03	0.52
8	9	120	35	0.97	1.15	0.45
9	12	120	35	0.90	1.11	0.62
10	2	120	60	1.08	1.31	0.20
11	10	148	17	0.84	1.36	1.43
12	3	148	53	0.81	1.28	0.50
13	13	160	35	0.78	1.27	0.69

4.1.3.4. Análisis estadístico del proceso SAF para *M. officinalis*

Con el objetivo de optimizar el proceso de concentración de los principios activos CAF y RA, se realizó la evaluación estadística de los resultados experimentales obtenidos mediante el software *Minitab*® 18.

Todos los rendimientos del proceso SAF (Y_{PV} , Y_{DV} e Y_{SAF}) se ajustaron correctamente al modelo descrito por la Ecuación 8. En la Tabla 15 se recogen los coeficientes para cada uno de los rendimientos considerados, así como su nivel de significancia, p y el coeficiente R^2 del modelo junto con su desviación s . El análisis estadístico indica que todos los rendimientos dependieron de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del término de caudal de CO_2 (β_2) y del término de presión (β_1), con excepción de Y_{SAF} ($\beta_1 p > 0.05$). Y_{DV} también depende del término cuadrático del caudal de CO_2 (β_{12}) de forma estadísticamente significativa, mientras que en el caso de Y_{SAF} ocurre lo mismo con el término cuadrático de la presión (β_{11}). Y_{PV} depende de ambos términos también de forma significativa. El término cruzado (con β_{12}) no fue necesario para ninguno de los casos.

Tabla 15. Coeficientes de ajuste de la Ecuación 8 para los rendimientos PV, DV y global (Y_{PV} , Y_{DV} , Y_{SAF} , respectivamente), ratios de enriquecimiento en PV de los ácidos clorogénico y ferúlico ($E_{CHA/PV}$, $E_{FA/PV}$, respectivamente) y enriquecimiento total ($E_{ALL/PV}$) junto con sus correspondientes factores de significación de los términos, p . También se consignan los coeficientes de regresión, R^2 , y la desviación estándar, s , para cada ajuste.

	$Y_{PV} / wt \%$		$Y_{DV} / wt \%$		$Y_{SAF} / wt \%$		$E_{CA/PV}$		$E_{RA/PV}$		$E_{CA/DV}$	
	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p
β_0	-63.0	0.000	21.4	0.000	-33.0	0.000	-0.514	0.000	0.228	0.000	1.508	0.000
β_1	2.321	0.008	0.0767	0.023	2.318	0.185	0.00899	0.259	0.00841	0.000	0.00839	0.000
β_2	0.679	0.002	-0.871	0.012	0.4619	0.001	0.04247	0.000	0.00428	0.033	-0.08852	0.000
β_{11}	0.01033	0.000	-	-	0.001	0.001	-	-	-	-	-	-
β_{22}	-0.01429	0.001	0.01043	0.004	-	-	-	-	0.000169	0.022	0.000849	0.000
β_{12}	-	-	-	-	-	-	0.000286	0.002	0.000113	0.053	-	-
R^2	90.42	-	78.22	-	84.81	-	85.92	-	89.87	-	97.42	-
s	3.59	-	2.24	-	4.52	-	0.07	-	0.05	-	0.09	-

Las gráficas de contorno, definidas por la Ecuación 8, para Y_{PV} , Y_{DV} e Y_{SAF} se representan en la Figura 45a, 45b y 45c respectivamente. En el caso de Y_{PV} , se puede observar que el rendimiento aumenta y posteriormente disminuye a medida que aumenta la presión, efecto que es más fuerte para flujos intermedios-bajos, mientras que el caudal de CO_2 influye principalmente de forma inversa, disminuyendo el rendimiento a medida que aumenta el flujo. Este mismo efecto se puede observar en el caso de Y_{SAF} , que se comporta de manera similar a Y_{PV} . Para los rangos de presión y caudales estudiados, el máximo de Y_{PV} se encuentra en el rango intermedio de presiones (89-135 bar) y caudales de CO_2 (10-43 g/min), mientras que el máximo para Y_{SAF} se encuentra en un rango intermedio de presión (90-142) pero a valores más bajos de caudal de CO_2 (10-25 g/min). Es destacable la similitud entre las gráficas de contorno correspondientes al rendimiento total, Y_{SAF} , obtenidas para esta planta y para *S. officinalis*.

Por otro lado, como se puede ver en la Figura 45b, Y_{DV} aumenta conforme aumenta la presión, mientras que el incremento del caudal primero aumenta Y_{DV} y después lo disminuye. El Y_{DV} máximo se encuentra en valores más elevados del intervalo de presión (154-160 bar) y los valores más bajos de caudal de CO_2 (10-12 g/min), aunque también se puede intuir que a valores altos de caudal podría haber otro máximo.

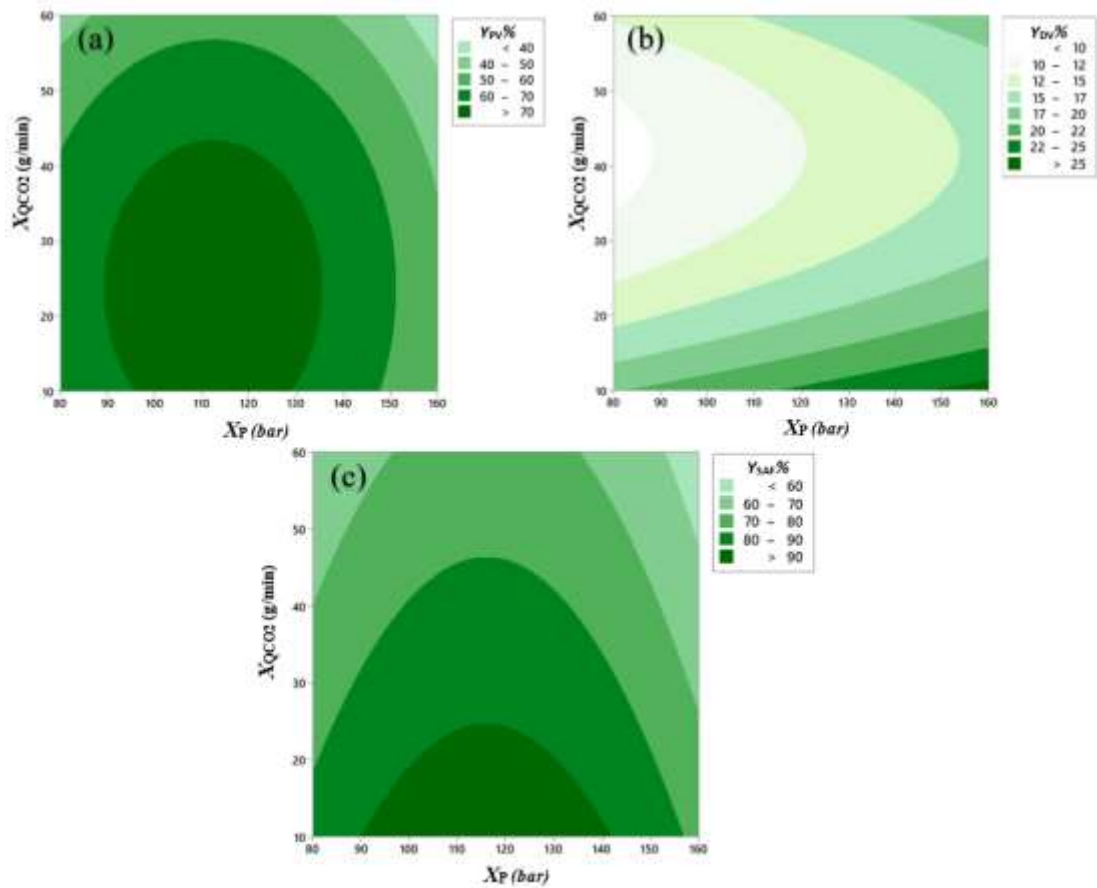


Figura 45. Gráficos de contorno para los rendimientos correspondientes a las fracciones de *M. officinalis*: (a) en PV, $Y_{PV}\%$; (b) en DV, $Y_{DV}\%$ y (c) rendimiento global, $Y_{SAF}\%$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$ (g/min).

En cuanto al análisis estadístico de las ratios de enriquecimiento de las especies activas en la fracción de cámara, $E_{i/PV}$, y en la fracción de colector, $E_{i/DV}$, solo pudieron ajustarse $E_{RA/PV}$, $E_{CAF/PV}$ y $E_{CAF/DV}$, que se recogen en la Tabla 15, junto los coeficientes de ajuste correspondientes a la Ecuación 8. En esta tabla se puede observar que $E_{CAF/PV}$ depende únicamente de los términos lineales de presión (β_1) y caudal de CO_2 (β_2), junto con el término cruzado (β_{12}), siendo todos ellos estadísticamente significativos a excepción del término β_1 . Por otro lado, $E_{RA/PV}$ depende de los mismos términos (β_1 , β_2 , β_{12}) junto con el término cuadrático de caudal de CO_2 (β_{22}), siendo todos ellos estadísticamente significativos excepto el término β_{12} . $E_{CAF/DV}$ se comporta de manera similar a $E_{CAF/PV}$ pero en lugar de depender del término cruzado (β_{12}), depende del término cuadrático del caudal de CO_2 (β_{22}), siendo todos los coeficientes significativamente estadísticos.

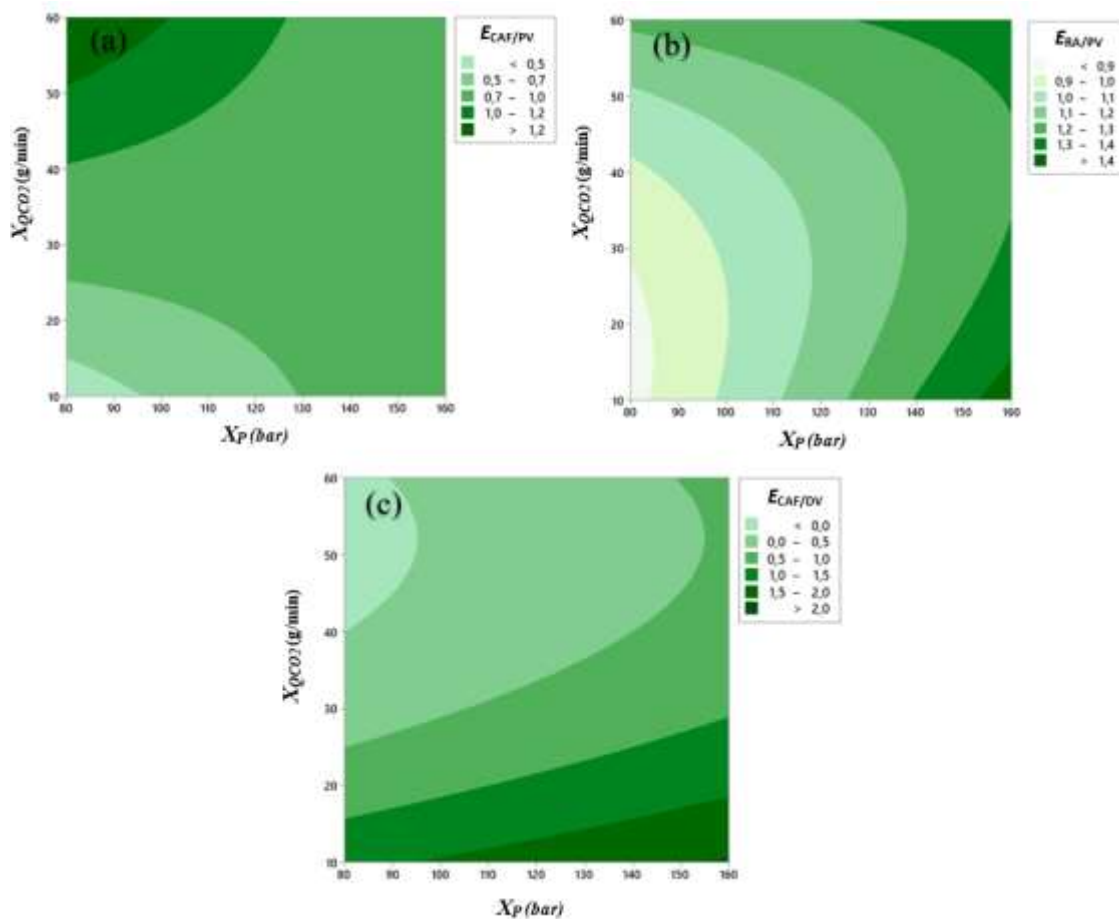


Figura 46. Gráficos de contorno de las ratios de enriquecimiento de *M. officinalis*: (a) $E_{CAF/PV}$; (b) $E_{RA/PV}$ y (c) $E_{CAF/DV}$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$ (g/min).

Al igual que en el caso de los rendimientos SAF, los gráficos de contorno para $E_{RA/PV}$, $E_{CAF/PV}$ y $E_{CAF/DV}$ están representadas en la Figura 46a-c. Para $E_{CAF/PV}$, como se puede ver en la Figura 46a, un aumento de la presión, a bajos caudales de CO_2 , implica un aumento en la ratio de enriquecimiento, mientras que a bajos caudales de CO_2 ocurre lo contrario y a medida que aumenta la presión, $E_{CAF/PV}$ disminuye. Para valores intermedios de caudal (25-40 g/min) apenas hay variación con la presión. Por otro lado, a una presión dada (inferior a 129 bar), se puede observar que un aumento en el caudal de CO_2 siempre genera un aumento en $E_{CAF/PV}$. Para los intervalos de caudal y presión estudiados, el máximo del enriquecimiento se encuentra en el límite inferior de presión (80-102 bar) y en el límite superior de caudal (51-60 g/min).

Según se deduce de la Figura 46b, la ratio de enriquecimiento de RA, $E_{RA/PV}$, aumenta con la presión, mientras que con un incremento del caudal, $E_{RA/PV}$ primero aumenta y después

disminuye. El máximo de $E_{RA/PV}$, en contraste con el caso de $E_{CAF/PV}$ antes descrito, se encuentra en valores de alta presión (153-160 bar) y valores bajos de caudal (10-15 g/min).

En la Figura 46c se puede observar que $E_{CAF/DV}$ tiene un comportamiento similar a $E_{RA/PV}$, un aumento de la presión genera un aumento en $E_{CAF/DV}$ mientras que un aumento en el caudal de CO_2 provoca una disminución en $E_{CAF/DV}$. El máximo $E_{CAF/DV}$ está en el mismo extremo que $E_{RA/PV}$: a valores altos de presión (154-160 bar) y valores bajos de caudal (10-11 g/min). Las condiciones óptimas de trabajo según el modelo CCD aplicado, son las de presión 140 bar y caudal 12 g/min.

La precipitación de RA, como se puede ver en la Figura 46b, se favorece a altas presiones y bajos caudales de CO_2 , mientras que, según la Figura 46a, ocurre lo contrario con la precipitación CAF en PV. Esto puede explicarse, como ya se ha hecho para *S. officinalis*, teniendo en cuenta que aunque una mayor presión implica una mayor solubilidad de los compuestos, también favorece la nucleación. En el caso de RA, y debido a su mayor concentración en la corriente de alimentación, el efecto de la nucleación es mayor y por lo tanto también su precipitación a presiones más elevadas, mientras que el CAF precipita más cuando la presión es menor y por tanto menor es su solubilidad.

En cuanto al caudal de CO_2 , un aumento del mismo implica dos efectos opuestos: un mayor efecto de arrastre, pero también un mayor efecto antidisolvente. En el caso de CAF, la mezcla de disolventes se favorece a altos caudales de CO_2 , y por tanto el efecto antidisolvente y la precipitación del compuesto, mientras que la precipitación de RA se favorece tanto a bajos caudales, donde el efecto de arrastre es menor, como a altos caudales de CO_2 donde se favorece el efecto antidisolvente.

Las condiciones óptimas obtenidas mediante el modelo CCD para el proceso SAF (140 bar, 12 g/min), similares a las obtenidas para la especie *S. officinalis* (148 bar, 10 g/min) se pueden explicar de igual forma. Los efectos opuestos que tienen lugar tanto para la presión como para el caudal de CO_2 generan un máximo dentro del intervalo de trabajo considerado.

4.1.4. *Jasonia glutinosa* L.

Bajo estos epígrafes se presentan los resultados obtenidos para la concentración de activos a partir de extractos de hojas de la especie *J. glutinosa*, cuyo contenido en agua fue 11.02 ± 0.02 wt %.

4.1.4.1. Extracción SCE y maceración

Para el caso de *Jasonia glutinosa*, el rendimiento de la extracción supercrítica, Y_{SCE} , fue de $1.9\% \pm 1.1$ wt %, mientras que el rendimiento de la maceración en etanol, Y_{EtOH} , realizada tras la extracción SCE, fue de 4.2 ± 0.1 wt %. Estos resultados se compararán posteriormente con los del resto de las especies vegetales estudiadas.

4.1.1.2. Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente (SAF)

El proceso SAF aplicado a los extractos de *Jasonia glutinosa* dio como resultado, para cada uno de los experimentos realizados, por un lado, un precipitado en cámara (PV) de color amarillento-verdoso que también formaba aglomeraciones, como ya ocurría en el caso de *C. officinalis* pero con textura algo menos pegajosa, lo que facilitó su recogida. Por otro lado, en DV se recogió una disolución verde-amarilla clara. En la Figura 47 se puede observar el resultado del experimento 1.



Figura 47. Imágenes correspondientes al experimento número 11 de *Jasonia glutinosa*: (a,b) polvo precipitado en la fracción de cámara y (c) disolución recogida como fracción de colector.

En la Tabla 16 se aparecen los resultados de rendimientos alcanzados, Y_{PV} (wt %), Y_{DV} (wt %) e Y_{SAF} (wt %), para *Jasonia glutinosa*.

Tabla 16. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *J. glutinosa* junto con los resultados de los rendimientos definidos por las Ecuaciones 4 y 5.

N° Exp.	Run	X_P (bar)	$X_{Q_{CO_2}}$ (g/min)	Y_{PV} (wt %)	Y_{DV} (wt %)	Y_{SAF} (wt %)
1	3	80	35	32.4	20.4	52.8
2	7	90	17	41.3	24.8	66.1
3	2		53	48	23.3	71.3
4	10	115	10	50.7	30.7	81.4
5	4		35	52.4	15.6	68
6	5		35	47.7	26.4	74.1
7	8		35	46.6	24.6	71.2
8	11		35	42.2	27.1	69.3
9	12		35	46.2	26.8	73
10	6		60	54.7	29.9	84.6
11	1	140	17	64.4	30.9	95.3
12	13		53	48.7	26.2	74.9
13	9	150	35	52.7	22.8	75.5

Como se muestra en la Tabla 16, Y_{PV} varió desde 32.4% (exp. 1; 80 bar - 35 g/min) hasta 64.4% (exp. 11; 140 bar-17 g/min) mientras que Y_{DV} osciló entre 15.6% (exp. 5; 115 bar - 35 g/min) y 30.9% (exp. 11; 140 bar - 17 g/min). También se puede observar que Y_{PV} es mayor que Y_{DV} en todos los experimentos, entre 1.6 veces (exp. 1) y 3.4 veces, (exp. 5). Por otro lado, Y_{SAF} varió desde 52.8% (exp. 1; 80 bar - 35 g/min) hasta un 95.3% (exp. 11; 140 bar - 17 g/min). Este último valor resulta especialmente elevado, como ya sucedía en el caso de *M. officinalis*.

4.1.4.3. Análisis HPLC de los extractos obtenidos en SAF

El gradiente de elución aplicado para la identificación y cuantificación de los compuestos de interés en los extractos de *J. glutinosa* fue el mismo que el empleado con la especie *M. officinalis*: 10% A, 90-0% B, 0-90% C (0-18 min); 10% A, 0% B, 90% C (18-20 min); 10% A, 0-90% B, 90-0% C (20-25 min) y 10% A, 90% B, 0% C (25-30 min).

De los cuatro compuestos fenólicos bajo estudio, solo se pudo identificar mediante análisis cromatográfico el ácido clorogénico (CHA). El tiempo de retención de dicho compuesto aparece en la Figura 48. La cuantificación de CHA se obtuvo mediante la correspondiente recta de calibrado, Anexo IV.4.

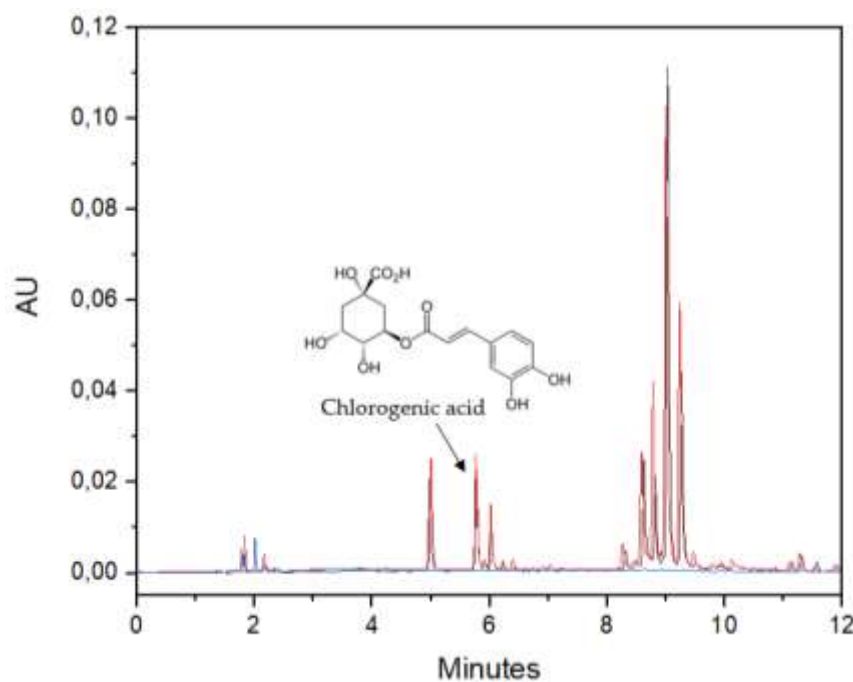


Figura 48. Cromatograma de los extractos de *Jasonia glutinosa*. CHA ($T_R = 5.61$ min, $\lambda = 324$ nm). Fracciones: PV línea roja, FS línea negra, DV línea negra.

En el caso de esta especie, el ácido clorogénico queda prácticamente retenido en la fracción PV. La Tabla 17 muestra la ratio de enriquecimiento de CHA, $E_{CHA/PV}$, para cada uno de los experimentos realizados. Un efecto similar se ha observado en el caso de *Calendula officinalis*.

Tabla 17. Condiciones experimentales de presión, X_P , y caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$, para cada uno de los experimentos SAF programados mediante el diseño CCD correspondientes a la especie *J. glutinosa* junto con las ratios de enriquecimientos definidas por la Ecuación 7.

N° Exp.	Run	X_P (bar)	$X_{Q_{CO_2}}$ (g/min)	$E_{CHA/PV}$
1	3	80	35	0.90
2	7	90	17	1.02
3	2		53	0.95
4	10	115	10	1.06
5	4		35	1.17
6	5		35	1.05
7	8		35	1.12
8	11		35	1.06
9	12		35	1.10
10	6		60	0.85
11	1	140	17	1.10
12	13		53	1.00
13	9	150	35	1.27

4.1.4.3. Análisis estadístico del proceso SAF para *Jasonia glutinosa*

En este caso, la evaluación estadística realizada mediante *Minitab*® 18 al proceso SAF permitió optimizar la concentración del ácido clorogénico.

El análisis estadístico mostró que solo los rendimientos en PV y global, Y_{PV} e Y_{SAF} respectivamente, se ajustaron correctamente al modelo matemático propuesto con la Ecuación 8. Los coeficientes correspondientes a cada rendimiento se recogen en la Tabla 18 junto con los parámetros estadísticos anteriormente indicados. Como puede apreciarse, ambos rendimientos, Y_{PV} e Y_{SAF} , dependieron de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$) solo de los términos de presión (β_1), cuadrático del caudal de CO_2 (β_{22}) y cruzado (β_{12}). El término de caudal de CO_2 (β_2) fue necesario para los modelos, pero no fue estadísticamente significativo ($\beta_2, p > 0.05$).

Tabla 18. Coeficientes de ajuste de la Ecuación 8 para los rendimientos PV y global (Y_{PV} , Y_{SAF} , respectivamente) y ratios de enriquecimiento en PV del ácido clorogénico ($E_{CHA/PV}$) y enriquecimiento total ($E_{ALL/PV}$) junto con sus correspondientes factores de significación de los términos, p . También se consignan los coeficientes de regresión, R^2 , y la desviación estándar, s , para cada ajuste.

	$Y_{PV} / wt \%$		$Y_{SAF} / wt \%$		$E_{CHA/PV}$	
	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p
β_0	-18.9	0.000	4.8	0.000	0.548	0.000
β_1	0.699	0.001	0.824	0.001	0.003280	0.003
β_2	0.564	0.755	-0.024	0.392	0.01296	0.020
β_{11}	-	-	-	-	-	-
β_{22}	0.01204	0.029	0.02262	0.002	-0.000232	0.009
β_{12}	-0.01244	0.019	-0.01422	0.017	-	-
R^2	83.18	-	88.10	-	79.51	-
s	3.80	-	4.24	-	0.06	-

Las gráficas de contorno generadas con la Ecuación 8 para Y_{PV} e Y_{SAF} se pueden observar en la Figura 49a y 49b respectivamente. La Figura 49a muestra que Y_{PV} aumenta con la presión, efecto que se acentúa para valores de caudal bajos, para los que se observa un mayor incremento. Por otro lado, a presiones inferiores a 108 bar, un aumento en el caudal de CO_2 incrementa Y_{PV} mientras que a presiones superiores a 138 bar ocurre lo contrario. Además, entre 108 y 138 bar, se aprecia que el rendimiento disminuye y posteriormente aumenta a medida con el caudal.

En la Figura 49b se observa que Y_{SAF} se comporta de manera similar a Y_{PV} . Un aumento en la presión implica un aumento en Y_{SAF} , más marcadamente para los valores de caudal más bajos, mientras que un aumento en el caudal supone un incremento de Y_{SAF} a presiones inferiores a 93 bar. Para presiones por encima de ese valor, a medida que aumenta el caudal de CO_2 , Y_{SAF} disminuye y después aumenta ligeramente. El máximo de ambos rendimientos se puede encontrar a valores altos de presión (143-150 bar para Y_{PV} , 137-150 bar para Y_{SAF}) y bajos caudales (10-14 g/min para Y_{PV} , 10-16 g/min para Y_{SAF}).

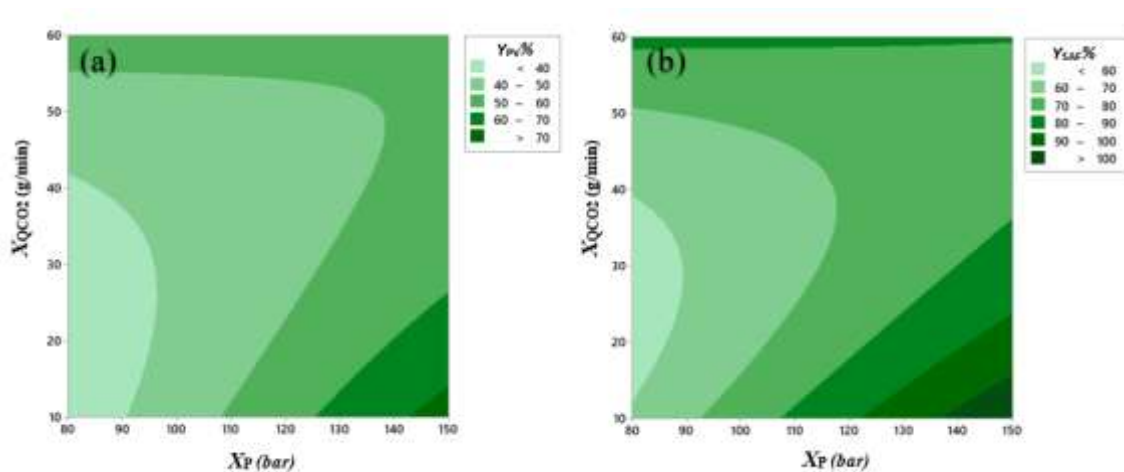


Figura 49. Gráficos de contorno para los rendimientos correspondientes a las fracciones de *J. glutinosa*: (a) en PV, $Y_{PV}\%$ y (b) $Y_{SAF}\%$ en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$ (g/min).

En lo que se refiere al análisis estadístico de las ratios de enriquecimiento de *J. glutinosa*, la Tabla 18 recoge los coeficientes de ajuste de $E_{CHA/PV}$ además de los parámetros p , R^2 y s . Al igual que en el caso de los rendimientos SAF, $E_{CHA/PV}$ depende del término lineal de presión (β_1) y de los términos lineal y cuadrático de caudal (β_2 , β_{22}), siendo todos ellos estadísticamente significativos. Ni el término cruzado ni el término de presión cuadrática (β_{12} , β_{11}) fueron necesarios para el modelo.

La gráfica de contorno para $E_{CHA/PV}$ se representa en la Figura 50. Como puede observarse en la figura, un aumento de la presión provoca un aumento de $E_{CHA/PV}$, mientras que, en general, un aumento del caudal induce un aumento y posterior disminución de $E_{CHA/PV}$. El máximo enriquecimiento se encuentra en el extremo derecho de la gráfica, a valores altos de presiones (144-150 bar) y valores intermedios-bajos de caudal (18-37 g/min). En este caso, las condiciones que permiten alcanzar rendimientos máximos y un enriquecimiento óptimo son 150 bar y 19 g/min.

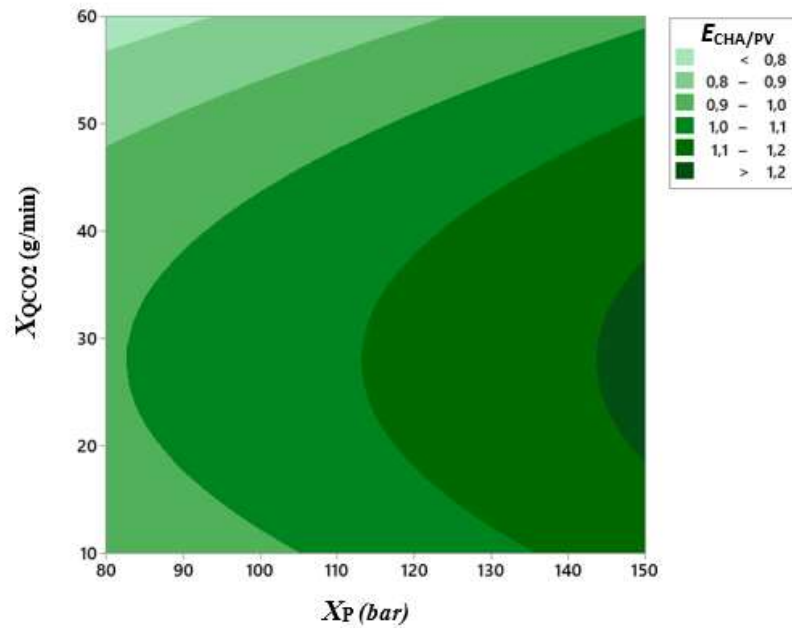


Figura 50. Gráficos de contorno de la ratio de enriquecimiento de CHA para *J. glutinosa*, $E_{CHA/PV}$, en función de la presión, X_P (bar) y del caudal de CO_2 , $X_{Q_{CO_2}}$ (g/min).

En los apartados anteriores para cada especie vegetal estudiada, se ha abordado la complejidad del proceso de precipitación cinética, mostrando que los procesos primarios de nucleación y crecimiento y los procesos secundarios de agregación y ruptura son necesarios para que dicho fenómeno ocurra. En el caso que nos ocupa, la disolución de alimentación preparada a partir de *Jasonia glutinosa* tenía una alta viscosidad, como indica la naturaleza de su nombre. Este carácter glutinoso, al igual que se ha visto en el caso de *C. officinalis*, puede favorecer el proceso de nucleación heterogénea por lo que se produce una precipitación completa en PV de algunos compuestos, como el CHA. Las condiciones óptimas indicadas anteriormente (150 bar, 19 g/min) pueden explicarse de la misma manera. Una alta presión favorece la nucleación, provocando la precipitación de los compuestos. Por otro lado, un caudal bajo de CO_2 implica un menor efecto de arrastre, obteniéndose así una mayor recuperación del material. La presión óptima de trabajo para obtener la mayor ratio de CHA y la máxima recuperación en el caso de *J. glutinosa* es similar a la obtenida para *C. officinalis* (153 bar), mientras que el caudal de CO_2 es notablemente mayor en el caso de *C. officinalis* (42 g/min).

Una vez presentadas y discutidas las particularidades del proceso de Fraccionamiento SAF para las cuatro especies, y analizados los análisis estadísticos, resulta conveniente incluir a modo de corolario una tabla comparativa que resuma los aspectos clave de la experimentación, Tabla 19.

Tabla 19. Comparación de los resultados del proceso SAF y su análisis estadístico obtenidos para las especies *S. officinalis*, *C. officinalis*, *M. officinalis* y *J. glutinosa*. También se indican los rendimientos de la extracción supercrítica (SCE) y de la maceración etanólica.

Resultados	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Jasonia glutinosa</i>
Aspecto fracción PV	Polvo verde intenso	Precipitado aglomerado marrón-verdoso oscuro. Muy pegajoso	Polvo verde-amarillento	Precipitado aglomerado amarillo-verdoso. Algo pegajoso
Aspecto fracción DV	Disolución verde-amarillenta	Disolución verde oscura	Disolución verde oscura	Disolución verde-amarillenta clara
Compuestos detectados en PV	CHA, CAF, RA	CHA, CAF, FA	CAF, RA	CHA
Compuestos detectados en DV	CHA, CAF	-	CAF	-
Y_{SCE} (wt %)	4.9	8.3	1.9	1.9
Y_{EtOH} (wt %)	10.9	7.2	5.2	4.2
Y_{PV} máximos (wt %)	64.8	47.0	77.9	64.4
Y_{DV} máximos (wt %)	28.5	42.8	22.6	30.9
Y_{SAF} máximos (wt %)	85.1	75.7	95.1	95.3
Condiciones óptimas	148 bar, 10 g/min	153 bar, 42 g/min	140 bar, 12 g/min	150 bar, 19 g/min

Tal y como se puede observar en la tabla y en las figuras correspondientes, el aspecto de las fracciones obtenidas para las plantas estudiadas es, si bien mayoritariamente de color verdoso, distinto para cada una de ellas. Cabe destacar que caléndula y jasonia producen precipitados glutinosos, especialmente en el caso de caléndula.

El análisis HPLC reveló que las cuatro especies vegetales estudiadas pueden diferenciarse en dos grupos; por un lado aquellas donde los compuestos de interés se detectaron solo en la fracción PV (*C. officinalis* y *J. glutinosa*) y por otro lado aquellas para las que los compuestos se encontraron en ambas fracciones, PV y DV (*S. officinalis* y *M. officinalis*). Además, en este último grupo también se encontró que el ácido rosmarínico precipitaba en PV.

En cuanto a los rendimientos de extracción supercrítica, Y_{SCE} , destaca el valor de *C. officinalis* por ser superior al del resto, mientras que el mayor valor de la maceración etanólica, Y_{EtOH} , de los exhaustos se consigue para *S. officinalis*.

En general, el proceso SAF ofrece una elevada recuperación del material, que se encuentra entre el 76% y el 95%, cuya ordenación ascendente es caléndula < salvia < jasonia < melisa. La mayor parte del material precipita en la fracción de cámara, obteniéndose unos elevados rendimientos excepto para el caso de caléndula, siendo el orden ascendente: caléndula < jasonia \cong salvia < melisa.

En cuanto a las condiciones óptimas de trabajo, éstas resultan similares para todas las especies estudiadas, exceptuando el caso de caléndula, cuyo caudal queda cercano al extremo superior. Esto se puede explicar por el elevado carácter glutinoso que esta especie presenta, el cual permite trabajar con un elevado caudal de CO₂.

Los resultados obtenidos apuntan hacia el posible interés de trabajar a flujos más bajos en el caso de salvia. Además, para todas las especies, cabe destacar que las condiciones óptimas son asumibles en cuanto a la implementación para la concentración de activos, lo que resulta de gran interés para un posible procesamiento de estas plantas.

4.2. Evaluación computacional

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de las herramientas computacionales como instrumentos de preselección de principios activos, útiles en cosmética y farmacia; a saber, modelos QSAR, permeabilidad en piel *in silico* y screening inverso.

4.2.1. Resultados QSAR/COSMO-RS

Tal y como se ha indicado en la sección § 3.3.1, se ha desarrollado un modelo QSAR basado en la utilización de perfiles σ como descriptores para determinar la actividad antioxidante de compuestos puros presentes en extractos de plantas, como los que son principal objeto de estudio en este trabajo.

Los valores experimentales de EC₅₀ (mol/mol), obtenidos de la literatura [219], y sus logaritmos para los compuestos seleccionados (Figura 27), junto a los valores teóricos que

resultan del ajuste según el modelo, se recogen en las Tablas 20 y 21. Aplicando la MLR indicada por la Ecuación 9, se obtiene la relación lineal entre la actividad antioxidante y los descriptores de perfil σ para el modelo de 4 áreas que se describe en la Ecuación 16:

$$-\text{Log}(\text{EC}_{50}) = -0.230 + 1.941S_1 + 0.519S_2 - 0.4055S_3 - 2.18S_4 \quad (16)$$

Los resultados muestran que, para este modelo de 4 áreas, todos los descriptores (S_1 - S_4) fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) y el coeficiente de determinación, R^2 , fue 80.0%, lo que indica un buen ajuste del modelo. La desviación estándar fue de 0.17, la variación en la respuesta explicada por el modelo y ajustada por el número de predictores, R^2 (adjust), fue de 66.7% y la R^2 (pred), que determina qué tan bien el modelo predeciría las respuestas para nuevos datos, fue de 1.3%. En el Anexo V.1 se recoge los detalles del tratamiento estadístico MLR con más detalle.

Tabla 20. Valores experimentales y predichos de EC_{50} y sus logaritmos para cada compuesto utilizado en el modelo QSAR con 4 áreas.

Compuestos	EC_{50} (mol/mol)	$-\text{LogEC}_{50}$	EC_{50} (mol/mol)	$-\text{LogEC}_{50}$	Desviaciones
	<i>Valores experimentales</i>		<i>Valores ajustados</i>		
<i>Conjunto de entrenamiento</i>					
3-metilcatecol	0.29	0.54	0.22	0.65	0.07
Catecol	0.21	0.68	0.30	0.52	-0.09
Ácido clorogénico	0.39	0.41	0.55	0.26	-0.16
Ácido ferúlico	0.93	0.03	0.60	0.22	0.33
Hidroquinona	0.52	0.29	0.63	0.20	-0.11
Ácido L-ascórbico	0.21	0.68	0.19	0.71	0.02
Galato de propilo	0.08	1.08	0.08	1.09	0.00
Ácido protocatecuico	0.62	0.21	0.62	0.21	0.00
Pirogalol	0.17	0.78	0.25	0.60	-0.08
Quercetina	0.29	0.53	0.23	0.63	0.06
Ácido rosmarínico	0.18	0.74	0.18	0.75	0.00
<i>Conjunto de prueba/validación</i>					
Epicatequina	0.22	0.67	0.32	0.50	-0.10
Ácido gálico	0.10	0.98	0.21	0.67	-0.11

Cuando se aplica la MLR, indicada en la Ecuación 9, para el modelo de 10 áreas, se obtiene la relación lineal entre la actividad antioxidante y los descriptores de perfil σ que se describe en la Ecuación 17.

$$-\text{Log}(\text{EC}_{50}) = -0.556 - 0.230S_1 - 0.317S_4 + 0.1903S_5 - 0.1015S_6 + 0.5683S_7 \quad (17)$$

De los diez descriptores iniciales planteados en el modelo de 10 áreas, sólo S₄-S₇ fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$), aunque S₁ es necesario para obtener una buena correlación. R² fue 93.1%, la desviación estándar fue 0.11, R² (adjust) fue 86.3% y R² (pred) fue 72.7%. El Anexo V.2 recoge los detalles estadísticos del ajuste MLR para el modelo de 10 áreas.

El hecho de que las áreas S₄ a S₇ influyan significativamente en la actividad antioxidante puede explicarse en base al mecanismo de reacción que las moléculas fenólicas consideradas en este trabajo, presentan en el método DPPH. Este es un mecanismo de transferencia de un átomo de H al radical DPPH, según el cual la actividad antioxidante depende principalmente de dos factores: la capacidad de abstracción del H de la molécula en el estado fundamental y la estabilidad del radical libre formado [255]. Es en este último factor donde entran en juego las zonas neutras de la molécula, ya que son las que permiten la deslocalización del electrón libre y por tanto su estabilización.

Tabla 21. Valores experimentales y predichos de EC₅₀ y sus logaritmos para cada compuesto utilizado en el modelo QSAR con 10 áreas.

Compuestos	EC ₅₀ (mol/mol)	-LogEC ₅₀	EC ₅₀ (mol/mol)	-LogEC ₅₀	Desviaciones
	<i>Valores experimentales</i>		<i>Valores ajustados</i>		
<i>Conjunto de entrenamiento</i>					
3-metilcatecol	0.29	0.54	0.24	0.62	0.05
Catecol	0.21	0.68	0.25	0.61	-0.04
Ácido clorogénico	0.39	0.41	0.39	0.41	0.00
Ácido ferúlico	0.93	0.03	0.93	0.03	-0.01
Hidroquinona	0.52	0.29	0.39	0.41	0.13
Ácido L-ascórbico	0.21	0.68	0.24	0.62	-0.03
Galato de propilo	0.08	1.08	0.08	1.09	0.00
Ácido protocatecuico	0.62	0.21	0.51	0.29	0.10
Pirogalol	0.17	0.78	0.22	0.66	-0.05
Quercetina	0.29	0.53	0.30	0.52	-0.01
Ácido rosmarínico	0.18	0.74	0.18	0.75	0.00
<i>Conjunto de prueba/validación</i>					
Epicatequina	0.22	0.67	0.10	1.01	0.12
Ácido gálico	0.10	0.98	0.20	0.7	-0.10

Si bien es cierto que el perfil σ permite identificar las diferentes áreas de las moléculas (presencia de anillos aromáticos, grupos alquilo...) no parece ser lo suficientemente preciso como para, por ejemplo, distinguir entre diferentes anillos aromáticos como ocurre en el caso del RA [255]. Aun así, el perfil σ es lo suficientemente adecuado como para permitir

particiones más finas que describan mejor la actividad antioxidante, tal y como se deduce de la comparación de los resultados alcanzados con los modelos de 10 y 4 áreas.

Una vez desarrollados ambos modelos, se procede a verificar las actividades antioxidantes de los compuestos que conforman el conjunto de validación, al objeto de comprobar su capacidad predictiva. Las Tablas 20 y 21 muestran los valores predichos y las desviaciones respecto los valores experimentales como residuos EC_{50} (mol/mol) para cada modelo. En el modelo de 4 áreas, tanto los valores EC_{50} de epicatequina como los de ácido gálico están sobreestimados y presentan valores de desviación similares, -0.10 y -0.11. Si bien parece que el modelo podría predecir el orden de magnitud de EC_{50} para la epicatequina, en el caso del ácido gálico, su desviación es mayor que el propio valor experimental. Por su parte, en el modelo de 10 áreas, el valor EC_{50} de epicatequina resulta subestimado y el residuo, en valor absoluto, es similar al obtenido por el modelo de 4 áreas, pero con signo opuesto, 0.12. Por otro lado, para el ácido gálico el valor de EC_{50} resulta nuevamente sobreestimado, casi de la misma manera que en el caso del modelo de 4 áreas, siendo ahora la desviación -0.10.

En cualquier caso, aunque el modelo de 10 áreas presenta mejores coeficientes de correlación, la predicción del conjunto de validación de este modelo es similar a la del modelo de 4 áreas. Pese a estos resultados, la metodología parece muy prometedora siempre y cuando se soslaye la carencia de datos experimentales fiables que permitan, en un futuro próximo, utilizar esta herramienta para realizar la preselección de compuestos en base a su capacidad antioxidante. Esta tesis deja abierto todo un campo de estudio experimental de la determinación de la actividad antioxidante de los compuestos puros presentes en los extractos vegetales, de estandarización de medida y de la expresión de resultados.

4.2.2. Permeabilidad en piel de los compuestos

El modelo de permeabilidad aplicado fue un modelo computacional que consideraba la piel totalmente hidratada. Tal y como se ha indicado en la sección § 3.3.2., todos los cálculos derivados de la aplicación de este modelo, fueron realizados utilizando el paquete de software comercial COSMOtherm. Los valores calculados por las ecuaciones 10-13 para los compuestos individuales estudiados en este trabajo, se recogen en la Tabla 22.

Tabla 22. Parámetros detallados del modelo de resistencias y K_p (predicho, calculado, experimental y sus desviaciones) para CAF, CHA, FA y RA para cada compartimento y su ruta de permeación.

Parámetro	Ácido Cafeico	Ácido Clorogénico	Ácido Ferúlico	Ácido Rosmarínico
Vehículo	agua	agua	agua	agua
Membrana cutánea	epidermis	epidermis	epidermis	epidermis
Compartimento limitante y ruta de permeación	SC vía trans-corneocitos polar	SS vía matriz intersticial	SC vía trans-corneocitos polar	SC vía trans-corneocitos polar
$\log K_{\text{vehículo:water}}$	0.00	0.00	0.00	0.00
$R_{SC,inter}$ (s/m)	2.15×10^{12}	8.20×10^{16}	2.55×10^{11}	4.13×10^{18}
$R_{SC,trans}$ (s/m)	4.07×10^7	1.76×10^8	3.23×10^7	1.62×10^9
R_{SC} (s/m)	4.07×10^7	1.76×10^8	3.23×10^7	1.62×10^9
$\log R_{SC}$ (cm/s)	-5.61	-6.25	-5.51	-7.21
$R_{SG,inter}$ (s/m)	1.26×10^8	5.14×10^8	1.23×10^8	2.34×10^8
$R_{SG,trans}$ (s/m)	1.34×10^7	5.13×10^{11}	1.63×10^6	2.58×10^{13}
R_{SG} (s/m)	1.22×10^7	$5.13E \times 10^8$	1.61×10^6	2.34×10^8
$\log R_{SG}$ (cm/s)	-5.09	-6.71	-4.21	-6.37
$R_{SS,inter}$ (s/m)	2.86×10^8	1.17×10^9	2.80×10^8	5.32×10^8
$R_{SS,trans}$ (s/m)	2.26×10^7	8.54×10^{11}	2.91×10^6	4.30×10^{13}
R_{SS} (s/m)	2.09×10^7	1.16×10^9	2.88×10^6	5.32×10^8
$\log R_{SS}$ (cm/s)	-5.32	-7.06	-4.46	-6.73
$R_{SB,inter}$ (s/m)	1.98×10^7	8.07×10^7	1.94×10^7	3.68×10^7
$R_{SB,trans}$ (s/m)	$4.58E \times 10^6$	1.71×10^{11}	6.50×10^5	8.60×10^{12}
R_{SB} (s/m)	3.72×10^6	8.06×10^7	6.29×10^5	3.68×10^7
$\log R_{SB}$ (cm/s)	-4.57	-5.91	-3.80	-5.57
R_{cells} (s/m)	7.75×10^7	1.93×10^9	$3.74E \times 10^7$	2.42×10^9
R_{shunt} (s/m)	5.00×10^{10}	5.00×10^{10}	5.00×10^{10}	5.00×10^{10}
R_{skin} (s/m)	7.74×10^7	1.86×10^9	$3.74E \times 10^7$	2.31×10^9
$\log K_p$ (pred.) (cm/s)	-5.89	-7.27	-5.57	-7.36
$\log K_p$ (pred.) + cte offset (cm/s)	-7.01	-8.39	-6.69	-8.48
$\log K_p$ (calc.) epidermis (cm/s)	-6.85	-	-7.15	-6.82
Desviación	0.16	-	0.46	0.54
$\log K_p$ (exp.) Caco-2 (cm/s)	-5.84	-5.60	-4.98	-6.70
Desviación	1.17	2.79	1.71	0.66

El compartimento con mayor resistencia para CAF, FA y RA fue el estrato córneo ($\log R_{SC} = -5.61, -5.51$ y -8.70 respectivamente), mientras que para CHA, la mayor resistencia resultó el estrato espinoso ($\log R_{SS} = -7.06$). Esto significa que mientras que para CAF, FA y RA el estrato córneo es la principal barrera en el proceso de penetración, CHA logra penetrar hasta el estrato espinoso. En cuanto a la vía de penetración, tanto CAF como FA y RA prefieren la ruta transcelular a través de los corneocitos ($R_{SC, inter} \gg R_{SC, trans}$), mientras que CHA prefiere la vía intercelular a través de la matriz lipídica ($R_{SC, inter} \ll R_{SC, trans}$).

Las resistencias globales, R_{skin} , calculadas según la Ecuación 12, son $R_{skin} = 7.74 \cdot 10^7$, $1.86 \cdot 10^9$, $3.74 \cdot 10^7$ y $2.31 \cdot 10^9$ para CAF, CHA, FA y RA, respectivamente. Utilizando la Ecuación 10, los valores de $\log K_p$ para la permeabilidad de cada compuesto resultaron -5.89 para CAF, -7.27 para CHA, -5.57 para FA y -7.36 para RA. Estos valores se corrigen mediante una constante de compensación ($\Delta \log K_p = -1.12$ cm/s) [187], siendo por tanto los valores finales de permeabilidad $\log K_p = -7.01$, -8.39 , -6.69 y -8.48 para CAF, CHA, FA y RA, respectivamente.

La Tabla 22 también muestra los valores promedio de permeabilidad calculados por Zhang et al. [256] para CAF y FA en piel y por Hui-Zhen et al. [257] para RA en piel, junto con los valores de permeabilidad experimental de las células Caco-2 para CAF, CHA, FA y RA [258–260], así como la desviación con respecto a los valores corregidos de $\log K_p$ hallados en este trabajo. Se puede observar que estos valores corregidos se aproximan más a los calculados por Zhang et al. (desviación = 0.16 y -0.46 para CAF y FA) y por Hui-Zhen et al. (desviación = -0.54) que a los valores experimentales de las células Caco-2 (desviación = 1.17, 2.79, 1.71 y 0.66 para CAF, CHA, FA y RA, respectivamente). Esto es esperable ya que las líneas celulares de Caco-2 se utilizan como modelo de absorción intestinal y la estimación de la biodisponibilidad oral [261], y por lo tanto, su permeabilidad difiere a la cutánea.

Para que un compuesto se considere tóxico, debe alcanzar una cierta capa profunda de la piel. El estrato córneo, que consiste principalmente en células muertas, se considera una capa segura en la que no se produce toxicidad o irritación [262]. Esto hace que tanto CAF como FA y RA sean seguros para uso cosmético. Sin embargo, CHA alcanza una capa más profunda de la epidermis, aunque sin llegar a la dermis, y además su coeficiente de permeabilidad es menor que el coeficiente de tasa de descamación ($\log K_D = -9$) [263], lo que también hace que este compuesto resulte seguro para uso cosmético. En efecto, esta tasa de descamación indica que, incluso si un compuesto tiende a penetrar más allá del estrato córneo, la regeneración de la piel evita que el compuesto penetre más profundamente en la epidermis [262].

4.2.3. Predicción de dianas mediante screening inverso

La herramienta computacional SEA se utilizó para predecir las dianas, en concreto enzimas, que tenían más probabilidades de interactuar con los compuestos bioactivos seleccionados: CHA, CAF, RA y FA, que pudieran mostrar sus posibles usos farmacológicos.

4.2.3.1 Ácido clorogénico

Para este compuesto se encuentran 45 dianas vinculantes, con valores E entre 10^{-49} y 10^{-6} . Los primeros 5 resultados, omitiendo aquellos cuyo Tc fuese inferior a 0.65, se muestran en la Tabla 23, ordenados de menor a mayor valor E. Los resultados con Tc = 1, aunque posean un valor de E mayor, se muestran en primer lugar.

Tabla 23. Principales dianas moleculares de CHA obtenidas a través del servidor web SEA, su descripción, el nombre de la diana, las ID de Uniprot y ChEMBL y el valor E y el coeficiente de Tanimoto (Tc).

Descripción	Target Key	Nombre Diana	Uniprot ID	ChEMBL ID	Valor E	Max Tc
Aldo-ceto reductasa familia 1 miembro B1	ALDR_RAT	Akr1b1	P07943	CHEMBL2622	1.64×10^{-13}	1.00
Integrasa	Q7ZJM1_9HIV1	Pol	Q7ZJM1	CHEMBL3471	1.28×10^{-44}	0.91
Integrasa	P89582_9HIV2	Pol	P89582	CHEMBL3463	9.92×10^{-37}	0.83
Aldo-ceto reductasa familia 1 miembro B10	AK1BA_HUMAN	AKR1B10	O60218	CHEMBL5983	1.28×10^{-23}	0.91
Proteína beta-amiloide	A4_HUMAN	APP	P05068	CHEMBL2487	3.29×10^{-19}	0.83

La principal diana identificada fue la aldo-ceto reductasa de la familia 1 miembro B1, posee un Tc = 1, lo que indica la máxima similitud. Varios estudios muestran que esta diana es crítica por sus implicaciones en complicaciones diabéticas, de inflamación y relacionadas con diversos cánceres [264,265]. El gen Akr1b1 codifica una serie de proteínas asociadas con una variedad de enfermedades que incluyen la neuropatía diabética y la catarata diabética [266] y cuenta con un ortólogo humano que está implicado en enfermedades como arteriosclerosis, cataratas, retinopatía diabética y diabetes mellitus tipo 2 [267]. Las siguientes dos dianas resultan atractivas para la terapia clínica debido a su implicación en enfermedades provocadas por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2). Por otra parte, varios estudios han demostrado que la diana AKR1B10 está

relacionada con cáncer de pulmón, hígado, pecho y cáncer del sistema digestivo [268–270] y que focalizarse en ella podría ser una forma de terapia contra el cáncer [271]. La proteína APP es la última diana en la lista con un $T_c = 0.83$ y un valor de E de 10^{-19} y está asociada con enfermedades humanas neurodegenerativas como el Alzheimer [272,273] y trastornos metabólicos como la diabetes [273].

4.2.3.2 Ácido cafeico

Se obtuvieron 166 dianas para CAF, con valores E entre 10^{-112} y 10^{-6} . Las 18 primeras cuentan con un $T_c = 1.00$, lo que indica una máxima interacción. En la Tabla 24 se muestran las cinco primeras con los menores valores de E, ordenadas de menor a mayor.

Tabla 24. Principales dianas moleculares de CAF obtenidas a través del servidor web SEA, su descripción, el nombre de la diana, las ID de Uniprot y ChEMBL y el valor E y el coeficiente de Tanimoto (T_c).

Descripción	Target Key	Nombre Diana	Uniprot ID	ChEMBL ID	Valor E	Max T_c
Anhidrasa carbónica 6	CAH6_HUMAN	CA6	P23280	CHEMBL3025	4.06×10^{-26}	1.00
Anhidrasa carbónica 5B mitocondrial	CAH5B_HUMAN	CA5B	Q9Y2D0	CHEMBL2111457	9.31×10^{-23}	1.00
Metaloproteinasas de matriz-9	MMP9_HUMAN	MMP9	P14780	CHEMBL321	1.32×10^{-21}	1.00
Colagenasa intersticial	MMP1_HUMAN	MMP1	P33436	CHEMBL1075175	3.05×10^{-21}	1.00
Anhidrasa carbónica 5A, mitocondrial	CAH5A_HUMAN	CA5A	P35218	CHEMBL4789	5.13×10^{-19}	1.00

La primera diana que aparece en la Tabla 24 y, por tanto, aquella con un menor valor E dentro del grupo de dianas, es la CA6 para la que las enfermedades asociadas incluyen el carcinoma de mama, ovario, pulmón y vejiga [274]. La siguiente diana que se incluye es la CA5B, y está codificada por un gen asociado a enfermedades como la deficiencia de anhidrasa carbónica VA (CA-VA) y la dermatitis seborreica [275]. Por otra parte, CA5A es la quinta diana en la lista con un valor de E de 10^{-19} y está codificada por el gen parálogo de CA5B, asociado con la enfermedad CA-VA y la hiperamonemia [276]. La diana MMP9 tiene el tercer valor E más bajo (10^{-21}) y desempeña un papel clave en la tumorigénesis al regular la migración y supervivencia de las células cancerosas, así como la respuesta inmunitaria, la

angiogénesis y la formación de microambientes tumorales [277]. Por otro lado la diana MMP1, que pertenece a la misma familia que MMP9 (metaloproteinasas de matriz), es una proteína que en recientes estudios [278] se ha identificado como responsable de la resistencia al medicamento Erlotinib contra el cáncer de pulmón no microcítico. Este cáncer cuenta con una elevada morbilidad, con lo que encontrar un inhibidor de MMP9 podría conducir a una mejora de pronóstico.

4.2.3.3 Ácido rosmarínico

Se obtuvieron 103 dianas vinculantes para RA, con valores E entre 10^{-86} y 10^{-6} . Las diez primeras dianas obtenidas cuentan con un $T_c = 1.00$, de las cuales la Tabla 25 muestra las cinco primeras ordenadas de menor a mayor valor E.

Tabla 25. Principales dianas moleculares de RA obtenidas a través del servidor web SEA, su descripción, el nombre de la diana, las ID de Uniprot y ChEMBL y el valor E y el coeficiente de Tanimoto (T_c).

Descripción	Target Key	Nombre Diana	Uniprot ID	ChEMBL ID	Valor E	Max T_c
Integrasa	Q7ZJM1_9HIV1	Pol	Q7ZJM1	CHEMBL3471	2.16×10^{-54}	1.00
Aldo-ceto reductasa familia 1 miembro B1	ALDR_RAT	Akr1b1	P07943	CHEMBL2622	6.07×10^{-25}	1.00
Transtiretina	TTHY_HUMAN	TTR	P02766	CHEMBL3194	2.5×10^{-18}	1.00
Aldo-ceto reductasa familia 1 miembro B12	ALDR_HUMAN	AKR1B1	P15121	CHEMBL1900	1.23×10^{-12}	1.00
Colagenasa intersticial	MMP1_HUMAN	MMP1	P33436	CHEMBL1075175	2.88×10^{-12}	1.00

El ácido rosmarínico comparte dianas tanto con el ácido clorogénico (Pol en primer lugar con un valor E de 10^{-54} , Akr1b1 en segundo y cuarto lugar con valores E de 10^{-25} y 10^{-12}) como con el ácido cafeico (MMP1, quinto lugar 10^{-12}). Esto implica que este compuesto también funcionaría como inhibidor de las enfermedades ya descritas, inducidas por estas proteínas. La tercera diana que aparece en la tabla es la TTR, que está codificada por un gen asociado con enfermedades como la amiloidosis ATTR hereditaria y la hipertiroxinemia distraniretinémica [279].

4.2.3.4 Ácido ferúlico

Para este compuesto aparecen consignadas 277 dianas vinculantes, con valores E entre 10^{-177} y 10^{-6} . Las nueve primeras dianas obtenidas cuentan con un $T_c = 1.00$, de las cuales en la Tabla 26 se muestran las cinco primeras, ordenadas de menor a mayor valor E.

Tabla 26. Principales dianas moleculares de FA obtenidas a través del servidor web SEA, su descripción, el nombre de la diana, las ID de Uniprot y ChEMBL y el valor E y el coeficiente de Tanimoto (T_c).

Descripción	Target Key	Nombre Diana	Uniprot ID	ChEMBL ID	Valor E	Max T_c
Anhidrasa carbónica 6	CAH6_HUMAN	CA6	P23280	CHEMBL3025	2.28×10^{-30}	1.00
Anhidrasa carbónica 5A, mitocondrial	CAH5A_HUMAN	CA5A	P35218	CHEMBL4789	1.10×10^{-25}	1.00
Anhidrasa carbónica 7	CAH7_HUMAN	CA7	P43166	CHEMBL2326	2.06×10^{-23}	1.00
Anhidrasa carbónica 14	CAH14_HUMAN	CA14	Q9ULX7	CHEMBL3510	7.92×10^{-23}	1.00
Anhidrasa carbónica 12	CAH12_HUMAN	CA12	O43570	CHEMBL3242	4.47×10^{-14}	1.00

Todas las dianas recogidas en la Tabla 26 pertenecen a la familia de las anhidrasas carbónicas, estudiadas por su implicación en la patogénesis de los cánceres humanos [280]. Las dos primeras, CA6 y CA5A, también son dianas del ácido cafeico y sus respectivos genes están implicados en las enfermedades anteriormente descritas. CA7 ocupa el tercer lugar en la Tabla con un valor E de 10^{-23} y está codificada por un gen asociado con la cirrosis infantil y la amaurosis congénita de Leber 7 [282]. Por último, en cuarto y quinto lugar se muestran las proteínas codificadas por los genes parálogos CA14 y CA12, asociados con enfermedades como el teratoma gástrico maligno y el tumor maligno de células germinativas gástricas en el caso de CA14 [283] y la hiperclorhidrosis o el leiomioma pulmonar en el caso de CA12 [284].

4.3. Contribución a la elaboración de la crema hidratante SPAGYRIA

A lo largo del trabajo se ha probado la viabilidad de las cuatro especies estudiadas (*Salvia officinalis*, *Calendula officinalis*, *Melissa officinalis* y *Jasonia glutinosa*) para la posible incorporación de sus extractos, obtenidos mediante un proceso sostenible, en la formulación de un nuevo producto con características cosméticas o farmacéuticas. En primer lugar, se ha hecho patente que la selección inicial de estas especies, basada en sus usos tradicionales como medicamentos o cosméticos, ha sido acertada al comprobar las características de los extractos obtenidos. Se ha demostrado que dichos extractos poseen compuestos de tipo fenólico cuyas bioactividades están relacionadas con la industria cosmética o farmacéutica y que, por tanto, son susceptibles de ser utilizados en sus formulaciones.

Al estar esta tesis enmarcada dentro de un proyecto cuyo objetivo ha sido diseñar un producto final cosmético hidratante, resulta conveniente detallar las aportaciones que se han realizado para su obtención. De las especies estudiadas en esta tesis se seleccionaron dos para incorporar sus extractos al producto final: *Calendula officinalis* y *Melissa officinalis*. De la primera se seleccionó el extracto obtenido mediante SCE ya que el extracto SAF, aunque si bien resultaba muy prometedor, presentaba complicaciones cuando se pretendía obtener en cantidades preindustriales, debido a su bajo rendimiento en la cámara de precipitación. De *M. officinalis* se utilizó el extracto acuoso, el hidrolato, por sus propiedades beneficiosas en cuanto a hidratación y efecto calmante y por facilitar una formulación efectiva y estable.

Además de las cuatro especies estudiadas, para el desarrollo de la formulación se trabajó con cinco especies adicionales (*Echinacea purpurea*, *Thymus vulgaris*, *Thymus ziggis*, *Salvia lavandulifolia* y *Salvia sclarea*). Con la excepción de *Salvia sclarea*, el resto fueron descartadas a lo largo del proyecto ya fuese por las dificultades que presentaron en su cultivo ecológico, por su bajo rendimiento en la extracción o también a causa de los posibles efectos adversos de algunos componentes detectados en sus extractos. *Salvia officinalis*, *Jasonia glutinosa*, *Echinacea purpurea*, *Thymus vulgaris*, *Thymus ziggis* y *Salvia lavandulifolia* fueron reservadas para otras aplicaciones futuras.

Una vez que el consorcio, asesorado por el laboratorio cosmético, decidió cuales eran las especies a incluir en la formulación, hubo que generar en torno a 750 gramos de extractos

supercríticos entre extracción SCE de *Calendula officinalis* y extracción SCE y fraccionamiento SAF de *Salvia sclarea*. Para este último se utilizaron las condiciones óptimas de trabajo previstas por la aplicación de un diseño experimental RSM.

Todos los extractos obtenidos en nuestro laboratorio para su inclusión en el formulado cosmético final deben de cumplir una serie de requisitos legales: tienen que estar caracterizados (descriptiva del aspecto, color, olor, propiedades y usos...etc), identificados (tanto el producto como sus riesgos) y aprobar los correspondientes test microbiológicos y de estabilidad química. Toda esta información se incluyó en las correspondientes fichas técnicas y de seguridad para cada especie. Los estudios microbiológicos, realizados por laboratorios independientes, demostraron que todos los extractos eran seguros. A modo de ejemplo, se adjunta en el Anexo VI tanto la ficha técnica como la de seguridad cumplimentadas para la especie *Calendula officinalis*. Así mismo, en el Anexo VII se incluyen también los análisis microbiológicos de *Salvia sclarea*.



Figura 51. Fotografía del producto final cosmético hidratante SPAGYRIA.



Figura 52. Ensayos de la crema SPAGYRIA en voluntarios en el MEDES.

Finalmente, la formulación cosmética, Figura 51, final tuvo que pasar por un proceso de evaluación de seguridad idéntico al que se exige para un producto cosmético comercial a través de la aprobación de la agencia francesa ANSM (L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé). Esta formulación ha sido ensayada, Figura 52, en voluntarios en el MEDES (Institut de Médecine et de Physiologie Spatiales, Toulouse, Francia).

4.4. Otras actividades en colaboración

De forma adicional al trabajo realizado en esta tesis, y de cara a un posible escalado del proceso SAF, se inició una colaboración con el Grupo de investigación de Fluidodinámica Numérica (GFN), perteneciente a la Universidad de Zaragoza. Dicha colaboración está orientada inicialmente a un estudio de la fluidodinámica en la cámara de precipitación teniendo en cuenta la particular geometría de la misma. El modelo permite estudiar el flujo multiespecie (CO_2 + etanol) bajo distintas condiciones de operación y contorno y abre una puerta futura de estudio de la precipitación en SAF con la geometría actual de la cámara de precipitación.

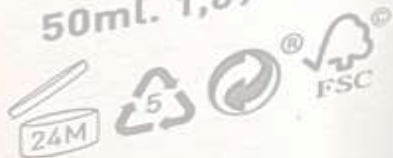
Capítulo 5. Síntesis y Conclusiones

INGREDIENTS
Melissa officinalis extract, Aqua, Prunus amygdalus dulcis oil, Glycerin, Sorbitan olivate, Ceteraryl olivate, Xanthan gum, Sodium levulinate, Sodium benzoate, Potassium sorbate, Cetyl palmitate, Citrus grandis fruit extract, Sorbitan palmitate, Sodium anisate, Glyceryl caprylate, Salvia sclarea extract, Parfum, Inulin lauryl carbamate, Tocoferol, Calendula officinalis extract, D-limonene, Linalool.



MUESTRA GRATUITA

50ml. 1,69 fl.oz



BINDU 2013, S.L.
C/ MAYOR, 20
22411 SANTALECINA
HUESCA
WWW.KARICIA.COM

**SPA
GY
RIA**

Crema hidratante
facial ecológica
Crème hydratante
écologique
pour le visage

Imagen Capítulo 5: Crema hidratante facial ecológica SPAGYRIA

El trabajo desarrollado y presentado a lo largo de esta memoria para cubrir los múltiples objetivos propuestos, ha conducido a la obtención de resultados de diversa índole, por lo que se estima conveniente el realizar en este capítulo una síntesis de los mismos que faciliten su visión global.

La selección de las plantas aromático-medicinales se realizó esencialmente en base a una búsqueda bibliográfica sobre sus usos cosméticos y/o farmacéuticos, la posibilidad de utilizarlas como fuentes naturales para la concentración de compuestos de interés y por su adaptación al territorio. *Salvia officinalis*, *Calendula officinalis*, *Melissa officinalis* y *Jasonia glutinosa* fueron las especies finalmente seleccionadas bajo estos criterios.

A fin de cumplir con los requisitos exigidos para la incorporación de un extracto en una formulación cosmética, se ha implementado en nuestro laboratorio un sistema de trazabilidad para la obtención de extractos, basado en el Reglamento 178/2002, Sistema APPCC y en la Norma ISO 22000. Esto llevó emparejado la realización de una serie de fichas de trazabilidad en el laboratorio que incluían desde las de registro de entrada de material vegetal hasta fichas de envíos de muestras, de determinación de humedad o de procesado del material (molienda, maceración, rotavaporización, extracción y fraccionamiento). A modo de ejemplo, en el Anexo VI se incluye una ficha de trazabilidad cumplimentada correspondiente a la etapa de recepción del material vegetal. Así mismo, también se generaron modelos de fichas técnicas y de seguridad con la información pertinente relativa a la identificación, caracterización de los extractos obtenidos y su estabilidad química y microbiológica.

En esta tesis se ha abordado, por primera vez en nuestro laboratorio, la realización del desengrasado del material vegetal mediante un proceso de extracción supercrítico con CO₂ (SCE) lo que supone la obtención de un producto más limpio que el obtenido con una maceración en hexano. Los rendimientos en este proceso de desengrasado mediante extracción supercrítica (Y_{SCE}) para cada una de las especies estudiadas fueron: 4.9% para *Salvia officinalis*, 8.3% para *Calendula officinalis* y 1.9% para *Melissa officinalis* y *Jasonia glutinosa*, de los cuales destaca el valor de *C. officinalis* por ser ampliamente superior al resto.

Tras la extracción supercrítica del material vegetal, se realizó una maceración etanólica del material desengrasado para obtener la fracción antioxidante, rica en los compuestos fenólicos de interés cosmético/farmacéutico: ácido clorogénico (CHA), ácido cafeico (CAF), ácido ferúlico (FA) y ácido rosmarínico (RA). El rendimiento bruto de esta maceración para cada especie fue de 10.9% para *Salvia officinalis*, 7.2% para *Calendula officinalis*, 5.2% para *Melissa officinalis* y 4.2% para *Jasonia glutinosa*.

A partir del extracto etanólico obtenido mediante maceración, se prepararon las correspondientes disoluciones de alimentación del proceso de Fraccionamiento Supercrítico Antisolvente (SAF) para la concentración de los compuestos de interés. En general, en el proceso SAF se consiguió una elevada recuperación del material, alcanzándose, para cada una de las especies estudiadas, los siguientes porcentajes: 85.1% para *Salvia officinalis*, 75.7% para *Calendula officinalis*, 95.1% para *Melissa officinalis* y 95.3% para *Jasonia glutinosa*. La mayor parte del material precipitó en la cámara (PV) y no en el colector (DV), siendo los rendimientos: PV: 64.8%, DV: 28.5% para *Salvia officinalis*; PV: 77.6%, DV: 22.6% para *Melissa officinalis* y PV: 64.4%, DV: 30.9% para *Jasonia glutinosa*. El caso de *Calendula officinalis* supone una excepción ya que el reparto de los rendimientos fue de 47% en PV y 42.8% en DV.

La caracterización analítica mediante HPLC-PDA (13 experimentos x 3 fracciones SAF: alimentación, cámara y colector) de los extractos de cada una de las especies estudiadas, detectó CHA en *Salvia officinalis*, *Calendula officinalis* y *Jasonia glutinosa*; CAF en *S. officinalis*, *C. officinalis* y *M. officinalis*; RA en *S. officinalis* y *M. officinalis* y FA en *C. officinalis*. Adicionalmente, los análisis revelaron que RA y FA quedaban retenidos completamente en cámara mientras que CAF y CHA presentaron un reparto que depende ya no solo de las condiciones experimentales, sino también de la naturaleza del extracto de alimentación propio de cada planta. Además, fundamentalmente en cámara, se observa un enriquecimiento promedio para la mayoría de los compuestos de 1.4 veces.

En cuanto a la evaluación del proceso SAF para obtener extractos ricos en compuestos antioxidantes de interés que puedan incluirse en una formulación cosmética o farmacéutica, se realizó un estudio estadístico del proceso. El modelo CCD utilizado en este trabajo permitió establecer el diseño de experimentos y obtener las condiciones

de presión y caudal de CO₂ óptimas de concentración de extractos para cada una de las especies estudiadas. El resto de condiciones de trabajo, temperatura (40 °C), caudal de disolución (0.45 mL/min) y concentración de la disolución de alimentación (3% en peso) se mantuvieron constantes a los valores que habitualmente se emplean en el grupo de investigación por experiencias previas.

El análisis estadístico de las respuestas para el proceso SAF correspondientes a cada especie vegetal estudiada mostró que, para el caso de *C. officinalis* y *M. officinalis*, los rendimientos en cámara, en colector y global (Y_{PV} , Y_{DV} , Y_{SAF}) se ajustaron correctamente al modelo propuesto (Ecuación 8). Solamente los rendimientos Y_{PV} para *S. officinalis* e Y_{DV} para *J. glutinosa* no respondieron al modelo utilizado. Por otro lado, para el conjunto de especies, los enriquecimientos en cámara, $E_{CHA/PV}$, $E_{FA/PV}$ y $E_{RA/PV}$, de los ácidos clorogénico, ferúlico y rosmarínico, se ajustaron correctamente. Este mismo buen ajuste se obtuvo para el enriquecimiento del ácido cafeico tanto en cámara como en colector ($E_{CAF/PV}$, $E_{CAF/DV}$) para *Melissa officinalis*. Los valores R² para los ajustes de todos los modelos se situaron entre el 73.85% y el 96.74% y resulta destacable que las desviaciones estándar para todos los modelos fuesen inferiores al 5%.

Las condiciones óptimas resultaron ser similares para *Salvia officinalis* (148 bar, 10 g/min), *Melissa officinalis* (140 bar, 12 g/min) y *Jasania glutinosa* (150 bar, 19 g/min), mientras que *Calendula officinalis* (153 bar, 42 g/min) supone una excepción al requerir un caudal de CO₂ superior al resto debido, probablemente, al carácter glutinoso de sus extractos. Para las condiciones de presión y caudal de CO₂ óptimas, según el tratamiento estadístico CCD, se alcanzaría un valor promedio de recuperación total de material superior al 90% si se excluye *C. officinalis*, para la cual esta recuperación sería solo del 67%. De este material recuperado para *M. officinalis* y *J. glutinosa* más del 65% podría recuperarse en la fracción de cámara. En cuanto a los enriquecimientos óptimos calculados, destaca el valor estimado en cámara para el ácido cafeico procedente de *M. officinalis* ya que alcanzaría un valor de 1.77, muy superior al máximo de los obtenidos en la serie de experimentos (1.19).

La evaluación de las herramientas computacionales, modelos QSAR, permeabilidad en piel *in silico* y screening inverso para localización de dianas sobre las que interaccionan los compuestos de interés, presentaron los siguientes resultados:

- Se estableció una correlación original basada en modelos QSAR entre actividad antioxidante y el llamado perfil σ relacionado con la densidad de carga superficial en la molécula. Se desarrollaron y compararon dos modelos basados en distintas particiones de este perfil, en concreto, en 4 y 10 áreas, utilizándose valores experimentales contrastados de actividad antioxidante de 11 compuestos que actuaron como conjunto de entrenamiento. Para el modelo de 4 áreas, todos los descriptores (S_1 - S_4) fueron estadísticamente significativos mientras que el modelo de 10 áreas necesitó cinco descriptores, S_1 y S_4 - S_7 , de los cuales solo estos últimos resultaron significativos. En cuanto al ajuste, se encontró que el modelo de 10 áreas presentó unos coeficientes de regresión significativamente mayores. Los valores R^2 , R^2 (adjust), R^2 (pred) y s para el modelo de 4 áreas fueron 80.0%, 66.7%, 1.3% y 0.17, respectivamente, mientras que para el modelo de 10 áreas fueron 93.1%, 86.3%, 72.7% y 0.11. Aunque el ajuste del modelo de 10 áreas parezca mucho más prometedor que el de 4 áreas, debe señalarse que ninguna de las propuestas llega a describir los datos que conforman el conjunto de validación de manera satisfactoria.
- Con respecto al modelo de permeabilidad en piel, propuesto por Schwöbel et al. e implementado con el software COSMOtherm, se calcularon las resistencias definidas por las ecuaciones 11-13 para cada uno de los compuestos bajo estudio, así como sus posibles vías de permeación y valores generales de permeabilidad. La aplicación de este modelo mostró que la capa con mayor resistencia para CAF, FA y RA fue el estrato córneo, mediante ruta transcelular (corneocitos), mientras que para CHA fue el estrato espinoso a través de la vía intercelular (matriz lipídica). Los valores de permeabilidad, $\log K_p$, para CAF, CHA, FA y RA fueron -7.01, -8.39, -6.69 y -8.48, respectivamente, de manera que ninguno de los activos alcanza las capas profundas de la epidermis simulada. Estos valores resultaron similares a los calculados por Zhang et al. y Hui-Zhen et al con otros modelos teóricos.

- Se utilizó la base de datos SEA para comprobar la idoneidad de los compuestos fenólicos CHA, CAF, FA y RA como posibles principios activos en la industria farmacéutica. Para cada uno de los compuestos estudiados se encontraron interacciones con dianas de diversa índole, aunque mayoritariamente todos los compuestos tienen altas probabilidades de presentar actividad contra dianas implicadas en procesos cancerosos. La intensidad de estas interacciones se evalúa mediante el coeficiente de Tanimoto (T_c) y el valor E, calculados por el servidor web SEA.

Conclusiones finales

Los resultados obtenidos a lo largo de la presente tesis y su análisis han permitido alcanzar una serie de conclusiones que han sido parcialmente expuestas en los trabajos publicados incluidos al final del Anexo VIII, de manera que a continuación se destacan solamente las más significativas.

- Las especies seleccionadas *Salvia officinalis*, *Calendula officinalis*, *Melissa officinalis* y *Jasonia glutinosa* resultaron adecuadas a los criterios establecidos según la relevancia para su uso cosmético y/o farmacéutico, fuente natural de los compuestos de interés y carácter autóctono de las plantas. A lo largo de todo el trabajo realizado en esta tesis, se ha comprobado que los extractos obtenidos a partir dichas especies tienen un potencial uso e interés en las industrias cosmética y farmacéutica.
- Se ha implementado un sistema de trazabilidad adaptado a nuestro laboratorio, para cumplir con los estándares de calidad necesarios que permitan gestionar ingredientes cosméticos con las garantías adecuadas para su incorporación en *formulados orgánicos*.
- Se ha realizado una secuenciación de dos tecnologías basadas en CO₂ supercrítico que ha permitido la obtención de extractos concentrados en compuestos antioxidantes de forma más sostenible a partir de las especies vegetales estudiadas. La etapa inicial de desengrasado mediante extracción supercrítica con CO₂ ha resultado efectiva y ventajosa como sustituta de la maceración en hexano, uno de los pasos más controvertidos que venía utilizándose previamente en otros trabajos.
- La metodología analítica de HPLC-PDA propuesta para el desarrollo de este trabajo, ha sido adecuada para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos de interés seleccionados: ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido rosmarínico.
- El proceso de Fraccionamiento Supercrítico Antidisolvente (SAF) ha permitido recuperar la mayor parte del material de alimentación en la cámara de precipitación,

generándose en la misma una fracción, libre de disolventes, y enriquecida en los activos de interés (del 40% en promedio). Particularmente, los ácidos rosmarínico y ferúlico quedaron exclusivamente retenidos en esta fracción.

- El tratamiento estadístico mediante el diseño CCD ha sido de gran utilidad para detallar la influencia notable de la presión y el caudal de CO₂ sobre el proceso SAF, en concreto sobre los rendimientos y los enriquecimientos de los compuestos en las dos fracciones generadas. Para cada una de las especies vegetales fue posible deducir, dentro de los intervalos estudiados, las condiciones óptimas de presión y caudal de CO₂, que resultaron ser muy próximas para tres de ellas (148 bar, 10 g/min para *S. officinalis*, 140 bar, 12 g/min para *M. officinalis* y 150 bar, 19 g/min para *J. glutinosa*), siendo la excepción *C. officinalis* (153 bar, 42 g/min). Con estas condiciones, teóricamente podríamos alcanzar recuperaciones del material superiores al 90% con rendimientos máxicos en cámara superiores a los de colector (65%). Particularmente, en el caso de melisa, se alcanzaría un enriquecimiento en cámara del ácido cafeico del 77%. Cabe señalar que las condiciones óptimas calculadas para la concentración de activos son asumibles de cara a un posible escalado industrial, si bien hay que puntualizar el interés de trabajar a flujos más reducidos para el caso de salvia y de valorar las dificultades de recogida de material procedente de caléndula por su naturaleza pastosa.
- El estudio de la correlación entre el perfil σ y la actividad antioxidante mediante el desarrollo de un modelo QSAR preliminar, ha permitido concluir que el modelo realizado con 10 áreas (particiones de dicho perfil) se ajustaba mejor que el modelo realizado con 4 áreas. Además, la partición más fina (10 áreas) tiene un mayor sentido químico-físico que permite, de forma aproximada, relacionar cada área con una parte de la estructura de la molécula, llegándose a la conclusión de que, para los compuestos estudiados, las áreas significativas correspondientes a las zonas neutras de la molécula son las que más influyen en la actividad antioxidante. Esto se debe a que dichas zonas son las que permiten la deslocalización y por tanto la estabilización del electrón libre que aparece por la abstracción de un átomo de H.

Todo esto apunta a que el modelo QSAR de 10 áreas pudiera convertirse en una herramienta útil para realizar una selección de activos basada en la actividad antioxidante. No obstante, en primer lugar sería necesario generar una base de datos cuidadosamente seleccionada mediante ensayos estandarizados que permitiesen obtener resultados más fiables.

- El modelo computacional de permeabilidad cutánea utilizado para evaluar el grado de penetrabilidad de los compuestos seleccionados ha resultado una herramienta poderosa que permite evaluar *in silico* la idoneidad del comportamiento de estos compuestos en la epidermis. Los resultados alcanzados ponen de manifiesto la viabilidad y consistencia de esta metodología respecto de otras preexistentes, y se puede concluir que los compuestos activos son seguros para su aplicación tópica.
- A fin de explorar el interés que los activos seleccionados pueden tener en la industria farmacéutica, se optó por aplicar la herramienta online Similarity Ensemble Approach (SEA), basada en el principio de similitud química cuyo uso ha crecido exponencialmente en los últimos años. Esta herramienta ha permitido realizar un cribado de dianas que interaccionan con los compuestos de interés, lo que ha facilitado la localización de posibles bioactividades asociadas a estos compuestos y por tanto de sus posibles usos farmacéuticos. Particularmente, resulta de interés la menos estudiada *Jasonia glutinosa* por el contenido de ácido clorogénico en sus extractos y la capacidad de penetración de este compuesto en la epidermis.
- Gracias a los estudios y al trabajo realizado en esta tesis se ha logrado obtener los ingredientes activos de calidad que formaron parte de la formulación de dos preparados cosméticos que, junto con el blanco, fueron probados por paneles de 60 voluntarios en el MEDES (ensayos *in vivo*) y que, finalmente, permitieron fabricar una crema hidratante facial ecológica natural con el sello ORGANIC*, según la normativa de cosmética natural y orgánica del proyecto SPAGYRIA basada en la

UNE-ISO 16128/1/2 de 2018 y en el sello NACEN creado por la marca de cosmética Karicia.

En definitiva, el estudio realizado en esta tesis asienta las bases metodológicas para el desarrollo de futuros trabajos que tengan como finalidad la implementación de prototipos o formulados con una perspectiva ecológica y sostenible dentro de la industria cosmética, farmacéutica o alimentaria.

*Sello ORGANIC según norma SPAGYRIA: Cosmética elaborada con ingredientes extraídos directamente de la naturaleza en producción ecológica o silvestre.

Bibliografía

1. Stahel, W.R. *Performance Economy, 2nd Edition*; Palgrave: Basingstoke, 2010; pp. 1–349; ISBN 978-0-230-27490-7.
2. Salvador, R.; Souza, J.; Jesus, R.; Ramos Huarachi, D.A.; Francisco, A. *Circular Economy: Fundamentals and Applications.*; August 4 2019.
3. De Angelis, R. *Business Models in the Circular Economy*; Springer; ISBN 978-3-319-75127-9.
4. Bourguignon, D. Closing the Loop: New Circular Economy Package. *Enero 2016* 9.
5. Circular Economy Introduction Available online: https://ellenmacarthurfoundation.org/topics/circular-economy-introduction/overview?gclid=CjwKCAjwqauVBhBGEiwAXOepkfdQxz033c4nfi1Pf1TDOQQ7WuEcxrYl6N7ZSYRhLCZZKF38r8oWuxoCWnwQAvD_BwE (accessed on 16 June 2022).
6. First Circular Economy Action Plan Available online: https://environment.ec.europa.eu/topics/circular-economy/first-circular-economy-action-plan_en (accessed on 15 June 2022).
7. European Commission. Directorate General for the Environment.; Cambridge Econometrics.; Trinomics.; ICF. *Impacts of Circular Economy Policies on the Labour Market: Final Report and Annexes.*; Publications Office: LU, 2018; ISBN 978-92-79-86856-6.
8. *COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS A New Circular Economy Action Plan For a Cleaner and More Competitive Europe*; 2020;
9. Circular Economy in the Agri-Food Sector | Interreg Europe - Sharing Solutions for Better Policy Available online: <https://www.interregeurope.eu/news-and-events/news/circular-economy-in-the-agri-food-sector-0> (accessed on 16 June 2022).
10. *Moving Forward on Food Loss and Waste Reduction*; FAO, Ed.; The state of food and agriculture; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, 2019; ISBN 978-92-5-131789-1.
11. Petersen-Rockney, M.; Baur, P.; Guzman, A.; Bender, S.F.; Calo, A.; Castillo, F.; De Master, K.; Dumont, A.; Esquivel, K.; Kremen, C.; et al. Narrow and Brittle or Broad and Nimble? Comparing Adaptive Capacity in Simplifying and Diversifying Farming Systems. *Front. Sustain. Food Syst.* **2021**, *5*, 564900, doi:10.3389/fsufs.2021.564900.
12. Scarascia-Mugnozza, G.; Perrino, P. The History of Ex Situ Conservation and Use of Plant Genetic Resources.; 2002; p. 22.
13. IPES-Food *From Uniformity to Diversity: A Paradigm Shift from Industrial Agriculture to Diversified Agroecological Systems*; 2016;
14. Messean, A.; Viguier, L.; Paresys, L.; Aubertot, J.-N.; Canali, S.; Iannetta, P.; Justes, E.; Karley, A.; Keillor, B.; Kemper, L.; et al. Enabling Crop Diversification to Support Transitions Toward More Sustainable European Agrifood Systems. *Front. Agric. Sci. Eng.* **2021**, *8*, 474–480, doi:10.15302/J-FASE-2021406.
15. EIP-AGRI *Plant-Based Medicinal and Cosmetic Products*; 2020; p. 24;.
16. EIP-AGRI *Benefits of Medicinal and Aromatic Plants for Farming/Forest Systems: Multifunctionality, Ecosystem Services and Social Benefits*; 2020; p. 10;.
17. Rao, M.R.; Palada, M.C.; Becker, B.N. Medicinal and Aromatic Plants in Agroforestry Systems. *Agrofor. Syst.* **2004**, *61–2*, 107–122, doi:10.1023/B:AGFO.0000028993.83007.4b.
18. Kumar, J.; Malik, N.; Atri, N. Aromatic and Medicinal Plants for Phytoremediation: A Sustainable Approach. In; 2021; pp. 485–543 ISBN 978-3-030-58974-5.

19. Patel, A.; Patra, D.D. A Sustainable Approach to Clean Contaminated Land Using Terrestrial Grasses. In *Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants*; Bauddh, K., Singh, B., Korstad, J., Eds.; Springer: Singapore, 2017; pp. 305–331 ISBN 978-981-10-3084-0.
20. Kumar, D.; Singh, B.; Sharma, Y.C. Bioenergy and Phytoremediation Potential of *Milletia Pinnata*. In *Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants*; Bauddh, K., Singh, B., Korstad, J., Eds.; Springer: Singapore, 2017; pp. 169–188 ISBN 978-981-10-3084-0.
21. Abioye, O.P.; Ijah, U.J.J.; Aransiola, S.A. Phytoremediation of Soil Contaminants by the Biodiesel Plant *Jatropha Curcas*. In *Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants*; Bauddh, K., Singh, B., Korstad, J., Eds.; Springer: Singapore, 2017; pp. 97–137 ISBN 978-981-10-3084-0.
22. Saba, N.; Jawaid, M.; Hakeem, K.R.; Paridah, M.T.; Khalina, A.; Alothman, O.Y. Potential of Bioenergy Production from Industrial Kenaf (*Hibiscus Cannabinus* L.) Based on Malaysian Perspective. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2015**, *42*, 446–459, doi:10.1016/j.rser.2014.10.029.
23. Mahar, A.; Wang, P.; Ali, A.; Awasthi, M.K.; Lahori, A.H.; Wang, Q.; Li, R.; Zhang, Z. Challenges and Opportunities in the Phytoremediation of Heavy Metals Contaminated Soils: A Review. *Ecotox. Environ. Safe.* **2016**, *126*, 111–121, doi:10.1016/j.ecoenv.2015.12.023.
24. Gupta, A.K.; Verma, S.K.; Khan, K.; Verma, R.K. Phytoremediation Using Aromatic Plants: A Sustainable Approach for Remediation of Heavy Metals Polluted Sites. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 10115–10116, doi:10.1021/es403469c.
25. Lajayer, B.A.; Ghorbanpour, M.; Nikabadi, S. Heavy Metals in Contaminated Environment: Destiny of Secondary Metabolite Biosynthesis, Oxidative Status and Phytoextraction in Medicinal Plants. *Ecotox. Environ. Safe.* **2017**, *145*, 377–390, doi:10.1016/j.ecoenv.2017.07.035.
26. Verma, S.K.; Singh, K.; Gupta, A.K.; Pandey, V.C.; Trivedi, P.; Verma, R.K.; Patra, D.D. Aromatic Grasses for Phytomanagement of Coal Fly Ash Hazards. *Ecol. Eng.* **2014**, *73*, 425–428, doi:10.1016/j.ecoleng.2014.09.106.
27. Qué Es SPAGYRIA | Spagyria Available online: <https://www.spagyria-fres.eu/que-es-spagyria/> (accessed on 16 June 2022).
28. Sukhdev Swami Handa *An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants*; Italy, 2008;
29. Petrovska, B.B. Historical Review of Medicinal Plants' Usage. *Pharmacogn Rev* **2012**, *6*, 1–5, doi:10.4103/0973-7847.95849.
30. Staub, P.O.; Casu, L.; Leonti, M. Back to the Roots: A Quantitative Survey of Herbal Drugs in Dioscorides' *De Materia Medica* (Ex Matthioli, 1568). *Phytomedicine* **2016**, *23*, 1043–1052, doi:10.1016/j.phymed.2016.06.016.
31. Inoue, M.; Hayashi, S.; Craker, L.E. In *Role of medicinal and aromatic plants: past, present and future*; Perveen, S., Al-Taweel, A., Eds.; IntechOpen: London, 2019; p. 19.
32. Fenja Gunn *The Artificial Face A History of Cosmetics*; David & Charles: Londres, Inglaterra, 1973; ISBN 0-7153-6299-2.
33. González-Minero, F.J.; Bravo-Díaz, L. The Use of Plants in Skin-Care Products, Cosmetics and Fragrances: Past and Present. *Cosmetics* **2018**, *5*, 50, doi:10.3390/cosmetics5030050.
34. Middeke-Conlin, R. The Scents of Larsa: A Study of the Aromatics Industry in an Old Babylonian Kingdom. 53.
35. El-Kilany, E.; Raoof, E. Facial Cosmetics in Ancient Egypt By. **2017**, 20.
36. Gonzalez Minero, F.J.; Bravo Diaz, L. History and present of skin care products, cosmetics and fragrances. Especially those derived from plants. *Ars Pharm.* **2017**, *58*, 5–12, doi:10.4321/S2340-98942017000100001.
37. ProceessNet-Subject Division Plant Based Extracts *Phytoextracts. Proposal towards a New Comprehensive Research Focus*; Frankfurt, 2017; p. 33;.
38. Sanchez, M.; Gonzalez-Burgos, E.; Iglesias, I.; Lozano, R.; Gomez-Serranillos, M.P. Current Uses and Knowledge of Medicinal Plants in the Autonomous Community of Madrid (Spain):

- A Descriptive Cross-Sectional Study. *BMC Complement. Med. Ther.* **2020**, *20*, 306, doi:10.1186/s12906-020-03089-x.
39. Knoess, W.; Chinou, I. Regulation of Medicinal Plants for Public Health - European Community Monographs on Herbal Substances. *Planta Med.* **2012**, *78*, 1311–1316, doi:10.1055/s-0031-1298578.
 40. Directive 2004/24/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 Amending, as Regards Traditional Herbal Medicinal Products, Directive 2001/83/EC on the Community Code Relating to Medicinal Products for Human Use; 2004; Vol. 136;.
 41. Reglamento (CE) n o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 , sobre aditivos alimentarios (Texto pertinente a efectos del EEE); 2008; Vol. 354;.
 42. Reglamento (CE) No 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos (versión refundida) (Texto pertinente a efectos del EEE) Texto pertinente a efectos del EEE; 2020;
 43. Samarth, R.M.; Samarth, M.; Matsumoto, Y. Medicinally Important Aromatic Plants with Radioprotective Activity. *Future Sci OA* **2017**, *3*, FSO247, doi:10.4155/fsoa-2017-0061.
 44. Kaur, N.; Ahmed, T. Bioactive Secondary Metabolites of Medicinal and Aromatic Plants and Their Disease-Fighting Properties. In *Medicinal and Aromatic Plants: Healthcare and Industrial Applications*; Aftab, T., Hakeem, K.R., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2021; pp. 113–142 ISBN 978-3-030-58975-2.
 45. Padalia, R.C. Medicinal and Aromatic Plants: Chemical Goldmines. 1.
 46. Lin, D.; Xiao, M.; Zhao, J.; Li, Z.; Xing, B.; Li, X.; Kong, M.; Li, L.; Zhang, Q.; Liu, Y.; et al. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules* **2016**, *21*, 1374, doi:10.3390/molecules21101374.
 47. Piluzza, G.; Bullitta, S. Correlations between Phenolic Content and Antioxidant Properties in Twenty-Four Plant Species of Traditional Ethnoveterinary Use in the Mediterranean Area. *Pharm. Biol.* **2011**, *49*, 240–247, doi:10.3109/13880209.2010.501083.
 48. Lizcano, L.J.; Viloria-Bernal, M.; Vicente, F.; Angel Berrueta, L.; Gallo, B.; Martinez-Canamero, M.; Begona Ruiz-Larrea, M.; Ignacio Ruiz-Sanz, J. Lipid Oxidation Inhibitory Effects and Phenolic Composition of Aqueous Extracts from Medicinal Plants of Colombian Amazonia. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 5454–5467, doi:10.3390/ijms13055454.
 49. Teixeira, T.S.; Vale, R.C.; Almeida, R.R.; Ferreira, T.P.S.; Guimaraes, G.L. Antioxidant Potential and Its Correlation with the Contents of Phenolic Compounds and Flavonoids of Methanolic Extracts from Different Medicinal Plants. *Rev. Virtual Quim.* **2017**, *9*, 1546–1559, doi:10.21577/1984-6835.20170090.
 50. Pojer, E.; Mattivi, F.; Johnson, D.; Stockley, C.S. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2013**, *12*, 483–508, doi:10.1111/1541-4337.12024.
 51. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* **2013**, 162750, doi:10.1155/2013/162750.
 52. Minatel, I.O.; Borges, C.; Ferreira, M.I.; Gomez Gomez, H.; Chen, O.; Lima, G. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. In *Phenolic Compounds - Biological Activity*; InTechOpen, 2017; pp. 1–24 ISBN 978-953-51-2960-8.
 53. Goleniowski, M.; Bonfill, M.; Cusido, R.; Palazón, J. Phenolic Acids. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp. 1951–1973 ISBN 978-3-642-22144-6.
 54. Ghasemzadeh, A.; Jaafar, H.Z.E.; Rahmat, A. Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids Content in Two Varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe). *Molecules* **2010**, *15*, 4324–4333, doi:10.3390/molecules15064324.

55. Kumar, N.; Goel, N. Phenolic Acids: Natural Versatile Molecules with Promising Therapeutic Applications. *Biotechnol. Rep.* **2019**, *24*, e00370, doi:10.1016/j.btre.2019.e00370.
56. Altus Market Research *Global Chlorogenic Acid Market Size, Share by Product, End-Use, Applications, Industry Analysis Report, Growth Potential, Regional Outlook and Forecast, 2022–2028*; 2022; p. 242;.
57. Global Chlorogenic Acid Market by Type (Honeysuckle Extract (HPLC 5%-20%), Honeysuckle Extract (HPLC 98%), Eucommia Extract (HPLC 5%-30%), Eucommia Extract (HPLC 50%-90%), Eucommia Extract (HPLC 98%), Green Coffee Bean Extract (HPLC 45%-50%), Other), By Application (Supplements, Pharmaceuticals, Cosmetics, Others) And By Region (North America, Latin America, Europe, Asia Pacific and Middle East & Africa), Forecast From 2022 To 2030. *Dataintelo*.
58. Chlorogenic Acid Market Size and Share 2022, Global Industry Analysis by Trends, Future Demands, Emerging Technologies, Demand by Regions, Key Players Showing Impressive Growth by 2026 with Top Growth Companies | 124 Report Pages - MarketWatch Available online: <https://www.marketwatch.com/press-release/chlorogenic-acid-market-size-and-share-2022-global-industry-analysis-by-trends-future-demands-emerging-technologies-demand-by-regions-key-players-showing-impressive-growth-by-2026-with-top-growth-companies-124-report-pages-2022-11-14> (accessed on 25 November 2022).
59. Ferulic Acid Market Size, Trends, Growth, Report 2022 To 2030 Available online: <https://www.precedenceresearch.com/ferulic-acid-market> (accessed on 25 November 2022).
60. Ferulic Acid Market Available online: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/ferulic-acid-market> (accessed on 25 November 2022).
61. Research, R.M. Rosmarinic Acid Market Size, Share, Growth & Forecast 2030 Available online: <https://www.rubixmarketresearch.com/rosmarinic-acid-market> (accessed on 25 November 2022).
62. Caffeic Acid Market Available online: <https://www.transparencymarketresearch.com/caffeic-acid-market.html> (accessed on 25 November 2022).
63. Verified Market Reports *Caffeic Acid Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast, 2020 - 2030*; 2022; p. 202;.
64. Kintzios, S.E. *Sage: The Genus Salvia*; Harwood Academic Publishers: Amsterdam, 2000; ISBN 978-0-203-30455-6.
65. Adams, M.; Gmuender, F.; Hamburger, M. Plants Traditionally Used in Age Related Brain Disorders - A Survey of Ethnobotanical Literature. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113*, 363–381, doi:10.1016/j.jep.2007.07.016.
66. Barnes, J.; Anderson, L.A.; Phillipson, J.D. *Herbal Medicines*; 3rd ed.; Pharmaceutical Press: London ; Grayslake, IL, 2007; ISBN 978-0-85369-623-0.
67. European Medicines Agency European Union Herbal Monograph on *Salvia Officinalis* L., Folium. *Off. J. Eur. Union* **2016**, *44*, 8.
68. European Chemical Agency Sage, *Salvia officinalis*, ext. - Substance Information - ECHA Available online: <https://echa.europa.eu/es/substance-information-/substanceinfo/100.074.545> (accessed on 7 December 2020).
69. Generalic, I.; Skroza, D.; Ljubenkov, I.; Katalinic, A.; Burcul, F.; Katalinic, V. Influence of the Phenophase on the Phenolic Profile and Antioxidant Properties of Dalmatian Sage. *Food Chem.* **2011**, *127*, 427–433, doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.013.
70. Ghorbani, A.; Esmaeilzadeh, M. Pharmacological Properties of *Salvia Officinalis* and Its Components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **2017**, *7*, 433–440, doi:10.1016/j.jtcme.2016.12.014.

71. Jasicka-Misiak, I.; Poliwoda, A.; Petecka, M.; Buslovych, O.; Shlyapnikov, V.A.; Wieczorek, P.P. ANTIOXIDANT PHENOLIC COMPOUNDS IN *Salvia Officinalis* L. AND *Salvia Sclarea* L. *Ecol. Chem. Eng. S-* **2018**, *25*, 133–142, doi:10.1515/eces-2018-0009.
72. El Euch, S.K.; Hassine, D.B.; Cazaux, S.; Bouzouita, N.; Bouajila, J. *Salvia Officinalis* Essential Oil: Chemical Analysis and Evaluation of Anti-Enzymatic and Antioxidant Bioactivities. *S. Afr. J. Bot.* **2019**, *120*, 253–260, doi:10.1016/j.sajb.2018.07.010.
73. Khiya, Z.; Hayani, M.; Gamar, A.; Kharchouf, S.; Amine, S.; Berrekhis, F.; Bouzoubae, A.; Zair, T.; El Hilali, F. Valorization of the *Salvia Officinalis* L. of the Morocco Bioactive Extracts: Phytochemistry, Antioxidant Activity and Corrosion Inhibition. *J. King Saud Univ. Sci.* **2019**, *31*, 322–335, doi:10.1016/j.jksus.2018.11.008.
74. Moreira, M.R.; Souza, A.B.; Moreira, M.A.; Bianchi, T.C.; Carneiro, L.J.; Estrela, F.T.; dos Santos, R.A.; Januario, A.H.; Martins, C.H.G.; Ambrosio, S.R.; et al. RP-HPLC Analysis of Manool-Rich *Salvia Officinalis* Extract and Its Antimicrobial Activity against Bacteria Associated with Dental Caries. *Rev. Bras. Farmacogn.-Braz. J. Pharmacogn.* **2013**, *23*, 870–876, doi:10.1590/S0102-695X2013000600003.
75. Wei, Z.-F.; Zhao, R.-N.; Dong, L.-J.; Zhao, X.-Y.; Su, J.-X.; Zhao, M.; Li, L.; Bian, Y.-J.; Zhang, L.-J. Dual-Cooled Solvent-Free Microwave Extraction of *Salvia Officinalis* L. Essential Oil and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *120*, 71–76, doi:10.1016/j.indcrop.2018.04.058.
76. Russo, A.; Formisano, C.; Rigano, D.; Senatore, F.; Delfino, S.; Cardile, V.; Rosselli, S.; Bruno, M. Chemical Composition and Anticancer Activity of Essential Oils of Mediterranean Sage (*Salvia Officinalis* L.) Grown in Different Environmental Conditions. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 42–47, doi:10.1016/j.fct.2012.12.036.
77. Pedro, D.F.N.; Ramos, A.A.; Lima, C.F.; Baltazar, F.; Pereira-Wilson, C. Colon Cancer Chemoprevention by Sage Tea Drinking: Decreased DNA Damage and Cell Proliferation. *Phytother. Res.* **2016**, *30*, 298–305, doi:10.1002/ptr.5531.
78. Abad, A.N.A.; Nouri, M.H.K.; Tavakkoli, F. Effect of *Salvia Officinalis* Hydroalcoholic Extract on Vincristine-Induced Neuropathy in Mice. *Chin. J. Nat. Med.* **2011**, *9*, 354–358, doi:10.3724/SP.J.1009.2011.00354.
79. Miroddi, M.; Navarra, M.; Quattropani, M.C.; Calapai, F.; Gangemi, S.; Calapai, G. Systematic Review of Clinical Trials Assessing Pharmacological Properties of *Salvia* Species on Memory, Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *CNS Neurosci. Ther.* **2014**, *20*, 485–495, doi:10.1111/cns.12270.
80. European Commission CosIng, *Salvia Officinalis* Extract Available online: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=80200 (accessed on 7 December 2020).
81. World Health Organization Geneva *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*; 2002; Vol. 2; ISBN 92-4-154537-2.
82. Chevallier, A. *Encyclopaedia of Medicinal Plants*; Dorling Kindersley: New York : Boston, 2002; ISBN 978-0-7894-1067-2.
83. Arora, D.; Rani, A.; Sharma, A. A Review on Phytochemistry and Ethnopharmacological Aspects of Genus *Calendula*. *Pharmacogn Rev* **2013**, *7*, 179–187, doi:10.4103/0973-7847.120520.
84. European Scientific Cooperative on Phytotherapy *ESCOP Monographs, The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Online Series. Calendulae Flos (Calendula Flower)*; 2019;
85. *Calendula officinalis*, ext. - Substance Information - ECHA Available online: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.076.289> (accessed on 15 July 2021).

86. Bako, E.; Deli, J.; Toth, G. HPLC Study on the Carotenoid Composition of *Calendula* Products. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, *53*, 241–250, doi:10.1016/S0165-022X(02)00112-4.
87. Ukiya, M.; Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Tokuda, H.; Suzuki, T.; Kimura, Y. Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula Officinalis*) Flowers. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1692–1696, doi:10.1021/np068016b.
88. Frum, A. HPLC Determination of Polyphenols from *Calendula Officinalis* L. Flowers. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology* **2017**, *21*, doi:10.1515/auaft-2017-0020.
89. Pasca, M.B.; Pallag, A.; Gitea, D. The Quantitative Determination of Active Principles from *Calendula Officinalis* L. Inflorescences. **2013**, *XII*, 317–320.
90. Ferreira, C.; Pereyra, A.; Patriarca, A.; Mazzobre, M.; Polak, T.; Abram, V.; Buera, M.; PoklarUlrihd, N. Phenolic Compounds in Extracts from Eucalyptus Globulus Leaves and *Calendula Officinalis* Flowers. *Journal of natural products and Research* **2016**, www.jacsdirectory.com.
91. Efstratiou, E.; Hussain, A.I.; Nigam, P.S.; Moore, J.E.; Ayub, M.A.; Rao, J.R. Antimicrobial Activity of *Calendula Officinalis* Petal Extracts against Fungi, as Well as Gram-Negative and Gram-Positive Clinical Pathogens. *Complement Ther Clin Pract* **2012**, *18*, 173–176, doi:10.1016/j.ctcp.2012.02.003.
92. Sahingil, D. GC/MS-Olfactometric Characterization of the Volatile Compounds, Determination Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oil from Flowers of *Calendula (Calendula Officinalis L.)*. *J. Essent. Oil Bear. Plants.* **2019**, *22*, 1571–1580, doi:10.1080/0972060X.2019.1703829.
93. Babae, N.; Moslemi, D.; Khalilpour, M.; Vejdani, F.; Moghadamnia, Y.; Bijani, A.; Baradaran, M.; Kazemi, M.T.; Khalilpour, A.; Pouramir, M.; et al. Antioxidant Capacity of *Calendula Officinalis* Flowers Extract and Prevention of Radiation Induced Oropharyngeal Mucositis in Patients with Head and Neck Cancers: A Randomized Controlled Clinical Study. *DARU* **2013**, *21*, 18, doi:10.1186/2008-2231-21-18.
94. Chroho, M.; Drioiche, A.; Saidi, S.; Zair, T.; Bouissane, L. Total Phenolic and Flavonoids Contents and in Vitro Evaluation of Antioxidant Activity of Several *Calendula Officinalis* (Marigold) Extracts. *J. Biol. Res.-Boll. Soc. Biol. Sper.* **2021**, *94*, 9680, doi:10.4081/jbr.2021.9680.
95. Shivasharan, B.D.; Nagakannan, P.; Thippeswamy, B.S.; Veerapur, V.P.; Bansal, P.; Unnikrishnan, M.K. Protective Effect of *Calendula Officinalis* Linn. Flowers against 3-Nitropropionic Acid Induced Experimental Huntington's Disease in Rats. *Drug Chem. Toxicol.* **2013**, *36*, 466–473, doi:10.3109/01480545.2013.776583.
96. Ray, D.; Mukherjee, S.; Falchi, M.; Bertelli, A.; Braga, P.C.; Das, D.K. Amelioration of Myocardial Ischemic Reperfusion Injury with *Calendula Officinalis*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2010**, *11*, 849–854, doi:10.2174/138920110793261971.
97. Klouchek-Popova, E.; Popov, A.; Pavlova, N.; Krūsteva, S. Influence of the Physiological Regeneration and Epithelialization Using Fractions Isolated from *Calendula Officinalis*. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* **1982**, *8*, 63–67.
98. Duran, V.; Matic, M.; Jovanović, M.; Mimica, N.; Gajinov, Z.; Poljacki, M.; Boza, P. Results of the Clinical Examination of an Ointment with Marigold (*Calendula Officinalis*) Extract in the Treatment of Venous Leg Ulcers. *Int J Tissue React* **2005**, *27*, 101–106.
99. Fonseca, Y.M.; Catini, C.D.; Vicentini, F.T.M.C.; Cardoso, J.C.; Cavalcanti De Albuquerque Junior, R.L.; Vieira Fonseca, M.J. Efficacy of Marigold Extract-Loaded Formulations Against UV-Induced Oxidative Stress. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 2182–2193, doi:10.1002/jps.22438.
100. Loggia, R.D.; Tubaro, A.; Sosa, S.; Becker, H.; Saar, S.; Isaac, O. The Role of Triterpenoids in the Topical Anti-Inflammatory Activity of *Calendula Officinalis* Flowers. *Planta Med* **1994**, *60*, 516–520, doi:10.1055/s-2006-959562.

101. ZitterlEglseer, K.; Sosa, S.; Jurenitsch, J.; SchubertZsilavec, M.; DellaLoggia, R.; Tubaro, A.; Bertoldi, M.; Franz, C. Anti-Oedematous Activities of the Main Triterpendiol Esters of Marigold (*Calendula Officinalis* L). *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *57*, 139–144, doi:10.1016/S0378-8741(97)00061-5.
102. Jimenez-Medina, E.; Garcia-Lora, A.; Paco, L.; Algarra, I.; Collado, A.; Garrido, F. A New Extract of the Plant *Calendula Officinalis* Produces a Dual in Vitro Effect: Cytotoxic Anti-Tumor Activity and Lymphocyte Activation. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 119, doi:10.1186/1471-2407-6-119.
103. European Commission CosIng - Cosmetics - *Calendula Officinalis* Callus Extract Available online: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=95567 (accessed on 21 July 2021).
104. European Commission CosIng - Cosmetics - *Calendula Officinalis* Flower Oil Available online: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=74930 (accessed on 21 July 2021).
105. European Commission CosIng - Cosmetics - *Calendula Officinalis* Flower Water Available online: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=83485 (accessed on 21 July 2021).
106. Shakeri, A.; Sahebkar, A.; Javadi, B. *Melissa Officinalis* L. - A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *188*, 204–228, doi:10.1016/j.jep.2016.05.010.
107. European Scientific Cooperative on Phytotherapy *ESCOP Monographs, The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Online Series. Melissa Folium (Melissa Leaf)*; 2013;
108. *Melissa officinalis*, ext. -Substance Information - ECHA Available online: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.074.528> (accessed on 28 June 2022).
109. Koksall, E.; Bursal, E.; Dikici, E.; Tozoglu, F.; Gulcin, I. Antioxidant Activity of *Melissa Officinalis* Leaves. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 217–222.
110. Mabrouki, H.; Duarte, C.M.M.; Akretche, D.E. Estimation of Total Phenolic Contents and In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Various Solvent Extracts of *Melissa Officinalis* L. *Arab. J. Sci. Eng.* **2018**, *43*, 3349–3357, doi:10.1007/s13369-017-3000-6.
111. Ben Aicha, B.; Rouabhi, R.; Gasmi, S.; Bensouici, C.; Mohammedi, H.; Mennai, I. Lc-Ms Analysis and Antioxidant Activity of the Hydro-Alcoholic Extract of *Melissa Officinalis* L. from Algeria. *Chem. J. Mold.* **2020**, *15*, 78–87, doi:10.19261/cjm.2020.778.
112. Akhondzadeh, S.; Noroozian, M.; Mohammadi, M.; Ohadinia, S.; Jamshidi, A.H.; Khani, M. *Melissa Officinalis* Extract in the Treatment of Patients with Mild to Moderate Alzheimer's Disease: A Double Blind, Randomised, Placebo Controlled Trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2003**, *74*, 863–866, doi:10.1136/jnnp.74.7.863.
113. Bayat, M.; Tameh, A.A.; Ghahremani, M.H.; Akbari, M.; Mehr, S.E.; Khanavi, M.; Hassanzadeh, G. Neuroprotective Properties of *Melissa Officinalis* after Hypoxic-Ischemic Injury Both in Vitro and in Vivo. *DARU* **2012**, *20*, 42, doi:10.1186/2008-2231-20-42.
114. Eivani, M.; Khosronezhad, N. *Melissa Officinalis*: A Memory Enhancer Remedy. *Physiol. Pharmacol.* **2020**, *24*, 159–164, doi:10.32598/ppj.24.3.10.
115. Taiwo, A.E.; Leite, F.B.; Lucena, G.M.; Barros, M.; Silveira, D.; Silva, M.V.; Ferreira, V.M. Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of *Melissa Officinalis* (Lemon Balm) Extract in Rats: Influence of Administration and Gender. *Indian J Pharmacol* **2012**, *44*, 189–192, doi:10.4103/0253-7613.93846.

116. Schnitzler, P.; Schuhmacher, A.; Astani, A.; Reichling, J. *Melissa Officinalis* Oil Affects Infectivity of Enveloped Herpesviruses. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 734–740, doi:10.1016/j.phymed.2008.04.018.
117. Chung, M.J.; Cho, S.-Y.; Bhuiyan, M.J.H.; Kim, K.H.; Lee, S.-J. Anti-Diabetic Effects of Lemon Balm (*Melissa Officinalis*) Essential Oil on Glucose- and Lipid-Regulating Enzymes in Type 2 Diabetic Mice. *Br. J. Nutr.* **2010**, *104*, 180–188, doi:10.1017/S0007114510001765.
118. Asadi, A.; Shidfar, F.; Safari, M.; Hosseini, A.F.; Huseini, H.F.; Heidari, I.; Rajab, A. Efficacy of *Melissa Officinalis* L. (Lemon Balm) Extract on Glycemic Control and Cardiovascular Risk Factors in Individuals with Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Clinical Trial. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 651–659, doi:10.1002/ptr.6254.
119. Mimica-Dukic, N.; Bozin, B.; Sokovic, M.; Simin, N. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa Officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2485–2489, doi:10.1021/jf030698a.
120. Carvalho, F.; Duarte, A.P.; Ferreira, S. Antimicrobial Activity of *Melissa Officinalis* and Its Potential Use in Food Preservation. *Food Biosci.* **2021**, *44*, 101437, doi:10.1016/j.fbio.2021.101437.
121. Gazola, R.; Machado, D.; Ruggiero, C.; Singi, G.; Alexandre, M.M. Lippia Alba, *Melissa Officinalis* and *Cymbopogon Citratus*: Effects of the Aqueous Extracts on the Isolated Hearts of Rats. *Pharmacol. Res.* **2004**, *50*, 477–480, doi:10.1016/j.phrs.2004.01.012.
122. Bounihi, A.; Hajjaj, G.; Alnamer, R.; Cherrah, Y.; Zellou, A. In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of *Melissa Officinalis* L. Essential Oil. *Adv Pharmacol Sci* **2013**, *2013*, 101759, doi:10.1155/2013/101759.
123. Saraydin, S.U.; Tuncer, E.; Tepe, B.; Karadayi, S.; Ozer, H.; Sen, M.; Karadayi, K.; Inan, D.; Elagoz, S.; Polat, Z.; et al. Antitumoral Effects of *Melissa Officinalis* on Breast Cancer in Vitro and in Vivo. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 2765–2770, doi:10.7314/APJCP.2012.13.6.2765.
124. Jahanban-Esfahlan, A.; Modaeinama, S.; Abasi, M.; Abbasi, M.M.; Jahanban-Esfahlan, R. Anti Proliferative Properties of *Melissa Officinalis* in Different Human Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* **2015**, *16*, 5703–5707, doi:10.7314/apjcp.2015.16.14.5703.
125. Cases, J.; Ibarra, A.; Feuillère, N.; Roller, M.; Sukkar, S.G. Pilot Trial of *Melissa Officinalis* L. Leaf Extract in the Treatment of Volunteers Suffering from Mild-to-Moderate Anxiety Disorders and Sleep Disturbances. *Med J Nutrition Metab* **2011**, *4*, 211–218, doi:10.1007/s12349-010-0045-4.
126. Torres Neto, L.; Monteiro, M.L.G.; Galvan, D.; Conte-Junior, C.A. An Evaluation of the Potential of Essential Oils against SARS-CoV-2 from In Silico Studies through the Systematic Review Using a Chemometric Approach. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1138, doi:10.3390/ph14111138.
127. Prasanth, D.S.N.B.K.; Manikanta, M.; Chandramohan, V.; Bhavya, G.; Lakshmana Rao, A.; Panda, S.P.; Rao, G.S.N.K.; Chakravarthi, G.; Teja, N.; Suguna Rani, P.; et al. In-Silico Strategies of Some Selected Phytoconstituents from *Melissa Officinalis* as SARS CoV-2 Main Protease and Spike Protein (COVID-19) Inhibitors. *Mol. Simul.* **2021**, *47*, 457–470, doi:10.1080/08927022.2021.1880576.
128. CosIng - *Melissa Officinalis* Leaf Extract Available online: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=57852 (accessed on 19 January 2022).
129. CosIng - *Melissa Officinalis* Flower/Leaf Stem Extract Available online: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=84254 (accessed on 28 June 2022).
130. CosIng - *Melissa Officinalis* Flower/Leaf/Stem Oil Available online: <https://ec.europa.eu/growth/tools->

- databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=95959 (accessed on 28 June 2022).
131. Natura, P. per M. *Jasonia Glutinosa* (L.) DC. Available online: sal (accessed on 14 July 2022).
 132. *Jasonia Glutinosa* (L.) DC. — The Plant List Available online: <http://www.theplantlist.org/tpl/record/gcc-84641> (accessed on 5 May 2022).
 133. Pardo de Santayana, M.; Morales, R. Consideraciones Sobre El Género *Jasonia* (Compositae, Inuleae). Sistemática y Usos. *Acta botánica malacitana, ISSN 0210-9506*, N° 29, 2004, *pags. 221-231* **2004**, 29, doi:10.24310/abm.v29i0.7232.
 134. Pardo de Santayana, M.; Blanco, E.; Morales, R. Plants Known as Te' in Spain: An Ethno-Pharmaco-Botanical Review. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 98, 1–19, doi:10.1016/j.jep.2004.11.003.
 135. Akerreta, S.; Yolanda Caverro, R.; Lopez, V.; Isabel Calvo, M. Analyzing Factors That Influence the Folk Use and Phytonomy of 18 Medicinal Plants in Navarra. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2007**, 3, 16, doi:10.1186/1746-4269-3-16.
 136. *Inventario español de los conocimientos tradicionales relativos a la biodiversidad*; 2018; ISBN 978-84-491-1401-4.
 137. Valero, M.; Berzosa, C.; Langa, E.; Gómez, C.; Lopez, V. *Jasonia Glutinosa* D.C (“Rock Tea”): Botanical, Phytochemical and Pharmacological Aspects. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* **2013**, 12, 543–557.
 138. Ortega-Vidal, J.; Ruiz-Riaguas, A.; Fernandez-de Cordova, M.L.; Ortega-Barrales, P.; Llorent-Martinez, E.J. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of *Jasonia Glutinosa* Herbal Tea. Influence of Simulated Gastrointestinal In Vitro Digestion. *Food Chem.* **2019**, 287, 258–264, doi:10.1016/j.foodchem.2019.02.101.
 139. Las Heras Etayo, N.; Llamas, F.; Acedo, C. Ethnobotanical Research and Compilation of the Medicinal Uses in Spain and the Active Principles of *Chiliadenus Glutinosus* (L.) Fourr. for the Scientific Validation of Its Therapeutic Properties. *Plants-Basel* **2021**, 10, 584, doi:10.3390/plants10030584.
 140. Les, F.; Valero, M.S.; Moliner, C.; Weinkove, D.; Lopez, V.; Gomez-Rincon, C. *Jasonia Glutinosa* (L.) DC., a Traditional Herbal Tea, Exerts Antioxidant and Neuroprotective Properties in Different In Vitro and In Vivo Systems. *Biology-Basel* **2021**, 10, 443, doi:10.3390/biology10050443.
 141. Valero, M.S.; Gonzalez, M.; Ramon-Gimenez, M.; Andrade, P.B.; Moreo, E.; Les, F.; Fernandes, F.; Gomez-Rincon, C.; Berzosa, C.; Garcia de Jalon, J.A.; et al. *Jasonia Glutinosa*(L.) DC., a Traditional Herbal Medicine, Reduces Inflammation, Oxidative Stress and Protects the Intestinal Barrier in a Murine Model of Colitis. *Inflammopharmacology* **2020**, 28, 1717–1734, doi:10.1007/s10787-019-00626-0.
 142. Lopez, V.; Akerreta, S.; Casanova, E.; Garcia-Mina, J.M.; Caverro, R.Y.; Calvo, M.I. Screening of Spanish Medicinal Plants for Antioxidant and Antifungal Activities. *Pharm. Biol.* **2008**, 46, 602–609, doi:10.1080/13880200802179634.
 143. Benito, P.B.; Abad, M.J.; Diaz, A.M.; Villaescusa, L.; Gonzalez, M.A.; Silvan, A.M. Sesquiterpenes from *Jasonia Glutinosa*: In Vitro Anti-Inflammatory Activity. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 1–4, doi:10.1248/bpb.25.1.
 144. Caverro, R.Y.; Akerreta, S.; Calvo, M.I. Pharmaceutical Ethnobotany in the Middle Navarra (Iberian Peninsula). *J. Ethnopharmacol.* **2011**, 137, 844–855, doi:10.1016/j.jep.2011.07.001.
 145. Poliakov, M.; Fitzpatrick, J.M.; Farren, T.R.; Anastas, P.T. Green Chemistry: Science and Politics of Change. *Science* **2002**, 297, 807–810, doi:10.1126/science.297.5582.807.
 146. Knez, Z.; Markocic, E.; Leitgeb, M.; Primožic, M.; Hrncic, M.K.; Skerget, M. Industrial Applications of Supercritical Fluids: A Review. *Energy* **2014**, 77, 235–243, doi:10.1016/j.energy.2014.07.044.
 147. Anastas, P.T.; Warner, J.C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press, 1998; ISBN 978-0-19-850234-0.

148. Clifford, A.A.; Williams, J.R. Introduction to Supercritical Fluids and Their Applications. In *Supercritical Fluid Methods and Protocols*; Williams, J.R., Clifford, A.A., Eds.; Methods In Biotechnology™; Humana Press: Totowa, NJ, 2000; pp. 1–16 ISBN 978-1-59259-030-8.
149. Parhi, R.; Suresh, P. Supercritical Fluid Technology-A Review. *J. Adv. Pharm. Sc. Technol* **2013**, *1*, 13–36, doi:10.14302/issn.2328-0182.japst-12-145.
150. Gil Chavez, G.J.; Heredia, J.B.; Aguilar, G. Supercritical Fluids: A Useful and Effective Alternative for the Extraction and Application of Antioxidants in Food Industry (in Spanish). In; 2013; pp. 555–580.
151. Reverchon, E.; De Marco, I. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Natural Matter. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *38*, 146–166, doi:10.1016/j.supflu.2006.03.020.
152. Velasco, R.; Samuel, H.; Carrera, J.E. Applications of Supercritical Fluids in the Agroindustry. *Informacion Tecnologica* **2007**, *18*, 53–66.
153. Modey, W.K.; Mulholland, D.A.; Raynor, M.W. Analytical Supercritical Fluid Extraction of Natural Products. *Phytochem. Anal.* **1996**, *7*, 1–15, doi:10.1002/(SICI)1099-1565(199601)7:1<1::AID-PCA275>3.0.CO;2-U.
154. Brunner, G. Applications of Supercritical Fluids. In *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, Vol 1*; Prausnitz, J.M., Doherty, M.F., Segalman, R.A., Eds.; Annual Reviews: Palo Alto, 2010; Vol. 1, pp. 321–342 ISBN 978-0-8243-5201-1.
155. Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M.H.A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. a. N.; Omar, A.K.M. Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. *J. Food Eng.* **2013**, *117*, 426–436, doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
156. Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibanez, E. Sub- and Supercritical Fluid Extraction of Functional Ingredients from Different Natural Sources: Plants, Food-by-Products, Algae and MicroalgaeA Review. *Food Chem.* **2006**, *98*, 136–148, doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.058.
157. Langa, E.; Cacho, J.; Palavra, A.M.F.; Burillo, J.; Mainar, A.M.; Urieta, J.S. The Evolution of Hyssop Oil Composition in the Supercritical Extraction Curve. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *49*, 37–44, doi:10.1016/j.supflu.2008.11.022.
158. Martín, L.; Mainar, A.M.; González-Coloma, A.; Burillo, J.; Urieta, J.S. Supercritical Fluid Extraction of Wormwood (*Artemisia Absinthium L.*). *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *56*, 64–71, doi:10.1016/j.supflu.2010.11.017.
159. Martín, L.; González-Coloma, A.; Díaz, C.E.; Mainar, A.M.; Urieta, J.S. Supercritical CO₂ Extraction of Persea Indica: Effect of Extraction Parameters, Modelling and Bioactivity of Its Extracts. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *57*, 120–128, doi:10.1016/j.supflu.2011.03.004.
160. García-Abarrio, S.M.; Martín, L.; Burillo, J.; Porta, G.D.; Mainar, A.M. Supercritical Fluid Extraction of Volatile Oil from Lippia Alba (Mill.) Cultivated in Aragón (Spain). *J. Supercrit. Fluids* **2014**, *94*, 206–211, doi:10.1016/j.supflu.2014.07.016.
161. Gimenez-Rota, C.; Langa, E.; Urieta, J.S.; Hernaiz, M.J.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Fractionation of Antioxidant Compounds from *Lavandula Luisieri* (Rozeira) Riv.-Mart. *J. Supercrit. Fluids* **2020**, *161*, 104821, doi:10.1016/j.supflu.2020.104821.
162. Monroy, Y.M.; Rodrigues, R.A.F.; Rodrigues, M.V.N.; Cabral, F.A. Fractionation of Ethanolic and Hydroalcoholic Extracts of Green Propolis Using Supercritical Carbon Dioxide as an Anti-Solvent to Obtain Artepillin Rich-Extract. *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *138*, 167–173, doi:10.1016/j.supflu.2018.04.016.
163. Paula, J.T.; Sousa, I.M.O.; Foglio, M.A.; Cabral, F.A. Selective Fractionation of Extracts of *Arrabidaea Chica Verlot* Using Supercritical Carbon Dioxide as Antisolvent. *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *133*, 9–16, doi:10.1016/j.supflu.2017.09.021.
164. Meneses, M.A.; Caputo, G.; Scognamiglio, M.; Reverchon, E.; Adami, R. Antioxidant Phenolic Compounds Recovery from *Mangifera Indica L.* by-Products by Supercritical Antisolvent Extraction. *J. Food Eng.* **2015**, *163*, 45–53, doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.04.025.

165. Ballesteros-Vivas, D.; Alvarez-Rivera, G.; Garcia Ocampo, A.F.; Johanna Morantes, S.; Sanchez Camargo, A. del P.; Cifuentes, A.; Parada-Alfonso, F.; Ibanez, E. Supercritical Antisolvent Fractionation as a Tool for Enhancing Antiproliferative Activity of Mango Seed Kernel Extracts against Colon Cancer Cells. *J. Supercrit. Fluids* **2019**, *152*, 104563, doi:10.1016/j.supflu.2019.104563.
166. Sanchez-Camargo, A.P.; Mendiola, J.A.; Valdes, A.; Castro-Puyana, M.; Garcia-Canas, V.; Cifuentes, A.; Herrero, M.; Ibanez, E. Supercritical Antisolvent Fractionation of Rosemary Extracts Obtained by Pressurized Liquid Extraction to Enhance Their Antiproliferative Activity. *J. Supercrit. Fluids* **2016**, *107*, 581–589, doi:10.1016/j.supflu.2015.07.019.
167. Berger, T.A. Supercritical Fluid Chromatography | Applications. In *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*; Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A., Miró, M., Eds.; Academic Press: Oxford, 2013; pp. 300–312 ISBN 978-0-08-101984-9.
168. Novakova, L.; Plachka, K.; Khalikova, M.; Svec, F. *Supercritical Fluid Chromatography in Bioanalysis*; Rosse, G., Ed.; Walter De Gruyter GmbH: Berlin, 2019; pp. 33–75; ISBN 978-3-11-061898-3.
169. Gordillo, R. Supercritical Fluid Chromatography Hyphenated to Mass Spectrometry for Metabolomics Applications. *J. Sep. Sci.* **2021**, *44*, 448–463, doi:10.1002/jssc.202000805.
170. Pessey, V.; Garriga, R.; Weill, F.; Chevalier, B.; Etourneau, J.; Cansell, F. Core-Shell Materials Elaboration in Supercritical Mixture CO₂/Ethanol. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, *39*, 4714–4719, doi:10.1021/ie000155f.
171. Cocero, M.J.; Martin, A.; Mattea, F.; Varona, S. Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Fundamentals and Applications. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *47*, 546–555, doi:10.1016/j.supflu.2008.08.015.
172. Oliveira, D.A.; Mezzomo, N.; Gomes, C.; Ferreira, S.R.S. Encapsulation of Passion Fruit Seed Oil by Means of Supercritical Antisolvent Process. *J. Supercrit. Fluids* **2017**, *129*, 96–105, doi:10.1016/j.supflu.2017.02.011.
173. Montero, J.M.S. Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results. *An. Real Acad. Farm.* **2016**, *82*, 168–184.
174. Valderrama, J.O. The State of the Cubic Equations of State. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, *42*, 1603–1618, doi:10.1021/ie020447b.
175. Khalil, R. *A Simple Approach to Quantum Chemistry*; Nova Science Publishers, INC.: New York, USA, 2020; ISBN 978-1-5361-8138-8.
176. Johansson, M.; Kaila, V.; Sundholm, D. Ab Initio, Density Functional Theory, and Semi-Empirical Calculations. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *924*, 3–27, doi:10.1007/978-1-62703-017-5_1.
177. Goel, S.; Knaggs, M.; Goel, G.; Zhou, X.; Upadhyaya, H.; Thakur, V.K.; Kumar, V.; Bizarri, G.; Tiwari, A.; Murphy, A.; et al. Horizons of Modern Molecular Dynamics Simulation in Digitalised Solid Freeform Fabrication with Advanced Materials. *Materials Today Chemistry* **2020**, *18*, doi:10.1016/j.mtchem.2020.100356.
178. Verma, J.; Khedkar, V.M.; Coutinho, E.C. 3D-QSAR in Drug Design - A Review. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 95–115, doi:10.2174/156802610790232260.
179. Roy, K.; Kar, S.; Das, R.N. *A Primer on QSAR/QSPR Modeling*; SpringerBriefs in Molecular Science; Springer International Publishing: Cham, 2015; ISBN 978-3-319-17280-4.
180. Ajmani, S.; Jadhav, K.; Kulkarni, S.A. Group-Based QSAR (G-QSAR): Mitigating Interpretation Challenges in QSAR. *QSAR Comb. Sci.* **2009**, *28*, 36–51, doi:10.1002/qsar.200810063.
181. Sippl, W. *3d-Qsar - Applications, Recent Advances, and Limitations*; Puzyn, T., Leszczynski, J., Cronin, M.T.D., Eds.; Springer: Dordrecht, 2010; Vol. 8, pp. 103–125; ISBN 978-1-4020-9782-9.
182. Manz, T.A.; Phomphrai, K.; Medvedev, G.; Krishnamurthy, B.B.; Sharma, S.; Haq, J.; Novstrup, K.A.; Thomson, K.T.; Delgass, W.N.; Caruthers, J.M.; et al. Structure-Activity Correlation in Titanium Single-Site Olefin Polymerization Catalysts Containing Mixed

- Cyclopentadienyl/Aryloxide Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3776–+, doi:10.1021/ja0640849.
183. Zeng, H.; Cao, R.; Zhang, H. Combined 3D-QSAR Modeling and Molecular Docking Study on Quinoline Derivatives as Inhibitors of P-Selectin. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 596–610, doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00893.x.
184. Tsakovska, I.; Pajeva, I.; Al Sharif, M.; Alov, P.; Fioravanzo, E.; Kovarich, S.; Worth, A.P.; Richarz, A.-N.; Yang, C.; Mostrag-Szlichtyng, A.; et al. Quantitative Structure-Skin Permeability Relationships. *Toxicology* **2017**, *387*, 27–42, doi:10.1016/j.tox.2017.06.008.
185. Ates, G.; Steinmetz, F.P.; Doktorova, T.Y.; Madden, J.C.; Rogiers, V. Linking Existing In Vitro Dermal Absorption Data to Physicochemical Properties: Contribution to the Design of a Weight-of-Evidence Approach for the Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients with Low Dermal Bioavailability. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *76*, 74–78, doi:10.1016/j.yrtph.2016.01.015.
186. Williams, F.M.; Rothe, H.; Barrett, G.; Chiodini, A.; Whyte, J.; Cronin, M.T.D.; Monteiro-Riviere, N.A.; Plautz, J.; Roper, C.; Westerhout, J.; et al. Assessing the Safety of Cosmetic Chemicals: Consideration of a Flux Decision Tree to Predict Dermally Delivered Systemic Dose for Comparison with Oral TTC (Threshold of Toxicological Concern). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *76*, 174–186, doi:10.1016/j.yrtph.2016.01.005.
187. Schwöbel, J.A.H.; Klamt, A. Mechanistic Skin Penetration Model by the COSMOperm Method: Routes of Permeation, Vehicle Effects and Skin Variations in the Healthy and Compromised Skin. *Computational Toxicology* **2019**, *11*, 50–64, doi:10.1016/j.comtox.2019.02.004.
188. Klamt, A. Conductor-Like Screening Model for Real Solvents - a New Approach to the Quantitative Calculation of Solvation Phenomena. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 2224–2235, doi:10.1021/j100007a062.
189. Klamt, A. COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics. In *28th European Symposium on Computer Aided Process Engineering*; Friedl, A., Klemes, J.J., Radl, S., Varbanov, P.S., Wallek, T., Eds.; Elsevier Science Bv: Amsterdam, 2018; Vol. 43, pp. 9–9 ISBN 978-0-444-64235-6.
190. Buggert, M.; Cadena, C.; Mokrushina, L.; Smirnova, I.; Maginn, E.J.; Arlt, W. COSMO-RS Calculations of Partition Coefficients: Different Tools for Conformational Search. *Chem. Eng. Technol.* **2009**, *32*, 977–986, doi:10.1002/ceat.200800654.
191. Klamt, A.; Huniar, U.; Spycher, S.; Keldenich, J. COSMOmic: A Mechanistic Approach to the Calculation of Membrane-Water Partition Coefficients and Internal Distributions within Membranes and Micelles. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12148–12157, doi:10.1021/jp801736k.
192. Jakobtorweihen, S.; Zuniga, A.C.; Ingram, T.; Gerlach, T.; Keil, F.J.; Smirnova, I. Predicting Solute Partitioning in Lipid Bilayers: Free Energies and Partition Coefficients from Molecular Dynamics Simulations and COSMOmic. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 045102, doi:10.1063/1.4890877.
193. Droge, S.T.J.; Hermens, J.L.M.; Gutsell, S.; Rabone, J.; Hodges, G. Predicting the Phospholipophilicity of Monoprotic Positively Charged Amines. *Environ. Sci.-Process Impacts* **2017**, *19*, 307–323, doi:10.1039/c6em00615a.
194. Yordanova, D.; Ritter, E.; Gerlach, T.; Jensen, J.H.; Smirnova, I.; Jakobtorweihen, S. Solute Partitioning in Micelles: Combining Molecular Dynamics Simulations, COSMOmic, and Experiments. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 5794–5809, doi:10.1021/acs.jpcc.7b03147.
195. Bittermann, K.; Linden, L.; Goss, K.-U. Screening Tools for the Bioconcentration Potential of Monovalent Organic Ions in Fish. *Environ. Sci.-Process Impacts* **2018**, *20*, 845–853, doi:10.1039/c8em00084k.
196. Klamt, A.; Schwoebel, J.; Huniar, U.; Koch, L.; Terzi, S.; Gaudin, T. COSMOplex: Self-Consistent Simulation of Self-Organizing Inhomogeneous Systems Based on COSMO-RS. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 9225–9238, doi:10.1039/c9cp01169b.

197. Rollinger, J.M.; Stuppner, H.; Langer, T. Virtual Screening for the Discovery of Bioactive Natural Products. In *Natural Compounds as Drugs Volume I*; Petersen, F., Amstutz, R., Eds.; Birkhäuser Basel: Basel, 2008; pp. 211–249 ISBN 978-3-7643-8098-4.
198. Wang, L.; Xie, X.-Q. Computational Target Fishing: What Should Chemogenomics Researchers Expect for the Future of in Silico Drug Design and Discovery? *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 247–249, doi:10.4155/fmc.14.5.
199. Cereto-Massague, A.; Jose Ojeda, M.; Valls, C.; Mulero, M.; Pujadas, G.; Garcia-Vallve, S. Tools for in Silico Target Fishing. *Methods* **2015**, *71*, 98–103, doi:10.1016/j.ymeth.2014.09.006.
200. Jenkins, J.L.; Bender, A.; Davies, J.W. In Silico Target Fishing: Predicting Biological Targets from Chemical Structure. *Drug Discov. Today Technol.* **2006**, *3*, 413–421, doi:10.1016/j.ddtec.2006.12.008.
201. Bender, A.; Young, D.W.; Jenkins, J.L.; Serrano, M.; Mikhailov, D.; Clemons, P.A.; Davies, J.W. Chemogenomic Data Analysis: Prediction of Small-Molecule Targets and the Advent of Biological Fingerprints. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **2007**, *10*, 719–731, doi:10.2174/138620707782507313.
202. Adams, J.C.; Keiser, M.J.; Basuino, L.; Chambers, H.F.; Lee, D.-S.; Wiest, O.G.; Babbitt, P.C. A Mapping of Drug Space from the Viewpoint of Small Molecule Metabolism. *PLoS Comput. Biol.* **2009**, *5*, e1000474, doi:10.1371/journal.pcbi.1000474.
203. Rogers, D.; Hahn, M. Extended-Connectivity Fingerprints. *J. Chem Inf. Model.* **2010**, *50*, 742–754, doi:10.1021/ci100050t.
204. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad *Real Decreto 85/2018, de 23 de Febrero, Por El Que Se Regulan Los Productos Cosméticos*; 2018; Vol. BOE-A-2018-2693, pp. 23055–23075;.
205. The European Federation for Cosmetic Ingredients Available online: <https://effci.com/?p=sec-gmp> (accessed on 24 November 2022).
206. ISO 22716 - Buenas prácticas de fabricación de productos cosméticos. *Normas ISO*.
207. Marques, J.L.; Della Porta, G.; Reverchon, E.; Renuncio, J. a. R.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Extraction of Antioxidants from Grape Seeds after Vinification. *J. Supercrit. Fluids* **2013**, *82*, 238–243, doi:10.1016/j.supflu.2013.07.005.
208. Torrecilla, J.S.; Palomar, J.; Lemus, J.; Rodriguez, F. A Quantum-Chemical-Based Guide to Analyze/Quantify the Cytotoxicity of Ionic Liquids. *Green Chem.* **2010**, *12*, 123–134, doi:10.1039/b919806g.
209. Mai, N.L.; Koo, Y.-M. Quantitative Prediction of Lipase Reaction in Ionic Liquids by QSAR Using COSMO-RS Molecular Descriptors. *Biochem. Eng. J.* **2014**, *87*, 33–40, doi:10.1016/j.bej.2014.03.010.
210. Ben Ghanem, O.; Mutalib, M.I.A.; El-Harbawi, M.; Gonfa, G.; Kait, C.F.; Alitheen, N.B.M.; Leveque, J.-M. Effect of Imidazolium-Based Ionic Liquids on Bacterial Growth Inhibition Investigated via Experimental and QSAR Modelling Studies. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *297*, 198–206, doi:10.1016/j.jhazmat.2015.04.082.
211. Palomar, J.; Torrecilla, J.S.; Ferro, V.R.; Rodriguez, F. Development of an a Priori Ionic Liquid Design Tool. 2. Ionic Liquid Selection through the Prediction of COSMO-RS Molecular Descriptor by Inverse Neural Network. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 2257–2265, doi:10.1021/ie8009507.
212. Lemaoui, T.; Hammoudi, N.E.H.; Alnashef, I.M.; Balsamo, M.; Erto, A.; Ernst, B.; Benguerba, Y. Quantitative Structure Properties Relationship for Deep Eutectic Solvents Using S Sigma-Profile as Molecular Descriptors. *J. Mol. Liq.* **2020**, *309*, 113165, doi:10.1016/j.molliq.2020.113165.
213. Zhao, Y.; Huang, Y.; Zhang, X.; Zhang, S. A Quantitative Prediction of the Viscosity of Ionic Liquids Using S Sigma-Profile Molecular Descriptors. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 3761–3767, doi:10.1039/c4cp04712e.

214. Benguerba, Y.; Alnashef, I.M.; Erto, A.; Balsamo, M.; Ernst, B. A Quantitative Prediction of the Viscosity of Amine Based DESs Using S Sigma-Profile Molecular Descriptors. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1184*, 357–363, doi:10.1016/j.molstruc.2019.02.052.
215. Lemaoui, T.; Darwish, A.S.; Hammoudi, N.E.H.; Abu Hatab, F.; Attoui, A.; Alnashef, I.M.; Benguerba, Y. Prediction of Electrical Conductivity of Deep Eutectic Solvents Using COSMO-RS Sigma Profiles as Molecular Descriptors: A Quantitative Structure-Property Relationship Study. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2020**, *59*, 13343–13354, doi:10.1021/acs.iecr.0c02542.
216. Palomar, J.; Torrecilla, J.S.; Lemus, J.; Ferro, V.R.; Rodriguez, F. A COSMO-RS Based Guide to Analyze/Quantify the Polarity of Ionic Liquids and Their Mixtures with Organic Cosolvents. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 1991–2000, doi:10.1039/b920651p.
217. Gonfa, G.; Bustam, M.A.; ShariffResearch, A.M. Quantum-Chemical-Based Quantitative Structure-Activity Relationships for Estimation of CO₂ Absorption/Desorption Capacities of Amine-Based Absorbents. *Int. J. Greenh. Gas Control* **2016**, *49*, 372–378, doi:10.1016/j.ijggc.2016.03.022.
218. Sellaoui, L.; Soetaredjo, F.E.; Ismadji, S.; Benguerba, Y.; Dotto, G.L.; Bonilla-Petriciolet, A.; Rodrigues, A.E.; Ben Lamine, A.; Erto, A. Equilibrium Study of Single and Binary Adsorption of Lead and Mercury on Bentonite-Alginate Composite: Experiments and Application of Two Theoretical Approaches. *J. Mol. Liq.* **2018**, *253*, 160–168, doi:10.1016/j.molliq.2018.01.056.
219. Xie, J.; Schaich, K.M. Re-Evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 4251–4260, doi:10.1021/jf500180u.
220. Ben Ghanem, O.; Mutalib, M.I.A.; Leveque, J.-M.; El-Harbawi, M. Development of QSAR Model to Predict the Ecotoxicity of *Vibrio Fischeri* Using COSMO-RS Descriptors. *Chemosphere* **2017**, *170*, 242–250, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.12.003.
221. Haya, L.; Mainar, A.M.; Pardo, J.I.; Urieta, J.S. A New Generation of Cysteine Derivatives with Three Active Antioxidant Centers: Improving Reactivity and Stability. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 1409–1414, doi:10.1039/c3cp53913j.
222. Tropsha, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol. Inf.* **2010**, *29*, 476–488, doi:10.1002/minf.201000061.
223. salud, M.-E. portal de la Análisis de las tres capas de la piel: estructura y funciones Available online: <https://www.meditip.lat/el-cuerpo-humano/tres-capas-de-la-piel/> (accessed on 29 November 2022).
224. Naegel, A.; Heisig, M.; Wittum, G. Detailed Modeling of Skin Penetration-An Overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 191–207, doi:10.1016/j.addr.2012.10.009.
225. Gaulton, A.; Hersey, A.; Nowotka, M.; Bento, A.P.; Chambers, J.; Mendez, D.; Mutowo, P.; Atkinson, F.; Bellis, L.J.; Cibrian-Uhalte, E.; et al. The ChEMBL Database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D945–D954, doi:10.1093/nar/gkw1074.
226. Mayr, F.; Moeller, G.; Garscha, U.; Fischer, J.; Rodriguez Castano, P.; Inderbinen, S.G.; Temml, V.; Waltenberger, B.; Schwaiger, S.; Hartmann, R.W.; et al. Finding New Molecular Targets of Familiar Natural Products Using In Silico Target Prediction. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7102, doi:10.3390/ijms21197102.
227. Carlsson, L.; Spjuth, O.; Adams, S.; Glen, R.C.; Boyer, S. Use of Historic Metabolic Biotransformation Data as a Means of Anticipating Metabolic Sites Using MetaPrint2D and Bioclipse. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 362, doi:10.1186/1471-2105-11-362.
228. Aleksovski, S.A.; Sovova, H. Supercritical CO₂ Extraction of *Salvia Officinalis* L. *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *40*, 239–245, doi:10.1016/j.supflu.2006.07.006.
229. Dapkevicius, A.; Venskutonis, R.; van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H. Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from Some Aromatic Herbs Grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 140–146, doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<140::AID-JSFA18>3.0.CO;2-K.

230. Quintana, S.E.; Villanueva-Bermejo, D.; Reglero, G.; Garcia-Risco, M.R.; Fornari, T. Supercritical Antisolvent Particle Precipitation and Fractionation of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Extracts. *J. CO₂ Util.* **2019**, *34*, 479–489, doi:10.1016/j.jcou.2019.07.032.
231. Baldyga, J. Mixing and Fluid Dynamics Effects in Particle Precipitation Processes. *KONA Powder Part. J.* **2016**, 127–149.
232. Murga, R.; Sanz, M.T.; Beltrán, S.; Cabezas, J.L. Solubility of Three Hydroxycinnamic Acids in Supercritical Carbon Dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* **2003**, *27*, 239–245, doi:10.1016/S0896-8446(02)00265-6.
233. Bitencourt, R.G.; Palma, A.M.; Coutinho, J.A.P.; Cabral, F.A.; Meirelles, A.J.A. Solubility of Caffeic Acid in CO₂ + Ethanol: Experimental and Predicted Data Using Cubic Plus Association Equation of State. *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *138*, 238–246, doi:10.1016/j.supflu.2018.04.008.
234. Marcus, Y. Solubility Parameter of Carbon Dioxide-An Enigma. *ACS Omega* **2018**, *3*, 524–528, doi:10.1021/acsomega.7b01665.
235. Baumann, D.; Adler, S.; Gruner, S.; Otto, F.; Weinreich, B.; Hamburger, M. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Marigold at High Pressures: Comparison of Analytical and Pilot-Scale Extraction. *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 226–230, doi:10.1002/pca.772.
236. Lopez-Padilla, A.; Ruiz-Rodriguez, A.; Reglero, G.; Fornari, T. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of *Calendula Officinalis*: Kinetic Modeling and Scaling up Study. *J. Supercrit. Fluids* **2017**, *130*, 292–300, doi:10.1016/j.supflu.2017.03.033.
237. Hamzawy, M.A.; El-Denshary, E.S.M.; Hassan, N.S.; Manna, F.A.; Abdel-Wahhab, M.A. Dietary Supplementation of *Calendula Officinalis* Counteracts the Oxidative Stress and Liver Damage Resulted from Aflatoxin. *ISRN Nutrition* **2013**, *2013*, e538427, doi:10.5402/2013/538427.
238. Martin, A.; Gutierrez, L.; Mattea, F.; Cocero, M.J. Precipitation of Mandelic Acid with a Supercritical Antisolvent Process: Experimental and Theoretical Analysis, Optimization, and Scaleup. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 1552–1562, doi:10.1021/ie0608051.
239. Huang, D.; Zhu, Z.; Wang, Q.; Qin, B.; Dai, L.; Jiang, F.; Liu, W.; Qian, H. Prediction Model, Experimental Optimization, and Verification for Yield of High-Pressure Crystallization: A Case Study of Citric Acid. *Separation Science and Technology* **2020**, *55*, 135–143, doi:10.1080/01496395.2018.1561717.
240. Reverchon, E.; Caputo, G.; De Marco, I. Role of Phase Behavior and Atomization in the Supercritical Antisolvent Precipitation. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, *42*, 6406–6414, doi:10.1021/ie0302138.
241. Cardoso, M.A.T.; Cabral, J.M.S.; Palavra, A.M.F.; Geraldés, V. CFD Analysis of Supercritical Antisolvent (SAS) Micronization of Minocycline Hydrochloride. *J. Supercrit. Fluids* **2008**, *47*, 247–258, doi:10.1016/j.supflu.2008.08.008.
242. Sikroria, T.; Kushari, A.; Syed, S.; Lovett, J.A. Experimental Investigation of Liquid Jet Breakup in a Cross Flow of a Swirling Air Stream. *J. Eng. Gas. Turbines Power-Trans. ASME* **2014**, *136*, 061501, doi:10.1115/1.4026244.
243. Rantakyla, M.; Jantti, M.; Aaltonen, O.; Hurme, M. The Effect of Initial Drop Size on Particle Size in the Supercritical Antisolvent Precipitation (SAS) Technique. *J. Supercrit. Fluids* **2002**, *24*, 251–263, doi:10.1016/S0896-8446(02)00034-7.
244. Werling, J.O.; Debenedetti, P.G. Numerical Modeling of Mass Transfer in the Supercritical Antisolvent Process. *J. Supercrit. Fluids* **1999**, *16*, 167–181, doi:10.1016/S0896-8446(99)00027-3.
245. Werling, J.O.; Debenedetti, P.G. Numerical Modeling of Mass Transfer in the Supercritical Antisolvent Process: Miscible Conditions. *J. Supercrit. Fluids* **2000**, *18*, 11–24, doi:10.1016/S0896-8446(00)00054-1.
246. Mukhopadhyay, M.; Dalvi, S.V. Mass and Heat Transfer Analysis of SAS: Effects of Thermodynamic States and Flow Rates on Droplet Size. *J. Supercrit. Fluids* **2004**, *30*, 333–348, doi:10.1016/j.supflu.2003.10.001.

247. Cardoso, F. a. R.; Vogel, E.M.; Souza, M.F.; Cardozo-Filho, L. Mathematical Modeling to Predict the Size and Nucleation Rate of Micro and Nanoparticles Using the Scale-up Process with Supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* **2019**, *154*, 104608, doi:10.1016/j.supflu.2019.104608.
248. Dukhin, S.S.; Shen, Y.; Dave, R.; Pfeffer, R. Development in Modeling Submicron Particle Formation in Two Phases Flow of Solvent-Supercritical Antisolvent Emulsion. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *134–35*, 72–88, doi:10.1016/j.cis.2007.04.022.
249. Kumar, R.; Thakur, A.K.; Banerjee, N.; Chaudhari, P. Investigation on Crystallization Phenomena with Supercritical Carbon Dioxide (CO₂) as the Antisolvent. *Int. J. Chem. React. Eng.* **2021**, *19*, 861–871, doi:10.1515/ijcre-2020-0189.
250. De Marco, I.; Reverchon, E. Influence of Pressure, Temperature and Concentration on the Mechanisms of Particle Precipitation in Supercritical Antisolvent Micronization. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *58*, 295–302, doi:10.1016/j.supflu.2011.06.005.
251. Bogdanovic, A.; Tadic, V.; Arsic, I.; Milovanovic, S.; Petrovic, S.; Skala, D. Supercritical and High Pressure Subcritical Fluid Extraction from Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L., *Lamiaceae*). *J. Supercrit. Fluids* **2016**, *107*, 234–242, doi:10.1016/j.supflu.2015.09.008.
252. Ramanauskienė, K.; Raudonis, R.; Majiene, D. Rosmarinic Acid and *Melissa Officinalis* Extracts Differently Affect Glioblastoma Cells. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1564257, doi:10.1155/2016/1564257.
253. Petrisor, G.; Motelica, L.; Craciun, L.N.; Oprea, O.C.; Fikai, D.; Fikai, A. *Melissa Officinalis*: Composition, Pharmacological Effects and Derived Release Systems-A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3591, doi:10.3390/ijms23073591.
254. Mur, R.; Pardo, J.I.; Pino-Otín, M.R.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Fractionation of Antioxidant Compounds from *Salvia Officinalis*. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 9351, doi:10.3390/ijms22179351.
255. Cao, H.; Cheng, W.X.; Li, C.; Pan, X.L.; Xie, X.G.; Li, T.H. DFT Study on the Antioxidant Activity of Rosmarinic Acid. *Theochem-J. Mol. Struct.* **2005**, *719*, 177–183, doi:10.1016/j.theochem.2005.01.029.
256. Zhang, K.; Sun, W.; Fahr, A.; Zeng, X.; Ge, L.; Chen, M.; Yang, L.; Wu, S.; Fei, J.; Zhou, B. Skin-Permeating Components of *Lonicera Japonica* Flos: A Comprehensive Study from Observations and Model Computations. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 12538–12547, doi:10.1039/c9nj01123d.
257. Li, H.-Z.; Ren, Z.; Reddy, N.; Hou, T.; Zhang, Z.-J. In Silico Evaluation of Antimicrobial, Antihyaluronidase and Bioavailability Parameters of Rosmarinic Acid in *Perilla Frutescens* Leaf Extracts. *SN Appl. Sci.* **2020**, *2*, 1547, doi:10.1007/s42452-020-03323-8.
258. Qiang, Z.; Ye, Z.; Hauck, C.; Murphy, P.A.; McCoy, J.-A.; Widrlechner, M.P.; Reddy, M.B.; Hendrich, S. Permeability of Rosmarinic Acid in *Prunella Vulgaris* and Ursolic Acid in *Salvia Officinalis* Extracts across Caco-2 Cell Monolayers. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 1107–1112, doi:10.1016/j.jep.2011.07.037.
259. Farrell, T.L.; Poquet, L.; Dew, T.P.; Barber, S.; Williamson, G. Predicting Phenolic Acid Absorption in Caco-2 Cells: A Theoretical Permeability Model and Mechanistic Study. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 397–406, doi:10.1124/dmd.111.041665.
260. Mortelet, O.; Jorissen, J.; Spacova, I.; Lebeer, S.; van Nuijs, A.L.N.; Hermans, N. Demonstrating the Involvement of an Active Efflux Mechanism in the Intestinal Absorption of Chlorogenic Acid and Quinic Acid Using a Caco-2 Bidirectional Permeability Assay. *Food Funct.* **2021**, *12*, 417–425, doi:10.1039/d0fo02629h.
261. Artursson, P.; Palm, K.; Luthman, K. Caco-2 Monolayers in Experimental and Theoretical Predictions of Drug Transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *22*, 67–84, doi:10.1016/S0169-409X(96)00415-2.
262. Sugino, M.; Todo, H.; Suzuki, T.; Nakada, K.; Tsuji, K.; Tokunaga, H.; Jinno, H.; Sugibayashi, K. Safety Prediction of Topically Exposed Biocides Using Permeability Coefficients and the

- Desquamation Rate at the Stratum Corneum. *J. Toxicol. Sci.* **2014**, *39*, 475–485, doi:10.2131/jts.39.475.
263. Kimura, E.; Kawano, Y.; Todo, H.; Ikarashi, Y.; Sugibayashi, K. Measurement of Skin Permeation/Penetration of Nanoparticles for Their Safety Evaluation. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 1476–1486, doi:10.1248/bpb.b12-00103.
264. Diez-Dacal, B.; Sanchez-Gomez, F.J.; Sanchez-Murcia, P.A.; Milackova, I.; Zimmerman, T.; Ballekova, J.; Garcia-Martin, E.; Agundez, J.A.G.; Gharbi, S.; Gago, F.; et al. Molecular Interactions and Implications of Aldose Reductase Inhibition by PGA(1) and Clinically Used Prostaglandins. *Mol. Pharmacol.* **2016**, *89*, 42–52, doi:10.1124/mol.115.100693.
265. Zhang, K.-R.; Zhang, Y.-F.; Lei, H.-M.; Tang, Y.-B.; Ma, C.-S.; Lv, Q.-M.; Wang, S.-Y.; Lu, L.-M.; Shen, Y.; Chen, H.-Z.; et al. Targeting AKR1B1 Inhibits Glutathione de Novo Synthesis to Overcome Acquired Resistance to EGFR-Targeted Therapy in Lung Cancer. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabg6428, doi:10.1126/scitranslmed.abg6428.
266. Reddy, A.B.M.; Tammali, R.; Mishra, R.; Srivastava, S.; Srivastava, S.K.; Ramana, K.V. Aldose Reductase Deficiency Protects Sugar-Induced Lens Opacification in Rats. *Chem.-Biol. Interact.* **2011**, *191*, 346–350, doi:10.1016/j.cbi.2011.02.028.
267. Akr1b1 Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B1 [Rattus Norvegicus (Norway Rat)] - Gene - NCBI Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24192> (accessed on 9 May 2022).
268. Ye, X.; Li, C.; Zu, X.; Lin, M.; Liu, Q.; Liu, J.; Xu, G.; Chen, Z.; Xu, Y.; Liu, L.; et al. A Large-Scale Multicenter Study Validates Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10 as a Prevalent Serum Marker for Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **2019**, *69*, 2489–2501, doi:10.1002/hep.30519.
269. Shi, J.; Chen, L.; Chen, Y.; Lu, Y.; Chen, X.; Yang, Z. Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10 (AKR1B10) Overexpression in Tumors Predicts Worse Overall Survival in Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer* **2019**, *10*, 4892–4901, doi:10.7150/jca.32768.
270. Liu, R.; Zheng, S.; Yang, C.Y.; Yu, Y.; Peng, S.; Ge, Q.; Lin, Q.; Li, Q.; Shi, W.; Shao, Y. Prognostic Value of Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10 (AKR1B10) in Digestive System Cancers A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* **2021**, *100*, e25454, doi:10.1097/MD.00000000000025454.
271. He, R.-Z.; Jiang, J.; Luo, D.-X. New Cancers Therapy through Targeting Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10 with MiRNAs. *Transl. Cancer Res.* **2020**, *9*, 4043–4045, doi:10.21037/tcr-19-2467.
272. Kang, J.; Lemaire, H.; Unterbeck, A.; Salbaum, J.; Masters, C.; Grzeschik, K.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Mullerhill, B. The Precursor of Alzheimers-Disease Amyloid-A4 Protein Resembles a Cell-Surface Receptor. *Nature* **1987**, *325*, 733–736, doi:10.1038/325733a0.
273. Nguyen, K.V. Beta-Amyloid Precursor Protein (APP) and the Human Diseases. *AIMS Neurosci.* **2019**, *6*, 273–281, doi:10.3934/Neuroscience.2019.4.273.
274. Nicolazzi, C.; Caron, A.; Tellier, A.; Trombe, M.; Pinkas, J.; Payne, G.; Carrez, C.; Guerif, S.; Maguin, M.; Baffa, R.; et al. An Antibody-Drug Conjugate Targeting MUC1-Associated Carbohydrate CA6 Shows Promising Antitumor Activities. *Mol. Cancer Ther.* **2020**, *19*, 1660–1669, doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0826.
275. CA5B Gene - GeneCards | CAH5B Protein | CAH5B Antibody Available online: [https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CA5B#:~:text=CA5B%20\(Carbonic%20Anhydrase%205B\)%20is,Reversible%20hydration%20of%20carbon%20dioxide](https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CA5B#:~:text=CA5B%20(Carbonic%20Anhydrase%205B)%20is,Reversible%20hydration%20of%20carbon%20dioxide) (accessed on 9 May 2022).
276. CA5A Gene - GeneCards | CAH5A Protein | CAH5A Antibody Available online: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CA5A&keywords=ca5a> (accessed on 9 May 2022).
277. Augoff, K.; Hryniewicz-Jankowska, A.; Tabola, R.; Stach, K. MMP9: A Tough Target for Targeted Therapy for Cancer. *Cancers* **2022**, *14*, 1847, doi:10.3390/cancers14071847.

278. Zhou, H.; Xiang, Q.; Hu, C.; Zhang, J.; Zhang, Q.; Zhang, R. Identification of MMP1 as a Potential Gene Conferring Erlotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Based on Bioinformatics Analyses. *Hereditas* **2020**, *157*, 32, doi:10.1186/s41065-020-00145-x.
279. TTR Gene - GeneCards | TTHY Protein | TTHY Antibody Available online: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TTR&keywords=ttr> (accessed on 22 September 2022).
280. Yang, G.-Z.; Hu, L.; Cai, J.; Chen, H.-Y.; Zhang, Y.; Feng, D.; Qi, C.-Y.; Zhai, Y.-X.; Gong, H.; Fu, H.; et al. Prognostic Value of Carbonic Anhydrase VII Expression in Colorectal Carcinoma. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 209, doi:10.1186/s12885-015-1216-y.
281. CA6 Gene - GeneCards | CAH6 Protein | CAH6 Antibody Available online: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CA6&keywords=ca6> (accessed on 22 September 2022).
282. CA7 Gene - GeneCards | CAH7 Protein | CAH7 Antibody Available online: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CA7&keywords=ca7> (accessed on 22 September 2022).
283. CA14 Gene - GeneCards | CAH14 Protein | CAH14 Antibody Available online: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CA14&keywords=ca14> (accessed on 22 September 2022).
284. CA12 Gene - GeneCards | CAH12 Protein | CAH12 Antibody Available online: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CA12&keywords=ca12> (accessed on 22 September 2022).

Anexos



Imagen Capítulo 4: Extractos supercríticos de *Salvia sclarea*

Anexo I. Fichas del sistema de calidad.

A.1.1. Ficha de trazabilidad.



TIPO DOCUMENTO:	CONTROL TRAZABILIDAD PROCESO PRECARACTERIZACIÓN
ACCIÓN VINCULADA:	CONTROL DE ORIGEN DE MATERIAL VEGETAL DE LOS CEES

Especie:	Fecha de recepción en el laboratorio:	Conforme
Fecha de recolección:	Cantidad enviada:	Sí <input type="checkbox"/>
Lugar o finca de procedencia:	Cantidad recepcionada:	No <input type="checkbox"/>
Elaborado por:	Tipo de envase:	
Otra documentación vinculada:	Forma de envío/transporte:	

Recepción realizada por:	Cambio de envase:
Codificación Interna:	Codificación nueva
Observaciones:	

Entrada a almacén	
Almacén 1:	Almacén 2:
Ubicación en almacén:	Ubicación en almacén:
Fecha de entrada almacén:	Fecha de entrada almacén:
Ubicación nueva:	Ubicación nueva:

Firma:

A.1.2. Ficha técnica.

1 Identificación de la sustancia o preparado.

1.1 Identificación de la sustancia o preparado.

1.2 Sinónimos

2 Descripción

2.1 Aspecto:

2.2 Color:

2.3 Olor:

2.4 Método de obtención:

3 Composición/Información

4 Datos Físico-Químicos

4.1 Densidad aparente a 20 °C:

4.2 Solubilidad en aceite de almendra:

5 Propiedades/Usos

6 Dosificación:

7 Observaciones:

7.1 Especificaciones microbiológicas:

7.2 Precauciones de uso:

7.3 Reanálisis:

7.4 Observaciones:

7.5 Almacenamiento y conservación:

8 Referencias:

A.1.3. Ficha de seguridad.

1

Identificación del producto.**1.1 Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de identificación de productos:***Nombre del producto:**Nombre botánico latino de la procedencia del producto:**INCI: Extracto supercrítico de**EINECS/ELINCS nº:**CAS nº:**Código del producto:**Lugar de procedencia y parte usada de la planta:***1.2 Recomendaciones y restricciones de uso:****1.3 Información del suministrador:***Nombre de la empresa:**Dirección de la empresa:**Número de contacto:*

2

Identificación de riesgos.**2.1 Clasificación de la sustancia o mezcla:****2.2 Etiquetado SGA y precauciones de uso.**

Pictograma	Frases H	Frases P

3

Composición/información de los ingredientes.**3.1 Composición:**

4

Medidas de primeros auxilios.**4.1 Descripción de las posibles medidas de primeros auxilios:***Contacto con los ojos:**Contacto con la piel:**Inhalación:*

Ingestión:

4.2 Síntomas y efectos más importantes de la sustancia.

Contacto con los ojos:

Contacto con la piel:

Inhalación:

Ingestión:

4.3 Indicación para una atención médica de inmediato o de algún tratamiento especial:

5

Medidas contra el fuego.

5.1 Punto de combustión:

5.2 Medio de extinción:

Medio de extinción deseable:

Medio de extinción a evitar:

5.3 Riesgos específicos que puedan aparecer por la naturaleza de la sustancia:

5.4 Acciones de protección especiales para los bomberos:

6

Medidas contra una liberación involuntaria.

6.1 Precauciones del individuo, equipo de protección y procedimiento de emergencia.

Para los bomberos:

6.2 Precauciones medioambientales:

6.3 Métodos y materiales para la contención y limpieza:

7

Manipulación y almacenamiento.

7.1 Precauciones para una manipulación segura:

7.2 Condiciones para un almacenamiento seguro, incluyendo cualquier incompatibilidad:

8

Medidas de protección personal.

8.1 Parámetros de control

OSHA TWA:

OSHA STEL:

ACGIH TWA:

ACGIH STEL:

NOHSC TWA:

NOHSC STEL:

8.2 Equipos de protección personal:

8.3 Protección de la cara y ojos:

8.4 Protección de las manos:

8.5 Protección del cuerpo:

9

Propiedades químico físicas.

Estado físico:

Color:

Olor:

Solubilidad en agua:

Solubilidad en alcohol:

Solubilidad en aceite de almendra:

Liposolubilidad:

pH:

Punto/rango de ebullición:

Punto de descomposición:

Presión de vapor:

Ratio de evaporación:

Densidad aparente:

Punto de autoignición:

Punto/rango de descomposición:

Índice de refracción a 20 °C:

Coefficiente de partición:

Gravedad específica a 20 °C:

10

Estabilidad y reactividad.

10.1 Reactividad

10.2 Estabilidad química:

10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas:

10.4 Condiciones a evitar:

10.5 Materiales incompatibles:

10.6 Productos de descomposición peligrosos:

11

Información toxicológica:

11.1 Efectos adversos de la sustancia.

Toxicidad aguda No especificada.

Irritación/corrosión de la piel:

Daños/irritación de los ojos:

Sensibilización respiratoria:

Mutagenicidad:

Carcinogénesis:

IARH:

ACGIH:

NTP:

OSHA:

Toxicidad reproductiva:

Riesgo de aspiración:

11.2 Información de las rutas de exposición más probables.

11.3 Síntomas relacionados con las características físicas, químicas y toxicológicas:

11.4 Efectos inmediatos y crónicos de una exposición a corto y largo plazo a la sustancia:

Información ecológica:

12.1 Obtención del producto:

12.2 Toxicidad:

Toxicidad aguda para fauna acuática:

LC50/96 horas:

Toxicidad para plantas acuáticas:

Toxicidad para microorganismos:

Toxicidad límite:

12.3 Persistencia y degradabilidad:

12.4 Potencial en la bioacumulación:

12.5 Movilidad en suelo.

Consideraciones sobre la eliminación:

13.1 Métodos para el tratamiento de residuos:

Información de transporte:

14.1 Número UN.

14.2. Número UN apropiado para el transporte.

14.3 Riesgos según el tipo de transporte.

14.4 Riesgos medioambientales:

14.5 Precauciones específicas para el usuario:

14.6 Transporte en un contenedor específico:

14.7 Información adicional de transporte:

Información regulatoria:

15.1 Seguridad, salud y regulación/legislación ambiental específica para la sustancia.

Otra información.

Descargo de responsabilidades:

12

13

14

15

16

Anexo II. Coordenadas cartesianas para geometrías optimizadas en fase gas con parametrización bvp86/dga1.

3-metilcatecol

O	0.04471200	-2.02969400	-0.00000100
O	-2.34237000	-0.91639900	-0.00000300
C	1.19623600	0.13027500	0.00000200
C	0.03706800	-0.65014100	0.00000000
C	1.01279700	1.52012000	-0.00000200
C	-1.25721000	-0.09452100	-0.00000500
C	2.55164900	-0.52434300	0.00001100
C	-0.24860300	2.11051000	-0.00000900
C	-1.38257500	1.29246400	-0.00001000
H	1.89577200	2.15542000	-0.00000200
H	2.70325300	-1.15027900	0.88735500
H	2.70317300	-1.15046900	-0.88721200
H	3.34059400	0.22982000	-0.00010500
H	-0.35405600	3.18931400	-0.00001400
H	-2.38066300	1.72239700	-0.00001300
H	0.97775800	-2.31403900	0.00007600
H	-1.96073200	-1.81960600	0.00002500

Catecol

O	-1.68804500	-1.41784000	-0.00000100
O	-1.79000100	1.21031500	0.00001400
C	-0.50992000	-0.73752700	-0.00000200
C	-0.52147200	0.67401200	0.00000500
C	0.71960100	-1.39029500	-0.00001000
C	0.65820800	1.40817600	0.00000500
C	1.91738000	-0.66675500	-0.00001100
C	1.88118700	0.72536900	-0.00000400
H	0.72869800	-2.47680900	-0.00001600
H	0.62671300	2.49448000	0.00001000
H	2.86460700	-1.19440900	-0.00001800
H	2.80551000	1.29415100	-0.00000400
H	-2.37253000	-0.71554100	0.00000600
H	-1.69852400	2.18045400	0.00002100

Ácido clorogénico

O	0.75915900	-0.88140600	-0.27476600
O	4.29987400	0.81466400	1.35898200
O	2.32011700	-3.06830500	0.16949600
O	4.56225200	-1.84324700	1.44728400
O	4.72083900	2.09675300	-1.95490400
O	5.46278000	2.74142000	0.09395400
O	0.13667900	0.76762400	1.18983400
O	-7.30653000	1.53018300	0.99813900
O	-8.07913800	-0.27640100	-0.75779400
C	4.19167100	0.71494600	-0.06291300
C	2.14244900	-0.65658700	0.13801600
C	2.70466900	0.63408700	-0.44503100
C	4.95963900	-0.52459300	-0.58453300
C	2.88717400	-1.88796800	-0.35456400
C	4.36737900	-1.79625300	0.05040100
C	4.85293400	1.96559400	-0.62235100
C	-0.16252500	-0.08117000	0.37171000
C	-1.51074600	-0.41664900	-0.09985600
C	-2.58364100	0.24063300	0.38561000
C	-3.98516300	0.08481000	0.07485100
C	-4.95200600	0.89961900	0.70695800
C	-4.47716500	-0.85740400	-0.85134000
C	-6.30314000	0.78354900	0.43505000
C	-5.82718600	-1.00101700	-1.14788800
C	-6.75104300	-0.17436400	-0.50108800
H	2.16765100	-0.61568000	1.23356800
H	2.60416500	0.62967700	-1.53464000
H	2.16411500	1.49312600	-0.03827600
H	6.01775300	-0.43765700	-0.31764800
H	4.88864800	-0.56770600	-1.67473200
H	2.84830100	-1.88305700	-1.46173300
H	4.87241600	-2.67581300	-0.37439400
H	4.92909000	1.57131300	1.47081500
H	1.35775700	-2.90989700	0.08787500

H	4.53131100	-0.89789300	1.72980300
H	5.21099700	2.92033900	-2.17162900
H	-1.60316400	-1.20386900	-0.84454700
H	-2.35534600	1.01052900	1.12858900
H	-4.61911200	1.64374100	1.43126700
H	-3.77033300	-1.50789900	-1.36262000
H	-6.17910900	-1.73515500	-1.86467100
H	-6.89522500	2.15066500	1.62786300
H	-8.49797300	0.40156000	-0.18488000

Ácido ferúlico

O	-2.59988000	1.65394300	-0.42433300
O	-3.92502100	-0.77927000	-0.19180700
O	4.67859400	1.41444200	-0.09957800
O	4.56793600	-0.84445400	0.16655500
C	0.27087200	-0.64324100	0.00383700
C	-1.91634600	0.48572200	-0.18700100
C	-0.53212700	0.51038200	-0.13815600
C	-0.42203200	-1.86119400	0.11313400
C	-2.56392400	-0.77353200	-0.09726500
C	-1.80975700	-1.93891900	0.06886300
C	1.71514800	-0.60651900	0.04653200
C	2.55634400	0.44079700	-0.04981100
C	-3.60534000	1.99494400	0.55539000
C	4.00998600	0.22821800	0.02118000
H	-0.06001000	1.48827000	-0.21779500
H	0.14826200	-2.78044200	0.23256400
H	-2.31259200	-2.90002100	0.14295700
H	2.19904100	-1.57887200	0.17648900
H	2.19840200	1.45970300	-0.18329600
H	-3.13827300	2.24081200	1.51500300
H	-4.32552200	1.18292700	0.69079500
H	-4.11335000	2.87722900	0.16345600
H	-4.20638900	-1.71118800	-0.10804700
H	5.62046600	1.14433900	-0.03903100

Hidroquinona

O	2.77546000	0.11009100	-0.00003100
O	-2.77546700	-0.11008400	0.00004300
C	1.40981100	0.02905700	-0.00001700
C	-1.40981200	-0.02906300	0.00001600
C	0.67834400	1.22230800	-0.00003000
C	-0.71410400	1.18596600	-0.00001000
C	0.71410900	-1.18597400	0.00001100
C	-0.67834400	-1.22230500	0.00002500
H	1.20532200	2.17108800	-0.00005300
H	-1.26703600	2.12310400	-0.00001600
H	1.26704000	-2.12311200	0.00001900
H	-1.20531300	-2.17109000	0.00004300
H	3.10203200	-0.80925800	-0.00004300
H	-3.10201600	0.80927400	-0.00001200

Ácido L-ascórbico

O	-0.17776900	-1.17794100	-0.59067500
O	1.24313500	0.32578800	1.43394500
O	-0.82944100	2.40393700	-0.31305900
O	3.81846800	-0.18321300	0.27389900
O	-3.16346700	0.50016700	0.48292300
O	-2.14644900	-2.12401400	0.12661100
C	0.26134900	0.19005900	-0.78060200
C	1.52900800	0.41240700	0.05766300
C	-0.88756900	1.05555500	-0.32297900
C	2.63239600	-0.53382100	-0.41236900
C	-1.91553200	0.25183500	0.02436100
C	-1.49163700	-1.13486400	-0.12498300
H	0.47205400	0.32806100	-1.85087000
H	1.88036600	1.44266900	-0.11441100
H	2.30475300	-1.56668300	-0.20939200
H	2.73343400	-0.43281800	-1.50695900
H	0.82199800	-0.55120600	1.54386100
H	0.10997500	2.64305000	-0.44222000
H	4.47596000	-0.85646400	0.02119900
H	-3.52243500	-0.41143400	0.60309200

Galato de propilo

O	-2.04072200	0.10929400	0.00091600
O	2.22732000	2.68777500	0.00063200
O	3.68985800	-1.79561400	-0.00103800
O	4.19930900	0.82798200	-0.00051200
O	-1.45724700	-2.09942900	0.00073200
C	-4.30334300	0.89225300	-0.00196800
C	-3.41914200	-0.34231100	0.00148100
C	0.24531100	-0.41498500	0.00041800
C	1.26294800	-1.38364600	-0.00015600
C	0.56543200	0.94563400	0.00066500
C	-1.14151400	-0.92470900	0.00076800
C	1.89268300	1.36961900	0.00037300
C	2.58949900	-0.97247900	-0.00048200
C	-5.79075800	0.52562000	-0.00102700
C	2.90149700	0.39338800	-0.00021500
H	-4.06658500	1.50469900	0.87384800
H	-4.06649200	1.49980900	-0.88116000
H	-3.59688100	-0.96329900	0.88627400
H	-3.59615400	-0.96780000	-0.88026300
H	0.98628300	-2.43513300	-0.00032300
H	-0.22446500	1.68923400	0.00111900
H	-6.05172800	-0.05805300	0.88450100
H	-6.40682200	1.42645500	-0.00449200
H	-6.05120000	-0.06448200	-0.88244800
H	3.20698800	2.69882300	0.00034900
H	3.36080400	-2.71331700	-0.00141000
H	4.74242600	0.01270200	-0.00097300

Ácido protocatecuico

O	-2.22847200	1.82815100	-0.00004600
O	-3.18842000	-0.62053700	-0.00036300
O	3.13221000	-0.91018900	0.00016000
O	2.84494400	1.34759600	0.00034800
C	0.92976000	-0.07820900	0.00010800
C	0.02867800	0.99908700	0.00010900

ANEXO II

C	-1.34341800	0.79782100	-0.00004900
C	0.41941800	-1.37813600	-0.00006300
C	-1.81864800	-0.53561000	-0.00021400
C	-0.95399600	-1.62728700	-0.00022200
C	2.37399600	0.22619200	0.00029200
H	0.42690900	2.01118200	0.00023900
H	1.10656500	-2.21905100	-0.00006800
H	-1.34246000	-2.64161600	-0.00034900
H	-3.10917400	1.39710200	-0.00016500
H	-3.42950900	-1.56531100	-0.00044300
H	4.05083700	-0.56562100	0.00021700

Pirogalol

O	0.06042100	-2.05757000	-0.00004700
O	-2.30387400	-0.79562400	0.00011600
O	2.39475800	-0.69594900	-0.00015900
C	0.01531400	-0.68575100	-0.00001500
C	-1.19144200	0.01767900	0.00007200
C	1.22897100	0.01235400	-0.00007000
C	-1.21164500	1.41399700	0.00010700
C	1.23961200	1.41220400	-0.00002800
C	0.01631700	2.08136700	0.00005800
H	-2.15021200	1.95846900	0.00017500
H	2.18458300	1.94288000	-0.00006900
H	0.01735400	3.16775100	0.00008800
H	-0.87721000	-2.33849000	-0.00010300
H	-3.08485400	-0.21302200	0.00008400
H	2.11714200	-1.63554300	-0.00020400

Quercetina

O	-0.26244800	-0.70235200	-0.14354000
O	0.38662800	2.88854000	0.27534600
O	-4.48931000	1.52013100	0.17369200
O	-2.33558500	2.83674700	0.26067200
O	-4.21238300	-3.23188400	-0.24740000
O	4.41422600	-2.29224700	0.67480800

O	5.99482700	-0.35883100	-0.16416900
C	-2.35096500	0.47940400	0.01906500
C	-1.64065000	-0.72524100	-0.10055900
C	0.41274000	0.50386100	-0.06774000
C	1.85361000	0.29921800	-0.11097100
C	-0.24697800	1.69656000	0.10112900
C	-1.70028400	1.75743900	0.13215900
C	-3.78161600	0.39778500	0.05302800
C	-2.23151200	-1.97996900	-0.19129800
C	-3.63362700	-2.00353100	-0.15642400
C	2.41508400	-0.93039800	0.29899300
C	-4.41450000	-0.84398800	-0.03585800
C	2.75281600	1.28036300	-0.57255700
C	3.78122900	-1.14236800	0.28474700
C	4.13434800	1.08926400	-0.59889600
C	4.65835500	-0.12587000	-0.16079600
H	-1.64997400	-2.88695500	-0.29101200
H	1.75598200	-1.72091300	0.65195200
H	-5.49906300	-0.89921500	-0.01068400
H	2.36771000	2.20389600	-1.00157700
H	4.80287200	1.85820300	-0.97075400
H	1.32495400	2.67522100	0.47692300
H	-3.76189300	2.26303000	0.22938600
H	-5.17763000	-3.08648500	-0.21230100
H	3.72946600	-2.92780900	0.95518600
H	6.09164300	-1.27497200	0.17349800

Ácido rosmarínico

O	-1.19801500	1.09459800	-0.39318100
O	-3.07306300	4.11522700	0.13639900
O	-2.61589600	-3.55425700	-0.66426400
O	-4.74139600	-4.02555600	0.82813600
O	-1.18923100	3.74733200	-1.08537800
O	-0.07163400	2.22143800	1.24738700
O	7.01278400	0.07562400	1.40305200
O	7.26010900	-1.66704000	-0.56933300

ANEXO II

C	-3.55845200	1.33253400	-0.73955100
C	-2.33029200	1.88253200	-0.00139000
C	-3.89766300	-0.07255300	-0.31946900
C	-3.09747400	-1.16646400	-0.68798600
C	-5.01179100	-0.35549200	0.47127100
C	-2.08535400	3.34028100	-0.38615300
C	-3.37452800	-2.47692800	-0.31439300
C	-5.32437100	-1.65803500	0.87227100
C	-4.51296100	-2.72278700	0.48604900
C	-0.06563200	1.41570400	0.33757900
C	3.53506100	0.10613100	0.12965600
C	1.07360300	0.63458300	-0.15164300
C	2.28090600	0.75947000	0.43362600
C	4.68654500	0.38705400	0.89483800
C	3.68338200	-0.82463900	-0.91823300
C	5.91640000	-0.20800700	0.65343100
C	4.89812000	-1.44445200	-1.19585100
C	6.00672400	-1.13356100	-0.40910800
H	-4.39864300	1.99873900	-0.52262900
H	-3.36609100	1.38615400	-1.81752200
H	-2.47496900	1.82595700	1.08369900
H	-2.21781000	-0.98759700	-1.30493200
H	-5.66462900	0.45503600	0.78579100
H	-6.20132300	-1.84671500	1.48632900
H	0.90146000	-0.03251100	-0.99277300
H	2.31877300	1.46577400	1.26795600
H	4.61693500	1.10088100	1.71436100
H	2.82390900	-1.06989200	-1.53784300
H	4.98623000	-2.15758200	-2.01085000
H	-2.84756200	5.01800200	-0.17786400
H	-1.87865000	-3.19756300	-1.19604700
H	-5.55248000	-4.02439100	1.37136400
H	7.72567300	-0.47691100	1.01875400
H	7.22657300	-2.28853900	-1.31999700

Epicatequina

O	0.45540000	0.75710000	-0.11140000
O	-0.01980000	-1.31810000	1.82830000
O	4.33340000	-2.14530000	-0.00430000
O	4.82150000	2.57760000	-0.31710000
O	-5.11890000	-0.82250000	-1.52540000
O	-5.80480000	0.96340000	0.49110000
C	0.05280000	-1.61210000	0.43270000
C	-0.37070000	-0.38570000	-0.38650000
C	1.48800000	-1.99160000	0.07350000
C	2.35960000	-0.76960000	-0.03670000
C	1.80440000	0.51290000	-0.12990000
C	-1.82670000	-0.02720000	-0.15390000
C	3.75340000	-0.91210000	-0.06740000
C	2.63180000	1.63610000	-0.21070000
C	-2.81880000	-0.59310000	-0.95290000
C	-2.16940000	0.86830000	0.85810000
C	4.57790000	0.20960000	-0.16230000
C	4.01720000	1.48310000	-0.22970000
C	-4.15710000	-0.26280000	-0.73960000
C	-3.50760000	1.19870000	1.07130000
C	-4.50140000	0.63310000	0.27260000
H	-0.60300000	-2.47070000	0.24560000
H	-0.25540000	-0.60340000	-1.45860000
H	1.50070000	-2.50790000	-0.89400000
H	1.88790000	-2.66640000	0.83950000
H	2.18970000	2.62820000	-0.26570000
H	-2.54910000	-1.29320000	-1.73990000
H	-0.95900000	-1.29610000	2.07780000
H	-1.41380000	1.31490000	1.49840000
H	5.65940000	0.09890000	-0.18250000
H	-3.76220000	1.89650000	1.86460000
H	5.30020000	-2.04600000	-0.03830000
H	4.26610000	3.37520000	-0.35530000
H	-4.69620000	-1.41580000	-2.17000000
H	-5.85210000	1.59450000	1.22970000

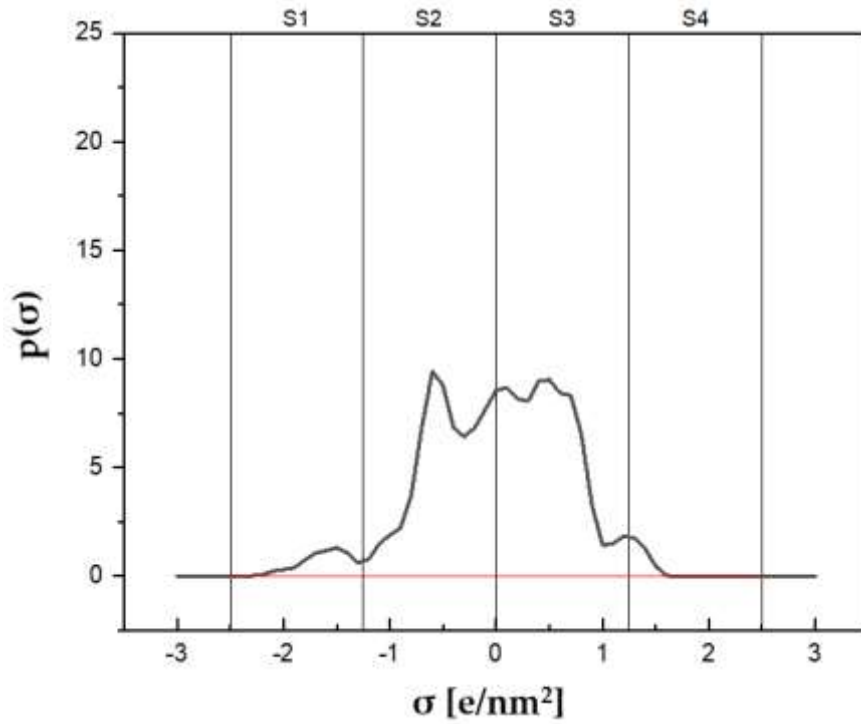
Ácido gálico

O	-3.06967700	-0.09278800	0.00000400
O	-1.86069800	2.28832200	-0.00000200
O	-1.68506900	-2.42321900	0.00001000
O	3.14119400	-1.10765800	-0.00007000
O	3.16366800	1.16795900	-0.00004400
C	1.07103300	0.01656600	0.00002900
C	-1.70283900	-0.03222400	0.00000900
C	-1.02768300	1.19580500	0.00001100
C	-1.00122900	-1.24803400	0.00001000
C	0.36066000	1.22796400	0.00002100
C	0.39194200	-1.20511300	0.00002000
C	2.54361100	0.12010500	0.00004900
H	0.91729900	2.16173900	0.00002700
H	0.94710900	-2.13757200	0.00002300
H	-3.36694100	0.84077200	-0.00001300
H	-1.29392700	3.08164800	0.00002100
H	-2.63031100	-2.16524000	0.00000200
H	4.09845300	-0.89268800	-0.00014200

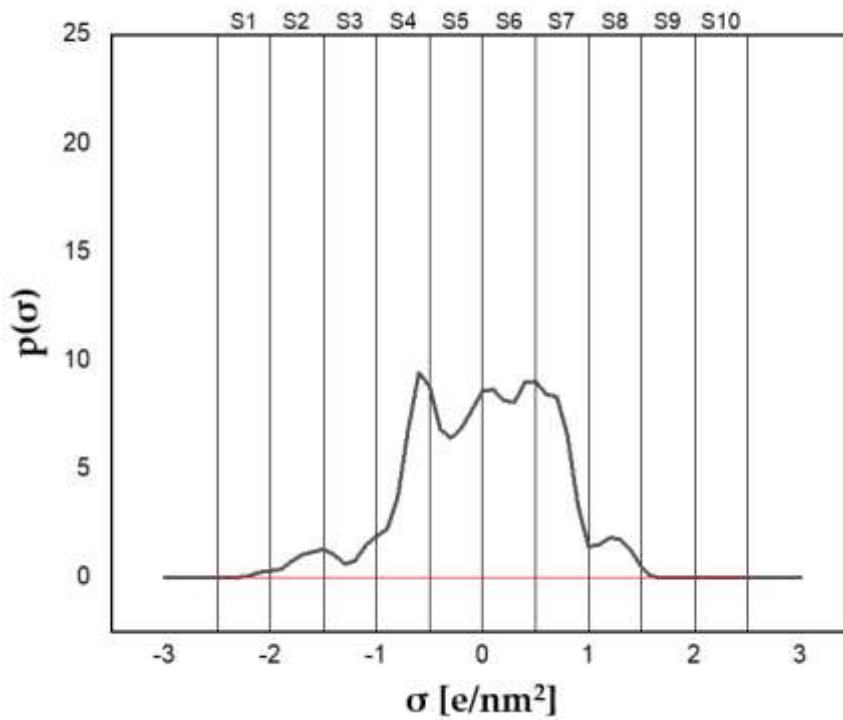
Anexo III. Divisiones del perfil σ en 4 y 10 áreas.

3-metilcatecol

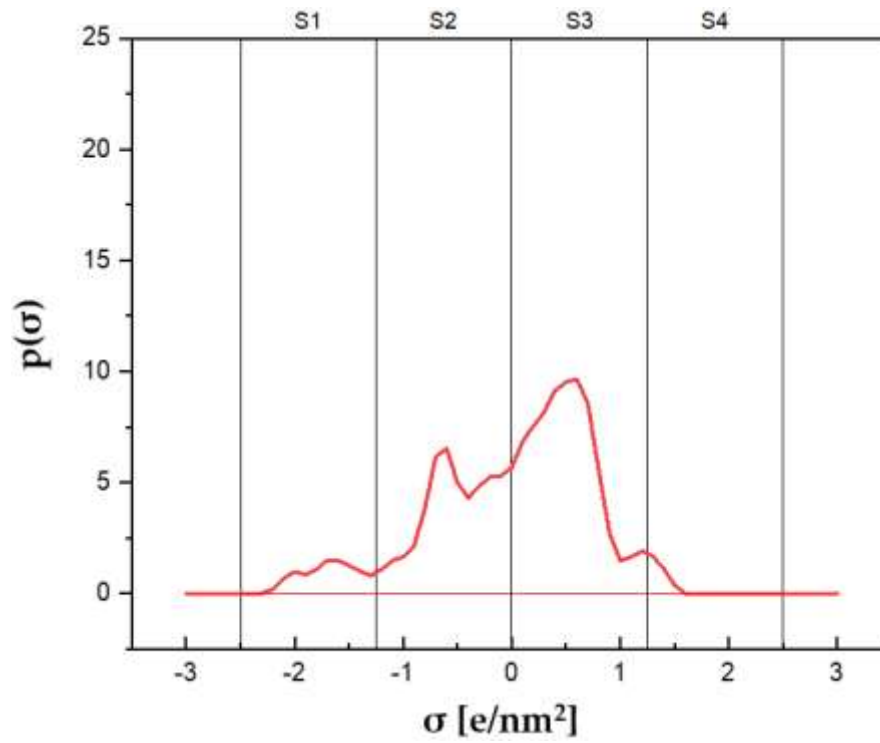
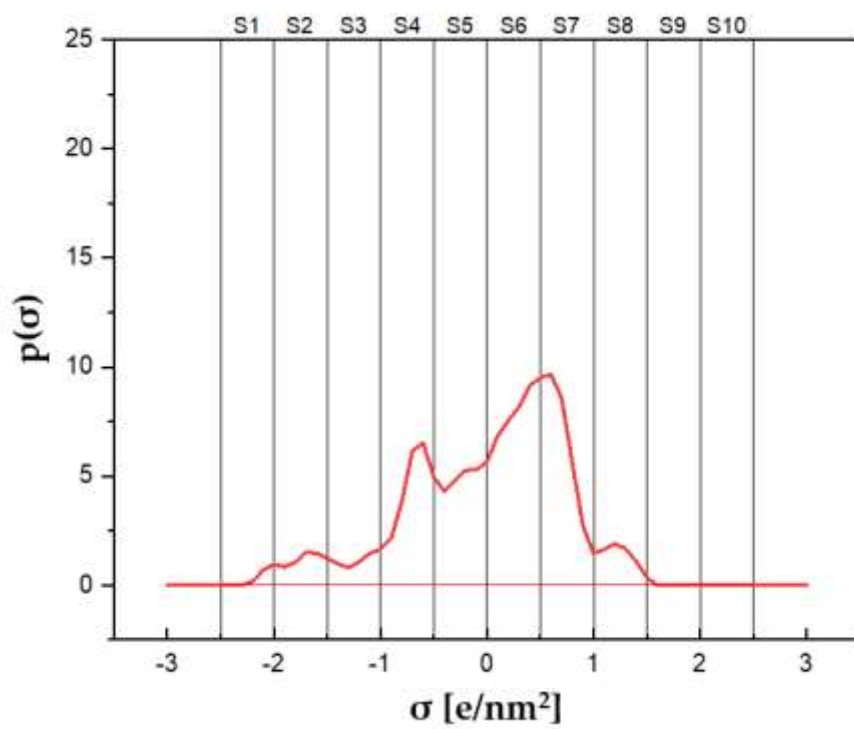
4 áreas



10 áreas

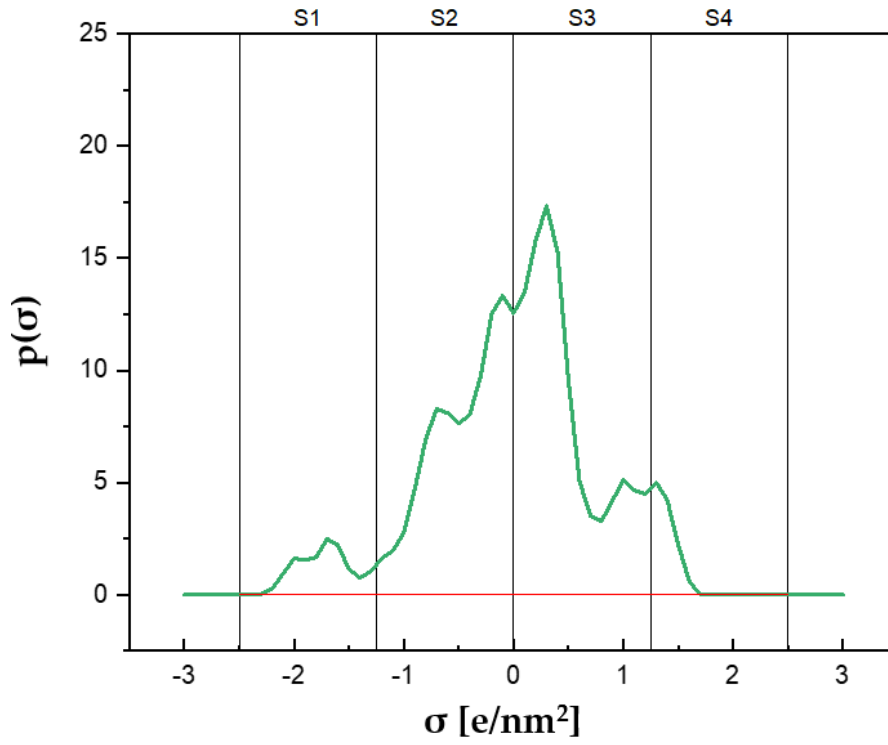


Catecol

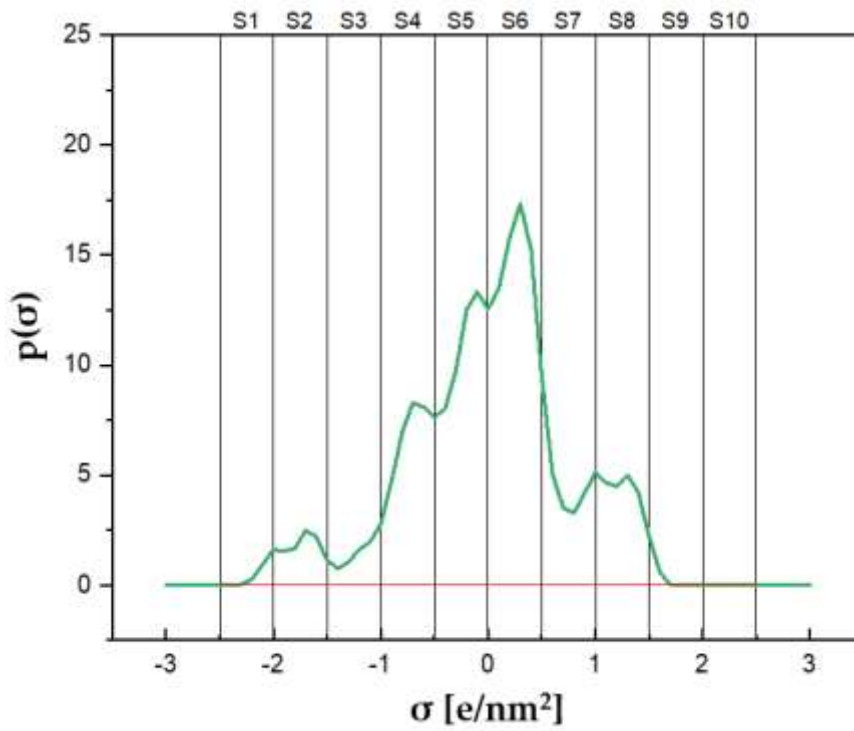
4 áreas10 áreas

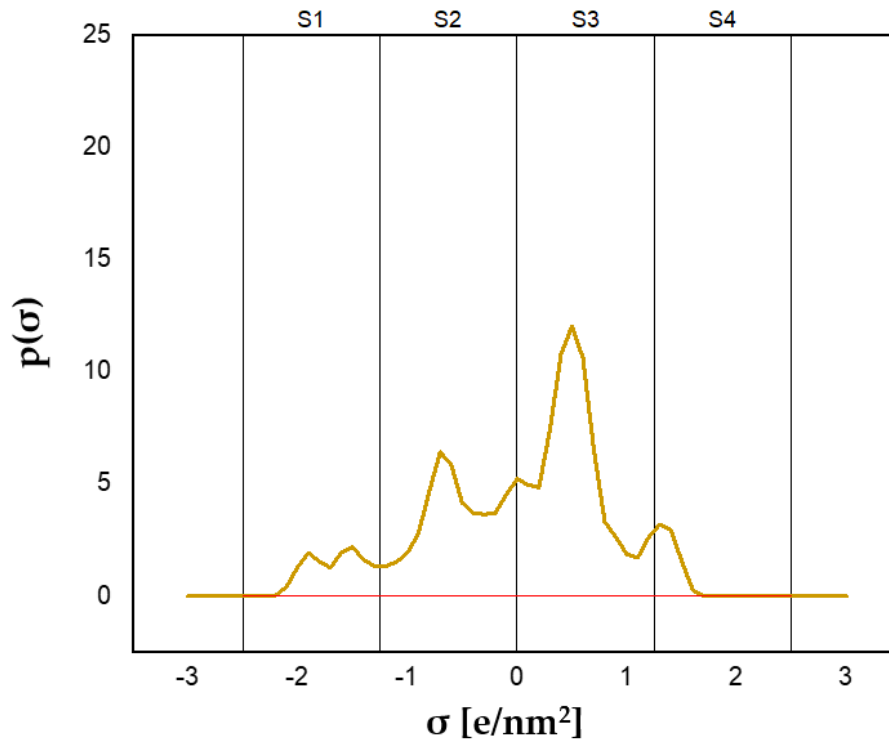
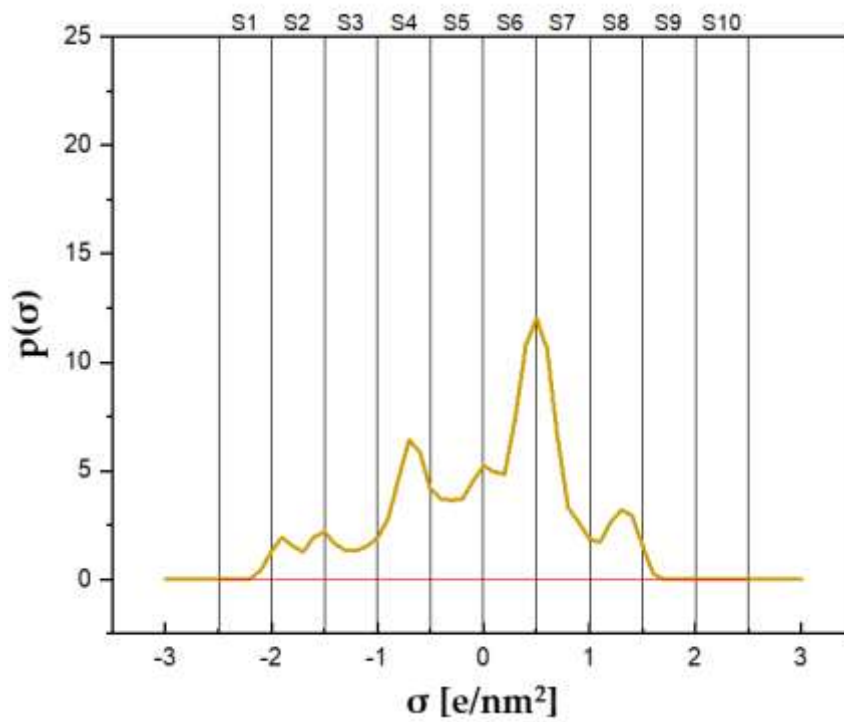
Ácido ferúlico

4 áreas



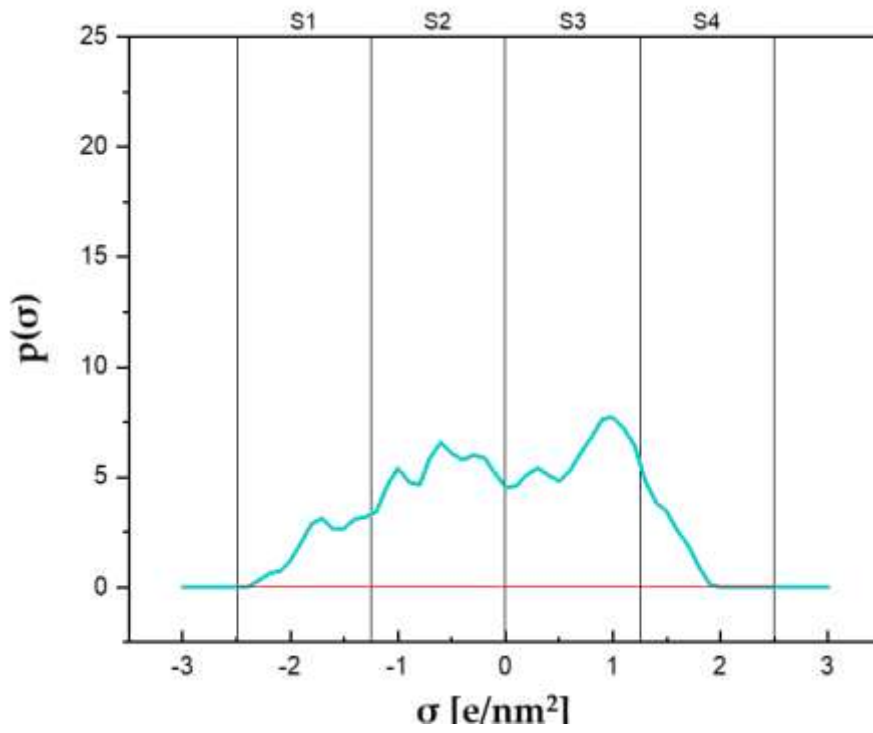
10 áreas



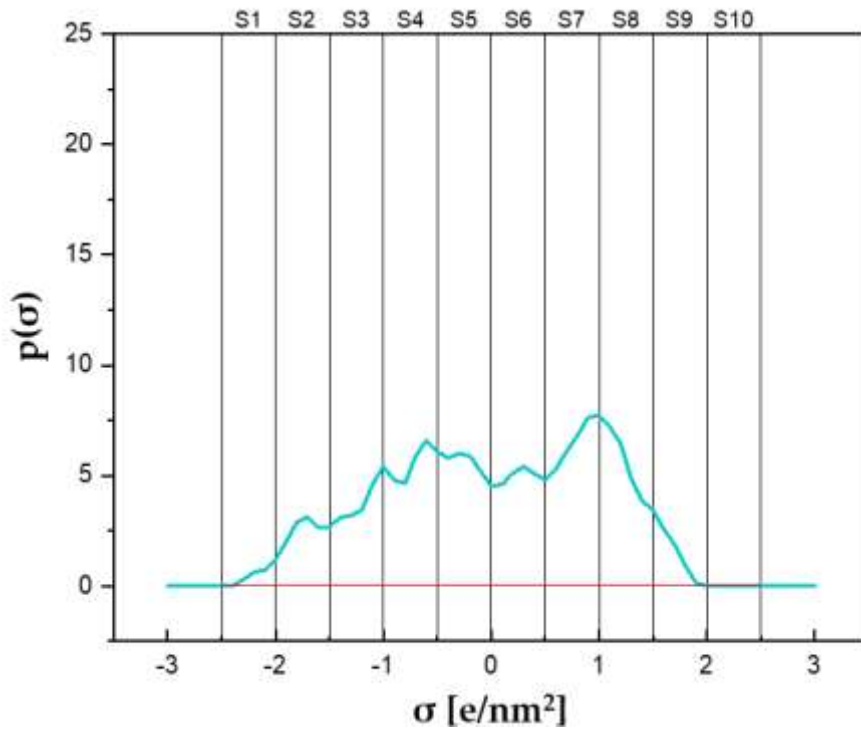
Hidroquinona4 áreas10 áreas

Ácido L-ascórbico

4 áreas

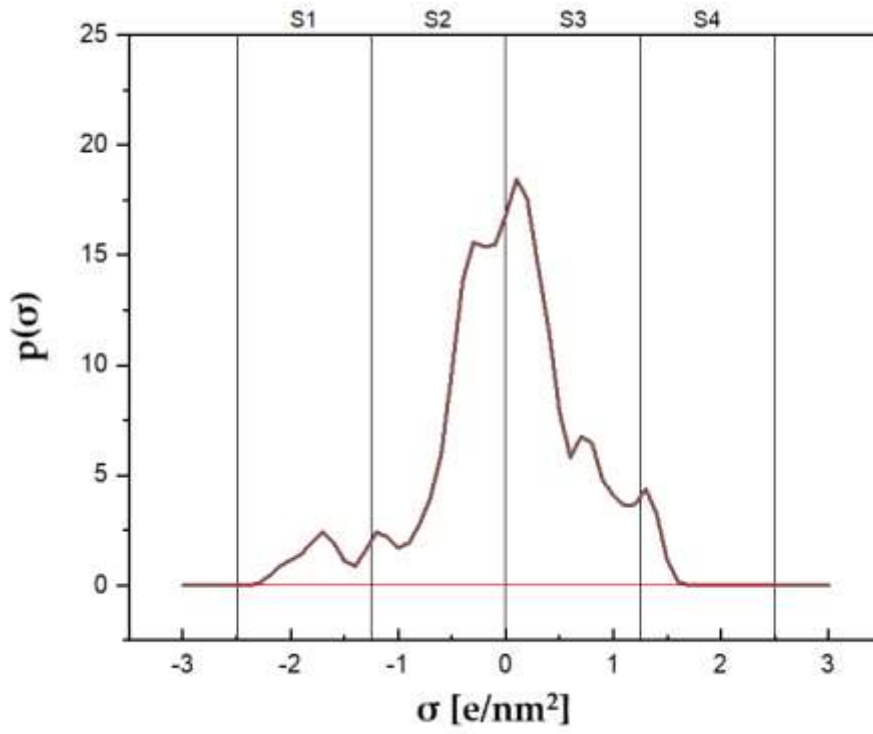


10 áreas

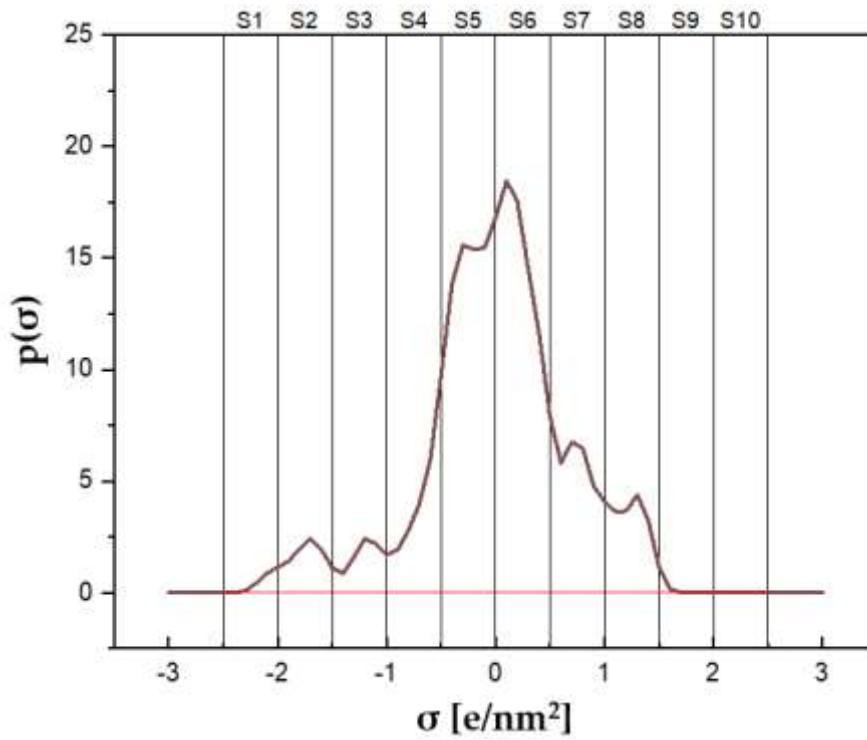


Galato de propilo

4 áreas

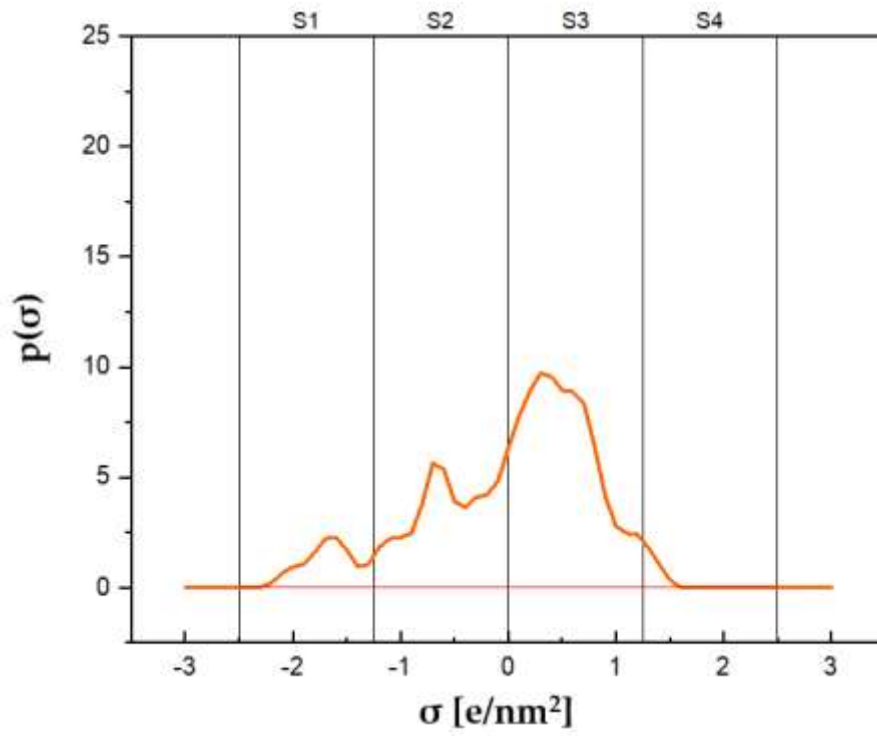


10 áreas

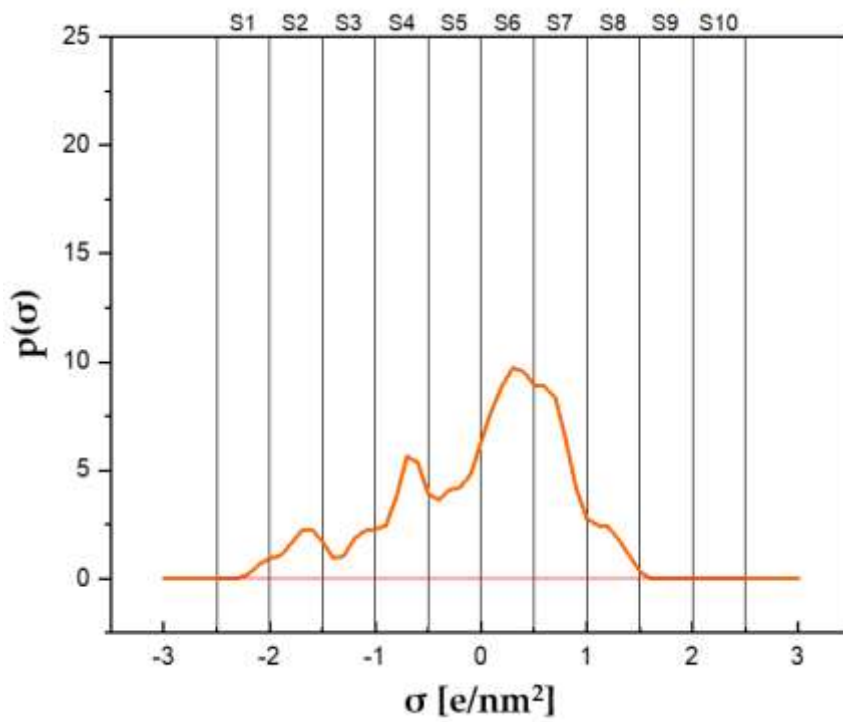


Pirogalol

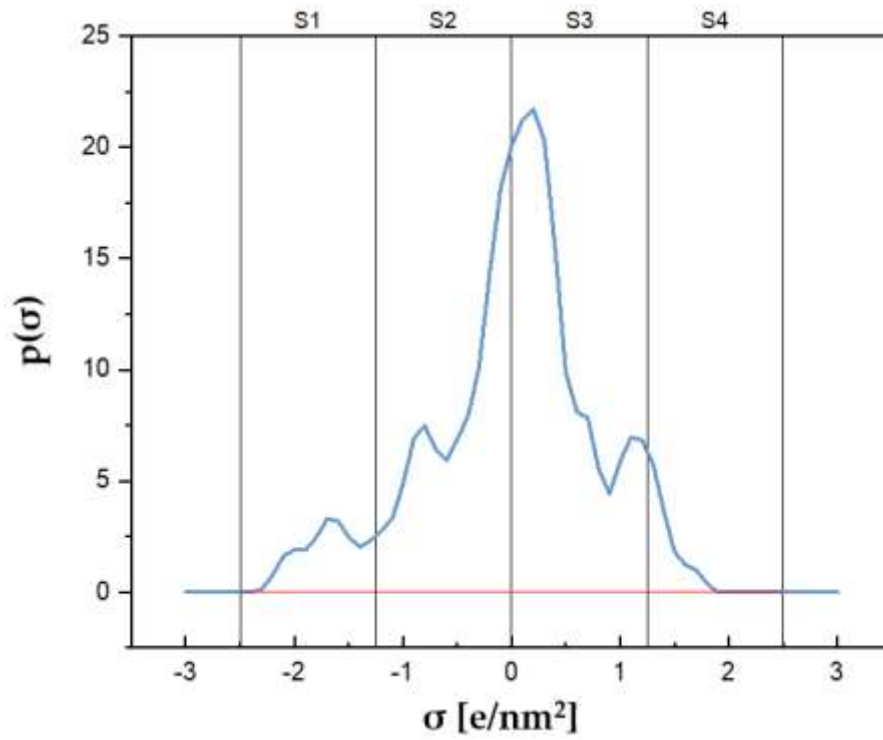
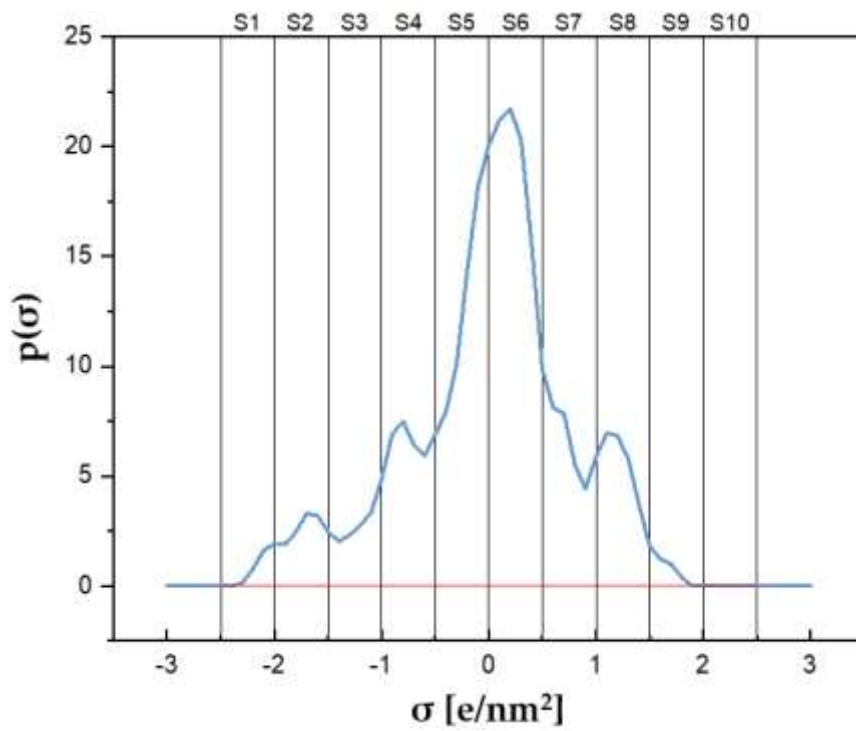
4 áreas



10 áreas

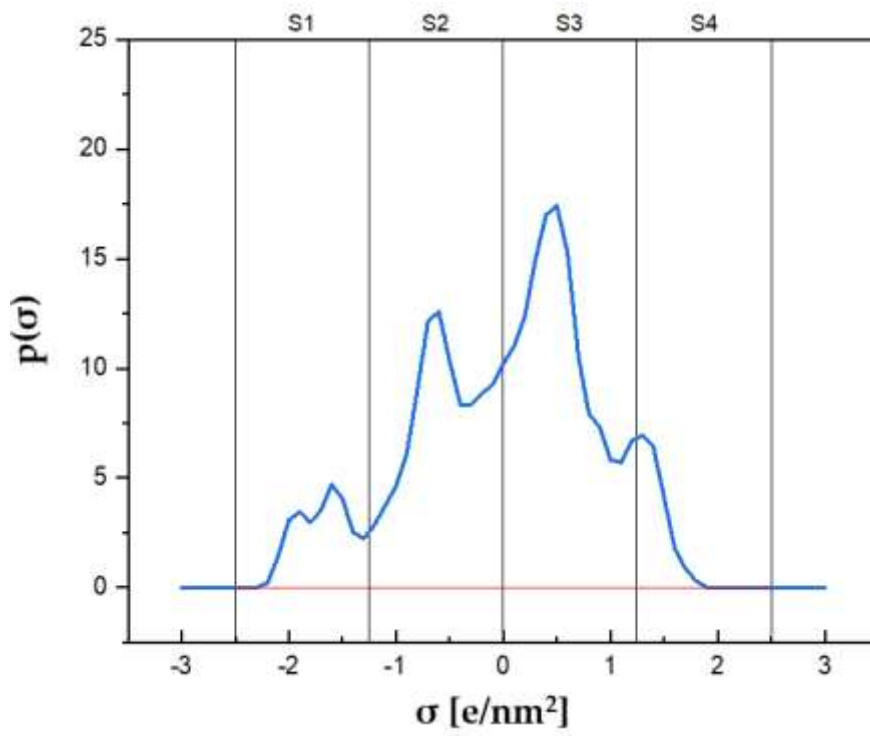


Quercetina

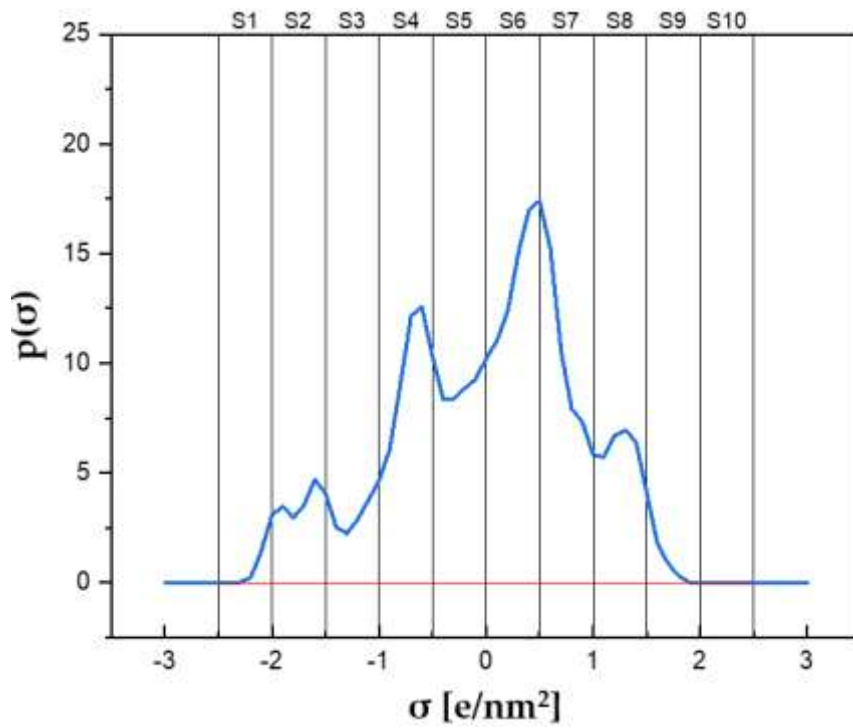
4 áreas10 áreas

Epicatequina

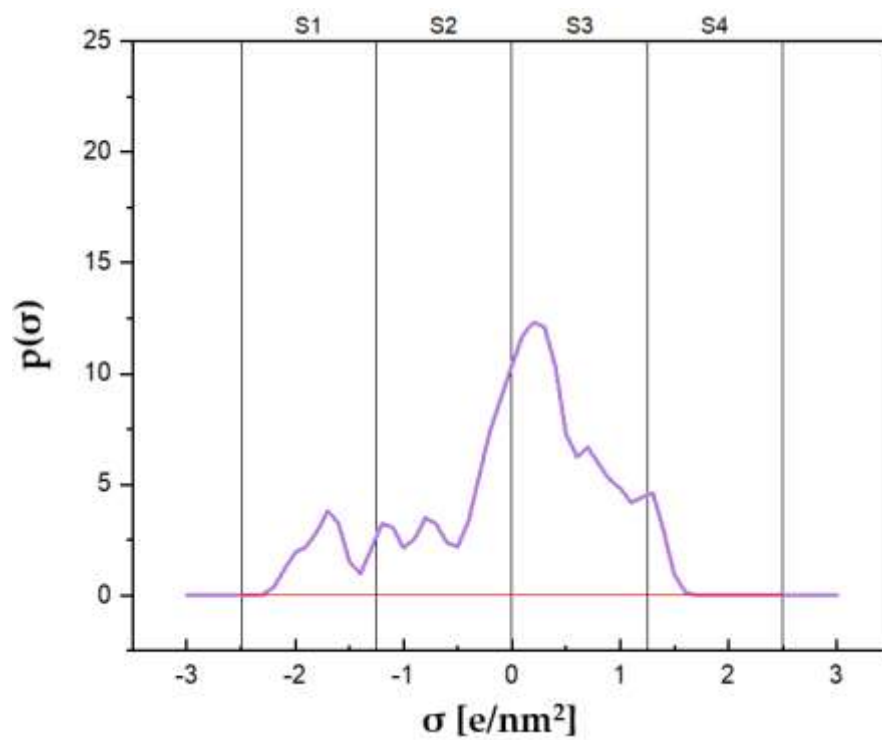
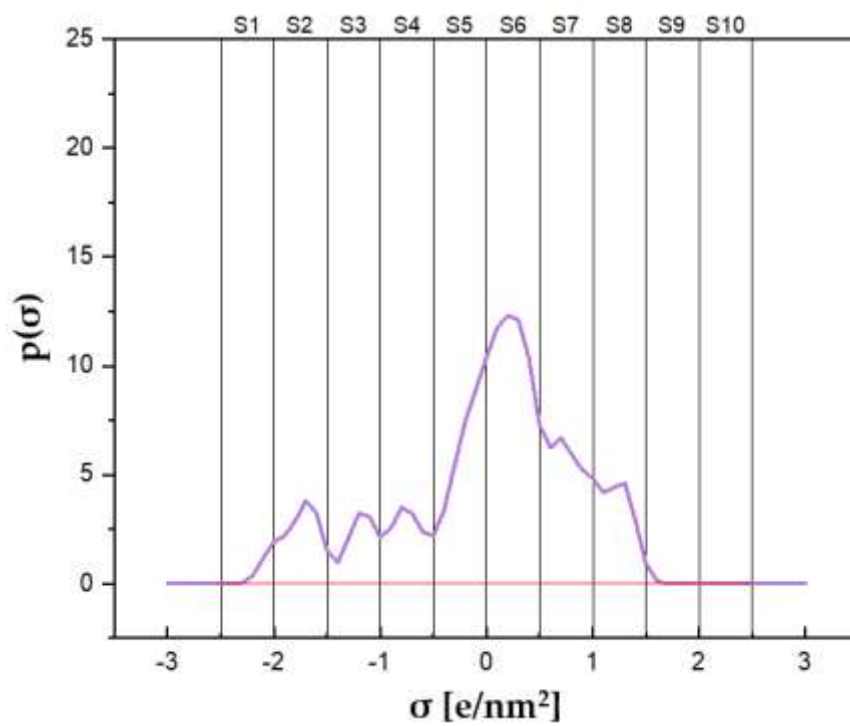
4 áreas

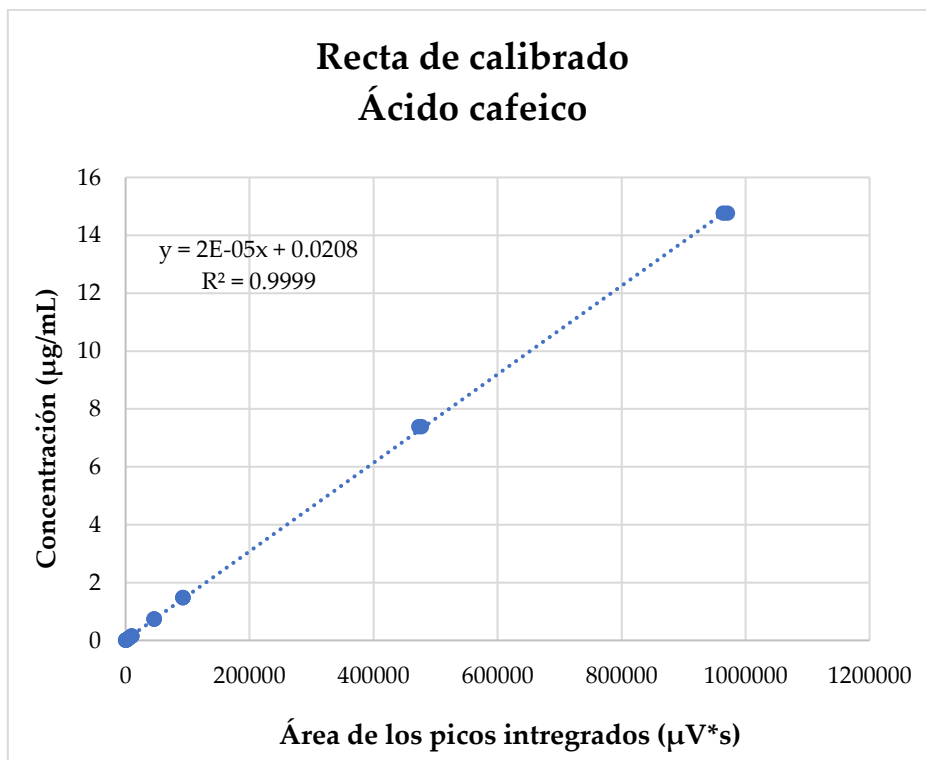
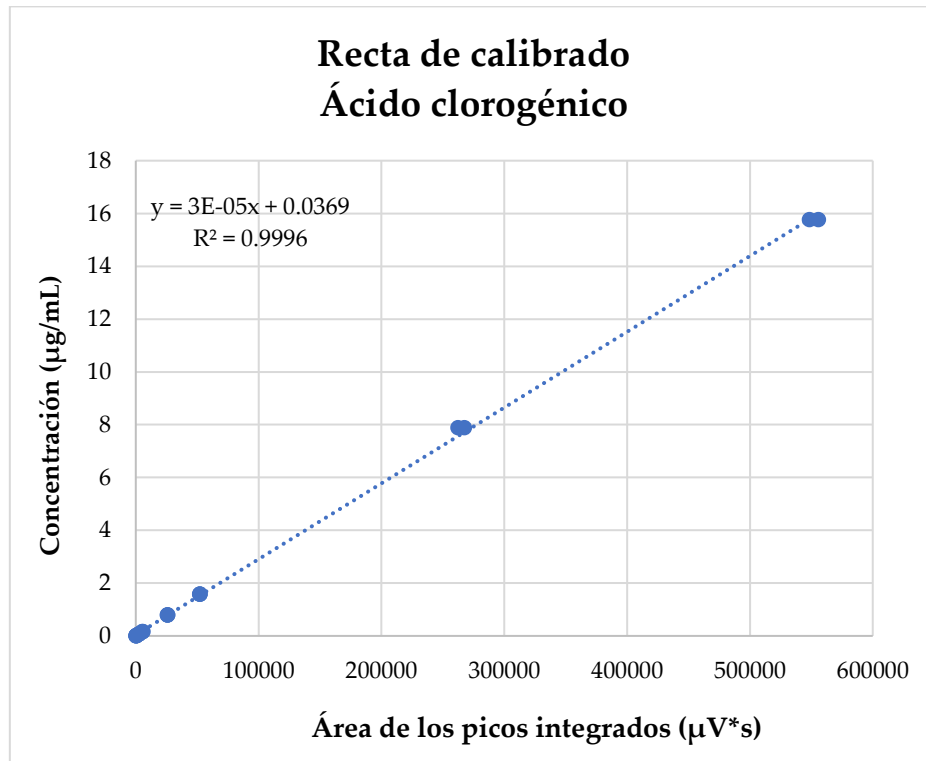


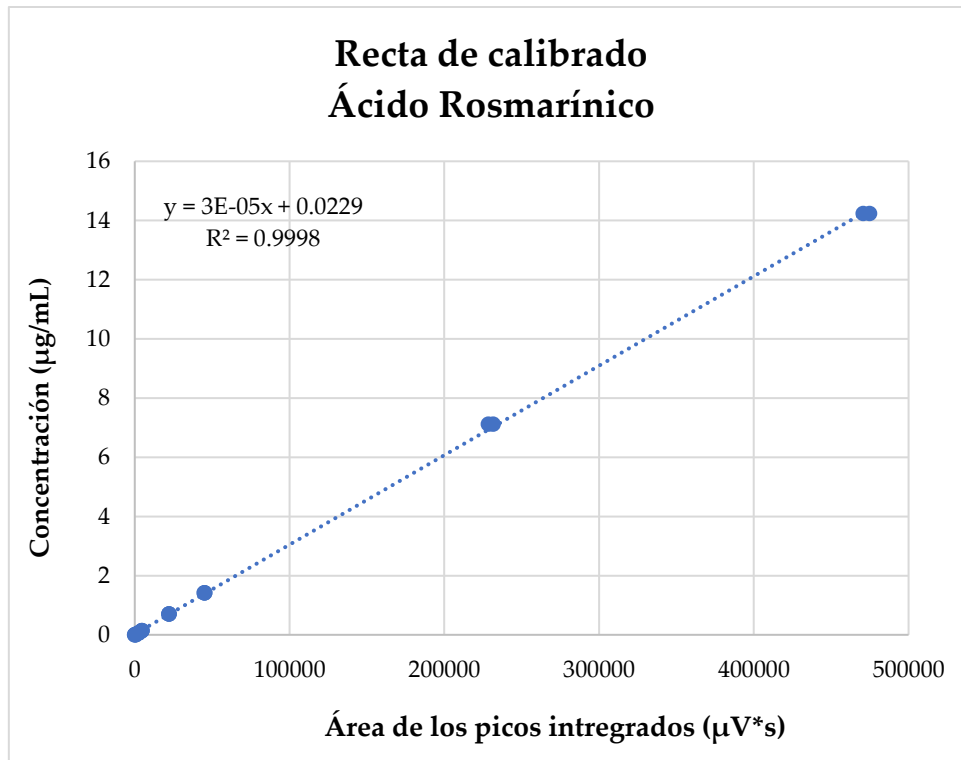
10 áreas



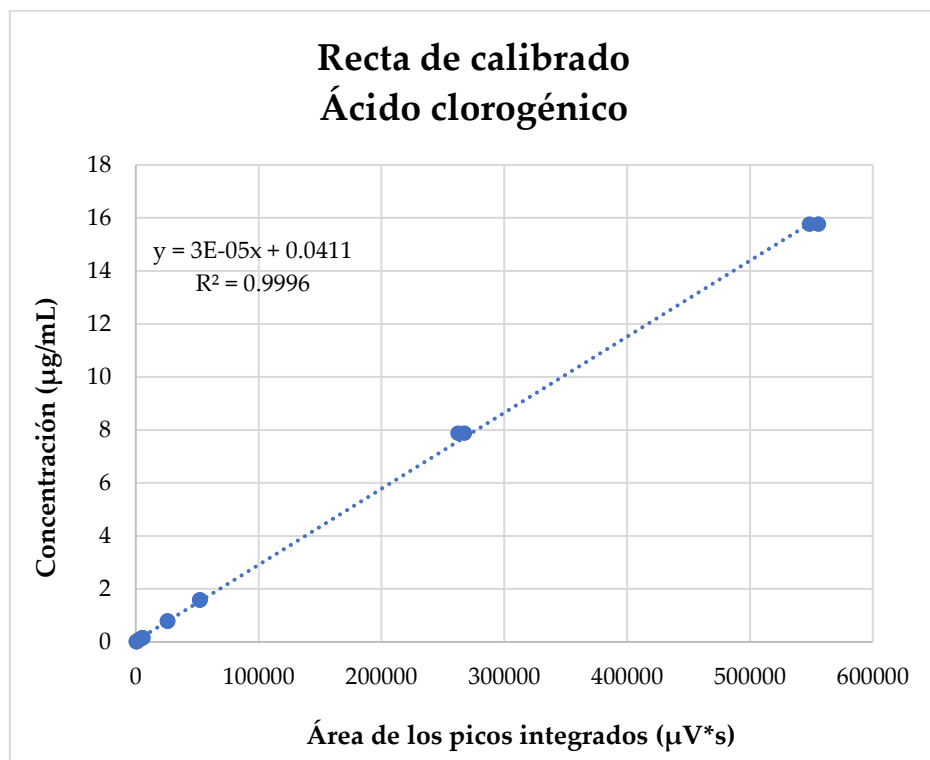
Ácido gálico

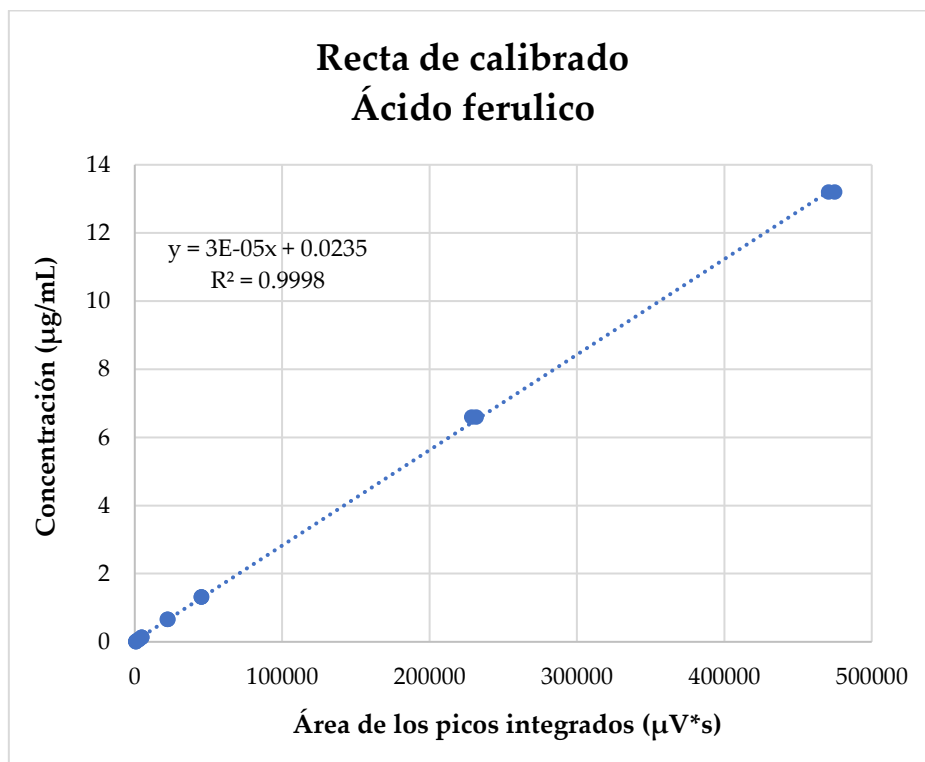
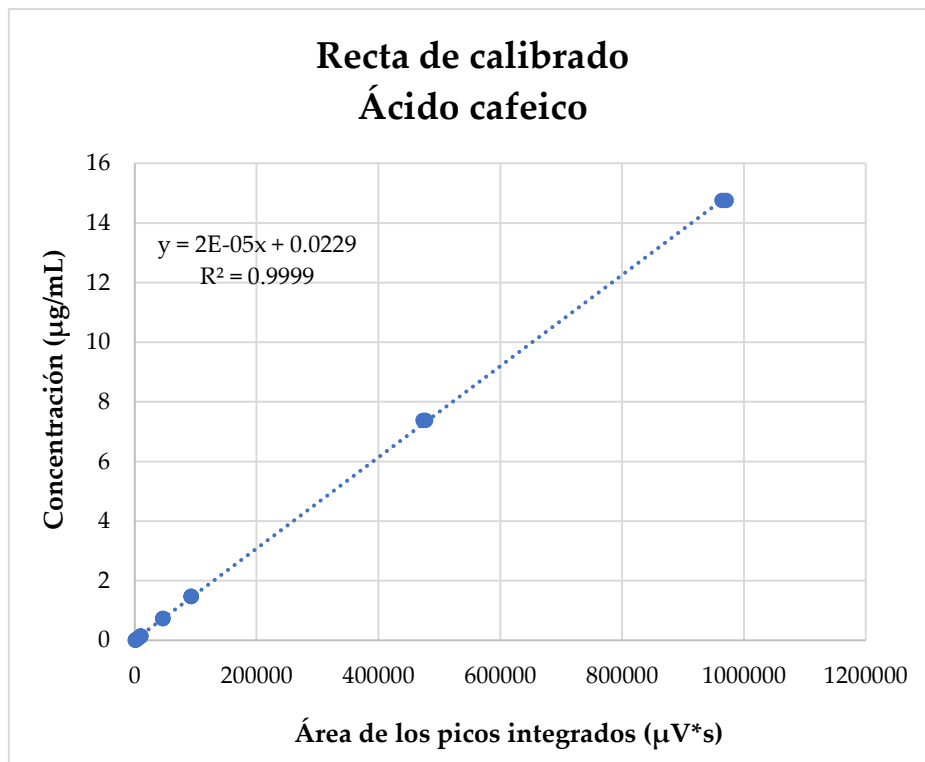
4 áreas10 áreas

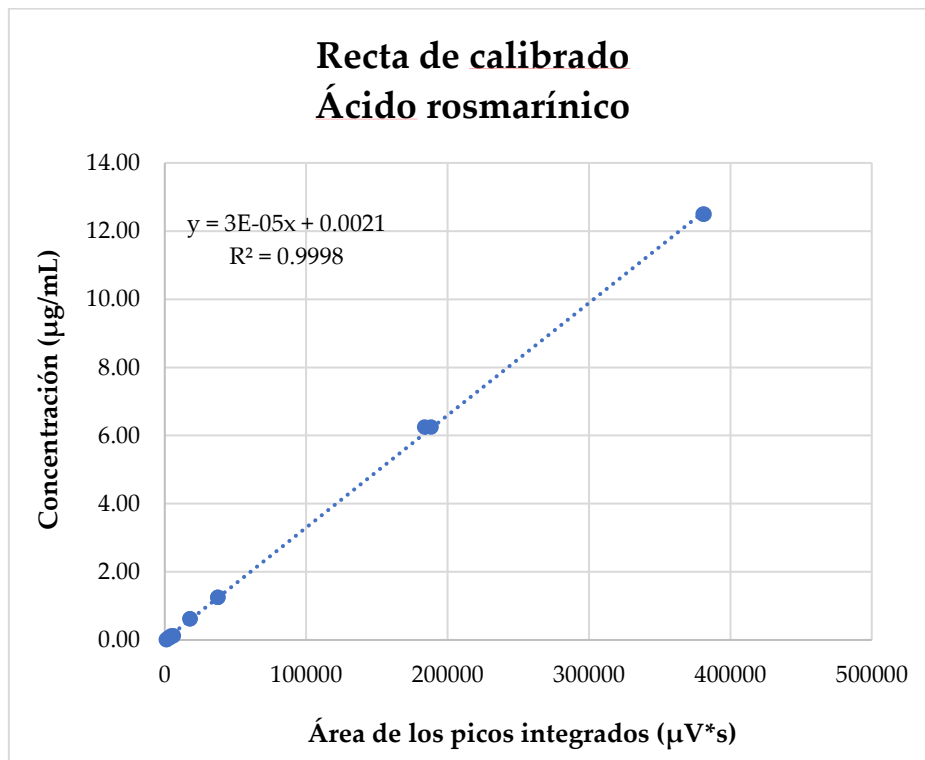
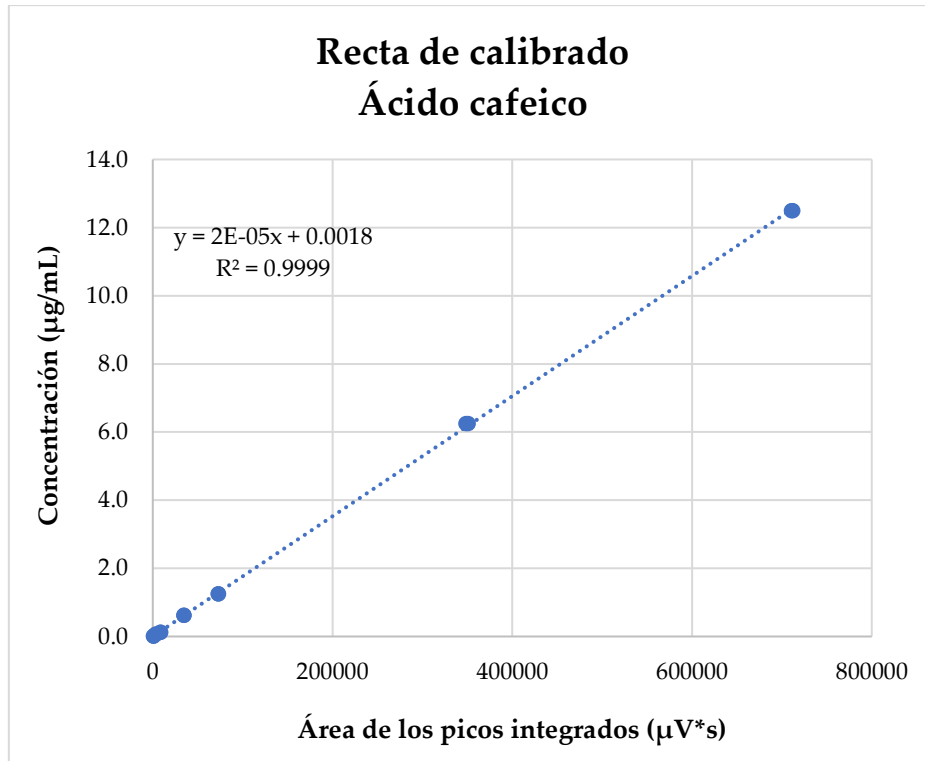
Anexo IV. Rectas de calibrado derivadas del análisis HPLC.**A.IV.1. Rectas de calibrado para *Salvia officinalis*.**

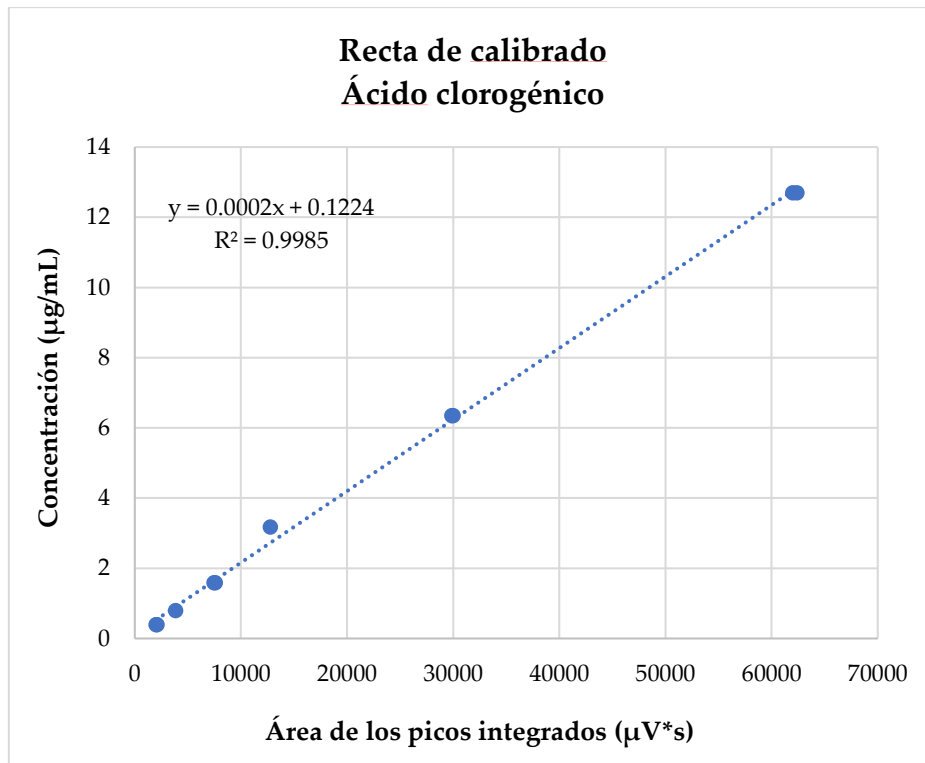


A.IV.2. Rectas de calibrado para *Calendula officinalis*.





A.IV.2. Rectas de calibrado para *Melissa officinalis*.

A.IV.2. Recta de calibrado para *Jasonia glutinosa*.

Anexo V. Ajuste MLR para los dos modelos QSAR propuestos.**A.V.1. Ajuste MLR para el modelo de 4 áreas.**

Resumen del modelo

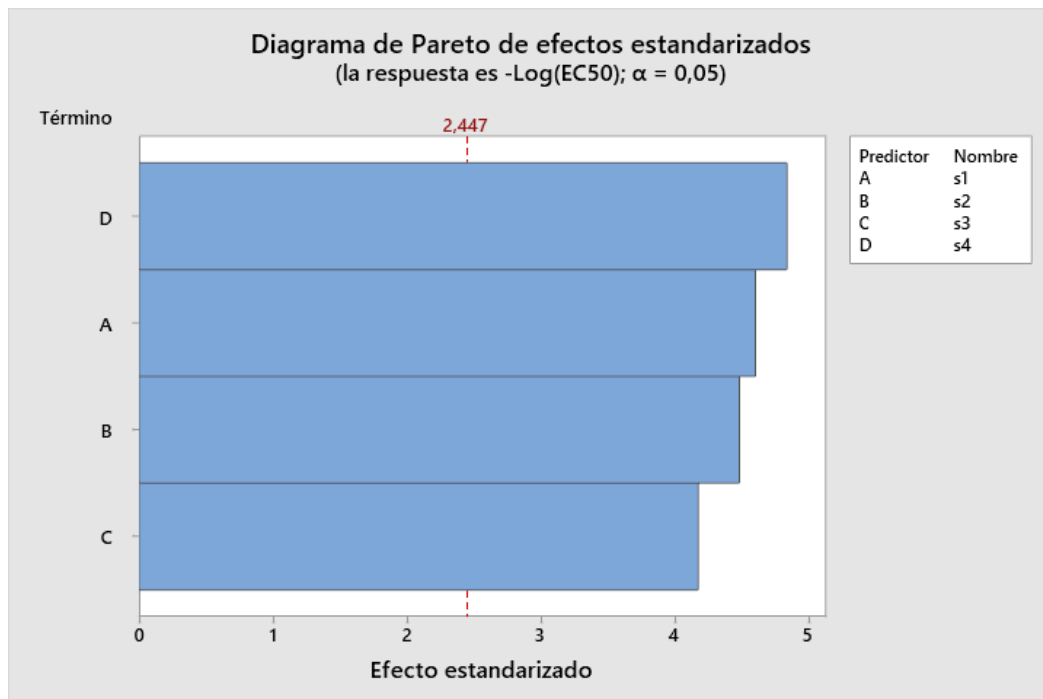
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,171061	80,00%	66,67%	1,30%

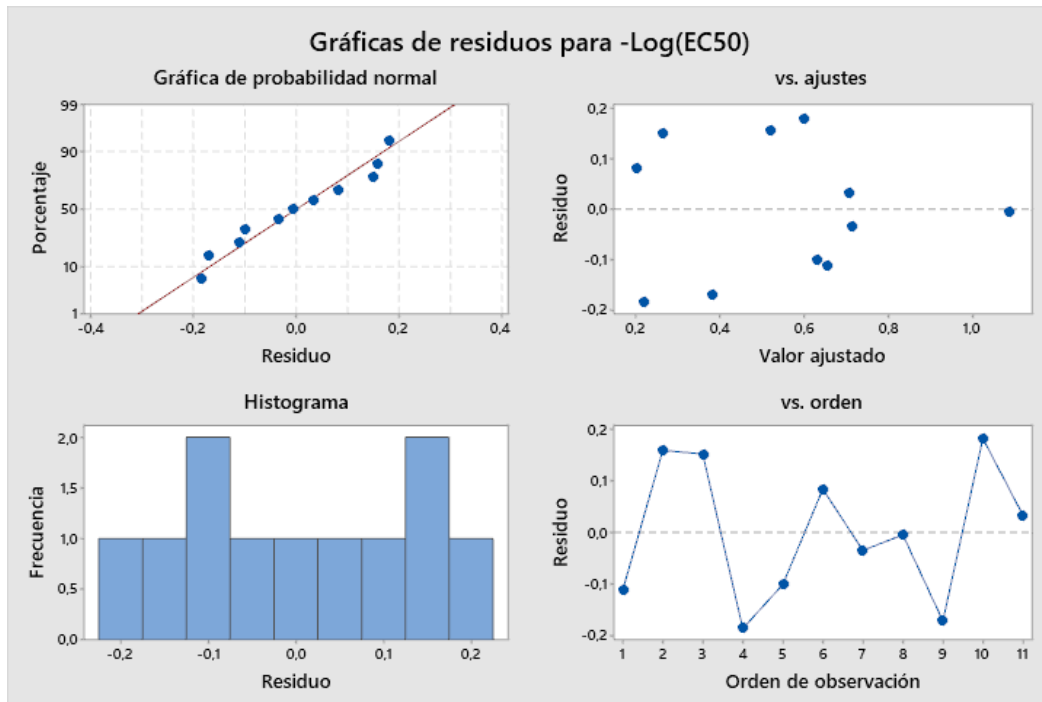
Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor p
Constante	-0,230	0,213	0,323
s1	1,941	0,422	0,004
s2	0,519	0,116	0,004
s3	-0,4055	0,0972	0,006
s4	-2,181	0,451	0,003

Ecuación de regresión

$$-\text{Log}(\text{EC50}) = -0,230 + 1,941 s_1 + 0,519 s_2 - 0,4055 s_3 - 2,181 s_4$$





A.V.1. Ajuste MLR para el modelo de 10 áreas.

Resumen del modelo

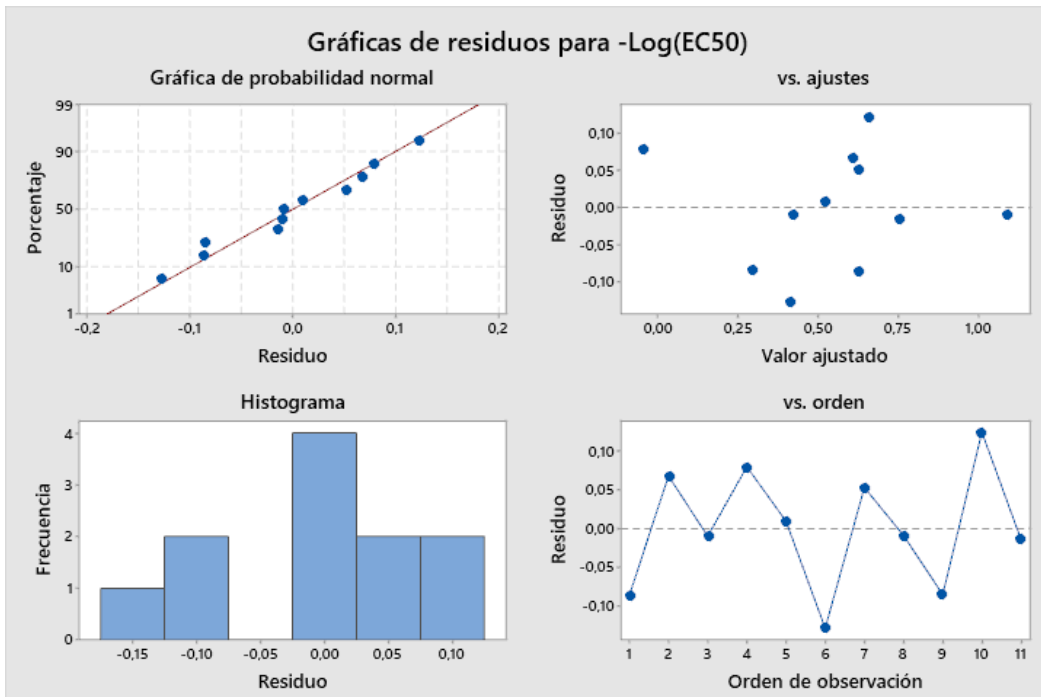
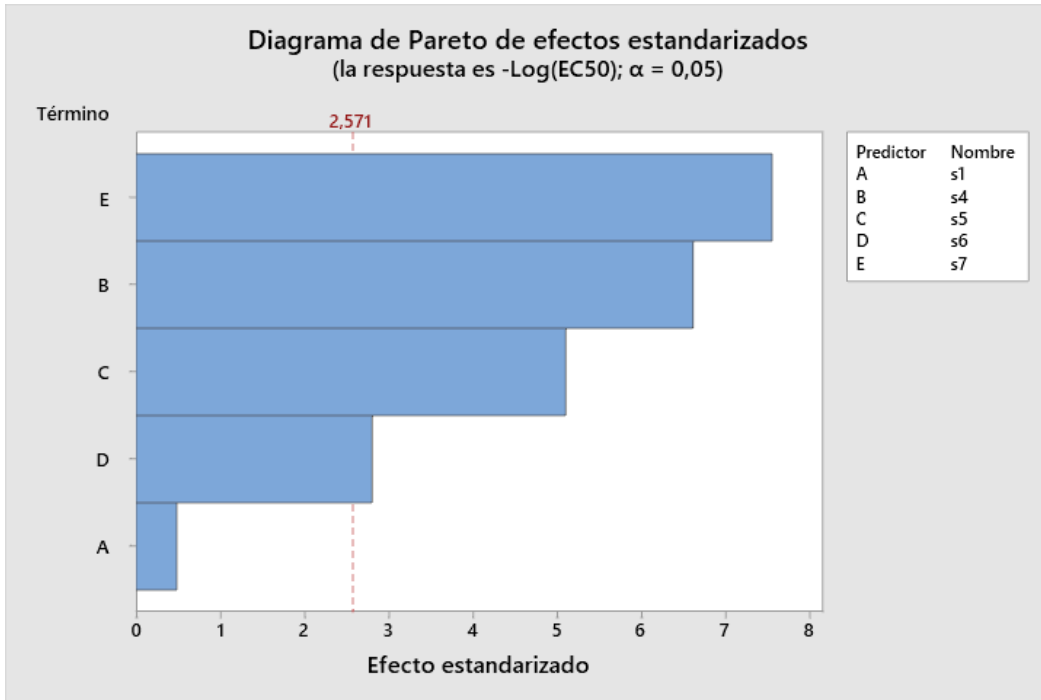
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,109770	93,14%	86,28%	72,68%

Coefficientes

Término	Coef	EE del	
		coef.	Valor p
Constante	-0,556	0,182	0,028
s1	-0,230	0,474	0,649
s4	-0,3170	0,0480	0,001
s5	0,1903	0,0373	0,004
s6	-0,1015	0,0363	0,038
s7	0,5683	0,0753	0,001

Ecuación de regresión

$$-\text{Log}(\text{EC50}) = -0,556 - 0,230 s1 - 0,3170 s4 + 0,1903 s5 - 0,1015 s6 + 0,5683 s7$$



Anexo VI. Fichas cumplimentadas del sistema de trazabilidad.**A.VI.1. Ficha de trazabilidad del control de material vegetal.**

TIPO DOCUMENTO:	CONTROL TRAZABILIDAD PROCESO PRECARACTERIZACIÓN
ACCIÓN VINCULADA:	CONTROL DE ORIGEN DE MATERIAL VEGETAL DE LOS CEES


Especie:	<i>Calendula officinalis</i>	Fecha de recepción en el laboratorio:	22/09/19	Conforme
Fecha de recolección:	26/06 a 04/09 del 2019	Cantidad enviada:	1046 g	
Lugar o finca de procedencia:	Elkarkide, G10 y G11	Cantidad recepcionada:	991,71 g	Sí <input type="checkbox"/>
Elaborado por:	Elkarkide	Tipo de envase:	Bolsas de malla en cajas	No <input type="checkbox"/>
Otra documentación vinculada:		Forma de envío/transporte:	Correo	

Recepción realizada por:	Raquel Mur
Codificación Interna:	CP_22/09
Observaciones:	

Entrada a almacén	
Almacén 1:	Almacén 2:
Ubicación en almacén:	Ubicación en almacén:
Fecha de entrada almacén:	Fecha de entrada almacén:
Ubicación nueva:	Ubicación nueva:

Firma: Raquel

A.VI.2. Ficha técnica del extracto de *Calendula officinalis* obtenido mediante SCE.

	Tipo de documento:		
	Ficha Técnica		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	3.0	1/7
Ficha técnica de extracto de <i>Caléndula</i> (calidad Supergreen).			

1

Identificación de la sustancia o preparado.

1.1 Identificación de la sustancia o preparado.

Nombre del producto: Extracto de *Caléndula* (calidad Supergreen).

Nombre botánico latino de la procedencia del producto: *Calendula officinalis* L.

INCI: Extracto supercrítico de *Calendula officinalis* L.

EINECS/ELINCS n°: 283-949-5

CAS n°: 84776-23-8

Código del producto: 0191104.

Lugar de procedencia y parte usada de la planta: Flores de cultivos ecológicos de centros de empleo de integración social.

1.2 Sinónimos

Nombre botánico: *Calendula officinalis* L.

2

Descripción

2.1 Aspecto:

Siruposo. Contiene también aceite.

2.2 Color:

RGB: 153, 52, 11. #99340B

2.3 Olor:

Característico.

2.4 Método de obtención:

Extracción supercrítica con CO₂.

3

Composición/Información

Extracto supercrítico de *Calendula officinalis*.

4


Datos Físico-Químicos

4.1 Densidad aparente a 20 °C:

No hay datos disponibles.

4.2 Solubilidad en aceite de almendra:

6.675 mg/mL (realizado mediante método visual).

	Tipo de documento:		
	Ficha Técnica		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	3.0	2/7
Ficha técnica de extracto de <i>Caléndula</i> (calidad Supergreen).			


5

Propiedades/Usos

En el uso tradicional, la *Calendula* es una de las hierbas mejor conocidas y más versátiles en cuestión de usos de la medicina herbácea occidental. Sus pétalos constituyen un remedio excelente para la piel inflamada o irritada, ya que tiene propiedades antisépticas, ya que algunos de sus componentes son antifúngicas, antibacterianas y antivirales, siendo eficaz contra cortes, heridas, varices y distintas afecciones inflamatorias. En uso tópico, la *Calendula* está autorizada por Europa, como se recoge en el ESCOP para el tratamiento de inflamación de la piel y como ayuda para la curación de heridas (ESCOP Monographs, *calendulae flos*, 2019). De hecho, se han realizado una gran cantidad de estudios que utilizan ungüentos con extractos de *Calendula* para tratar diversas afecciones de la piel: quemaduras de segundo/tercer grado (Lievre et al, 1992), dermatitis causada por el uso de pañal en infantes (Panahi, 2012) o episiotomía en mujeres primíparas (Eghdampour et al, 2013). También se realizó un ensayo clínico con extractos lipofílicos de *Calendula* para tratar los daños en la piel provocados por la radiación en pacientes con cáncer [Pommier et al, 2004] y su aceite esencial se usa para tratar úlceras provocadas por diabetes (Carvalho et al, 2016)

En su composición se encuentran los siguientes constituyentes: carotenoides como el flavocromo o el mutacromo; flavonoides como la quercentina o la quercetina glucósida; alcoholes triterpénicos como el α -amirina, el faradiol o el lupenetriol; saponinas, resinas, tocoferoles y poliprenilquinonas (Andersen et al, 2010).

Los extractos supercríticos de las flores de *Calendula* contienen compuestos lipofílicos enriquecidos en los ésteres de faradiol (May et al, 2014). La eficacia de estos ésteres está respaldada por otros triterpenos y trioles tales como los taraxasteroles y amirinas. Los alcoholes triterpénicos son ingredientes antiinflamatorios muy activos (Akihisa et al, 1996) y que además tienen un efecto positivo en las rutas bioquímicas que influyen en el envejecimiento (Wilkomirski et al, 1979), la génesis y la promoción tumoral (Boucaud-Maitre et al, 1988). La combinación de componentes bioactivos que contienen los extractos supercríticos de *Calendula*, hacen que sean un ingrediente ideal para la cosmética con eficacia protectora y reparadora (May et al, 2014)

	Tipo de documento:		
	Ficha Técnica		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	3.0	3/7
Ficha técnica de extracto de Calendula (calidad Supergreen).			


En 2010, el grupo de Andersen, en un artículo de revisión recoge el informe final del panel de expertos del Cosmetic Ingredient Review (CIR) sobre la evaluación de seguridad modificada de ingredientes cosméticos derivados de *Calendula officinalis*. Recoge y evalúa de forma exhaustiva trabajos presentes en la bibliografía a todos los temas de interés para la comercialización de productos que contengan en su composición el extracto de *Calendula*, incluyendo trabajos de toxicología animal y evaluaciones clínicas de seguridad (irritación dérmica y sensibilización), genotoxicidad y carcinogenicidad. Las conclusiones del panel fueron que los datos disponibles de toxicología en animales demostraban la ausencia de efectos adversos. A la vista de estos resultados el panel de expertos del CIR concluyó que el extracto de *Calendula officinalis* y el extracto de flor eran seguros para su uso en cosméticos en las prácticas de uso y concentraciones dados en la evaluación de seguridad modificada (Andersen et al, 2010).

El 27 de marzo de 2018, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) lanzó un informe de evaluación sobre la *Calendula officinalis*. En este informe, la EMA llegó a la conclusión de que aunque no hay suficientes estudios, no se podía valorar que los extractos de *Calendula officinalis* se pudieran catalogar como tóxicos, sin embargo indica que el uso de preparados de *Calendula* durante el embarazo podría estar contraindicado, igual que en menores de 12 años (European Medicines Agency, 2018)

Basándose en lo notificado por las fichas de seguridad de distintas compañías que comercializan el extracto de *Calendula*, la ECHA lo cataloga con las siguientes frases H: H302, H315, H319 y H226, por lo que estima que el extracto puede provocar irritación ocular y de piel, es tóxica si se ingiere y es una sustancia potencialmente inflamable en forma líquida o vapor (Página web de la ECHA).

Según la página web INCI Beauty, el extracto de flor de *Calendula officinalis* se encuentra en el 2,14 % de los productos cosméticos, siendo algunos de estos los siguientes: *Soin Naturel Toilette Intime Extra-Doux* de Rogé Cavaillès, *Soin de Jour Protecteur* de Tamalys, *Regenerating Balm Mask with Organic Marigold* de Yves Rocher y *Shampooing Cheveux Abimés* de Naturado (Página web de INCI Beauty Project).

Calendula officinalis es una planta antiséptica y también tiene un efecto astringente sobre los capilares y por ello desde la antigüedad ha sido utilizada como remedio para la piel y constituye un tratamiento eficaz para problemas dermatológicos leves como cor-

	Tipo de documento:		
	Ficha Técnica		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	3.0	4/7
Ficha técnica de extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			


tes, rasguños y heridas; piel inflamada o con rojeces, para el acné y erupciones y para afecciones debidas a hongos como la tiña, pie de atleta y el afta (Chevalier, 1997). En el ESCOP que la Unión Europea tiene realizado a *Calendula officinalis*, se encuentran múltiples estudios dirigidos a demostrar las actividades que se le presuponen a la planta. Estos estudios son en su mayoría de extractos etanólicos o acuosos, aunque también encontramos alguno realizado con extractos lipofílicos o supercríticos.

Para probar los efectos sobre la curación de heridas en un modelo *in vitro*, el grupo de Fronza en 2009 creó un modelo con fibroblastos de ratón al que tras la realización del ensayo de la herida añadió un extracto de *Calendula officinalis* realizado con hexano, aumentando el crecimiento de fibroblastos un 64.35 % (ESCOP Monographs, calendulae flos, 2019) El grupo de Arana, en 2015, utilizó células epiteliales humanas en el que realizó el mismo ensayo. En este caso, su grupo añadió al cultivo de células un extracto supercrítico de *Calendula officinalis*, observando que tras 48 horas, en las poblaciones de células donde habían añadido el extracto, la curación se llevaba a cabo en un porcentaje mayor (Arana et al, 2015).

En el ESCOP dedicado a *Calendula officinalis*, hay recogidos varios estudios realizados en animales en los que el tiempo de cicatrización de heridas se reduce significativamente tras el tratamiento tópico de una crema que contenía extractos de la planta (ESCOP Monographs, calendulae flos, 2019).

Sobre los efectos antiinflamatorios de los extractos de *Calendula*, el ESCOP recoge un estudio realizado en 1994 donde se comparaba la acción antiinflamatoria de los extractos etanólicos y supercríticos de *Calendula officinalis* sobre un edema. En este estudio se observó que en la dosis 1200 µg se produce una inhibición del edema de un 71 % para el caso del extracto supercrítico frente a un 20 % del etanólico (ESCOP Monographs, calendulae flos, 2019).

En 2011 se realizó un estudio (Bernatoniene et al, 2011) en el que se probó la capacidad antioxidante de una crema que llevaba un extracto hidrofílico de *Calendula officinalis*, llegándose a la teoría de que esta crema podría utilizarse para proteger a la piel de los daños causados por el estrés oxidativo. Además, en el ESCOP se recogen varios trabajos en el que se demuestra que los extractos etanólicos y el aceite esencial de *Calendula* protegen la piel de las radiaciones UV (ESCOP Monographs, calendulae flos, 2019).

	Tipo de documento:		
	Ficha Técnica		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	3.0	5/7
Ficha técnica de extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			

6

Dosificación:

Sin datos disponibles

7

Observaciones:**7.1 Especificaciones microbiológicas:**

Sin datos disponibles.

7.2 Precauciones de uso:

Uso del producto restringido solamente a **investigación del Proyecto EFA 188/16 SPAGYRIA.**

7.3 Reanálisis:


Tras dos años de almacenamiento.

7.4 Observaciones:

La *Calendula* es originaria del sur de Europa y se puede cultivar en las regiones templadas de cualquier parte del mundo. Es una planta anual, con flores amarillo-anaranjado que duran casi todo el año, de unos 30 centímetros de alto (Pedro Moreiro, 2017). Es fácil de propagar con sus semillas y la recolección se realiza al principio del verano, dejándose secar a la sombra (Chevallier, 1997).

7.5 Almacenamiento y conservación:


Almacenar en recipiente herméticamente cerrado con refrigeración al abrigo de la luz directa y la humedad.

	Tipo de documento:		
	Ficha Técnica		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	3.0	6/7
Ficha técnica de extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			

8


Referencias:

1. Akihisa Toshihiro, Yasukawa Ken, Oinuma Hirotohi, Kasahara Yoshimasa, Yamanouchi Sakae, Takido Michio, Kumaki Kunio, Tamura Toshitake. *Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects*. *Phytochemistry*. (1996); **43**:1255-1260.
2. Andersen F. Alan, Bergfeld Wilma F., Belsito Donald. V. *Final Report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel Amended Safety Assessment of Calendula officinalis-Derived Cosmetic Ingredients*. *International Journal of Toxicology* (2010); **29**:221S-243S.
3. Andrew Chevallier. *Enciclopedia de Plantas Medicinales*. Acento Editorial, 1997.
4. Arana Lide, Salado Clarisa, Vega Sandra, Aizpurua-Olaizola Oier, de la Arada Igor, Suarez Tatiana, Usobiaga Aresatz, Arrondo José Luis R., Alonso Alicia, Goñi Félix M., Alkorta Itziar. *Solip lipid nanoparticles for delivery of Calendula officinalis extract*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. (2015); **135**:18-26.
5. Bernatoniene Jurga, Masteikova Ruta, Davalgiene Julija, Peciura Rimantas, Gauryliene Romualda, Bernatoniene Ruta, Majiene Daiva, Lazauskas Robertas, Civinskiene Genuvaite, Velziene Saule, Muselik Jan, Chalupova Zuzana. *Topical application of Calendula officinalis (L.): Formulation and evaluation of hydrophilic cream with antioxidant activity*. *Journal of Medicinal Plants Research*. (2011); **5**:868-877.
6. Boucaud-Maitre Y, Algernon O, Raynaud J. *Cytotoxic and antitumoural activity of Calendula officinalis extracts*. *Pharmazie*. (1988); **43**:220-1.
7. De Carvalho Ana Flávia Machado, Feitosa Maura Cristina Porto, Coelho Nayana Pinheiro Machado de Freitas, Rebêlo Veruska Cronemberge Nogueira, de Castro Juçara Gonçalves, de Sousa Patrícia Regina Gomes, Feitosa Valrian Campos, Arisawa Emilia Angela lo Schiavo. *Low-level laser therapy and Calendula officinalis in repairing diabetic foot ulcers*. *Rev Esc Enferm USP*. (2016); **50(4)**:626-632

	Tipo de documento:		
	Ficha Técnica		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	3.0	7/7
Ficha técnica de extracto de Calendula (calidad Supergreen).			

8. Eghdampour Farideh, Jahdie Fereshteh, Kheyrkhal Masomeh, Taghizadeh Mohsen, Naghizadeh Somayeh, Hagani Hamid. *Aloe vera and Calendula on perineal healing after Episiotomy in Primiparous Women. A Randomized Clinical Trial.* J Caring Sci, (2013); **2**:279-86
9. European Medicines Agency. Assessment report on Calendula officinalis L., flos. 2019.
10. Lievre M., Marichy J., Baux S., et al *Controlled study of three ointments for the local management of 2nd and 3rd degree burns.* Clinical Trials and Meta-Analysis. (1992); **28**:9-12.
11. May P., Quirim K.-W. *Supercritical Marigold Flower CO₂-Extract. Evergreen in Evidence Based Cosmetic Application.* Flavex® Naturextrakte. (2014).
12. Página web de la ECHA sobre Calendula officinalis L. <https://echa.europa.eu/es/brief-profile/-/briefprofile/100.076.289> Visitada el 10 de septiembre de 2020.
13. Página web del INCI Beauty sobre el extracto de Calendula officinalis. <https://incibeauty.com/ingredients/1883-calendula-officinalis-flower-extract> Visitada el 7 de septiembre de 2020.
14. Panahi Yunes, Sharif Mohamad Reza, Sharif Alireza, Beiraghdar Fatemeh, Zahiri Zahra, Amirchoopani Golnoush, Marzony Eisa Tahmasbpour, Sahebkar Amirhossein. *A Randomized Comparative Trial on the Therapeutic Efficacy of Topical Aloe vera and Calendula officinalis on Diaper Dermatitis in Children.* The Scientific World Journal. (2012).
15. Pommier P, Gomez F., Sunyach M. P. *Phase III Randomized Trial of Calendula officinalis Compared With Trolamine for the Prevention of Acute Dermatitis During Irradiation for Breast Cancer.* J Clin Oncol. (2004); **22**:1447-53.
16. Wilkomirski Boguslaw, Kasprzyk Zofia. *Free and ester-bound triterpene alcohols and sterol in cellular subtractions of Calendula officinalis.* Phytochem. (1979) **18**:253-255.

A.VI.3. Ficha de seguridad del extracto de *Calendula officinalis* obtenido mediante SCE.

	Tipo de documento:		
	Ficha de Seguridad		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	2.0	1/8
Ficha de seguridad del extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			

1

Identificación del producto.

1.1 Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de identificación de productos:

Nombre del producto: Extracto de Caléndula (calidad Supergreen).

Nombre botánico latino de la procedencia del producto: *Calendula officinalis* L.

INCI: Extracto supercrítico de *Calendula officinalis* L.

EINECS/ELINCS n°: 283-949-5

CAS n°: 84776-23-8

Código del producto: 0191104.

Lugar de procedencia y parte usada de la planta: Flores de cultivos ecológicos de centros de empleo de integración social.

1.2 Recomendaciones y restricciones de uso:

Uso del producto restringido solamente a investigación del Proyecto EFA 188/16 SPAGYRIA.

1.3 Información del suministrador:

Nombre de la empresa: Universidad de Zaragoza.

Dirección de la empresa: Calle Pedro Cerbuna, 12, 50009 Zaragoza.

Número de contacto: 976 76 10 00.

2

Identificación de riesgos.


2.1 Clasificación de la sustancia o mezcla:

Nocivo en caso de ingesta, categoría 4.


Corrosión o irritación de la piel, categoría 2.

Daño/irritación en el ojo, categoría 2.

Riesgo de inflamación, categoría 3.

	Tipo de documento:		
	Ficha de Seguridad		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	2.0	2/8
Ficha de seguridad del extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			

2.2 Etiquetado SGA y precauciones de uso.

Pictograma	Frases H	Frases P
	<p><i>H226</i>: Sustancia inflamable, categoría 3.</p> <p><i>H302</i>: Nocivo en caso de ingestión, categoría 4.</p> <p><i>H315</i>: Irritación o corrosión cutánea, categoría 2. Provoca irritación cutánea.</p> <p><i>H319</i>: Lesiones oculares graves o irritación ocular, categoría 2. Provoca irritación ocular grave.</p>	<p><i>P262</i>: Evitar el contacto con los ojos, piel o ropa.</p> <p><i>P273</i>: Evitar la liberación al medio ambiente.</p> <p><i>P280</i>: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.</p> <p><i>P305, P338, P351</i>: En caso de contacto con los ojos, lavar con abundante agua. En caso de llevar lentes de contacto, retírelas y proceda al lavado.</p>

3

Composición/información de los ingredientes.

3.1 Composición:

Extracto supercrítico de *Calendula officinalis*.

4

Medidas de primeros auxilios.

4.1 Descripción de las posibles medidas de primeros auxilios:

Contacto con los ojos: Si lleva, retírese las lentes de contacto. Lavar con abundante agua durante 15 minutos. Si los síntomas persisten, diríjase a buscar atención médica.


Contacto con la piel: Ningún efecto nocivo observado en piel normal. Si la irritación de la piel aparece, lavar con agua y jabón y enjuague apropiadamente.

Inhalación: Ningún efecto observado para condiciones normales de uso. Si aparece algún síntoma, diríjase a una zona con aire fresco y obtenga recomendación médica.

Ingestión: No está contemplada la exposición a la sustancia mediante esta vía. En caso de ingerir, si la cantidad es pequeña, lávese la boca con agua o leche y consulte a un médico. Mantengan a la persona expuesta descansando. No la fuerce a vomitar a menos que lo haga personal sanitario específicamente.

4.2 Síntomas y efectos más importantes de la sustancia.

Contacto con los ojos: Puede causar irritación y daño en la córnea si no es eliminado de inmediato.

	Tipo de documento:		
	Ficha de Seguridad		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	2.0	3/8
Ficha de seguridad del extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			

Contacto con la piel: El contacto repetido puede provocar dermatitis alérgica.

Inhalación: Respirar altas concentraciones de vapor puede causar un efecto anestésico.

Ingestión: Vía de exposición no contemplada.

4.3 Indicación para una atención médica de inmediato o de algún tratamiento especial:

Ninguno conocido.

5

Medidas contra el fuego.

5.1 Punto de combustión:

Desconocido.

5.2 Medio de extinción:

Medio de extinción deseable: Agua nebulizada, líquido espumante, polvo químico ABC, polvo químico BC o dióxido de carbono.

Medio de extinción a evitar: Agua a presión.

5.3 Riesgos específicos que puedan aparecer por la naturaleza de la sustancia:

Ninguno específico.

5.4 Acciones de protección especiales para los bomberos:

Uso de ropa de protección adecuada y de máscara para respirar.

6

Medidas contra una liberación involuntaria.

6.1 Precauciones del individuo, equipo de protección y procedimiento de emergencia.

Detenga la liberación si puede hacerlo sin riesgo alguno. Consulte las medidas de seguridad que aparecen listadas en las secciones 7 y 8.

Para los bomberos:


Los bomberos deberán equipados con un equipo de protección adecuado (véase sección 8). Las altas temperaturas pueden incrementar la presión dentro del contenedor del producto. Si esto ocurre, rocíen agua para enfriar el contenedor. Evitar respirar los vapores.

6.2 Precauciones medioambientales:

Contener y controlar la filtración del producto o verter materiales absorbentes como arena, tierra o vermiculita en barriles para tratamiento de residuos. Evitar que el producto llegue a los sumideros o cualquier otro medio para eliminar residuos líquidos. En caso de que esto ocurra, informar a las autoridades pertinentes.

6.3 Métodos y materiales para la contención y limpieza:

Absorber el vertido con material no combustible como detergente y transferirlo a los contenedores apropiados.

	Tipo de documento:		
	Ficha de Seguridad		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	2.0	4/8
Ficha de seguridad del extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			

7

Manipulación y almacenamiento.

7.1 Precauciones para una manipulación segura:

Manejar en concordancia con una buena higiene industrial y una práctica segura. Evitar el contacto involuntario con la piel. Vestir ropas de seguridad adecuadas. Evitar la inhalación. Asegurar una buena ventilación en el lugar de trabajo. No permita el contacto con los ojos. Lávese las manos después de trabajar con el producto. Quítese y lave cualquier ropa contaminada antes de reutilizarla. Asegúrese de que la ventilación es suficiente, sobre todo en áreas cerradas.

7.2 Condiciones para un almacenamiento seguro, incluyendo cualquier incompatibilidad:

Guardar el producto en frascos de cristal. Manténgalo alejado del calor, luz o cualquier otra fuente de ignición. Consérvese en una zona fresca.

8

Medidas de protección personal.

8.1 Parámetros de control

OSHA TWA: No establecido.

OSHA STEL: No establecido.

ACGIH TWA: No establecido.

ACGIH STEL: No establecido.

NOHSC TWA: No establecido.

NOHSC STEL: No establecido.

8.2 Equipos de protección personal:

Utilice un material que esté limpio y con un mantenimiento adecuado. Guarde este material en un sitio limpio y alejado del área de trabajo. Nunca coma, beba o fume mientras lo use. Quítese y lave adecuadamente la ropa contaminada antes de reutilizarla.

8.3 Protección de la cara y ojos:


Evite el contacto con los ojos. Use protectores oculares (gafas de seguridad homologadas) diseñadas para proteger contra salpicaduras.

8.4 Protección de las manos:

Lleve guantes homologados para proteger la piel de un contacto repetido. Los guantes recomendados son los de nitrilo o los de PVA.

8.5 Protección del cuerpo:

Lleve ropa de trabajo unipersonal que debe ser lavada regularmente. Si entra en contacto con el producto, todas las partes del cuerpo que lo hayan sufrido deben ser lavadas de inmediato.

	Tipo de documento:		
	Ficha de Seguridad		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	2.0	5/8
Ficha de seguridad del extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			

9

Propiedades químico físicas.

Estado físico: Siruposo a temperatura ambiente.

Color: RGB: 153, 52, 11. #99340B.

Olor: Característico.

Solubilidad en agua: Insoluble.

Solubilidad en alcohol: Soluble.

Solubilidad en aceite de almendra: 6,675 g/mL (realizado mediante método visual).

Liposolubilidad: Parcialmente soluble.

pH: No aplicable.

Punto/rango de ebullición: No especificado.

Punto de descomposición: Desconocido.

Presión de vapor: No especificado.

Ratio de evaporación: No especificado.

Densidad aparente: No hay datos disponibles.

Punto de autoignición: No especificado.

Punto/rango de descomposición: No especificado.

Índice de refracción a 20 °C: No especificado.

Coefficiente de partición: No especificado.

Gravedad específica a 20 °C: No especificada.

10

Estabilidad y reactividad.

10.1 Reactividad

No reactivo

10.2 Estabilidad química:


La sustancia es estable bajo las recomendaciones de manipulación y almacenamiento descritas en la sección 7.

10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas:

Cuando es expuesto a altas temperaturas, la sustancia podría liberar productos de descomposición como monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂), gases y óxido de nitrógeno.

10.4 Condiciones a evitar:

Ninguna conocida.

	Tipo de documento:		
	Ficha de Seguridad		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	2.0	6/8
Ficha de seguridad del extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			

10.5 Materiales incompatibles:

Metales alcalinos, amoníaco, agentes oxidantes.

10.6 Productos de descomposición peligrosos:

La descomposición térmica podría liberar CO y CO₂.

11

Información toxicológica:

11.1 Efectos adversos de la sustancia.

Toxicidad aguda No especificada.

Irritación/corrosión de la piel: Puede provocar irritación en la piel.

Daños/irritación de los ojos: Puede irritar los ojos. Lávese los ojos rápidamente y elimine la sustancia para evitar daños.

Sensibilización respiratoria: Respirar una alta concentración de la sustancia puede provocar efectos anestésicos.

Mutagenicidad: No especificado.

Carcinogénesis:

IARH: Ninguno de los componentes presentes en este producto presenta unos niveles superiores o iguales al 0.1 % identificado como probable o posible componente carcinogénico determinado por la IARC.

ACGIH: Ninguno de los componentes presentes en este producto presenta unos niveles superiores o iguales al 0.1 % identificado como probable o posible componente carcinogénico determinado por la IARC.

NTP: Ninguno de los componentes presentes en este producto presenta unos niveles superiores o iguales al 0.1 % identificado como probable o posible componente carcinogénico determinado por la IARC.

OSHA: Ninguno de los componentes presentes en este producto presenta unos niveles superiores o iguales al 0.1 % identificado como probable o posible componente carcinogénico determinado por la IARC.

Toxicidad reproductiva: No especificado.


Riesgo de aspiración: No especificado.

11.2 Información de las rutas de exposición más probables.

Contacto con la piel.

11.3 Síntomas relacionados con las características físicas, químicas y toxicológicas:

Ninguna conocida. Irritación de los ojos si hay exposición. Enrojecimiento de la piel si esta se irrita.

	Tipo de documento:		
	Ficha de Seguridad		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	2.0	7/8
Ficha de seguridad del extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			

11.4 Efectos inmediatos y crónicos de una exposición a corto y largo plazo a la sustancia:

La exposición de los vapores en disolvente de la sustancia puede producir efectos adversos a las mucosas y una irritación del sistema respiratoria y efectos adversos en el hígado, riñones y sistema nervioso central.

El contacto repetido o prolongado con la sustancia podría eliminar la grasa natural de la piel, haciendo que aparezca una dermatitis de contacto no alérgico y una absorción a través de la piel. Las salpicaduras en los ojos podrían provocar irritación y daños irreversibles.

12

Información ecológica:

12.1 Obtención del producto:

El producto se ha obtenido sin utilizar disolventes orgánicos.

12.2 Toxicidad:

Toxicidad aguda para fauna acuática:

LC50/96 horas: No hay datos disponibles.

Toxicidad para plantas acuáticas: No hay datos disponibles.

Toxicidad para microorganismos: No hay datos disponibles

Toxicidad límite: No hay datos disponibles.

12.3 Persistencia y degradabilidad:

Se espera biodegradación.

12.4 Potencial en la bioacumulación:

No se espera bioacumulación.

12.5 Movilidad en suelo.


Desconocida.

13

Consideraciones sobre la eliminación:

13.1 Métodos para el tratamiento de residuos:

El tratamiento de los residuos debe ser acorde al ordenado por la Directiva 2008/98/EC. No verter en desagües o ríos. El tratamiento de los residuos se debe llevar a cabo sin poner en riesgo la salud humana, la ambiental y en particular sin poner en riesgo el agua, aire, suelo, plantas o animales. Recicle o deshágase de los residuos de acuerdo con la legislación vigente, preferiblemente vía compañía recolectora certificada.

	Tipo de documento:		
	Ficha de Seguridad		
	Fecha de revisión	Versión	Página
	11/09/2020	2.0	8/8
Ficha de seguridad del extracto de Caléndula (calidad Supergreen).			

14

Información de transporte:**14.1 Número UN.**

1293.

14.2. Número UN apropiado para el transporte.

1293.

14.3 Riesgos según el tipo de transporte.

Carretera: No regulado.

Aire: No regulado.

Mar: No regulado.

14.4 Riesgos medioambientales:

No determinado. Evitar vertidos en ríos.

14.5 Precauciones específicas para el usuario:

No especificada.

14.6 Transporte en un contenedor específico:

No especificado.

14.7 Información adicional de transporte:

No especificada.

15

Información regulatoria:**15.1 Seguridad, salud y regulación/legislación ambiental específica para la sustancia.**

Unión Europea. Dependiente de los alérgenos presentes en la composición.

16

Otra información.*Descargo de responsabilidades:*

La información proporcionada en esta hoja de seguridad es válida en la fecha de emisión. La información dada solo es válida para el producto específico y puede no ser aplicable a una mezcla de este producto con otro o en cualquier otro proceso que no sea para el que se suministra.

El producto suministrado solo es válido para uso de **investigación del Proyecto EFA 188/16 SPAGYRIA.**

Anexo VII. Informe de los ensayos microbiológicos realizado en extractos supercríticos (SCE) de *Salvia sclarea*.



INFORME DE ENSAYO

Ciudad : Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón I3A	Nº. de Informe : 12614
NIF : Q5018001G	Nº Muestra : 200812
Domicilio : C/ Mariano Esquillor s/n Edificio I+D 50018 (ZARAGOZA)	Registro muestra : 06/08/2020
Contacto : Ana Mª Mainar Fernández	Inicio análisis : 07/08/2020
Muestra de : EXTRACTO (10g)	Finalización análisis : 11/08/2020
Por : Cliente	Referencia : SALVIA SCLAREA SUPERGREEN 0191007 2

Nombre Determinación	Resultado	Limites	Método	C.
Bacterias aerobias mesófilas (Recuento)	<1.0x10 ¹ ufc/g		Procedimiento interno PE-MCB-052	
Mohos y Levaduras (Recuento)	<1.0x10 ¹ ufc/g		Procedimiento interno PE-MCB-053	
Microorganismos totales aerobios mesófilos (Cálculo)	<1.0x10 ¹ ufc/g	1.0x10 ³	Procedimiento interno PE-MCB-054	[1]

[1]: Interpretación de resultados:

Para cosméticos de uso general, el resultado del recuento de microorganismos totales aerobios mesófilos se considera fuera de límites si es > 2000 ufc/g o ml. Esto es debido a la variabilidad inherente al método de recuento en placa según el apartado 2.6.12 de la Farmacopea Europea.

OBSERVACIONES: El procedimiento interno PE-MCB-052 está basado en la Norma UNE-EN ISO 21149:2017 (Recuento y detección de bacterias aerobias mesófilas).
El procedimiento interno PE-MCB-053 está basado en la Norma UNE-EN ISO 16212:2017 (Enumeración de mohos y levaduras)

NORMATIVA APLICABLE:
Límites microbiológicos según la norma ISO 17516:2014 para cosméticos de uso general.
Para cosméticos destinados a bebés o contorno de ojos, los límites microbiológicos recomendados serán un orden menor a los establecidos para cosméticos de uso general

Los resultados reflejados en el presente informe afectan únicamente a la muestra que ha sido objeto de ensayo. No deberán reproducirse parcialmente sin la autorización por escrito del laboratorio que lo emite.

Emitido por: Laboratorio de Microbiología y Parasitología

ZARAGOZA 18 de Agosto de 2020

Responsable(s) de Laboratorio

ENSEÑAT ORTIZ
MARIA
FERNANDA -
17214770Y

Firmado digitalmente por ENSEÑAT
ORTIZ MARIA FERNANDA - 17214770Y
Nombre de inscripción: SIRE: c-04,
url: #url=;#IDCES=17214770Y,
givenName=MARIA FERNANDA,
sn=ENSEÑAT ORTIZ, #c=ENSEÑAT
ORTIZ MARIA FERNANDA - 17214770Y
Fecha: 2020.08.18 11:14:02 +0200

Mª FERNANDA ENSEÑAT ORTIZ

Anexo VIII. Listado de publicaciones y congresos.

A.VIII.1. Congresos

“Optimización del proceso de fraccionamiento antidisolvente supercrítico de extractos de *Salvia officinalis*”. Mur, Raquel; Benítez-Quesada, Manuel; Pardo, Juan I.; Martínez-López, José F.; Urieta, José S.; Mainar, Ana M. **XII Congreso de Fitoterapia Ciudad de Oviedo**. Oviedo, octubre 2020. Contribución: Póster.

“Optimización del proceso de fraccionamiento antidisolvente supercrítico de extractos de *Calendula officinalis* para uso cosmético”. Mur, Raquel; Pardo, Juan I.; Martínez-López, José F.; Urieta, José S.; Mainar, Ana M. **11º Congreso de Fitoterapia de SEFIT**. Alicante, octubre 2021. Contribución: Póster.

“Técnicas avanzadas para la concentración de antioxidantes naturales”. Mur, Raquel; Pardo, Juan I.; Martínez-López, José F.; Urieta, José S.; Mainar, Ana M. **X Jornadas de Jóvenes Investigadores del I3A**. Zaragoza, octubre 2021. Contribución: Presentación.

“Supercritical Antisolvent Fractionation of *Melissa officinalis* Extracts”. Urieta, José S.; Mur, Raquel; Mainar, Ana M. **2º Encuentro Ibérico de Fluidos Supercríticos**. Coimbra - Portugal, febrero 2022. Contribución: Póster.

A.VIII.2. Publicaciones

Mur, R.; Langa, E.; Pino-Otín, M. R.; Urieta, J. S.; Mainar, A. M. Supercritical Antisolvent Fractionation of Antioxidant Compounds from *Salvia officinalis*. **Int. J. Mol. Sci.** 2021, 22(17), 9351. doi: 10.3390/ijms22179351.

Mur, R.; Langa, E.; Pino-Otín, M. R.; Urieta, J. S.; Mainar, A. M. Concentration of Antioxidant Compounds from *Calendula officinalis* through Sustainable Supercritical Technologies, and Computational Study of Their Permeability in Skin for Cosmetic Use. **Antioxidants**. 2022, 11(1), 96. doi: 10.3390/antiox11010096.



Article

Supercritical Antisolvent Fractionation of Antioxidant Compounds from *Salvia officinalis*

Raquel Mur ¹, Juan I. Pardo ¹, M. Rosa Pino-Otín ², José S. Urieta ¹ and Ana M. Mainar ^{1,*}

¹ GATHERS Group, Aragón Institute of Engineering Research (I3A), Universidad de Zaragoza, C/Mariano Esquillor s/n, 50018 Zaragoza, Spain; 649396@unizar.es (R.M.); jupardo@unizar.es (J.I.P.); urieta@unizar.es (J.S.U.)

² Universidad San Jorge, Campus Universitario Villanueva de Gállego, Autovía A-23 Zaragoza-Huesca Km. 299, 50830 Villanueva de Gállego, Spain; rpino@usj.es

* Correspondence: ammainar@unizar.es; Tel.: +34-976761195

Abstract: The increasing interest towards greener antioxidants obtained via natural sources and more sustainable processes encourages the development of new theoretical and experimental methods in the field of those compounds. Two advanced separation methods using supercritical CO₂ are applied to obtain valuable antioxidants from *Salvia officinalis*, and a first approximation to a QSAR model relating molecular structure with antioxidant activity is explored in order to be used, in the future, as a guide for the preselection of compounds of interest in these processes. Separation experiments through antisolvent fractionation with supercritical CO₂ were designed using a Response Surface Methodology to study the effect of pressure and CO₂ flow rate on both mass yields and capability to obtain fractions enriched in three antioxidant compounds: chlorogenic acid, caffeic acid and rosmarinic acid which were tracked using HPLC PDA. Rosmarinic acid was completely retained in the precipitation vessel while chlorogenic and caffeic acids, though distributed between the two separated fractions, had a major presence in the precipitation vessel too. The conditions predicted for an optimal overall yield and enrichment were 148 bar and 10 g/min. Although a training dataset including much more compounds than those now considered can be recommended, descriptors calculated from the σ -profiles provided by COSMO-RS model seem to be adequate for estimating the antioxidant activity of pure compounds through QSAR.

Keywords: advanced separation processes; supercritical antisolvent fractionation; rosmarinic acid; caffeic acid; chlorogenic acid; antioxidant activity; QSAR



Citation: Mur, R.; Pardo, J.I.; Pino-Otín, M.R.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Fractionation of Antioxidant Compounds from *Salvia officinalis*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9351. <https://doi.org/10.3390/ijms22179351>

Academic Editor: Elena Ibáñez

Received: 6 August 2021

Accepted: 25 August 2021

Published: 28 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The importance of antioxidants coming from natural sources as bioactive compounds, and their interest in the pharmaceutical, food and cosmetic industries, is increasingly [1–3] recognized worldwide. Moreover, society and government agencies progressively demand not only for safer products for humans and the environment, but also that these products should be obtained through clean, non-polluting procedures. Over many years, the extraction of bioactive compounds from natural sources and their subsequent fractionation or isolation have been conducted by means of conventional methods, many of which are based in the use of organic solvents that can be harmful for the environment and human health. Then, the development of more sustainable processes, as free as possible of organic solvents, is of great importance. For this reason, supercritical fluid, especially supercritical carbon dioxide (sc-CO₂), technology has gained importance and is widely used for extraction, fractionation and isolation of bioactive compounds from plants [4] or animal parts [5]. CO₂ is non-flammable, non-toxic, available at low cost with high purity and its critical pressure and temperature (P_c = 74 bar T_c = 31 °C) are moderate [4]. This last circumstance makes it very suitable for the extraction of thermolabile compounds. Besides, sc-CO₂ has zero surface tension, low viscosity and its diffusivity is two or three times higher than that

of other fluids. CO₂ exhibits a polarity similar to pentane, and for this reason is suitable for the extraction of lipophilic substances [6]. Although, CO₂ has the disadvantage that it lacks the polarity required to extract polar substances, this shortcoming could be surmounted by using a co-solvent such as a short chain alcohol [4]. As a result of its properties, sc-CO₂ leads to effective and quick extractions and also eliminates clean-up steps because it can be easily and completely removed by lowering the pressure in which case it becomes a gas.

Supercritical carbon dioxide technology allows working in several different modes. By far the most used and studied is supercritical fluid extraction (SFE). More than 90 SFE processes are now performed by this technique. It has been applied to plants because they are sources of a great number of bioactive substances such as hydrocarbons (monoterpenes and sesquiterpenes) and oxygenated compounds (aldehydes, acids, alcohols, ketones, phenols, etc.) [7]. Most studies on SFE include investigations of the effect on the yield of extraction owing to parameters such as temperature, pressure, size of sample, modifiers (co-solvent), flow rate of fluid, and sample moisture [4–10]. Our group has previously studied the extraction of *Hyssopus officinalis* [11], *Salvia officinalis* [12], *Artemisia absinthium* [13], *Persea indica* [14], *Lippia alba* [15], *Citrus aurantium amara* [16]. Regarding the extraction of *Salvia officinalis*, in the last 10 years, several papers have been published with variations in both the origin of the plant and the conditions used for its extraction, which mean different results in the yield and composition of the extracts [17–22].

Another interesting and less studied technique is the supercritical antisolvent fractionation (SAF) [4], in which the non-polarity of CO₂ can be used to precipitate some compounds from a solution into solid particles, whose shape and diameter could be controlled according to the operational conditions [4,23], while the rest remain dissolved. That is, two fractions can be obtained that are enriched in different components. Our group has already performed investigations in this technology aiming to obtain fractions enriched in bioactive compounds: *Persea indica* [24], grape seeds [25], *Artemisia absinthium* [26] and *Lavandula luisieri* [23]. There are no SAF studies for *Salvia officinalis*, although Ganan et al. [27] performed a fractionation of its essential oil using different technique.

In relation to the SAF process, it exhibits conceptual similarities with the supercritical antisolvent micronization (SAS) [4,28], a process widely used in the pharmaceutical industry to obtain small particles of some drugs. Complex mathematical models [29,30] have been also developed to understand particularities of SAS such as jet hydrodynamics, mass transfer and phase equilibrium data as well as the buoyancy effect on the fluid. Besides, the technique of coprecipitation with polymers in sc-CO₂ has also been applied to stabilize antioxidants in order to preserve them and avoid their degradation [31–34].

Now, this work focusses on the application of SAF to extract *Salvia officinalis* L., commonly known as sage. *Salvia officinalis* belongs to the *Salvia* genus, which includes over 900 species [35]. It is native to Middle East and Mediterranean areas. In the traditional medicine of Europe, it has been used to treat some different illnesses, such as dyspepsia or inflammations in the throat and skin [36]. In recent years, many researches have revealed a wide range of pharmacological activities including antioxidant [37,38], antimicrobial [39,40], anticancer [41,42], anti-inflammatory [43], antimutagenic [37], cognitive and memory-enhancing [38,44]. However, one of the major uses of *Salvia officinalis* extracts and essential oil lies in the cosmetic and perfume industries. In fact, those extracts are so important that they are controlled under various regulations (Directive 2004/24/EC, CFR Title 21 from FDA, etc.) and have their own CAS (Chemical Abstracts Service) registry numbers, 8022-56-8/84082-79-1, and EINEC number (European Inventory of Existing Commercial chemical Substances): 282-025-9/282-025-9 [45]. According to the EU cosmetic ingredient database, CosIng, the extracts of this plant have several functions as a cosmetic: anti-seborrheic, antimicrobial, antioxidant, astringent, cleansing, deodorant, skin conditioning, skin protecting, soothing and tonic [46].

Due to the beneficial properties of its extracts, their composition has been studied in detail [20,41,47] and SFE of *S. officinalis* has been also investigated [48,49]. As could be expected, the composition and resulting properties of the extracts are highly dependent

on extraction conditions apart from other factors such as the origin of the plant or its chemotype [50,51]. As it is well known, extraction depends on solution and diffusion processes which are governed by thermodynamic laws corresponding to phase equilibria, and kinetic parameters associated with transport phenomena, respectively [52]. Over the years, different thermodynamic models have been proposed in order to correlate or predict solubilities in supercritical fluids such as those based on equations of state [53] or regular solution theory [54]. Additionally, more complex models, including the integration of differential mass balances, can be found—models that interpret the extraction curves giving mass yields against extraction time [4,28].

In this work, the influence of pressure (80–160 bar) and CO₂ flow rate (10–60 g/min) in a SAF process on the yields for each fraction as well as on the enrichment (fractionation) of three compounds, namely, rosmarinic acid (RA) [55–57], caffeic acid (CAF) [58] and chlorogenic acid (CHA) [59] have been studied. These phenolic acids were chosen because they exhibit a significant antioxidant activity [60,61]. A response surface methodology (RSM) based on central composite design (CCD) was used to carry out the experimental design. It must be said that this SAF process is intended as a stage of a global sustainable process in which SFE would be the first applied to defat the plant material which would be afterwards subjected to maceration with ethanol to obtain the polar and, to us, more interesting compounds that would, finally, undergo the SAF process.

It must be also considered that a lot of experimental and theoretical studies are necessary to reach a sufficiently satisfactory level of knowledge in the field of separation of bioactive compounds. On the one hand, due to the wide variety of raw materials susceptible to be treated and their composition variability (chemotype, farmland, harvest, climatology) and to the large series of compounds that can be obtained, this type of separation processes is far from being exhaustively studied, though several industrial applications are already in operation. On the other hand, together with the already indicated operational models, another types of approximations are necessary when a progressive line of scaling-up from laboratory to pilot and industrial scales is foreseeable as a result of the interest in and consequent demand for the obtained products. Another relevant facet is the assessment of the quality of the products. In this respect, because of the growing attention paid to obtaining high added value products, such as antioxidants, semiempirical models that would allow the discrimination of the most active compounds are of great interest as these models can be used to focus processes such as SAF in the most promising bioactive compounds. This has led us to explore the possibility of attempting the development of a Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) model by using molecular descriptors derived from the σ -profiles of antioxidant compounds provided by the Conductor-like Screening Model for Real Solvents (COSMO-RS model). COSMO-RS model, first proposed by Klamt [62] and afterwards refined in [63], is a continuum solvation model that combines quantum chemical theory and statistical thermodynamics. From optimized three-dimensional structures of the molecules COSMO-RS generates a 3-D distribution of surface polarization charge-densities, σ , of the compounds from which the corresponding 2-D σ -profiles are obtained. σ -profiles are histograms that provide the relative amount of molecular surface with a given polarization charge-density σ . The model was originally intended to calculate solvent properties, vapor-liquid or liquid-liquid equilibrium phase diagrams, vapor pressures or activity coefficients. From activity coefficients properties of real mixtures could be predicted. However, besides this original aim, it has also proven to be a useful tool to establish QSPR (Quantitative Structure Property Relationship) models for physical properties such as density [64,65], viscosity [65–67], electrical conductivity [68] and polarity [69] of different compounds or mixtures as well as adsorption phenomena [70,71]. Furthermore, QSAR models based on COSMO-RS have been developed for several bioactivity features, namely, cytotoxicity on leukaemia rat cell line [72], enzymes performance [73] and antimicrobial activity of ionic liquids [74]. However, as far as we know, the model that is intended to be studied in this work has not been used in the prediction of antioxidant activities as a guide before the selection of compounds of interest. Additionally, we take

advantage of the experience of our research group in the use of the COSMO-RS model to predict vapor-liquid equilibria [75], excess molar enthalpies [76–78] and excess molar heat capacities [79–82] of binary liquid mixtures in order to advance towards the development of a QSAR model for antioxidant activity of terpenes and terpenoids.

2. Results and Discussion

2.1. Extraction Yields

In previous works, pre-treated plant material was submitted to a hexane maceration in order to eliminate non-polar compounds such as cuticular waxes before obtaining the polar and active compounds [23,26]. In this work this step was substituted by a green process with sc-CO₂ because it is harmless and generates a final product without traces of residual solvent as CO₂ becomes a gas at low pressures. The yield for the supercritical extraction was calculated using the Equation (1):

$$Y_{SCE}(\text{wt.}\%) = \left(\frac{\text{mass (g)}_{C1} + \text{mass (g)}_{C2}}{\text{mass (g)}_{\text{plant material}}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

where mass(g)_{C1} and mass(g)_{C2} were the masses (grams) of extract collected in C1 and C2, respectively, and $\text{mass(g)}_{\text{plant material}}$ was the initial mass (grams) of plant material loaded in the extractor. The extraction yield of the supercritical extraction, Y_{SCE} , was 4.9%. Comparable results were obtained by S. A. Aleksovski et al. [83] (2.4–4.8%) and A. Dapkevicius et al. [84] (5.02%) at SFE conditions similar to those used in this work.

After the supercritical extraction the plant material was macerated in ethanol in order to obtain polar bioactive compounds. This solvent was used because of its good properties: it is nontoxic, biodegradable and has a high extractive capacity [23,85]. The yield of the maceration was calculated using Equation (2):

$$Y_M(\text{wt.}\%) = \left(\frac{\text{mass}_{\text{plant extract}}(\text{g})}{\text{mass}_{\text{plant material}}(\text{g})} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

where $\text{mass}_{\text{plant extract}}(\text{g})$ was the mass (grams) of the solvent-free extract and $\text{mass}_{\text{plant material}}(\text{g})$ was the initial mass (grams) of plant material subjected to maceration. The extraction yield obtained, Y_{EtOH} , was 10.9%. This extract was redissolved again in ethanol to obtain the feed solution (FS) (3% wt. of extract) for the SAF process.

2.2. Supercritical Antisolvent Fractionation (SAF) Processes

Mass recovery yields for precipitation vessel (PV) and downstream vessel (DV) fractions, Y_{PV} and Y_{DV} , were calculated using Equation (3):

$$Y_i(\text{wt.}\%) = \left(\frac{\text{mass fraction collected}_i}{\text{mass of FS}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

where i was the collecting vessel: PV or DV. The overall recovery yield of the process, Y_{SAF} , was defined according Equation (4):

$$Y_{SAF}(\text{wt.}\%) = Y_{PV}(\text{wt.}\%) + Y_{DV}(\text{wt.}\%) \quad (4)$$

The concentration of a single compound in each sample was calculated using Equation (5):

$$C_{i/j}(\text{wt.}\%) = \left(\frac{\text{mass of compound } i \text{ in fraction } j(\text{g})}{\text{mass of fraction } j} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

where i means the compound analysed (RA, CHA, CAF) and j the fraction (FS, PV or DV) where the compound has been collected from. Once the concentrations were obtained, the Enrichment ratio $E_{i/j}$ was calculated for each compound according to Equation (6):

$$E_{i/j} = \frac{C_{i/j}}{C_{i/FS}} \quad (6)$$

where j is PV or DV. With these values a Relative Enrichment ratio RE_i can be calculated using Equation (7):

$$RE_i = \frac{E_{i/PV}}{E_{i/DV}} \quad (7)$$

The operational parameters to be set in a SAF process are pressure and temperature in PV and DV as well as the flow rates of CO₂ and FS. Temperatures in PV and DV, pressure in DV and FS flow rate are fixed according to previous experiences in such a way that along with pressure in PV and CO₂ flow rate supercritical conditions of the (CO₂-ethanol) mixture would be ensured [25]. To statistically evaluate and optimize the influence of the variable operational parameters, namely, pressure in PV and CO₂ flow rate, on yields and enrichment ratios a response surface methodology (RMS) based on central composite design (CCD) was employed. The values for pressure, X_P , and CO₂ flow rate, $X_{Q_{CO_2}}$, were set between 80 and 160 bar and 10 and 60 g/min, respectively. In Table 1 the working conditions for every run can be found.

Table 1. Operational conditions of pressure, X_P , and CO₂ flow rate $X_{Q_{CO_2}}$, for every run of the experimental design of the SAF process applied to the ethanolic extract from defatted *S. officinalis* leaves along with the corresponding results for the yields and enrichment ratios as defined by Equations (3)–(7).

Run	Exp. Run Order	X_P (bar)	$X_{Q_{CO_2}}$ (g/min)	Y_{PV} (wt.%)	Y_{DV} (wt.%)	Y_{SAF} (wt.%)	$E_{CHA/PV}$	$E_{CAF/PV}$	$E_{RA/PV}$	$E_{CHA/DV}$	$E_{CAF/DV}$	RE_{CHA}	RE_{CAF}
1	8	80	35	61.9	7.1	69.0	0.81	0.57	0.77	0.32	0.31	2.53	1.84
2	5	92	17	64.8	17.5	82.3	1.18	0.75	0.91	0.37	0.34	3.19	2.21
3	1		53	53.0	12.9	65.9	1.20	0.98	1.05	0.32	0.12	3.75	8.17
4	4	120	10	56.0	27.8	82.4	1.33	0.75	1.15	0.33	0.66	4.03	1.14
5	2		35	62.8	15.4	78.3	1.19	0.94	1.06	0.33	0.25	3.61	3.76
6	6		35	64.8	17.4	82.2	1.21	0.95	1.11	0.34	0.23	3.56	4.13
7	11		35	62.6	22.5	85.1	1.19	1.11	1.14	0.32	0.21	3.72	5.29
8	12		35	60.0	20.8	80.8	1.24	0.91	1.11	0.36	0.45	3.44	2.02
9	13		35	61.7	19.9	81.6	1.47	1.17	1.29	0.33	0.26	4.45	4.50
10	3		60	50.5	16.3	75.8	1.20	0.79	0.90	0.34	0.25	3.53	3.16
11	10	148	17	55.8	28.5	84.3	1.61	1.04	1.51	0.31	0.47	5.19	2.21
12	7		53	57.2	17.8	75.0	1.19	1.09	1.32	0.34	0.25	3.50	4.36
13	9	160	35	57.4	20.6	78.0	1.32	1.04	1.32	0.33	0.53	4.00	1.96

2.3. SAF Yields Statistical Analysis

The mathematical model for a two variable CCD allows correlating a dependent variable, Y , with some independent variables, X_i and X_j , through the following Equation (8):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \quad (8)$$

where β_0 is the constant coefficient, β_1 and β_2 are linear coefficients, β_{11} and β_{22} are quadratic coefficients and β_{12} is an interaction coefficient. In this work, as said above, yields and enrichment ratios of bioactive compounds (RA, CAF, CHA) are the dependent variables while pressure and CO₂ flow rate (encoded as X_P and $X_{Q_{CO_2}}$, respectively) are the independent variables whose influence is under study.

In all the experiments a light-green powder precipitated in precipitation vessel (PV) and a green solution was obtained in downstream vessel (DV). Experimental values for PV (Y_{PV}), DV (Y_{DV}) and overall (Y_{SAF}) yields are also shown in Table 1, where, as can be observed, Y_{PV} was always higher than Y_{DV} , independent of the pressure and CO_2 flow conditions. Y_{PV} oscillated between 53.0% (run 3; 92 bar-53 g/min) and 64.8% (run 2; 92 bar-17 g/min and run 6; 120 bar-35 g/min) whereas Y_{DV} changed between 7.1% (run 1; 80 bar-35 g/min) and 28.5% (run 11; 148 bar-17 g/min). Y_{SAF} varied from 69.0% to 85.1% (runs 1 and 11 respectively). It can be seen that PV yields are from 2.0 (run 4) to 8.7 (run 1) times the DV yields. A full recovery of the entire mass of solutes contained in the feed solution is not possible due to the dragging of the most volatile components through the vent valve [86] and the deposition of materials in dead spaces.

Only Y_{DV} and Y_{SAF} were successfully fitted to the mathematical model and used to determine the coefficients of Equation (8) that can be found in Table 2 along with the corresponding level of significance, p , the coefficient of determination, R^2 , and the standard deviation, s . According to the statistical analysis, Y_{DV} depends on all the terms, although only the pressure (β_1), the quadratic term of pressure (β_{11}) and the CO_2 flow rate (β_2) are statistically significant ($p < 0.05$). Instead, Y_{SAF} %, only depends on the terms of pressure (β_1), CO_2 flow rate (β_2) and the quadratic term of pressure (β_{11}), being all of them statistically significant.

Table 2. Fitting coefficients of Equation (8) for DV and overall yields (Y_{DV} and Y_{SAF} , respectively), chlorogenic and rosmarinic acid enrichment ratio in PV ($E_{CHA/PV}$, $E_{RA/PV}$, respectively) and chlorogenic acid relative enrichment ratio (RE_{CHA}) along with the corresponding factors of significance of the terms, p . Regression coefficients, R^2 , and standard deviation, s , are also listed for each fitting.

	$Y_{DV}/wt\%$		$Y_{SAF}/wt\%$		$E_{CHA/PV}$		$E_{RA/PV}$		RE_{CHA}	
	Coefficient Value	p	Coefficient Value	p	Coefficient Value	p	Coefficient Value	p	Coefficient Value	p
β_0	-40.1	0.000	8.8	0.000	-1.17	0.000	-0.341	0.000	-4.84	0.000
β_1	0.982	0.001	1.239	0.019	0.0326	0.013	0.01305	0.000	0.1019	0.008
β_2	-0.242	0.002	-0.2465	0.002	0.0141	0.136	0.0168	0.210	0.0964	0.122
β_{11}	-0.003	0.026	-0.00472	0.008	-0.000083	0.200	-	-	-0.000191	0.315
β_{22}	0.00549	0.082	-	-	0.000114	0.466	-	-	0.000353	0.455
β_{12}	0.00303	0.217	-	-	-0.000218	0.117	-0.000164	0.150	-0.001116	0.019
R^2	90.95	-	80.58	-	73.85	-	79.61	-	79.84	-
s	2.2	-	2.9	-	0.12	-	0.10	-	0.37	-

The contour plots corresponding to the surfaces defined by Equation (8) for Y_{DV} and Y_{SAF} , as functions of pressure, X_P , and CO_2 flow rate, $X_{Q_{CO_2}}$, are represented in Figure 1a,b, respectively. According to Figure 1a Y_{DV} increases with pressure for a given CO_2 flow rate, except when CO_2 flow rate is between 35 and 38 g/min, in which case Y_{DV} increases with increasing pressure, then decreases. This effect (excluding the exception interval) becomes more marked at lower flow rates. In general, Y_{DV} increases as CO_2 flow rate diminishes for a fixed pressure. For the ranges studied, the highest Y_{DV} is found for high pressure (between 130 and 160 bar) and low CO_2 flow rate (between 10 and 14 g/min). It is possible that greater Y_{DV} could be found with further increase of pressure and decrease of CO_2 flow rate. On the other hand, as seen in Figure 1b, Y_{SAF} increases as CO_2 flow rate decreases for a fixed value of pressure whereas, for a given value of CO_2 flow rate, in general, Y_{SAF} first increases, then decreases for increasing pressure values. As a result, maximum values of Y_{SAF} occur for quite similar conditions to those of Y_{DV} , that is, at high values of pressure (109–155 bar) and the lowest values of CO_2 flow rate (between 10 and 20 g/min).

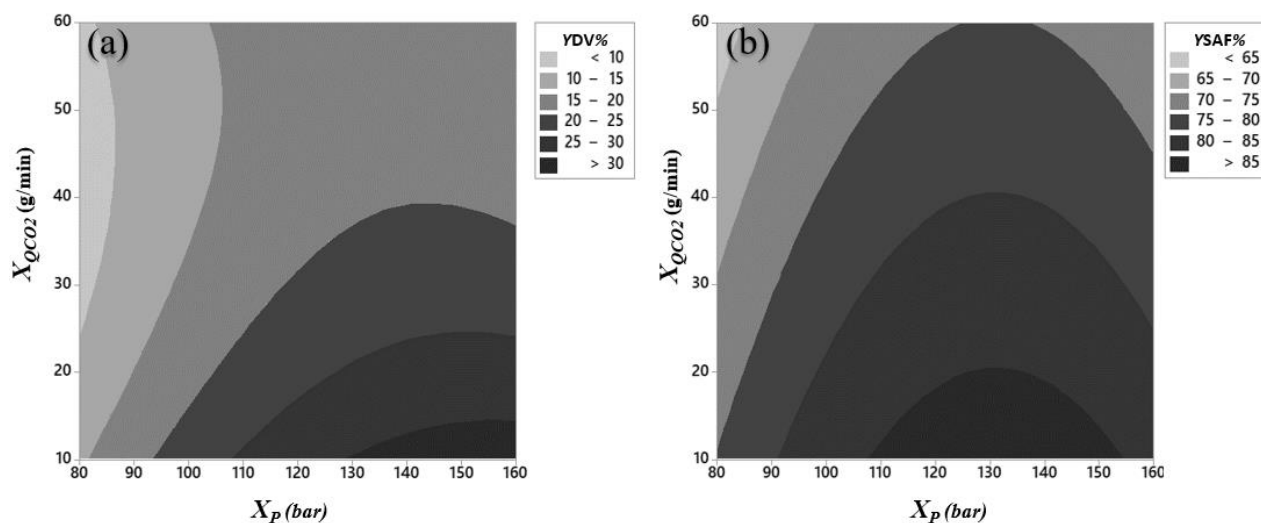


Figure 1. Contour plots of the yields: (a) at DV, $Y_{DV}\%$ and (b) overall yield, $Y_{SAF}\%$ as function of pressure, X_P (bar) and CO_2 flow rate, X_{QCO_2} (g/min).

2.4. Enrichment Ratios Statistical Analysis

Enrichment parameters, $E_{i/j}$ and relative enrichment parameters, RE_i , are gathered in Table 1. The chromatographic analysis revealed that rosmarinic acid (RA) is completely retained in PV and therefore neither $E_{RA/DV}$ nor RE_{RA} are included in the results. For chlorogenic acid (CHA) and caffeic acid (CAF), $E_{i/PV}$ values are significantly higher than $E_{i/DV}$ which means that these two compounds are more concentrated in the PV than in the DV fraction.

Values of RE_{CHA} show that concentration of the CHA in PV was from 2.53 to 5.19 higher than concentration in DV. The major value was for run 11 (148 bar-17 g/min) whereas the lowest value was for run 1 (80 bar-35 g/min). On the other hand, values of RE_{CAF} show that the concentration of CAF in PV was from 1.14 to 8.17 higher than concentration in DV. The first value was for run 3 (92 bar-53 g/min) and the second one was for run 4 (120 bar-10 g/min). In this case, high values of RE_{CAF} are obtained with intermediate pressures and high CO_2 flow rates.

In Table 2 the fitting coefficients of Equation (8) for $E_{CHA/PV}$, $E_{RA/PV}$ and RE_{CHA} are gathered. The remaining enrichment ratios could not be adjusted by the mathematical model. $E_{CHA/PV}$ depends on all terms but only pressure (β_1) was statistically significant. $E_{RA/PV}$ do not depend on any of the quadratic terms and only pressure (β_1) was statistically significant. RE_{CHA} depends on all terms, being statistically significant the pressure (β_1) and the cross term (β_{12}).

The contour plots corresponding to the surfaces defined by Equation (8) for these enrichment ratios as functions of pressure, X_P , and CO_2 flow rate, X_{QCO_2} , are depicted in Figure 2a–c. As can be observed in Figure 2a, at pressures higher than 116 bar, $E_{CHA/PV}$ decreases as the flow rate increases. However, at lower values of pressure the flow rate barely has influence on the $E_{CHA/PV}$. Regarding the influence of pressure, for CO_2 flow rates below 46 g/min, the $E_{CHA/PV}$ increases as the pressure increases, being the effect more pronounced as the lower is the CO_2 flow rate. Between 46 and 60 g/min, for increasing values of pressure, $E_{CHA/PV}$ increases, then decreases. The maximum was reached for high pressure values (138–160 bar) and low CO_2 flow rate values (10–16 g/min).

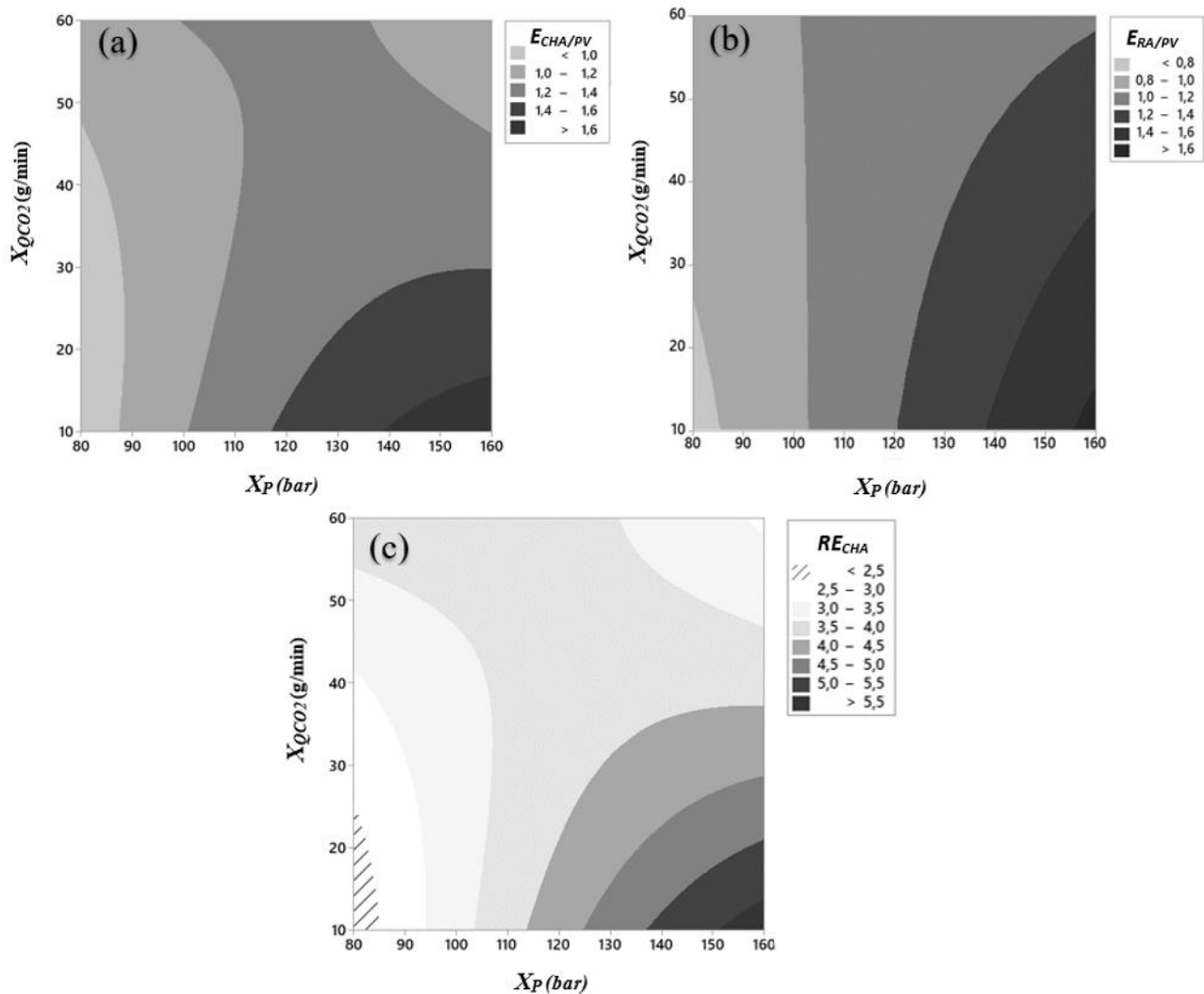


Figure 2. Contour plots of the enrichment ratios: (a) $E_{CHA/PV}$; (b) $E_{RA/PV}$ and (c) RE_{CHA} as a function of pressure, X_P (bar) and CO₂ flow rate, X_{QCO_2} (g/min).

In Figure 2b, the contour plot shows that below 120 bar the CO₂ flow rate has not any influence on $E_{RA/PV}$, except at lower pressure values where an increase in CO₂ flow rate causes an increase in $E_{RA/PV}$. From 120 bar onwards an increase in the flow leads to a decrease in $E_{RA/PV}$. For a given CO₂ flow rate, the higher the pressure, the higher $E_{RA/PV}$. As occurred with $E_{CHA/PV}$ the maximum $E_{RA/PV}$ is placed at the highest values of pressure (155–160 bar) and the lowest values of CO₂ flow rate (between 10 and 15 g/min).

Analysing Figure 2c it can be observed that up to 113 bar, when increasing CO₂ flow rate, RE_{CHA} increases. However, at higher values of pressure, a decrease in is observed when CO₂ flow rate increase. Referring to the influence of pressure, as it increases RE_{CHA} increases for CO₂ flow rates below 47 g/min, being the effect more pronounced as the lower is the CO₂ flow rate. The opposite takes place at CO₂ flow rates above 54 g/min. Between 47 and 54 g/min, RE_{CHA} increases, then decreases. The maximum RE_{CHA} was reached for high pressure values (between 151 and 160 bar) and the lowest values of CO₂ flow rate (10–14 g/min). Coupling the fact that CHA and CAF in a greater proportion in PV than in DV with the fact that rosmarinic acid only precipitates in PV, it can be concluded that the SAF technique can be used to obtain a dry solid highly enriched in antioxidant compounds. Taking into account the experimental inaccuracies, the statistical analysis for the applied RSM model provides the optimal working conditions to obtain the highest

values of $E_{CHA/PV}$, $E_{RA/PV}$, and RE_{CHA} together with a maximum Y_{SAF} are a pressure of 148 bar and a CO_2 flow rate of 10 g/min.

The justification of the results obtained considering the different factors involved in the precipitation process is very complex, especially for these multicomponent systems [4]. Precipitation is a kinetic process governed by a driving force [52], that is expressed as the difference between the chemical potential of a supersaturated solution, μ , and the chemical potential in saturated solution μ_{eq} . The sign of this difference indicates whether precipitation occurs ($\mu - \mu_{eq} > 0$) or if dissolution occurs instead ($\mu - \mu_{eq} < 0$). For the precipitation to occur it is necessary that the primary processes of nucleation and growth take place along with secondary processes of aggregation and rupture. It is in these primary and secondary processes that flow affects.

Focusing on the driving force of the precipitation phenomenon it is clear that solubility plays a determining role. Specifically, for the compounds of interest studied, the only experimental solubility data found in the literature in CO_2 and in the $scCO_2$ -EtOH mixture are for caffeic acid [87,88] (Table S1 in Supplementary Materials). Taking into account the working conditions, the supersaturation in caffeic acid is guaranteed. With respect to chlorogenic and rosmarinic acids, the overstressing is even higher due to their higher concentration in the FS (Table 1) and because their solubilities are lower than those of caffeic acid as deduced from the Hildebrand solubility parameter [89], δ_H , gathered in Table S1. The complete precipitation of RA in PV is a phenomenon that has been previously described in the literature [23,86]. This fact could be explained mainly by two effects, on the one hand, a lower solubility in the CO_2 -EtOH mixture, and on the other hand, the great supersaturation of the compound that favors the nucleation process and subsequent growth of the particles when compared to the two other compounds considered.

The optimal conditions reached for the maximum recovery of the fed material and the concentration of active ingredients (148 bar, 10 g/min) can be explained in a similar way. The flow rate value corresponds to the lower end of the studied interval, a fact that could be explained on the basis that this situation allows, on the one hand, a higher mass yield recovery due to a lower dragging effect, and on the other hand, a higher precipitation because nucleation is favored. Regarding pressure, it can be considered that, for a given flow, there are two factors that contribute in the opposite way to the driving force: nucleation and solubility. Both factors increase with pressure generating a maximum within the considered interval [90].

2.5. COSMO-RS as Screening Model for Antioxidants

Reliable Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) models can be very useful to predict activity of compounds from its structure, thus avoiding the, sometimes, laborious experimental measurements. In this case the possibility of attempting the development of a QSAR model for the antioxidant activity of compounds present in extracts of plants is explored.

The model here developed is based on previous studies which used COSMO-RS on QSAR models [72–74]. Figure 3 shows the 3D structures of the compounds used in this work and their surface charge density in colours.

To translate the σ -profile information into descriptors, that is, into numerical variables, σ -profile curves were divided in two different ways: a first thicker partition into four intervals [74,91] and a thinner partition into 10 different intervals [65–68], in order to be able to evaluate the suitability of the two models. Figure 4 shows an example of both divisions of the σ -profile for RA and CHA. The same division was applied to the σ -profiles of the rest of compounds. The descriptors of the model were defined as the area under the σ -profile curve for each interval i , S_i , being these areas S_1 – S_4 for the model with 4 partitions and S_1 – S_{10} for the model with 10 partitions. Table 3 shows the values of the molecular descriptors used for each molecule and their representation.

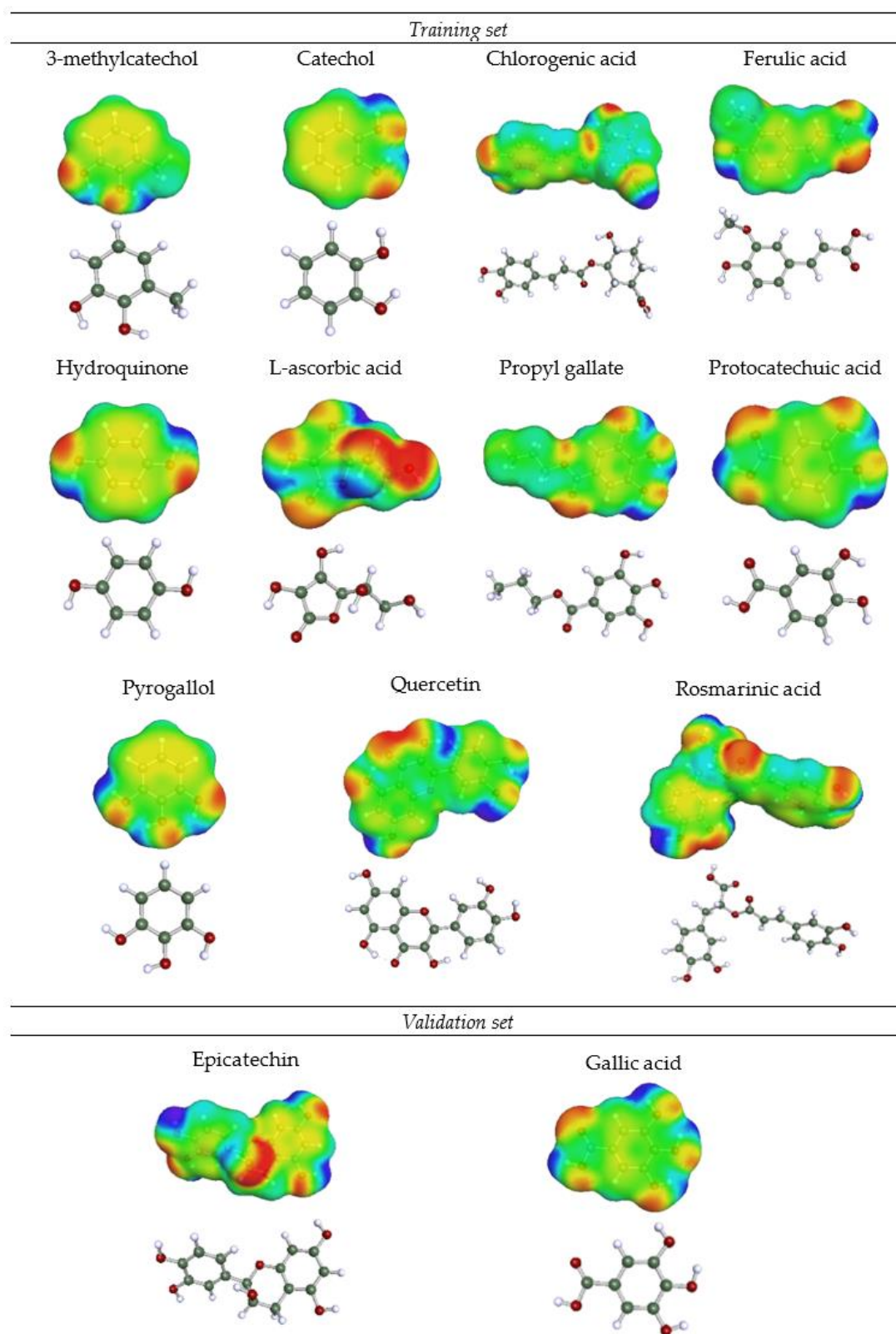


Figure 3. 3D molecular structures of the compounds used in this work and their charge density (electronegative zone in red, electropositive zone in blue and neutral zone in green).

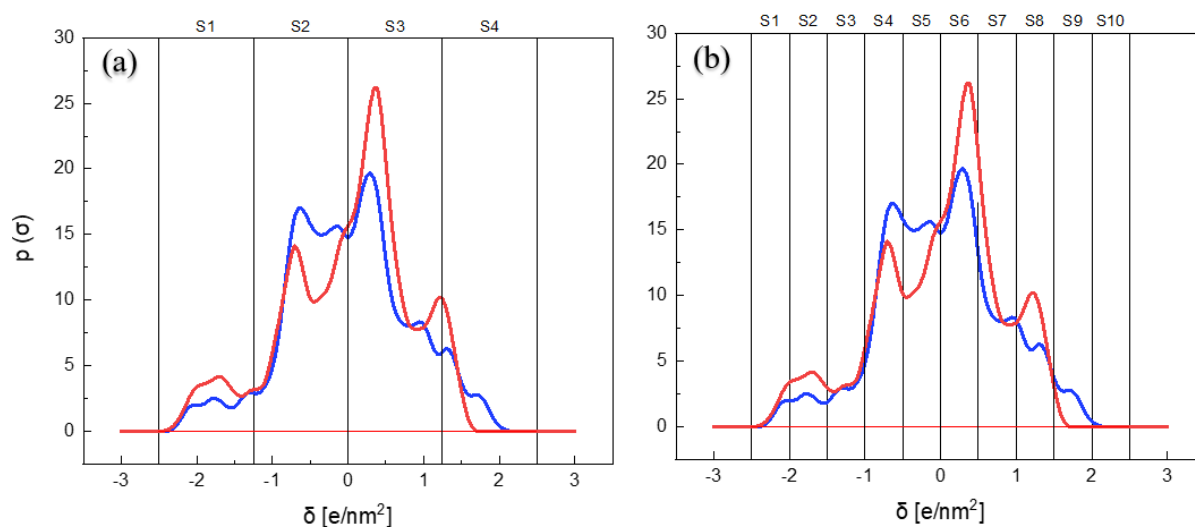


Figure 4. σ -profiles of rosmarinic acid (RA, red) and chlorogenic acid (CHA, blue) and its partition in (a) four intervals and (b) 10 intervals to generate the molecular descriptors.

Table 3. Molecular descriptors for the 4 areas model and 10 areas model and their representations based on Lemaoui et al. representation [68].

4 Areas Model		10 Areas Model		Representation
Molecular Descriptor	Screening Charge Density Range (e/nm)	Molecular Descriptor	Screening Charge Density Range (e/nm)	
S ₁	$-2.5 < \sigma < -1.25$	S ₁	$-2.5 < \sigma < -2.0$	HBD region
		S ₂	$2.0 < \sigma < -1.5$	
		S ₃	$-1.5 < \sigma < -1.0$	
S ₂	$-1.25 < \sigma < -0.0$	S ₄	$-1.0 < \sigma < -0.5$	Non polar region with negative charges density
		S ₅	$-0.5 < \sigma < 0.0$	
S ₃	$0.0 < \sigma < 1.25$	S ₆	$0.5 < \sigma < 1.0$	Non polar region with positive charges density
		S ₇	$0.0 < \sigma < 0.5$	
		S ₈	$1.0 < \sigma < 1.5$	
S ₄	$1.25 < \sigma < 2.5$	S ₉	$1.5 < \sigma < 2.0$	HBA region
		S ₁₀	$2.0 < \sigma < 2.5$	

The σ -profiles obtained by COSMO-RS provide physicochemical information of the molecular structure based on its functional groups [92]. The molecules used in this work are phenolic type compounds and show characteristic peaks around $\sigma = \pm 0.5$ corresponding to the aromatic rings and which peaks that may be displaced due to the presence of other groups in the molecule. In addition, there are peaks in the hydrogen bond donor (HBD) region of $-2.5 < \sigma < -1.0$, that are characteristic of the hydrogen's atoms in OH bonds, and some peaks in the hydrogen bond acceptor (HBA) region $1.0 < \sigma < 2.5$, characteristic of hydrogen acceptor atoms such as oxygen atoms.

The antioxidant activity data, expressed as the value of EC_{50} (μM) for the DPPH assay of several compounds, were collected from the literature [93]. In this respect, it must be said that there are several chemical methods for determining antioxidant activity and not all of them measure the same activity because different antioxidant reaction mechanisms are involved in the different methods [93,94]. In this case, the DPPH assay has been

chosen because it is widely used. EC_{50} , which is the effective concentration of antioxidant compound that reduces 50% of the DPPH initially present in the assay, was transformed from (μM) to (mol substance/mol DPPH) in order to work with standardized values.

In this work Multiple Linear Regression (MLR) was used to establish the linear relationship between the molecular descriptors of the compounds and their antioxidant activity, represented as $-\log(EC_{50})$. Equation (9) provides the expression for MLR

$$-\log(EC_{50}) = a_0 + a_1S_1 + a_2S_2 + a_3S_3 + \dots + a_nS_n \quad (9)$$

where $a_0, a_1, a_2, \dots, a_n$ are the regression coefficients and $S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$ are the molecular descriptors. *Minitab*[®] 18 software was used to calculate the coefficients for Equation (9) as well as the associated statistical parameters.

In order to have a homogeneous database that would allow to assess the applicability of the QSAR model, 3 compounds were removed from the set of the 16 initial compounds chosen. Specifically: alpha-tocopherol for having a very different structure, trolox for not being a compound present in natural sources such as plants, and caffeic acid. Caffeic acid was subsequently eliminated because it has dimerization capacity and a preliminary QSAR model performed including it was not able to correctly adjust molecules with that dimerization capacity. Therefore, the remaining 13 compounds were divided by 80–20%: a subset of 11 compounds (training set) was built to carry out the MLR and the 2 remaining compounds were used as external validation. The compounds were selected to form the validation set according to the following criteria: (i) data of maximum and minimum antioxidant activity are excluded, (ii) data that are grouped in the upper or lower extreme of antioxidant activity are excluded and (iii) molecules that have the same functional group are excluded [95].

It should be noted that this number of compounds is too small to develop an effective QSAR model and only the possibility of developing a full model is explored. There are several reasons that hinder the use of a more extensive set. First, although there are many works on the antioxidant activity of extracts from plants, works on the antioxidant activity of pure compounds present in those extracts are surprisingly scarce. On the other hand, even for a given assay, such as DPPH, there are modifications of the method that not always provide the same results for a given compound. Finally, the antioxidant activity can be expressed in several ways and not all of them can be easily translated into each other because the lack of chemical information [93]. In this work, compounds were selected whose reported antioxidant activity has been considered reliable after a comparison with that provided by other sources.

Experimental values of EC_{50} (mol/mol) and the corresponding logarithms are gathered in Tables 5 and 6 for the compounds selected. Equations (10) and (11) describe the obtained linear relationship between the antioxidant activity and σ -profile descriptors for the 4 areas model and 10 areas model, respectively:

$$-\text{Log}(EC_{50}) = -0.230 + 1.941S_1 + 0.519S_2 - 0.4055S_3 - 2.18S_4 \quad (10)$$

The results show that, for the 4 areas model, all the descriptors (S_1 – S_4) were statistically significant ($p < 0.05$) and the correlation coefficient, R^2 , was found to be 80.00%, indicating a good fitting of the model. The standard deviation was 0.17, the variation in the response explained by the model and adjusted for the number of predictors, $R^2(\text{adjust})$, was 66.67% and the $R^2(\text{pred})$, which determines how well the model would predict responses for new data, was 1.30%.

$$-\text{Log}(EC_{50}) = -0.556 - 0.230S_1 - 0.317S_4 + 0.1903S_5 - 0.1015S_6 + 0.5683S_7 \quad (11)$$

For the 10 areas model, out of the 10 initial descriptors, only S_4 – S_7 were statistically significant ($p < 0.05$), although S_1 is necessary to obtain a good correlation. R^2 was found to be 93.14%, the standard deviation was 0.11, $R^2(\text{adjust})$ was 86.28% and the $R^2(\text{pred})$ was

72.68%. The fact that the S_4 – S_7 areas significantly influence antioxidant activity can be explained on the basis of the reaction mechanism that the phenolic molecules considered in this work present in the DPPH method. This is a mechanism of transfer of a H atom to the radical according to which the antioxidant activity depends mainly on two factors: the H-abstraction level of the ground state molecule and the stability of the formed free radical [96]. It is in this last factor where the neutral zones of the molecule come in, since they are the zones that allow the delocalization of the free electron and therefore its stabilization. Although it is true that the σ -profile makes possible to identify the different areas of the molecules (presence of aromatic rings, alkyl groups, etc.) it does not seem to be precise enough to, for example, distinguish between different aromatic rings as is the case of RA [96]. Even so, it is precise enough to lead to an improvement when making more partitions over the previous model.

The antioxidant activity of compounds in the validation set was calculated from Equations (10) and (11) to test the performance of the models. Tables 4 and 5 show the predicted values and the deviations from the experimental values as residues for EC_{50} (mol/mol) for each model. In the 4 areas model, both epicatechin and gallic acid values of EC_{50} are overestimated and present similar deviation values, -0.10 and -0.11 , respectively. Although it appears that the model could predict the value of epicatechin, the deviation for gallic acid is greater than the experimental value itself. On one hand, in the 10 areas model, the epicatechin value of EC_{50} is underestimated and the residue is fairly low, 0.12, which means that the model could predict it quite correctly, while for gallic acid the value of EC_{50} is again overestimated almost in the same way as in the case of the 4 areas model being now the deviation -0.10 .

Table 4. Experimental and predicted values of EC_{50} and their logarithms for each compound used in QSAR model with 4 areas.

Compound	EC_{50} (mol/mol)	$-\text{Log}EC_{50}$	EC_{50} (mol/mol)	$-\text{Log}EC_{50}$	Deviation
	Experimental		Predicted		
Training set					
3-methylcatechol	0.29	0.54	0.22	0.65	0.07
Catechol	0.21	0.68	0.30	0.52	-0.09
Chlorogenic acid	0.39	0.41	0.55	0.26	-0.16
Ferulic acid	0.93	0.03	0.60	0.22	0.33
Hydroquinone	0.52	0.29	0.63	0.20	-0.11
L-ascorbic acid	0.21	0.68	0.19	0.71	0.02
Propyl gallate	0.08	1.08	0.08	1.09	0.00
Protocatechuic acid	0.62	0.21	0.62	0.21	0.00
Pyrogallol	0.17	0.78	0.25	0.60	-0.08
Quercetin	0.29	0.53	0.23	0.63	0.06
Rosmarinic acid	0.18	0.74	0.18	0.75	0.00
Validation set					
Epicatechin	0.22	0.67	0.32	0.50	-0.10
Gallic acid	0.10	0.98	0.21	0.67	-0.11

The fact that the 10 areas model presents a better regression than the 4 areas model seems to indicate that a thinner partition of the σ -profile allows a greater correlation between the descriptors, based on the said profile, with the antioxidant activity. In addition, this partition has a chemical-physical sense behind it that allows, in a rough way, to relate each area to a part of the structure of the molecule. While in the 4-area model all partitions are significant, when the σ profile is divided into 10 segments, the model suggests that the most influential partitions are those related to the neutral regions of the molecules. As already seen, these areas take part in the delocalization and therefore in the stabilization of the free electron formed by abstracting an H. In any case, although the model fits well the

data, it must be taken into account that the training set is really very small and the results provide only a clue that should be ascertained with a more extensive database.

Table 5. Experimental and predicted values of EC_{50} and their logarithms for each compound used in QSAR model with 10 areas.

Compound	EC_{50} (mol/mol)	$-\text{Log}EC_{50}$	EC_{50} (mol/mol)	$-\text{Log}EC_{50}$	Deviation
	Experimental		Predicted		
Training set					
3-methylcatechol	0.29	0.54	0.24	0.62	0.05
Catechol	0.21	0.68	0.25	0.61	−0.04
Chlorogenic acid	0.39	0.41	0.39	0.41	0.00
Ferulic acid	0.93	0.03	0.93	0.03	−0.01
Hydroquinone	0.52	0.29	0.39	0.41	0.13
L-ascorbic acid	0.21	0.68	0.24	0.62	−0.03
Propyl gallate	0.08	1.08	0.08	1.09	0.00
Protocatechuic acid	0.62	0.21	0.51	0.29	0.10
Pyrogallol	0.17	0.78	0.22	0.66	−0.05
Quercetin	0.29	0.53	0.30	0.52	−0.01
Rosmarinic acid	0.18	0.74	0.18	0.75	0.00
Validation set					
Epicatechin	0.22	0.67	0.10	1.01	0.12
Gallic acid	0.10	0.98	0.20	0.7	−0.10

3. Material and Methods

3.1. Plant Material

Dried sage leaves (*S. officinalis*) were purchased from a national supplier, Josenea Bio, in Pamplona (Spain). The plant was ground and sieved with a vibratory sieve shaker (CISA model BA 300N, Barcelona, Spain), and the particle size was adjusted to a normal distribution, being the average diameter approximately 0.5 mm. This average diameter was calculated according to ASAE S319.3 from the American National Standards Institute [97]. The moisture content of sage leaves, determined 10 times (*Sartorius* model MA 40 Moisture Analyzer, Goettingen, Germany) was 15.77 ± 0.96 wt.%.

3.2. Chemicals and Reagents

The solvents used in SFE, maceration and SAF were CO_2 (Carbueros Metálicos 99.9%, Zaragoza, Spain) and ethanol (VWR Chemicals, 99.9%, Barcelona, Spain). The HPLC-PDA mobile phase solvents were ethanol (PanReac AppliChem 99.9%, Barcelona, Spain), water (MilliQ 18.2 M Ω ·cm, Zaragoza, Spain), formic acid (PanReac AppliChem 98%, Barcelona, Spain) and acetonitrile (Scharlau 99.9%, Barcelona, Spain). The HPLC-PDA standards used were rosmarinic acid (Sigma-Aldrich $\geq 98\%$, Madrid, Spain), caffeic acid (Sigma-Aldrich $\geq 98\%$, Madrid, Spain) and chlorogenic acid (European Pharmacopoeia Reference Standard 97.1%, Madrid, Spain).

3.3. Supercritical CO_2 Extraction (SFE)

Defatting with sc- CO_2 of the plant material was performed in a laboratory scale plant from Waters (model SFE-1000F-2-FMC10 System, PA, USA) whose scheme is represented in Figure 5. Its main parts are a 1 L extraction vessel or extractor (E) and two 0.5 L collectors (C1, C2), which are jacketed to be maintained at a constant temperature. CO_2 from a bottle is kept liquid with a cooling bath (CB), and pumped by a pump (P2) through a heat exchanger (HE), that ensures it is above the critical temperature, into E. Temperatures, pressure in E and CO_2 flow rate are automatically controlled. Pressure in the collectors is controlled by means of their respective manual back pressures (MBPR).

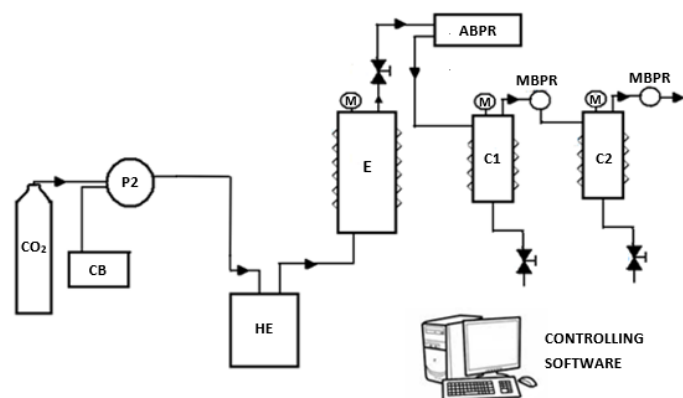


Figure 5. Scheme of the laboratory scale pilot plant. CO₂ reservoir (R), cooling bath (CB), CO₂ pump (P), heat exchanger (HE), extractor (E), collector 1 (C1), collector 2 (C2), automatic back pressure regulator (ABPR), manual back pressure regulator (MBPR), temperature and pressure gauges (M).

For each extraction, 100 g of plant material were loaded in the extractor along with 200 g of inert glass beads in order to obtain a better contact CO₂-solid and facilitate the extraction process. CO₂ was pumped until a pressure of 350 bar and a temperature of 40 °C were reached in E. Once the pressure and the temperatures were stable, the flow was stopped and a static stage (maceration) started. After 30 min, a dynamic stage of another 30 min began in which sc-CO₂ was pumped with a flow of 60 g/min and passed through E to C1 and C2. Pressure and temperature were 90 bar and 45 °C in C1 and 30 bar and 30 °C in C2. The complete extraction process consisted of 4 static-dynamic cycles. The extracts were collected from the collectors after the total depressurization of the machine and the plant material was removed from the extractor and stored in a freezer until further maceration.

3.4. Maceration and Supercritical Antisolvent Fractionation (SAF) Processes

In total, 300 g of plant material, previously defatted with SFE, were macerated in 3 L absolute ethanol for 48 h at room temperature (25 °C). The solvent was removed with a rotatory evaporator (Büchi R-200, Flawil, Switzerland) to obtain the dry extract. This solvent-free extract was dissolved again in ethanol at 3% (wt.%) to prepare the feed solution (FS) for the SAF experiments. A laboratory scale plant was used to carry out the SAF experiments (Waters, PA, USA). The device was previously described [25], and its main components being a CO₂ pump (P-SCF), a FS pump (P-LIQ), a 0.5 L precipitation vessel (PV) and a downstream vessel (DV). Pressure in PV, temperatures and flow rates of both CO₂ and FS can be automatically controlled.

Several experimental parameters were fixed according to previous experience of the group: temperature in PV, studied on earlier works where it was seen that it has little relevance [24,25], was 40 °C to avoid thermal degradation of the compounds and FS flow rate was 0.45 mL/min. The FS concentration of 3% (wt.%) leads to a CO₂ molar fraction which ensures the supercritical state of the mixture (CO₂ + ethanol) at the operational conditions for all of the experiments [24]. The pressure in PV and the CO₂ flow rate were varied (80–160 bar and 10–60 g/min, respectively).

A SAF experiment started by flowing supercritical CO₂ through the plant. Once the selected conditions of pressure and temperature as well as of CO₂ flow rate in PV and DV were stabilised, the FS, previously filtered through Cellulose Acetate 0.22 µm pore size filter, was pumped into the PV through an injector (nozzle Ø = 100 µm). Then, the insoluble compounds in the (CO₂ + ethanol) mixture precipitate in PV while those compounds which remain soluble, were collected in DV. After FS has been completely passed through, 30 mL of pure ethanol were pumped to wash the remaining FS from the pipes, then only CO₂ is pumped to remove ethanol from the solid precipitated in PV.

3.5. HPLC Analysis

Samples of FS as well as of PV and DV fractions were collected for their analysis with HPLC-PDA on a HPLC (Waters® Alliance 2695, Milford, MA, USA) with a PDA (Waters® 2998, MA, USA) detector. A CORTECS® C18 2.7 μm (4.6 \times 150 mm) (Waters®, MA, USA) with a pre-column CORTECS® Pre-column VanGuard C18 2.7 μm (2.1 \times 5 mm) (Waters®, MA, USA) were used. A gradient with the following solvents (A) 0.1% formic acid in Milli-Q water, (B) Milli-Q water and (C) acetonitrile, was used for the separation of the compounds. The gradient elution applied was: 10% A, 90–40% B, 0–50% C (0–15 min); 10% A, 40–10% B, 50–80% C (15–20 min), 10% A, 10–90% B, 80–0% C (20–25 min) and 10% A, 90% B, 0% C (25–30 min). The flow rate was 0.8 mL/min, the temperature was 30 °C and the detection wavelength was fixed at 324 nm. A total of approximately 100 ppm of each sample solution was filtered through a GH Polypropylene membrane ACRODISC 13 mm pore size 0.2 μm filter (Waters®, MA, USA). CHA, CAF and RA standards were run under the same chromatographic conditions. Retention times for each compound were 6.94 min, 7.98 min and 10.79 min, respectively, as can be observed in Figure 6. The analyses were performed in triplicate.

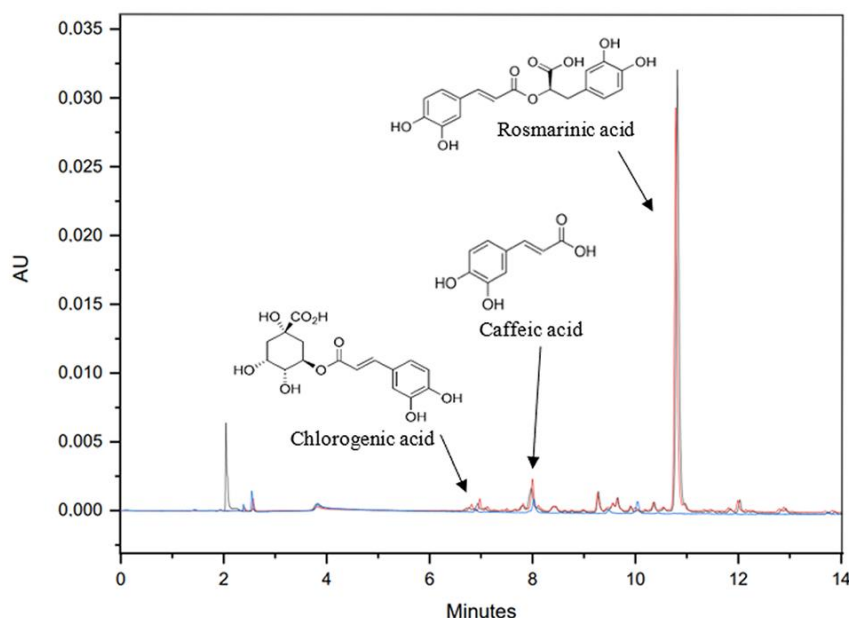


Figure 6. Chromatogram. Peak 1 CHA ($T_R = 6.94$ min, $\lambda = 324$ nm), peak 2 CAF ($T_R = 7.98$ min, $\lambda = 324$ nm) and peak 3 RA ($T_R = 10.79$ min, $\lambda = 324$ nm). PV fraction line red, DV fraction line black, FS fraction line blue.

3.6. Experimental Design and Statistical Analysis

Minitab® 18, Coventry, UK software was used to carry out a response surface methodology (RSM) based on central composite design (CCD) and provided 13 random experiments with five replicates in the central conditions according to the range levels of the two independent variables selected, as shown in Table 6. *Minitab*® 18 was also used to determine the values of each coefficient, β , in the model, Equation (8), as well as the significance of each term in Equation (8) (a term is considered significant if $p < 0.05$) and the optimal conditions for the maximum overall recovery yield and maximum bioactive compound (RA, CAF and CHA) enrichment.

Table 6. Codification and levels of the two independent variables for the factorial design of SAF experiments.

Variable	Symbol	Factor Levels				
		{−1.44	−1	0	1	1.44}
Pressure (bar)	X_P	80	92	120	148	160
CO ₂ flow rate (g/min)	$X_{Q_{CO_2}}$	10	17	35	53	60

3.7. QSAR Calculations

The structural descriptors for the molecules of pure compounds derived from their 2D σ -profiles of the molecules are obtained through COSMO-RS. The pre-optimized three-dimensional chemical structures of the compounds were obtained from the PubChem database. Those structures were refined using Gaussian 9.0 version with a DFT parametrization bvp86/dga1 and then COSMO-RS was used to generate the σ -profiles of the compounds. That parametrization was selected because he complies with the severe constraints imposed by the subsequent use of COSMO-RS to obtain the σ -profiles [98]. Then, σ -profiles were divided in several intervals and descriptors were defined as the areas under the σ -profile curve for each interval. The relationship between descriptors and antioxidant activity is described through a Multiple Linear Regression carried out by the *Minitab*[®] 18 software.

4. Conclusions

In this work, *Salvia officinalis* leaves were defatted by means of CO₂ supercritical fluid extraction (SFE), then macerated in ethanol, being the yields of these processes 4.9% and 10.9%, respectively. Then the influence of pressure, which was set between 80 and 160 bar, and CO₂ flow rate, which was set between 10 and 60 g/min, was studied for CO₂ supercritical antisolvent fractionation (SAF) in a series of experiments designed through a response surface methodology (RMS) based on central composite design (CCD). Temperature and feed solution flow rate were kept constant (40 °C and 0.45 mL/min, respectively).

Overall recovery yields up to 85.1% were reached, obtaining a significantly higher percentage in the precipitation vessel (53.0–64.8%) than in the downstream vessel (7.1–28.5%). Chlorogenic acid and caffeic acid were mostly retained in the precipitation vessel fraction and the rosmarinic acid precipitated exclusively in this fraction. Then, a fine powder was obtained in the precipitation vessel, a powder highly enriched in antioxidants and free of organic solvents, with potential applications in the cosmetic, food or pharmaceutical industries. Statistical analysis of data leads to the prediction that optimal overall yield and enrichments can be simultaneously reached working at the conditions of 148 bar of pressure and 10 g/min of CO₂ flow rate (composite desirability = 1.000). In view of these results and taking into account the complexity of the process, it should be noted the importance of the phenomena of supersaturation and solubility that constitute the driving force of the precipitation process. These, together with other secondary processes (macro-, meso- and micro-mixings, nucleation processes, aggregation and breakage) are of great importance for a possible industrial scaling of the process.

With respect to the preliminary attempt at a proposed QSAR model for the antioxidant activity, based on the division of σ -profiles provided by COSMO-RS when comparing the 4 areas model with the 10 areas model, the second presents better statistical results. The significant areas (S_4 – S_7) indicate that the neutral zones of the molecule influence the antioxidant activity because they allow delocalization and therefore stabilization of the free electron formed by abstracting an H atom. The 10 areas model could become a promising tool with which it would be possible to estimate the antioxidant activity of pure compounds. However, a training data set including much more compounds is needed to ascertain this possibility. This would require the determination of the antioxidant activity, now lacking, of many pure compounds present in vegetable extracts as well as the use for that purpose of standardized methods of measuring and ways of expressing the antioxidant activity.

In view of the results achieved, it can be concluded that QSAR-COSMO-RS model, the advanced separation technologies and the experimental design used have been efficient tools for a screening and sustainable concentration of extracts enriched in antioxidants of interest.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22179351/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, Resources, Supervision, Project administration and Funding acquisition, A.M.M. and J.S.U.; Methodology and software, R.M. and A.M.M.; Validation, A.M.M.; Formal analysis, R.M.; Investigation, R.M. and A.M.M.; Data curation, R.M., J.I.P., M.R.P.-O. and A.M.M.; Writing—original draft preparation, R.M.; Writing—review and editing, R.M., J.I.P., M.R.P.-O., J.S.U. and A.M.M.; Visualization, J.I.P., M.R.P.-O. and A.M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Authors give thanks to EFA188/16/SPAGYRIA (Este proyecto está cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)) and Gobierno de Aragón: Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento (Group E39_20R).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors acknowledge generous allocations of computer time in Hermes Cluster from the Aragon Institute for Engineering Research (I3A)—University of Zaragoza. The authors thanks to T.V. and E.L. their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Reddy, D.N. *Essential Oils Extracted from Medicinal Plants and Their Applications*; Akhtar, M.S., Swamy, M.K., Sinniah, U.R., Eds.; Springer: Singapore, 2019; pp. 237–283. ISBN 9789811371547.
2. Jugreet, B.S.; Suroowan, S.; Rengasamy, R.R.K.; Mahomoodally, M.F. Chemistry, Bioactivities, Mode of Action and Industrial Applications of Essential Oils. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *101*, 89–105. [CrossRef]
3. Carpena, M.; Nunez-Estevez, B.; Soria-Lopez, A.; Garcia-Oliveira, P.; Prieto, M.A. Essential Oils and Their Application on Active Packaging Systems: A Review. *Resources* **2021**, *10*, 7. [CrossRef]
4. Reverchon, E.; De Marco, I. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Natural Matter. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *38*, 146–166. [CrossRef]
5. Nagavekar, N.; Dubey, K.; Sharma, A.; Singhal, R.S. 2.41—Supercritical Extraction of Valued Components from Animals Parts. In *Innovative Food Processing Technologies*; Elsevier: Oxford, UK, 2021; pp. 597–619. ISBN 978-0-12-815782-4.
6. Giacometti, J.; Bursać Kovačević, D.; Putnik, P.; Gabrić, D.; Bilušić, T.; Krešić, G.; Stulić, V.; Barba, F.J.; Chemat, F.; Barbosa-Cánovas, G.; et al. Extraction of Bioactive Compounds and Essential Oils from Mediterranean Herbs by Conventional and Green Innovative Techniques: A Review. *Food Res. Int.* **2018**, *113*, 245–262. [CrossRef] [PubMed]
7. Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibanez, E. Sub- and Supercritical Fluid Extraction of Functional Ingredients from Different Natural Sources: Plants, Food-by-Products, Algae and Microalgae A Review. *Food Chem.* **2006**, *98*, 136–148. [CrossRef]
8. Casas, L.; Mantell, C.; Rodríguez, M.; Torres, A.; Macías, F.A.; Martínez de la Ossa, E. Extraction of Natural Compounds with Biological Activity from Sunflower Leaves Using Supercritical Carbon Dioxide. *Chem. Eng. J.* **2009**, *152*, 301–306. [CrossRef]
9. Coelho, J.P.; Cristino, A.F.; Matos, P.G.; Rauter, A.P.; Nobre, B.P.; Mendes, R.L.; Barroso, J.G.; Mainar, A.; Urieta, J.S.; Fareleira, J.M.N.A.; et al. Extraction of Volatile Oil from Aromatic Plants with Supercritical Carbon Dioxide: Experiments and Modeling. *Molecules* **2012**, *17*, 10550–10573. [CrossRef]
10. Rebolleda, S.; Rubio, N.; Beltrán, S.; Sanz, M.T.; González-Sanjosé, M.L. Supercritical Fluid Extraction of Corn Germ Oil: Study of the Influence of Process Parameters on the Extraction Yield and Oil Quality. *J. Supercrit. Fluids* **2012**, *72*, 270–277. [CrossRef]
11. Langa, E.; Cacho, J.; Palavra, A.M.F.; Burillo, J.; Mainar, A.M.; Urieta, J.S. The Evolution of Hyssop Oil Composition in the Supercritical Extraction Curve. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *49*, 37–44. [CrossRef]
12. Langa, E.; Porta, G.D.; Palavra, A.M.F.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Supercritical Fluid Extraction of Spanish Sage Essential Oil: Optimization of the Process Parameters and Modelling. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *49*, 174–181. [CrossRef]
13. Martín, L.; Mainar, A.M.; González-Coloma, A.; Burillo, J.; Urieta, J.S. Supercritical Fluid Extraction of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *56*, 64–71. [CrossRef]
14. Martín, L.; González-Coloma, A.; Díaz, C.E.; Mainar, A.M.; Urieta, J.S. Supercritical CO₂ Extraction of *Persea indica*: Effect of Extraction Parameters, Modelling and Bioactivity of Its Extracts. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *57*, 120–128. [CrossRef]

15. García-Abarrio, S.M.; Martín, L.; Burillo, J.; Porta, G.D.; Mainar, A.M. Supercritical Fluid Extraction of Volatile Oil from *Lippia alba* (Mill.) Cultivated in Aragón (Spain). *J. Supercrit. Fluids* **2014**, *94*, 206–211. [[CrossRef](#)]
16. Trabelsi, D.; Aydi, A.; Zibetti, A.W.; Della Porta, G.; Scognamiglio, M.; Cricchio, V.; Langa, E.; Abderrabba, M.; Mainar, A.M. Supercritical Extraction from *Citrus aurantium amara* Peels Using CO₂ with Ethanol as Co-Solvent. *J. Supercrit. Fluids* **2016**, *117*, 33–39. [[CrossRef](#)]
17. Micic, V.; Lepojević, Ž.; Jotanoviaæ, M.; Tadić, G.; Pejovic, B. Supercritical Extraction of *Salvia officinalis* L. *J. Appl. Sci.* **2011**, *11*, 3630–3634. [[CrossRef](#)]
18. Arranz, E.; Jaime, L.; Lopez de la Hazas, M.C.; Vicente, G.; Reglero, G.; Santoyo, S. Supercritical Sage Extracts as Anti-Inflammatory Food Ingredients. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, *54*, 159–166. [[CrossRef](#)]
19. Micic, V.; Suzana, Y.; Damjanovic, V.; Chan, Y. Kinetic Modeling of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Sage (*Salvia officinalis* L.) Leaves and *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) Seeds. *J. Supercrit. Fluids* **2015**, *100*, 18. [[CrossRef](#)]
20. Jokic, S.; Molnar, M.; Jakovljevic, M.; Aladic, K.; Jerkovic, I. Optimization of Supercritical CO₂ Extraction of *Salvia officinalis* L. Leaves Targeted on Oxygenated Monoterpenes, Alpha-Humulene, Viridiflorol and Manool. *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *133*, 253–262. [[CrossRef](#)]
21. Pavic, V.; Jakovljevic, M.; Molnar, M.; Jokic, S. Extraction of Carnosic Acid and Carnosol from Sage (*Salvia officinalis* L.) Leaves by Supercritical Fluid Extraction and Their Antioxidant and Antibacterial Activity. *Plants* **2019**, *8*, 16. [[CrossRef](#)]
22. Temerdashev, Z.A.; Milevskaya, V.V.; Ryabokon, L.P.; Latin, N.N.; Kiseleva, N.V.; Nagalevskii, M.V. Identification and Determination of the Components of Garden Sage (*Salvia officinalis* L.) Essential Oil, Isolated by Different Extraction Methods. *J. Anal. Chem.* **2020**, *75*, 1451–1460. [[CrossRef](#)]
23. Gimenez-Rota, C.; Langa, E.; Urieta, J.S.; Hernaiz, M.J.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Fractionation of Antioxidant Compounds from *Lavandula luisieri* (Rozeira) Riv.-Mart. *J. Supercrit. Fluids* **2020**, *161*, 104821. [[CrossRef](#)]
24. Martín, L.; Gonzalez-Coloma, A.; Adami, R.; Scognamiglio, M.; Reverchon, E.; Della Porta, G.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Fractionation of Ryanodol from *Persea indica*. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *60*, 16–20. [[CrossRef](#)]
25. Marques, J.L.; Della Porta, G.; Reverchon, E.; Renuncio, J.A.R.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Extraction of Antioxidants from Grape Seeds after Vinification. *J. Supercrit. Fluids* **2013**, *82*, 238–243. [[CrossRef](#)]
26. Langa, E.; Pardo, J.I.; Gimenez-Rota, C.; Gonzalez-Coloma, A.; Hernaiz, M.J.; Mainar, A.M. Supercritical Anti-Solvent Fractionation of *Artemisia absinthium* L. Conventional Extracts: Tracking Artemetin and Casticin. *J. Supercrit. Fluids* **2019**, *151*, 15–23. [[CrossRef](#)]
27. Ganán, N.; Brignole, E.A. Supercritical Carbon Dioxide Fractionation of *T. Minuta* and *S. Officinalis* Essential Oils: Experiments and Process Analysis. *J. Supercrit. Fluids* **2013**, *78*, 12–20. [[CrossRef](#)]
28. Sovova, H. Mathematical Model for Supercritical Fluid Extraction of Natural Products and Extraction Curve Evaluation. *J. Supercrit. Fluids* **2005**, *33*, 35–52. [[CrossRef](#)]
29. Werling, J.O.; Debenedetti, P.G. Numerical Modeling of Mass Transfer in the Supercritical Antisolvent Process: Miscible Conditions. *J. Supercrit. Fluids* **2000**, *18*, 11–24. [[CrossRef](#)]
30. Cardoso, M.A.T.; Cabral, J.M.S.; Palavra, A.M.F.; Geraldés, V. CFD Analysis of Supercritical Antisolvent (SAS) Micronization of Minocycline Hydrochloride. *J. Supercrit. Fluids* **2008**, *47*, 247–258. [[CrossRef](#)]
31. Teresa Fernandez-Ponce, M.; Masmoudi, Y.; Djerafi, R.; Casas, L.; Mantell, C.; Martínez de la Ossa, E.; Badens, E. Particle Design Applied to Quercetin Using Supercritical Anti-Solvent Techniques. *J. Supercrit. Fluids* **2015**, *105*, 119–127. [[CrossRef](#)]
32. Prosapio, V.; Reverchon, E.; De Marco, I. Coprecipitation of Polyvinylpyrrolidone/Beta-Carotene by Supercritical Antisolvent Processing. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2015**, *54*, 11568–11575. [[CrossRef](#)]
33. Oliveira, D.A.; Mezzomo, N.; Gomes, C.; Ferreira, S.R.S. Encapsulation of Passion Fruit Seed Oil by Means of Supercritical Antisolvent Process. *J. Supercrit. Fluids* **2017**, *129*, 96–105. [[CrossRef](#)]
34. Ozkan, G.; Franco, P.; Capanoglu, E.; De Marco, I. PVP/Flavonoid Coprecipitation by Supercritical Antisolvent Process. *Chem. Eng. Process.* **2019**, *146*, 107689. [[CrossRef](#)]
35. Walker, J.B.; Sytsma, K.J.; Treutlein, J.; Wink, M. *Salvia* (Lamiaceae) Is Not Monophyletic: Implications for the Systematics, Radiation, and Ecological Specializations of *Salvia* and Tribe Mentheae. *Am. J. Bot.* **2004**, *91*, 1115–1125. [[CrossRef](#)]
36. European Medicines Agency. European Union Herbal Monograph on *Salvia officinalis* L., Folium. *Off. J. Eur. Union* **2016**, *44*, 8.
37. El Euch, S.K.; Hassine, D.B.; Cazaux, S.; Bouzouita, N.; Bouajila, J. *Salvia officinalis* Essential Oil: Chemical Analysis and Evaluation of Anti-Enzymatic and Antioxidant Bioactivities. *S. Afr. J. Bot.* **2019**, *120*, 253–260. [[CrossRef](#)]
38. Khiya, Z.; Hayani, M.; Gamar, A.; Kharchouf, S.; Amine, S.; Berrekhis, F.; Bouzoubae, A.; Zair, T.; El Hilali, F. Valorization of the *Salvia officinalis* L. of the Morocco Bioactive Extracts: Phytochemistry, Antioxidant Activity and Corrosion Inhibition. *J. King Saud Univ. Sci.* **2019**, *31*, 322–335. [[CrossRef](#)]
39. Moreira, M.R.; Souza, A.B.; Moreira, M.A.; Bianchi, T.C.; Carneiro, L.J.; Estrela, F.T.; dos Santos, R.A.; Januario, A.H.; Martins, C.H.G.; Ambrosio, S.R.; et al. RP-HPLC Analysis of Manool-Rich *Salvia officinalis* Extract and Its Antimicrobial Activity against Bacteria Associated with Dental Caries. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.* **2013**, *23*, 870–876. [[CrossRef](#)]
40. Wei, Z.-F.; Zhao, R.-N.; Dong, L.-J.; Zhao, X.-Y.; Su, J.-X.; Zhao, M.; Li, L.; Bian, Y.-J.; Zhang, L.-J. Dual-Cooled Solvent-Free Microwave Extraction of *Salvia officinalis* L. Essential Oil and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *120*, 71–76. [[CrossRef](#)]

41. Russo, A.; Formisano, C.; Rigano, D.; Senatore, F.; Delfine, S.; Cardile, V.; Rosselli, S.; Bruno, M. Chemical Composition and Anticancer Activity of Essential Oils of Mediterranean Sage (*Salvia officinalis* L.) Grown in Different Environmental Conditions. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 42–47. [CrossRef]
42. Pedro, D.F.N.; Ramos, A.A.; Lima, C.F.; Baltazar, F.; Pereira-Wilson, C. Colon Cancer Chemoprevention by Sage Tea Drinking: Decreased DNA Damage and Cell Proliferation. *Phytother. Res.* **2016**, *30*, 298–305. [CrossRef]
43. Abad, A.N.A.; Nouri, M.H.K.; Tavakkoli, F. Effect of *Salvia officinalis* Hydroalcoholic Extract on Vincristine-Induced Neuropathy in Mice. *Chin. J. Nat. Med.* **2011**, *9*, 354–358. [CrossRef]
44. Miroddi, M.; Navarra, M.; Quattropiani, M.C.; Calapai, F.; Gangemi, S.; Calapai, G. Systematic Review of Clinical Trials Assessing Pharmacological Properties of *Salvia* Species on Memory, Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *CNS Neurosci. Ther.* **2014**, *20*, 485–495. [CrossRef]
45. European Chemical Agency. Sage, *Salvia Officinalis*, ext.—Substance Information—ECHA. Available online: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.074.545> (accessed on 7 December 2020).
46. European Commission. CosIng, *Salvia Officinalis* Extract. Available online: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=80200 (accessed on 7 December 2020).
47. Vosoughi, N.; Gomarian, M.; Pirbalouti, A.G.; Khaghani, S.; Malekpoor, F. Essential Oil Composition and Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extract under Chitosan Application and Irrigation Frequencies. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *117*, 366–374. [CrossRef]
48. Ivanovic, J.; Dilas, S.; Jadranin, M.; Vajs, V.; Babovic, N.; Petrovic, S.; Zizovic, I. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Antioxidants from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Serb. Chem. Soc.* **2009**, *74*, 717–732. [CrossRef]
49. Glisic, S.; Ivanovic, J.; Ristic, M.; Skala, D. Extraction of Sage (*Salvia officinalis* L.) by Supercritical CO₂: Kinetic Data, Chemical Composition and Selectivity of Diterpenes. *J. Supercrit. Fluids* **2010**, *52*, 62–70. [CrossRef]
50. Menaker, A.; Kravets, M.; Koel, M.; Orav, A. Identification and Characterization of Supercritical Fluid Extracts from Herbs. *Comptes Rendus Chim.* **2004**, *7*, 629–633. [CrossRef]
51. Babovic, N.; Djilas, S.; Jadranin, M.; Vajs, V.; Ivanovic, J.; Petrovic, S.; Zizovic, I. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Antioxidant Fractions from Selected *Lamiaceae* Herbs and Their Antioxidant Capacity. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11*, 98–107. [CrossRef]
52. Baldyga, J. Mixing and Fluid Dynamics Effects in Particle Precipitation Processes. *KONA Powder Part. J.* **2016**, 127–149. [CrossRef]
53. Al-matar, A.; Sweis, F.K. Thermodynamics of Supercritical Fluid Extraction of Some Dyes and Pharmaceutical Compounds Using the Weighting Matrix Approach. *Chem. Prod. Process. Model.* **2010**, *5*, 1422. [CrossRef]
54. Davarnejad, R.; Kassim, K.M.; Zainal, A.; Sata, S.A. Thermodynamic Model Used to Predict Supercritical Carbon Dioxide Separation of an Ethanol-Octane Mixture: Feasibility Studies. *Int. J. Thermodyn.* **2009**, *12*, 51–59. [CrossRef]
55. Wang, M.F.; Li, J.G.; Rangarajan, M.; Shao, Y.; LaVoie, E.J.; Huang, T.C.; Ho, C.T. Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4869–4873. [CrossRef]
56. Lu, Y.; Foo, L.Y. Rosmarinic Acid Derivatives from *Salvia Officinalis*. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 91–94. [CrossRef]
57. Nicolai, M.; Pereira, P.; Vitor, R.F.; Reis, C.P.; Roberto, A.; Rijo, P. Antioxidant Activity and Rosmarinic Acid Content of Ultrasound-Assisted Ethanolic Extracts of Medicinal Plants. *Measurement* **2016**, *89*, 328–332. [CrossRef]
58. Sulniute, V.; Pukalskas, A.; Venskutonis, P.R. Phytochemical Composition of Fractions Isolated from Ten *Salvia* Species by Supercritical Carbon Dioxide and Pressurized Liquid Extraction Methods. *Food Chem.* **2017**, *224*, 37–47. [CrossRef]
59. Roby, M.H.H.; Sarhan, M.A.; Selim, K.A.-H.; Khalel, K.I. Evaluation of Antioxidant Activity, Total Phenols and Phenolic Compounds in Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Marjoram (*Origanum majorana* L.) Extracts. *Ind. Crop. Prod.* **2013**, *43*, 827–831. [CrossRef]
60. Urbaniak, A.; Kujawski, J.; Czaja, K.; Szlag, M. Antioxidant Properties of Several Caffeic Acid Derivatives: A Theoretical Study. *Comptes Rendus Chim.* **2017**, *20*, 1072–1082. [CrossRef]
61. Agunloye, O.M.; Oboh, G.; Ademiluyi, A.O.; Ademosun, A.O.; Akindahunsi, A.A.; Oyagbemi, A.A.; Omobowale, T.O.; Ajibade, T.O.; Adedapo, A.A. Cardio-Protective and Antioxidant Properties of Caffeic Acid and Chlorogenic Acid: Mechanistic Role of Angiotensin Converting Enzyme, Cholinesterase and Arginase Activities in Cyclosporine Induced Hypertensive Rats. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *109*, 450–458. [CrossRef]
62. Klamt, A. Conductor-Like Screening Model for Real Solvents—A New Approach to the Quantitative Calculation of Solvation Phenomena. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 2224–2235. [CrossRef]
63. Klamt, A. COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics. In *28th European Symposium on Computer Aided Process Engineering*; Friedl, A., Klimes, J.J., Radl, S., Varbanov, P.S., Wallek, T., Eds.; Elsevier Science BV: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 43, pp. 9–10. ISBN 978-0-444-64235-6.
64. Palomar, J.; Torrecilla, J.S.; Ferro, V.R.; Rodriguez, F. Development of an a Priori Ionic Liquid Design Tool. 2. Ionic Liquid Selection through the Prediction of COSMO-RS Molecular Descriptor by Inverse Neural Network. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 2257–2265. [CrossRef]
65. Lemaoui, T.; Hammoudi, N.E.H.; Alnashef, I.M.; Balsamo, M.; Erto, A.; Ernst, B.; Benguerba, Y. Quantitative Structure Properties Relationship for Deep Eutectic Solvents Using S Sigma-Profile as Molecular Descriptors. *J. Mol. Liq.* **2020**, *309*, 113165. [CrossRef]

66. Zhao, Y.; Huang, Y.; Zhang, X.; Zhang, S. A Quantitative Prediction of the Viscosity of Ionic Liquids Using S Sigma-Profile Molecular Descriptors. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 3761–3767. [[CrossRef](#)]
67. Benguerba, Y.; Alnashef, I.M.; Erto, A.; Balsamo, M.; Ernst, B. A Quantitative Prediction of the Viscosity of Amine Based DESs Using S Sigma-Profile Molecular Descriptors. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1184*, 357–363. [[CrossRef](#)]
68. Lemaoui, T.; Darwish, A.S.; Hammoudi, N.E.H.; Abu Hatab, F.; Attoui, A.; Alnashef, I.M.; Benguerba, Y. Prediction of Electrical Conductivity of Deep Eutectic Solvents Using COSMO-RS Sigma Profiles as Molecular Descriptors: A Quantitative Structure-Property Relationship Study. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2020**, *59*, 13343–13354. [[CrossRef](#)]
69. Palomar, J.; Torrecilla, J.S.; Lemus, J.; Ferro, V.R.; Rodriguez, F. A COSMO-RS Based Guide to Analyze/Quantify the Polarity of Ionic Liquids and Their Mixtures with Organic Cosolvents. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 1991–2000. [[CrossRef](#)]
70. Gonfa, G.; Bustam, M.A.; Shariff, A.M. Research Quantum-Chemical-Based Quantitative Structure-Activity Relationships for Estimation of CO₂ Absorption/Desorption Capacities of Amine-Based Absorbents. *Int. J. Greenh. Gas Control* **2016**, *49*, 372–378. [[CrossRef](#)]
71. Sellaoui, L.; Soetaredjo, F.E.; Ismadji, S.; Benguerba, Y.; Dotto, G.L.; Bonilla-Petriciolet, A.; Rodrigues, A.E.; Ben Lamine, A.; Erto, A. Equilibrium Study of Single and Binary Adsorption of Lead and Mercury on Bentonite-Alginate Composite: Experiments and Application of Two Theoretical Approaches. *J. Mol. Liq.* **2018**, *253*, 160–168. [[CrossRef](#)]
72. Torrecilla, J.S.; Palomar, J.; Lemus, J.; Rodriguez, F. A Quantum-Chemical-Based Guide to Analyze/Quantify the Cytotoxicity of Ionic Liquids. *Green Chem.* **2010**, *12*, 123–134. [[CrossRef](#)]
73. Mai, N.L.; Koo, Y.-M. Quantitative Prediction of Lipase Reaction in Ionic Liquids by QSAR Using COSMO-RS Molecular Descriptors. *Biochem. Eng. J.* **2014**, *87*, 33–40. [[CrossRef](#)]
74. Ben Ghanem, O.; Mutalib, M.I.A.; El-Harbawi, M.; Gonfa, G.; Kait, C.F.; Alitheen, N.B.M.; Leveque, J.-M. Effect of Imidazolium-Based Ionic Liquids on Bacterial Growth Inhibition Investigated via Experimental and QSAR Modelling Studies. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *297*, 198–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Garcia-Abarrío, S.M.; Haya, L.; Pardo, J.I.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Isobaric VLE of the Mixture {(+/-)-Linalool plus Ethanol}: A Case Study for the Distillation of Absolute and Volatile Oils. *J. Chem. Thermodyn.* **2013**, *64*, 182–186. [[CrossRef](#)]
76. Martínez-López, J.F.; Mainar, A.M.; Urieta, J.S.; Pardo, J.I. Thermophysical Properties of {R-Fenchone plus Ethanol} at Several Temperatures and Pressures. *J. Chem. Thermodyn.* **2014**, *69*, 48–55. [[CrossRef](#)]
77. Martínez-López, J.F.; Pardo, J.I.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Excess Molar Enthalpies of R-Fenchone + Propan-1-ol or + Propan-2-ol. Modeling with COSMO-RS and UNIFAC. *J. Chem. Thermodyn.* **2015**, *89*, 93–97. [[CrossRef](#)]
78. Martínez-López, J.F.; Pardo, J.I.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Excess Molar Enthalpies of R-Fenchone + Butan-1-ol or + Pentan-1-ol. Modeling with COSMO-RS and UNIFAC. *J. Chem. Thermodyn.* **2018**, *120*, 13–20. [[CrossRef](#)]
79. Martínez-López, J.F.; Schneider, S.; Salavera, D.; Mainar, A.M.; Urieta, J.S.; Pardo, J.I. Molar Heat Capacities of the Mixture {1,8-Cineole + Ethanol} at Several Temperatures and Atmospheric Pressure. *J. Chem. Thermodyn.* **2016**, *92*, 146–151. [[CrossRef](#)]
80. Martínez-López, J.F.; Pardo, J.I.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Isobaric Molar Heat Capacities of the Mixture {p-Cymene plus Ethanol} at Several Temperatures and Atmospheric Pressure. *J. Chem. Thermodyn.* **2017**, *111*, 142–148. [[CrossRef](#)]
81. Martínez-López, J.F.; Pardo, J.I.; Liu, S.; Mainar, A.M. Thermophysical and Volumetric Study of Mixtures {p-Cymene + Propan-1-ol} at Several Temperatures and Atmospheric Pressure. Modeling with COSMO-RS. *J. Chem. Thermodyn.* **2018**, *123*, 1–7. [[CrossRef](#)]
82. Martínez-López, J.F.; Pardo, J.I.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Thermophysical and Volumetric Properties of Mixtures {carvacrol plus Ethanol} at Several Temperatures and Atmospheric Pressure. *J. Chem. Thermodyn.* **2020**, *143*, 106042. [[CrossRef](#)]
83. Aleksovski, S.A.; Sovova, H. Supercritical CO₂ Extraction of *Salvia officinalis* L. *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *40*, 239–245. [[CrossRef](#)]
84. Dapekivicius, A.; Venskutonis, R.; van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H. Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from Some Aromatic Herbs Grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 140–146. [[CrossRef](#)]
85. Zibetti, A.W.; Aydi, A.; Livia, M.A.; Bolzan, A.; Barth, D. Solvent Extraction and Purification of Rosmarinic Acid from Supercritical Fluid Extraction Fractionation Waste: Economic Evaluation and Scale-Up. *J. Supercrit. Fluids* **2013**, *83*, 133–145. [[CrossRef](#)]
86. Quintana, S.E.; Villanueva-Bermejo, D.; Reglero, G.; Garcia-Risco, M.R.; Fornari, T. Supercritical Antisolvent Particle Precipitation and Fractionation of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Extracts. *J. CO₂ Util.* **2019**, *34*, 479–489. [[CrossRef](#)]
87. Murga, R.; Sanz, M.T.; Beltrán, S.; Cabezas, J.L. Solubility of Three Hydroxycinnamic Acids in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Supercrit. Fluids* **2003**, *27*, 239–245. [[CrossRef](#)]
88. Bitencourt, R.G.; Palma, A.M.; Coutinho, J.A.P.; Cabral, F.A.; Meirelles, A.J.A. Solubility of Caffeic Acid in CO₂ + Ethanol: Experimental and Predicted Data Using Cubic Plus Association Equation of State. *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *138*, 238–246. [[CrossRef](#)]
89. Marcus, Y. Solubility Parameter of Carbon Dioxide—An Enigma. *ACS Omega* **2018**, *3*, 524–528. [[CrossRef](#)]
90. Wedekind, J.; Hyvarinen, A.-P.; Brus, D.; Reguera, D. Unraveling the “Pressure Effect” in Nucleation. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 125703. [[CrossRef](#)]
91. Ghanem, O.B.; Mutalib, M.I.A.; Leveque, J.-M.; El-Harbawi, M. Development of QSAR Model to Predict the Ecotoxicity of *Vibrio Fischeri* Using COSMO-RS Descriptors. *Chemosphere* **2017**, *170*, 242–250. [[CrossRef](#)]
92. Klamt, A.; Eckert, F.; Hornig, M. COSMO-RS: A Novel View to Physiological Solvation and Partition Questions. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2001**, *15*, 355–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

93. Xie, J.; Schaich, K.M. Re-Evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4251–4260. [[CrossRef](#)]
94. Haya, L.; Mainar, A.M.; Pardo, J.I.; Urieta, J.S. A New Generation of Cysteine Derivatives with Three Active Antioxidant Centers: Improving Reactivity and Stability. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 1409–1414. [[CrossRef](#)]
95. Tropsha, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol. Inf.* **2010**, *29*, 476–488. [[CrossRef](#)]
96. Cao, H.; Cheng, W.X.; Li, C.; Pan, X.L.; Xie, X.G.; Li, T.H. DFT Study on the Antioxidant Activity of Rosmarinic Acid. *Theochem-J. Mol. Struct.* **2005**, *719*, 177–183. [[CrossRef](#)]
97. Wilcox, R.A.; Deyoe, C.W.; Pfoest, H.B. A Method for Determining and Expressing the Size of Feed Particles by Sieving. *Poult. Sci.* **1970**, *49*, 9–13. [[CrossRef](#)]
98. Dassault Systemes. *Reference Manual Biovia Cosmotherm 2020*; Dassault Systemes: Vélizy-Villacoublay, France, 2019; p. 233.



Article

Concentration of Antioxidant Compounds from *Calendula officinalis* through Sustainable Supercritical Technologies, and Computational Study of Their Permeability in Skin for Cosmetic Use

Raquel Mur ¹, Elisa Langa ², M. Rosa Pino-Otín ², José S. Urieta ¹ and Ana M. Mainar ^{1,*}

¹ GATHERS Group, Aragón Institute of Engineering Research (I3A), Universidad de Zaragoza, c/. Mariano Esquillor s/n, 50018 Zaragoza, Spain; 649396@unizar.es (R.M.); urieta@unizar.es (J.S.U.)

² Campus Universitario Villanueva de Gállego, Universidad San Jorge, Autovía A-23 Zaragoza-Huesca Km. 299, 50830 Villanueva de Gallego, Spain; elanga@usj.es (E.L.); rpino@usj.es (M.R.P.-O.)

* Correspondence: ammainar@unizar.es; Tel.: +34-976761195

Abstract: The growing interest in the cosmetic industry in using compounds of natural and sustainable origin that are safe for humans is encouraging the development of processes that can satisfy these needs. Chlorogenic acid (CHA), caffeic acid (CAF) and ferulic acid (FA) are three compounds widely used within the cosmetic industry due to their functionalities as antioxidants, collagen modifiers or even as radiation protectors. In this work, two advanced separation techniques with supercritical CO₂ are used to obtain these three compounds from *Calendula officinalis*, and these are then evaluated using a computational skin permeability model. This model is encompassed by the COSMO-RS model, the calculations of which make it possible to study the behaviour of the compounds in the epidermis. The results show that both CAF and FA are retained in the stratum corneum, while CHA manages to penetrate to the stratum spinosum. These compounds were concentrated by antisolvent fractionation with super-critical CO₂ using a Response Surface Methodology to study the effect of pressure and CO₂ flow rate. CHA, CAF and FA were completely retained in the precipitation vessel, with concentrations between 40% and 70% greater than in the original extract. The conditions predicted that the optimal overall yield and enrichment achieved would be 153 bar and 42 g/min.

Keywords: supercritical antisolvent fractionation; ferulic acid; caffeic acid; chlorogenic acid; permeability skin

Citation: Mur, R.; Langa, E.; Pino-Otín, R. M.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Concentration of Antioxidant Compounds from *Calendula officinalis* Through Sustainable Supercritical Technologies, and Computational Study of Their Permeability in Skin for Cosmetic Use. *Antioxidants* **2022**, *11*, 96. <https://doi.org/10.3390/antiox11010096>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 30 November 2021

Accepted: 28 December 2021

Published: 30 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In recent years, there has been great interest in the cosmetic industry, among others, in including compounds of natural and sustainable origin in the formulation of products. This is due to, on the one hand, growing general concern related to the possible harmful effects of synthetic compounds and, on the other hand, awareness regarding the responsible consumption of these sustainable products, causing an increase in their demand. Additionally, the traditional use of plants as natural remedies, or even as cosmetics, makes them ideal candidates from which to obtain compounds that meet these requirements.

Calendula officinalis L., also known as marigold, is an aromatic herbaceous plant that belongs to the genus *Calendula* (*Asteraceae*), native to the Mediterranean countries. This genus includes approximately 25 species, of which *C. officinalis* is the only one used extensively clinically worldwide [1], traditionally as a skin remedy for dermatological problems, such as inflamed skin, redness, minor burns, or ulcers, as well as for acne or fungal

eruptions [2]. Over the years, studies have demonstrated these properties, which have been duly collected in various monographs such as those by the European Scientific Cooperative On Phytotherapy (ESCOP), the European Medicines Agency (EMA) or the World Health Organization (WHO), where wound healing and anti-inflammatory actions stand out [3–5]. In fact, different organizations that control and regulate substances for human consumption, such as the Food and Drug Administration (FDA) or the European Chemicals Agency (ECHA), have several guidelines to regulate extracts obtained from *C. officinalis* (Directive 2004/24/EC, CFR Title 21 from FDA, etc.). They also have Chemical Abstracts Service (CAS) registry numbers (84776-23-8/70892-20-5) and European Inventory of Existing Commercial chemical substances (EINEC) numbers (283-949-5/615-192-7). Regarding cosmetic use, *C. officinalis* is especially valuable for its assistance in cell rejuvenation, wound healing, inflammation reduction, soothing, and skin softening [6]. According to the EU cosmetic ingredient database, CosIng, the extracts of this plant have several functions as a cosmetic: skin conditioning, emollient, skin protection, fragrance, perfuming, and even flavouring [7–9]. Furthermore, it has been found that calendula oil cream can be used to protect the skin from UV radiation in the form of sunscreen cream and to maintain the natural pigmentation of the skin [10].

The potential bioactivity of *C. officinalis* has so far focused on its composition, which has been studied extensively. Important components of these plants include triterpenic saponins, flavonoids, carotenoids, sesquiterpenoids and polyphenols, among others, responsible for, for example, antimicrobial [2,11], wound and burn healing [12,13], photoprotective [14], anti-inflammatory and analgesic, [15,16] cytotoxic and immunological [17,18], and even neuroprotective [19] and cardiovascular activities [20]. Within the group of polyphenols, ferulic acid (FA), caffeic acid (CAF) and chlorogenic acid (CHA) stand out due to their high antioxidant capacity [21–23], their anti-wrinkle and anti-aging effects [24–26], and the ability to modify collagen properties [27]. Furthermore, a potential role in radiation protection and photooxidation has also been reported [28–30]. All this makes them compounds of great interest for the cosmetic industry, which already has formulations that include them [31], and for this reason they will be the subject of greater interest in this work.

On the other hand, plant extracts are usually obtained using traditional techniques such as hydrodistillation or Soxhlet working at high temperatures, which can cause the degradation of the bioactive compounds of interest. In addition, these are not sustainable processes due to possible environmental contamination and the use of organic solvents that can be harmful to human health. In this regard, the use of advanced separation technologies such as that using supercritical fluids, especially supercritical carbon dioxide (sc-CO₂), is of great interest for the extraction of bioactive compounds from natural sources [32,33]. This is due to its properties, since CO₂ is harmless and non-flammable, and its supercritical conditions (P_c = 74 bar, T_c = 31 °C) are moderate enough to avoid the degradation of compounds [32]. Furthermore, it can be easily removed by reducing the pressure, becoming a gas, which generates a final extract with no residual solvent presence [34].

There are various techniques that work with sc-CO₂. Supercritical fluid extraction (SFE) is one of the most widely used and studied techniques for the extraction of certain compounds like monoterpenes, sesquiterpenes, phenols, etc. [35]. The most studied parameters in this technique are the temperature, pressure, CO₂ flow rate, particle size of the sample, and the use of co-solvents that modify the polarity of CO₂ and allow the extraction of other compounds different from the above-mentioned ones [35,36]. Regarding the extraction of *C. officinalis*, there have been numerous studies applying this technique to obtain compounds such as triterpenoid esters [37], triterpene triols [38], or its essential oil [39,40]. Another promising technique is supercritical antisolvent fractionation (SAF), which makes it possible to precipitate and concentrate bioactive compounds selectively from a solution, while the rest remain dissolved [41]. For this purpose, the solution is pumped and sprayed into a vessel, where it converges with sc-CO₂ in such a way that the

insoluble compounds in this new mixture (solvent + sc-CO₂) precipitate, while the still soluble ones are collected in a second vessel as a dissolution. In this way, two fractions enriched in different compounds are obtained. This technique has been used to obtain fractions rich in compounds of interest having various bioactivities such as biopesticides [42], or antiproliferative [43], antimicrobial [44], or antioxidant activity [45].

Taking into account the above, one of the objectives of this work is to obtain, in a sustainable way and by combining two advanced separation techniques, an extract enriched in antioxidant compounds from *Calendula officinalis*. To do this, first, an extraction with supercritical CO₂ will be carried out to defat the plant material and facilitate obtaining the antioxidant substances. After maceration in ethanol, a study of the influence of pressure (80–160 bar) and of the CO₂ flow rate (10–60 g/min) on the SAF process will be performed. This will be performed using a Response Surface Methodology (RSM) based on Central Composite Design (CCD), which will provide the values for the studied magnitudes and the sequence to follow when doing the experiments. The compounds chosen to be concentrated on were FA, CHA and CAF, due to their antioxidant properties [21–23].

On the other hand, the fact that a compound is of natural or synthetic origin does not affect the possibility that it may have harmful or beneficial effects on people's health, so it is necessary to study its interaction with human tissues. In vivo and in vitro tests are expensive and difficult to perform, in addition to the fact that there are several regulations that strongly recommend or require the use of alternatives to animal studies (EU REACH regulation) or that even prohibit the marketing of cosmetics with ingredients tested on animals (EU Cosmetics Regulation EC 1223/2009) [46]. In this regard, in silico experimentation is of great interest, because it makes the study of the interaction of solutes with biological membranes possible, and therefore, their possible toxicity. There are various predictive models for the bioavailability of solutes based on quantitative structure–permeability relationship (QSPR) models, molecular dynamics (MD) simulation, or mechanistic models derived from first principles such as mass balance, relying on additional assumptions such as Fick's laws of diffusion [47].

In this research framework, in silico research on the interaction of solutes with biomembranes, the study of molecular mechanisms behind skin permeation stands out, since it is a tool that makes it possible to identify inappropriate ingredients that may be dangerous in a cosmetic composition [48,49]. One of the most innovative models is the one proposed by Schwöbel et al. [46] which is based on the use of the Conductor-like Screening model for Real Solvents (COSMO-RS). From the extensions of this model—COSMOperm, COSMOmic and COSMOplex—a computational skin model that makes it possible to calculate the permeability of different compounds in it is generated. This model was applied to study the interaction of the tracked compounds of *C. officinalis*, CHA, CAF, FA, with the skin and thus to calculate their permeabilities.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Calendula officinalis L. flowers were collected from an ecological cultivation in Huesca (Spain) by Valentia, an association where people at risk of social exclusion work. The plant material was dried in a dryer at room temperature. Dried *Calendula* flowers had an 11.29 ± 0.48 wt% humidity content, determined ten times with a Sartorius model MA 40 Moisture Analyzer (Goettingen, Germany). The plant material was ground with an electric grinder and sieved with a vibratory sieve shaker (CISA model BA 300N, Barcelona, Spain). The average diameter of particles was 0.5 mm. This was adjusted to a normal distribution according to ASAE S319.3 from the American National Standards Institute [50].

2.2. Chemicals and Reagents

The CO₂ (99.9%) used in SCE and SAF was purchased from Carbueros Metálicos (Zaragoza, Spain) and ethanol (99.9%) for maceration was obtained from VWR Chemicals (Barcelona, Spain). The solvents used for HPLC analysis were ethanol (PanReac AppliChem 99.9%, Barcelona, Spain), formic acid (PanReac AppliChem 98%, Barcelona, Spain), acetonitrile (Scharlau 99.9%, Barcelona, Spain) and MilliQ water (18.2 MΩ·cm, Zaragoza, Spain). The HPLC standards ferulic acid (≥99%) and caffeic acid (≥98%) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), whereas chlorogenic acid (97.1%) was procured from European Pharmacopoeia Reference Standard (Madrid, Spain).

2.3. Supercritical CO₂ Extraction (SCE)

In a first stage, the plant material was defatted with supercritical CO₂ in a Waters laboratory scale plant (SFE-1000F-2-FMC10 System, Pennsylvania, USA). Its scheme has been published previously [51] and its main components consist of an extraction vessel of 1 L (E), and two 0.5 L collectors (C1, C2). All three vessels were jacketed to maintain a constant temperature. The CO₂ stored in a bottle was passed through a cooling bath (CB) to keep it liquid and then propelled through a pump (P2) towards E. A heat exchanger (HE) was used to ensure that the CO₂ passing into E was above the critical temperature. Flow rate and temperature were automatically controlled, as was the pressure in E. The pressure in C1 and C2 was controlled by manual back pressures (MBPR).

The procedure is the same as that performed in previous works [51]. The same proportion of plant material/inert glass bead was used (100 g/200 g), which allows a better CO₂–solid contact, and therefore facilitates better extraction. The complete extraction process consisted of 4 static–dynamic cycles and the extraction conditions were 350 bar, 40 °C in E, 90 bar, 45 °C in C1 and 30 bar and 30 °C in C2. The CO₂ flow rate was 60 g/min. Once the machine was depressurized, the extracts collected from C1 and C2 and the plant material recovered from E were stored in a freezer for further experiments and analysis.

The supercritical extraction yield (Y_{SCE}) was calculated through Equation (1):

$$Y_{SCE}(\text{wt}\%) = \left(\frac{\text{mass}(g)_{C1} + \text{mass}(g)_{C2}}{\text{mass}(g)_{\text{vegetal material}}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

where $\text{mass}(g)_{C1}$ and $\text{mass}(g)_{C2}$ are the mass in grams of the extract deposited in collectors C1 and C2, respectively, of the SCE device, and $\text{mass}(g)_{\text{vegetal material}}$ is the initial mass in grams of the dried plant material loaded in the extractor.

2.4. Maceration and Supercritical Antisolvent Fractionation (SAF) Processes

Maceration with ethanol (EtOH) was performed to obtain the polar and active compounds of *C. officinalis* flowers. A 3 L volume of the solvent was used to macerate 300 g of vegetal material, previously defatted with SCE, for 48 h at room temperature (25 °C). Then, a rotatory evaporator (Büchi R-200, Flawil, Switzerland) was used to remove the solvent and obtain the dry extract. Equation (2) indicates the formula to calculate the maceration yield:

$$Y_{\text{EtOH}}(\text{wt}\%) = \left(\frac{\text{mass}_{\text{extract}}(g)}{\text{mass}_{\text{vegetal material}}(g)} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

where $\text{mass}_{\text{plant extract}}(g)$ was the mass of the solvent-free extract obtained and $\text{mass}_{\text{vegetal material}}(g)$ was the initial mass, in grams, of plant material subjected to maceration and on which the SCE process was applied.

To prepare the feed solution (FS) for each of the SAF experiments, the extract obtained (without solvent) was redissolved in ethanol at 3% (wt%) and filtered through Cellulose Acetate filters with a pore size of 0.22 μm. SAF experiments were carried out by a laboratory-scale plant (Waters, Pennsylvania, USA), the scheme of which is represented

in Figure 1. The plant was equipped with a CO₂ pump (P-SCF), an FS pump (P-LIQ), a 0.5 L precipitation vessel (PV), and a 0.5 L downstream vessel (DV). Temperatures and flow rates of both CO₂ and FS were automatically controlled, as was pressure in PV (ABPR), but pressure in DV was controlled by manual back pressure regulator (MBPR) [52].

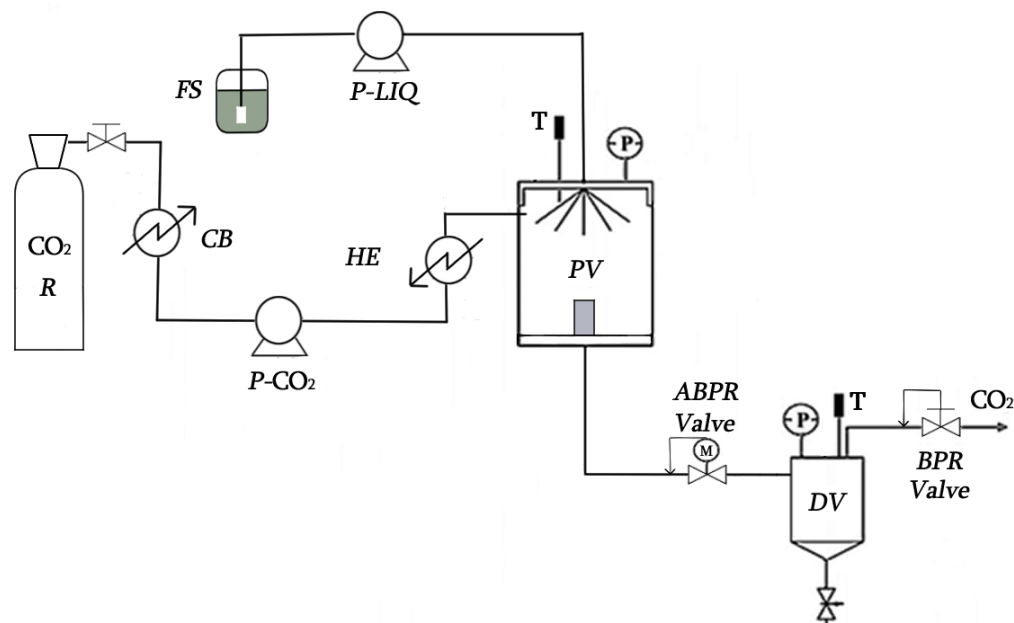


Figure 1. Scheme of the SAF equipment. Feed solution reservoir (FS); FS pump (P-LIQ); CO₂ reservoir (R); cooling bath (CB); CO₂ pump (P-SCF); heat exchanger (HE); precipitation vessel (PV); downstream vessel (DV); automatic back pressure regulator (ABPR); back pressure regulator (BPR); thermopar (T); Bourdon (P).

A typical SAF experiment starts when CO₂ is pumped by P-SCF through a heat exchanger (HE) to PV and the rest of the plant. Once the selected condition of pressure, temperature and CO₂ flow rate in the system have stabilised, FS is pumped into the PV through an injector (nozzle $\varnothing = 100$ mm). In this vessel, the insoluble compounds in the supercritical mixture (CO₂ + EtOH) precipitate, while the soluble compounds are gathered in DV. Once the flow of FS has finished, 30 mL of pure ethanol is pumped to draw the remaining FS from the pipes. Finally, a flow of CO₂ is maintained to eliminate the residual ethanol from the solid precipitated in PV. The conditions used were selected on the basis of the previous knowledge of the research group: to avoid thermal degradation, temperature in PV was fixed at 40 °C; to guarantee the supercritical state of the mixture (CO₂ + EtOH), the FS flow rate and the FS concentration were fixed at 0.45 mL/min and 3% (wt%), respectively, for all experiments [53]. Then the pressure in PV and the CO₂ flow rate were studied and varied between 80 and 160 bar and 10 and 60 g/min, respectively.

Equation (3) was used to calculate mass recovery yields for the precipitation (PV) and the downstream (DV) vessel fractions, Y_{PV} and Y_{DV} , respectively, of the SAF device:

$$Y_i(\text{wt}\%) = \left(\frac{\text{mass fraction collected}_i}{\text{mass of extract in FS}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

where i refers to the vessel from which the mass is collected: PV or DV. The overall recovery yield of the process, Y_{SAF} , was calculated using Equation (4):

$$Y_{SAF}(\text{wt}\%) = Y_{PV}(\text{wt}\%) + Y_{DV}(\text{wt}\%) \quad (4)$$

2.5. HPLC Analysis

The equipment used to analyse the SAF fractions of *Calendula officinalis* (FS, PV and DV) was a HPLC Waters® Alliance 2695 (Milford, MA, USA) with a PDA Waters® 2998 (Massachusetts, USA) detector working at $\lambda = 324$ nm. A reverse column C18 was used (CORTECS® C18 2.7 μm , 4.6 \times 150 mm, (Waters®, MA, USA) in conjunction with a pre-column CORTECS® Pre-column VanGuard C18 2.7 μm (2.1 \times 5 mm) (Waters®, MA, USA). For the chromatographic analysis, a gradient elution at 30 °C was applied with formic acid (0.1%): Milli-water: acetonitrile. The gradient was 10:90:0 to 10:40:50 for 15 min, 10:40:50 to 10:10:80 for 5 min, 10:10:80 to 10:90:0 for 5 min and 10:90:0 for another 5 min. The flow rate applied was 0.8 mL/min. For each sample 100 ppm was prepared in SAF fractions (FS, PV and DV) and filtered through a 0.2 μm filter (*GH Polypropylene membrane ACRO-DISC* 13 mm, Waters®, MA, USA) [51]. CHA, CAF and FA standards were used to build the calibrations curves, and the conditions for analysing them were the same. In Figure 2, retention times can be observed for each compound: CHA 7.04 min, CAF 7.98 min and FA 10.33 min. The analyses of both the samples and the standards were performed in triplicate.

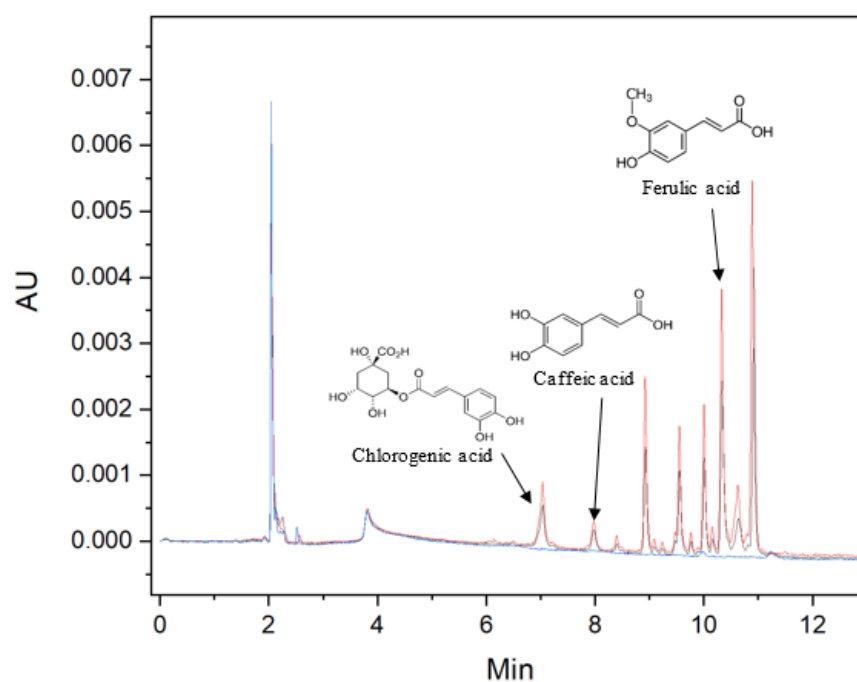


Figure 2. Chromatogram. Peak 1 CHA ($T_R = 7.04$ min, $\lambda = 324$ nm), peak 2 CAF ($T_R = 7.98$ min, $\lambda = 324$ nm) and peak 3 FA ($T_R = 10.33$ min, $\lambda = 324$ nm). PV fraction: red line; FS fraction: blue line.

Equation (5) was used to calculate the concentration of a compound in each sample analysed:

$$C_{i/j}(\text{wt}\%) = \left(\frac{\text{mass of compound } i \text{ in fraction } j}{\text{mass of fraction } j} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

where i is the considered antioxidant (CHA, CAF, FA) and j refers to the fraction in which the compound was analysed, i.e., FS, PV or DV. Once $C_{i/j}$ had been obtained, the enrichment ratio $E_{i/j}$ was obtained for each compound using Equation (6):

$$E_{i/j} = \frac{C_{i/j}}{C_{i/FS}} \quad (6)$$

where, again, i refers to the compound analysed (CHA, CAF, FA) and j is PV or DV. This equation can be modified to calculate how much the PV or DV fractions are enriched in

antioxidant compounds. Equation (7) shows how the enrichment ratio of all compounds analysed in PV fraction can be calculated:

$$E_{ALL/PV} = \frac{C_{CHA/PV} + C_{CAF/PV} + C_{FER/PV}}{C_{CHA/FS} + C_{CAF/FS} + C_{FER/FS}} \quad (7)$$

2.6. Experimental Design and Statistical Analysis

One of the aims in this work is to evaluate the influence of pressure and CO₂ flow rate on the SAF process and then to optimize the conditions to obtain the best results on yield and enrichment ratios. To statistically study this, a response surface methodology (RSM) based on central composite design (CCD) was used. The values were set between 80 and 160 for pressure in PV, X_P , and 10–60 g/min for CO₂ flow rate, $X_{Q_{CO_2}}$. The rest of the parameters in the experiments—temperature in PV and DV, pressure in DV, and FS flow rate—were constant and were set according to previous experience to ensure the supercritical conditions of the CO₂–ethanol mixture [51].

The mathematical model of a two variable CCD makes it possible to correlate, through Equation (8), a dependent variable, Y , with some independent variables, X_i and X_j :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \quad (8)$$

where β_0 is a constant coefficient, β_i is the linear coefficient, β_{ii} is the quadratic coefficient, and β_{ij} is an interaction coefficient. In this work, the dependant variable refers to both the yields of the SAF process (Y_{PV} , Y_{DV} and Y_{SAF}) and the enrichment ratios of the tracked compounds (CHA, CAF and FA), while the independent variables, which are the variables under study, are pressure (X_P) and CO₂ flow rate ($X_{Q_{CO_2}}$).

The software used to perform the CCD design was *Minitab*[®] 18. This design provides 13 random experiments, 5 of which are replicates of the central conditions according to the range levels of the variables used, shown in Table 1. This software was also used to determinate the values of each coefficient, β , in Equation (8) and their significance (when $p < 0.05$). Finally, *Minitab*[®] 18 was also used to obtain the optimal conditions for the maximum overall recovery yield (Y_{SAF}) and maximum enrichment ratio of the bioactive compounds (CHA, CAF, FA) ($Y_{ALL/PV}$).

Table 1. Codification and levels of the two independent variables considered in the factorial design of SAF experiments.

Variable	Symbol	Factor Levels				
		{-1.44	-1	0	1	1.44}
Pressure (bar)	X_P	80	92	120	148	160
CO ₂ flow rate (g/min)	$X_{Q_{CO_2}}$	10	17	35	53	60

2.7. Application of the Skin Model

COSMO-RS is a continuum solvation model that makes it possible to calculate thermodynamic properties, generating a three-dimensional distribution of surface polarization charge-densities, σ , from optimized 3D structures of molecules [53,54]. This σ is used, by means of an efficient statistical thermodynamic model of pairwise molecular surface interactions, to calculate the σ -potential, which gives the chemical potential of a surface segment of polarity in a particular solvent. Then, those segments are added and corrected by a combinatorial term to calculate the chemical potential of a compound in a pure or mixed solvent [53]. This can be applied, for example, to calculate the partition coefficient, K , of a solute between two liquid phases [55].

COSMOperm is an extension of the COSMO-RS model that applies these calculations in inhomogeneous systems such as biomembranes. The COSMOmic method, included within COSMOperm, allows the calculation of partition coefficients of membranes or micelles, chemical potentials, and free energies of solutes in a layered system, which in turn makes it possible to obtain their distribution within the membrane [56–60]. The distribution of the different compounds that make up a biomembrane can be obtained using classic molecular dynamics simulations or using another extension of the COSMO-RS model, called COSMOplex. This extension generates divided liquid layers of variable composition as a representation of a biomembrane from information about its structure [61]. This makes it possible to generate a skin model with which COSMOperm works to calculate the resistance of the membranes, the permeability of individual compounds as well as their position in them, and the permeation pathway [46].

The computational skin model used in this work is based on the model proposed by Schwöbel et al. [46]. This model is based on the division of the outermost layer of the skin, the epidermis, into different compartments, or layers, with their own structure and cellular compositions [47], as can be seen in Table 2.

Table 2. Compartments of epidermis, their abbreviations, and descriptions of each layer.

Compartment	Abbreviation	Description
Stratum corneum	SC	Horny layer, the outermost layer and the main barrier to permeability within the skin
Stratum granulosum	SG	Granular layer
Stratum spinosum	SS	Spinous or prickle layer, release neutral barrier lipids
Stratum basale	SB	Basal layer, metabolically active
Appendageal compartment	Shunt	Responsible for transport of chemical through the hair follicles sweat glands, and sebaceous glands

The skin penetration model is based on a series of resistances, R , from which the permeability coefficient, K_p , can be calculated [62], as indicated in Equation (9).

$$K_p = \frac{1}{R_{skin}} \quad (9)$$

where R_{skin} is the overall skin resistance. To calculate R_{skin} , it is first necessary to calculate the sum of all the resistances of each of the compartments that make up it, thus obtaining $R_{stratified-cells}$ as indicated by Equation (10):

$$R_{stratified-cells} = R_{SC} + R_{SG} + R_{SS} + R_{SB} \quad (10)$$

where R_{SC} , R_{SG} , R_{SS} , and R_{SB} are the resistances of the SC, SG, SS, and SB compartments, described in Table 2, respectively. Starting from $R_{stratified-cells}$ and also taking into account the shunt pathway, the R_{skin} is calculated following Equation (11):

$$\frac{1}{R_{skin}} = \frac{1}{R_{stratified-cell}} + \frac{1}{R_{shunt}} \quad (11)$$

where R_{shunt} is the resistance of the shunt pathway and is kept constant $1/R_{shunt} = 2 \times 10^{-11}$ m/s.

In addition, the transport of the compounds through the compartments is calculated by Equation (12):

$$\frac{1}{R_i} = \frac{1}{R_{i,trans}} + \frac{1}{R_{i,inter}} \quad (12)$$

where i refers to the compartment (SC, SG, SS or SB), $R_{i,trans}$ is the mechanism of transcellular absorption (through keratin-corneocytes by partitioning into and out of the cell

membrane), and $R_{i,inter}$ is the mechanism of intercellular absorption (through corneocytes in the lipid-rich extracellular regions).

The skin model was applied by COSMO-RS, using the COSMOtherm software package for each of the tracked compounds in this work: CHA, CAF and FA. First, the pre-optimized 3D chemical structures from PubChem database were obtained, and then those structures were refined by using Gaussian version 9.0 with a DFT parametrization bvp86-TZVP (cartesian coordinates for optimized geometries can be found in the Supplementary Material). The 3D structures of the compounds and their surface charge density can be observed in Figure 3. The skin model, included in COSMOplex module, was used together with the COSMOperm extension to calculate the permeabilities of each compound as well as their position in the skin model and the resistances of each compartment.

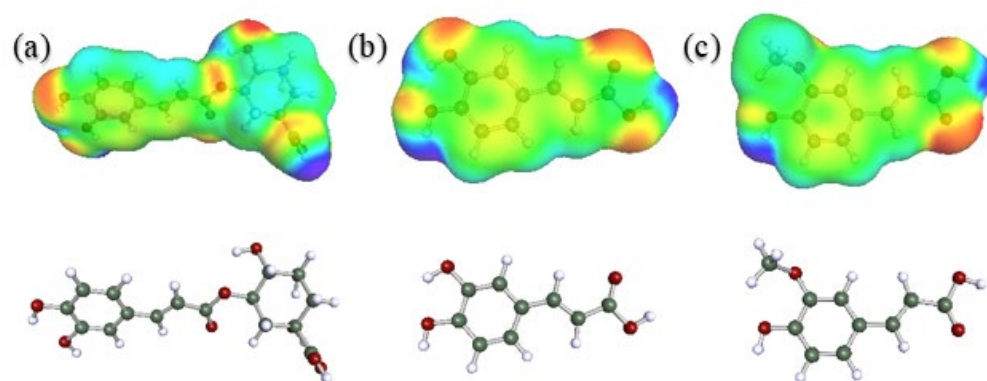


Figure 3. 3D molecular structures of (a) CHA, (b) CAF, and (c) FA and their charge density (electronegative zone in red, electropositive zone in blue and neutral zone in green).

3. Results and Discussion

3.1. SCE and Feed Solution Preparation

The pre-treated material, previously ground and sieved, was defatted in a first stage to facilitate the obtaining of the antioxidant fraction. This stage was usually carried out by means of maceration in hexane [41,45], but in a more recent study, supercritical extraction with CO_2 was used [51]. This is due to the advantages offered by this type of extraction; since it is a non-toxic solvent, its polarity facilitates the extraction of lipophilic compounds and generates solvent-free final products because it can be easily removed by lowering the pressure. The supercritical extraction yield, Y_{SCE} , was 8.3%, which is similar to the yields obtained by D. Baumman et al. (5.5–8.3%) [63] and A. Lopez-Padilla et al. (4.6–7.4%) [64] under comparable SCE conditions.

The polar fraction of *Calendula officinalis* was obtained by maceration in ethanol (EtOH) of the plant material after the SCE. The extraction yield obtained with this ethanolic maceration, Y_{EtOH} , was 7.2%. Other authors [65] have obtained similar extraction yield (8.0%), although the plant material was not previously defatted and the proportional mass plant (g):EtOH (mL) was 1:6 instead of 1:10, as used in this work.

3.2. SAF Yields Statistical Analysis

Experimental values for Y_{PV} (wt%), Y_{DV} (wt%) and Y_{SAF} (wt%) for every experiment are gathered in Table 3. Y_{PV} varied from 12.3% (run 10; 120 bar-60 g/min) to 47.0% (run 1; 80 bar-35 g/min), whereas Y_{DV} oscillated between 1.3% (run 1; 80 bar-35 g/min) and 42.8% (run 12; 148 bar-53 g/min). It can be seen that at low pressures, PV yields are higher than DV yields, but this changes as the pressure increases; then, the yields equalize until Y_{DV} are greater than Y_{PV} . The greatest difference was found in run 1, where Y_{PV} was 36 times the DV yield. Overall yields, Y_{SAF} , varied between 31.1% (run 3; 92 bar-53 g/min) and 73.7% (run 12; 148 bar-53 g/min). As seen previously in other works [51], a full recovery of the entire mass of solutes contained in the feed solution is not possible due to the effect of two

phenomena: the dragging of the most volatile components through the vent valve [66] and the deposition of materials in dead spaces.

Table 3. Operational conditions of pressure, X_P , and CO_2 flow rate $X_{Q_{CO_2}}$ for every run of the CCD design of the SAF process as well as the corresponding results for the yields and enrichment ratios, defined by Equations (3)–(7).

Run	Exp. Run Order	X_P (bar)	$X_{Q_{CO_2}}$ (g/min)	Y_{PV} (wt%)	Y_{DV} (wt%)	Y_{SAF} (wt%)	$E_{CHA/PV}$	$E_{CA/PV}$	$E_{FA/PV}$	$E_{ALL/PV}$
1	9	80	35	47.0	1.3	48.3	0.86	1.19	0.69	0.79
2	4	92	17	41.0	21.5	62.5	1.04	1.25	1.10	1.09
3	10		53	16.1	15.0	31.1	1.08	1.33	1.16	1.21
4	13	120	10	26.0	32.2	58.2	1.51	1.48	1.67	1.64
5	2		35	26.1	20.3	46.4	1.53	1.36	1.55	1.52
6	3		35	22.0	25.8	47.8	1.52	1.37	1.54	1.52
7	6		35	18.5	30.0	48.5	1.40	1.44	1.56	1.66
8	7		35	15.1	30.5	45.6	1.59	1.40	1.73	1.66
9	11		35	13.6	29.6	43.2	1.72	1.39	1.70	1.67
10	12		60	12.3	30.4	42.7	1.14	1.30	1.25	1.27
11	8	148	17	23.4	31.3	54.7	1.18	1.40	1.32	1.32
12	5		53	30.9	42.8	73.7	1.33	1.41	1.52	1.46
13	1	160	35	31.1	34.3	65.4	1.28	1.37	1.55	1.46

The coefficients of Equation (8) were obtained for Y_{PV} , Y_{DV} and Y_{SAF} and can be found in Table 4, along with their level of significance p and the coefficient R^2 and the deviation s of the fitted mathematical model. The statistical analysis reveals that Y_{PV} depends on all terms ($\beta_1, \beta_2, \beta_{11}$ and β_{12}) except the quadratic term of CO_2 (β_{22}) and all of them are statistically significant ($p < 0.05$) except the pressure term (β_1). Y_{DV} and Y_{SAF} depend on all terms being statistically significant only for Y_{SAF} . For Y_{DV} , the statistically significant terms are the pressure (β_1), the quadratic term of pressure (β_{11}), and the cross term (β_{12}).

Table 4. Fitting coefficients of Equation (8) for PV, Y_{PV} , DV, Y_{DV} , and overall, Y_{SAF} , yields, chlorogenic and ferulic acid enrichment ratio in PV ($E_{CHA/PV}$, $E_{FA/PV}$ respectively) total enrichment ratio ($E_{ALL/PV}$) as well as the significance of each term, p , the regression coefficients, R^2 , and standard deviation, s .

	$Y_{PV}/wt\%$		$Y_{DV}/wt\%$		$Y_{SAF}/wt\%$		$E_{CHA/PV}$		$E_{FA/PV}$		$E_{ALL/PV}$	
	Coefficient Value	p	Coefficient Value	p	Coefficient Value	p	Coefficient Value	p	Coefficient Value	p	Coefficient Value	p
β_0	284.3	0.000	-40.3	0.000	242.6	0.000	-3.889	0.000	-4.11	0.000	-3.840	0.000
β_1	-3.594	0.075	1.241	0.000	-2.343	0.000	0.0796	0.026	0.0835	0.003	0.0802	0.004
β_2	-2.204	0.019	-1.691	0.833	-3.835	0.003	0.0253	0.381	0.0160	0.454	0.0166	0.479
β_{11}	0.01215	0.000	-0.00493	0.035	0.00717	0.001	-0.000314	0.001	-0.000315	0.002	-0.000308	0.001
β_{22}	-	-	0.00898	0.105	0.00812	0.040	-0.000395	0.034	-0.000262	0.189	-0.000264	0.125
β_{12}	0.01620	0.006	0.00900	0.058	0.02520	0.000	-	-	-	-	-	-
R^2	88.28	-	91.26	-	96.74	-	83.00	-	82.91	-	84.54	-
s	4.42	-	4.00	-	2.66	-	0.13	-	0.15	-	0.13	-

In Figure 4, the contour plots corresponding to the surfaces defined by Equation (8) are shown for all yields (Y_{PV} , Y_{DV} and Y_{SAF} as 1a, 1b and 1c, respectively). In Figure 4a, for flow rates above 12 g/min and below 24 g/min, Y_{PV} decreases as pressure increases, while for CO_2 flow rates outside this range, Y_{PV} first decreases and then increases as pressure increases. For a fixed pressure, an increase in CO_2 flow rate causes Y_{PV} to decrease except for high pressures, whereas the CO_2 flow rate increases, Y_{PV} increases. For the studied ranges of pressure and CO_2 flow rates, the highest Y_{PV} is found at low pressures (80–83

bar) and at low CO₂ flow rates (10–16 g/min). Another maximum in Y_{PV} yield could be found at high pressures and CO₂ flow rates (133–160 bar, 51–60 g/min). According to Figure 4b, Y_{DV} increases as pressure increases for a set CO₂ flow rate. On the other hand, for a fixed pressure, a different behaviour is observed if the pressure is lower or higher than 133 bar: for low pressures, as the flow increases, Y_{DV} decreases, whereas the opposite effect is observed at higher pressures. In fact, the highest Y_{DV} is found at high pressures and CO₂ flow rates (133–160 bar, 47–60 g/min). This may be due to a greater solubility of components and a higher dragging effect of the solutes towards DV. Analysing Figure 4c, it can be seen that Y_{SAF} follows a similar behaviour to Y_{PV} , whereby the overall recovery of solutes from the feed solution is minimal at low pressures and high CO₂ flow rates, whereas Y_{SAF} reaches a maximum when the two variables simultaneously reach their maximum (158–160 bar, 59–60 g/min) or minimum (80–83 bar, 10–12 g/min) values in the intervals considered.

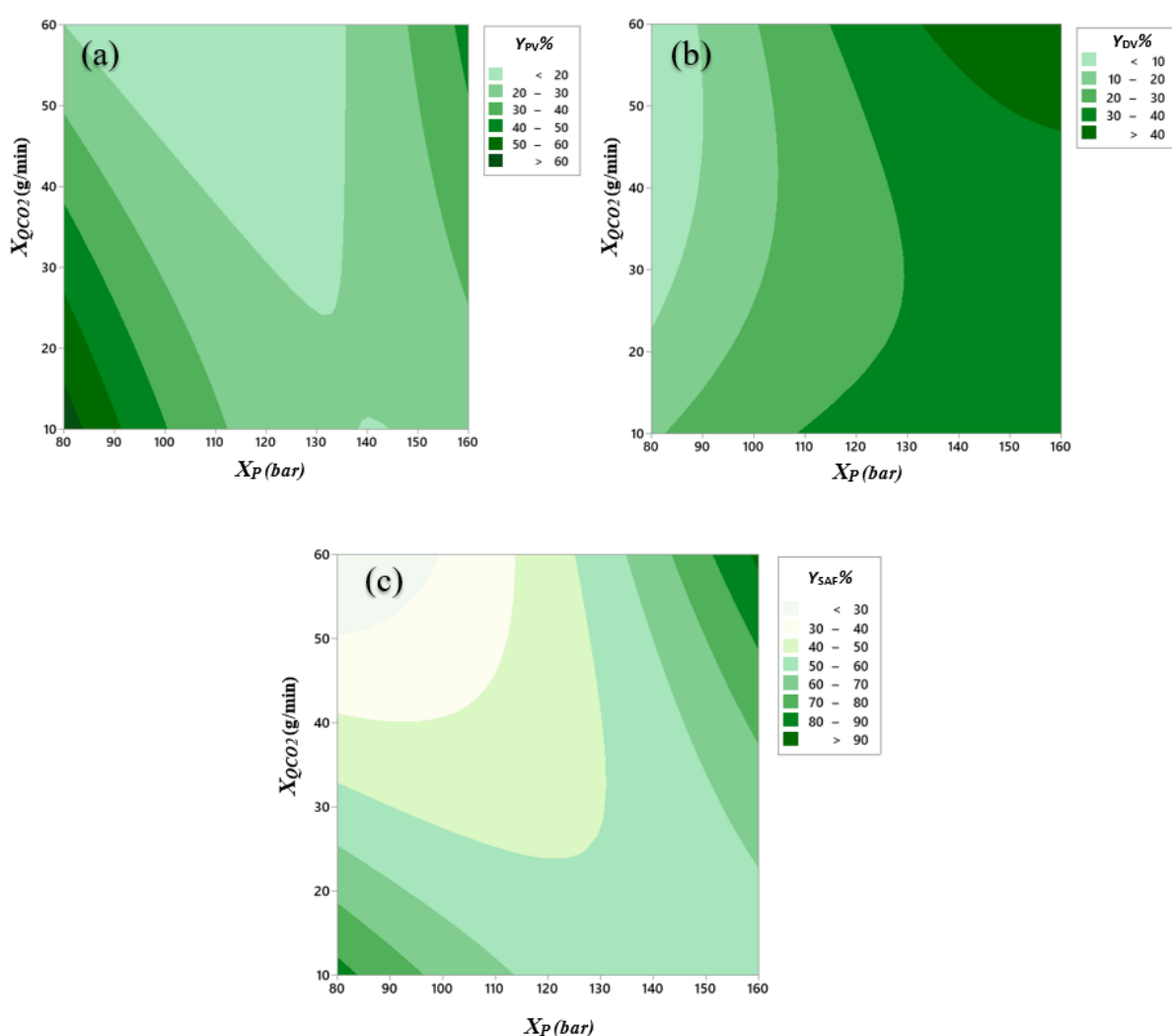


Figure 4. Contour plots of the yields: (a) at PV, $Y_{PV}\%$, (b) at DV, $Y_{DV}\%$, and (c) overall yield, $Y_{SAF}\%$, as function of pressure, X_P (bar) and CO₂ flow rate, X_{QCO_2} (g/min).

3.3. Enrichment Ratio Analysis

In addition to the SAF global yields, ferulic acid (FA), caffeic acid (CAF) and chlorogenic acid (CHA) were monitored for the feed solution fraction (FS), precipitation vessel (PV) and downstream vessel (DV). The enrichment ratios E_{ij} and $E_{ALL/PV}$, defined by Equations (6) and (7), are gathered in Table 3 for all experiments performed. No $E_{i/DV}$ is

included, since the amount of none of the three compounds tracked (FA, CAF, CHA) was higher than the chromatographic detection limit, which indicates that they are mostly found in PV.

Only $E_{CHA/PV}$, $E_{FA/PV}$, and $E_{ALL/PV}$ were correctly adjusted to Equation (8). The fitting coefficients of this equation are given in Table 4, where it can be seen that $E_{CHA/PV}$ depends on all of the terms except the cross term (β_{12}), and all of them are significant ($p < 0.05$) except for the linear term of the CO₂ flow rate (β_2). $E_{FA/PV}$ and $E_{ALL/PV}$ also depend on all terms except for the cross term (β_{12}), but only β_0 and the linear and quadratic pressure terms (β_1 , β_{11}) are significant.

Figure 5a–c shows the contour plot corresponding to the surface defined by Equation (8) for the $E_{CHA/PV}$, $E_{FA/PV}$, and $E_{ALL/PV}$ enrichment ratios. As Figure 5a initially shows, $E_{CHA/PV}$ increases as pressure increases and then decreases at higher pressure values. For a fixed pressure, $E_{CHA/PV}$ behaves similarly with increasing CO₂ flow rate. Then, the maximum is located in a central area, with pressure values between 103 and 150 bar and CO₂ flow rates of 12–53 g/min. $E_{FA/PV}$ and E_{ALL} have a similar behaviour, as can be seen from Figure 5b,c. The maximum of $E_{FA/PV}$ is found for medium–high pressure values (117–147 bar) and intermediate CO₂ flow rate values (14–47 g/min) within the considered intervals. For the enrichment of the three antioxidants, $E_{ALL/PV}$, the maximum zone is found at intermediate values of both pressure and CO₂ flow rate (118–142 bar, 18–44 g/min).

The fact that all of the analysed compounds, CHA, FA and CAF, are retained in PV makes the SAF technique perfect for obtaining a fraction enriched in these antioxidant compounds. Considering the precautions for experimental inaccuracies, the applied RSM model provides the upper limit of working conditions for achieving a significant enrichment of the compounds of interest. Optimum yield and enrichment values, provided by the applied RSM model, can be obtained working under conditions of 153 bar and 42 g/min.

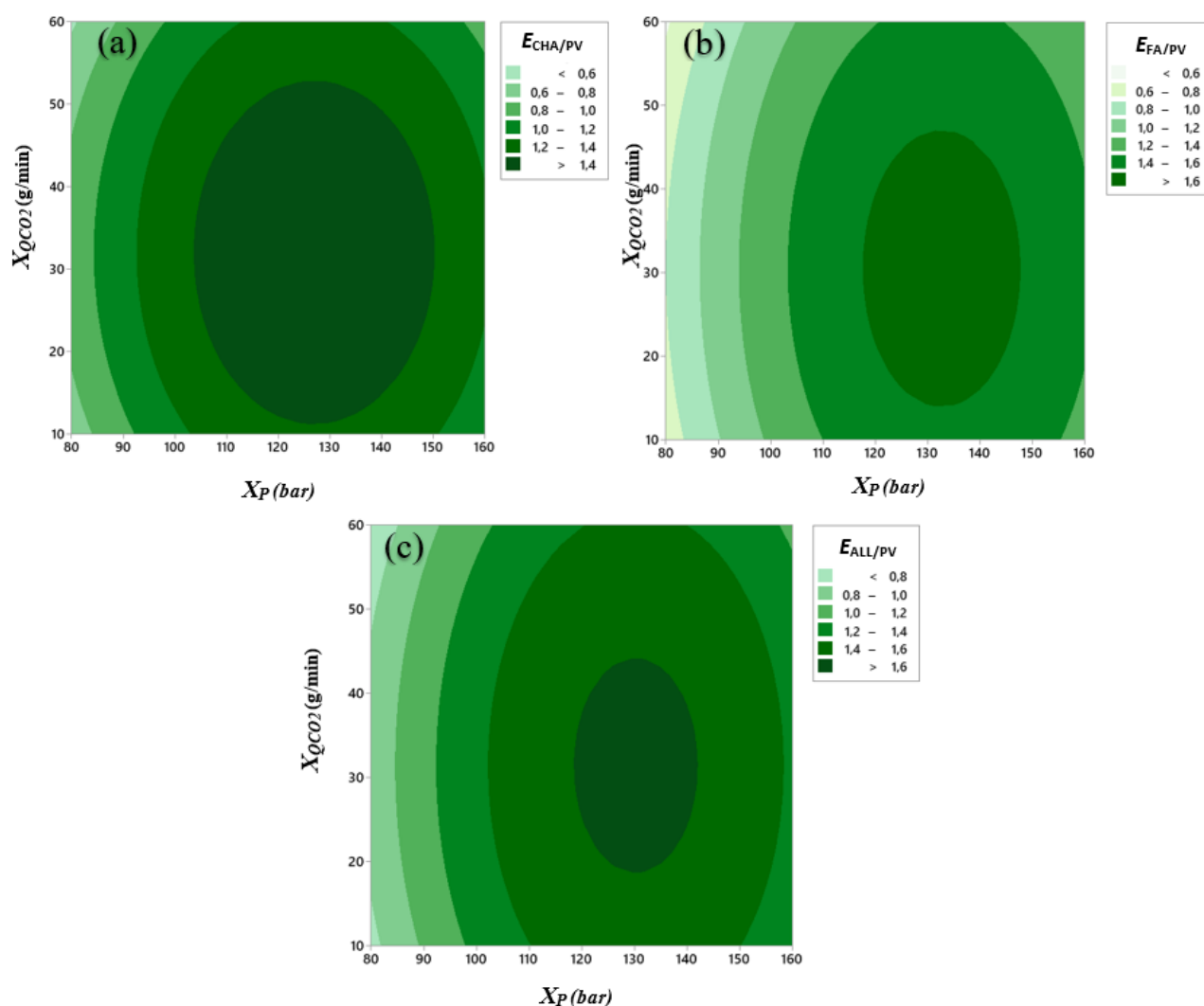


Figure 5. Contour plots of the enrichment ratios: (a) $E_{CHA/PV}$; (b) $E_{FA/PV}$, and (c) $E_{ALL/PV}$ as a function of pressure, X_P (bar), and CO₂ flow rate, X_{QCO_2} (g/min).

In relation to the physical-mathematical treatment of the considered SAF process, it can be indicated that there are close similarities with the well-known supercritical antisolvent precipitation (SAS) processes suitable for the production of fine powders, or even composites including a bioactive substance and a polymer. However, the SAF modelling turns out to be much more complex, because mixtures consisting of a high number of components, such as the natural extracts studied in this work, are considered. Tentatively, most of the developments for the different steps implied in SAS could be adapted to SAF [32]. There are specialized papers about SAS that model both the whole process [67–69] as well as specific steps, such as breakup of the feed solution jet in the supercritical CO₂ stream [70–72], mass transfer between droplets of organic solution and the compressed antisolvent [73–75], supersaturation and nucleation rate [76–78], growth mechanism [79], or the influence of the variables on precipitation [80]. However, as explained in a previous work [50], detailed modelling of the SAF process is quite a complex task, because of the high number of components in the extracts that usually need to be processed, then becoming rather inextricable from a rigorous theoretical study. In addition, reaction or association processes between the different components can occur. Therefore, and to the best of our knowledge, to date, there are no publications on the detailed theoretical modelling of SAF.

In any case, it seems clear that the different solubilities shown by the components of the mixture to be separated in the supercritical ethanol–CO₂ mixture play an essential role in the fractionation process. In fact, it can be mentioned here that a very simple semi-empirical model containing the operating parameters (temperature and pressure) and the Hansen solubility parameters has been proved to be appropriate for describing the selectivity in a GAS-fractionation process closely related to SAF and SAS [81,82].

Related to the system considered in this work, it can be pointed out that the feed solutions present a glutinous character, which may be due to components such as resins or mucilage [83,84] not being completely solubilized. The presence of this solid material could induce a very effective process of heterogeneous nucleation [76]. This is how a practically complete precipitation in PV of the widely supersaturated CAF, CHA and FA occurs.

The optimal conditions for optimum yield and enrichment values, indicated above (153 bar, 42 g/min), are located between the extreme values of the ranges studied. This could be explained by the opposing effects that take place both for the increase in CO₂ flow rate and pressure. An increase of CO₂ flow rate implies a higher dragging effect, but also favours better mixing and nucleation. For its part, an increase in pressure would increase solubility, but favours nucleation of solutes.

3.4. Results of the Skin Model

The skin model applied was a fully hydrated skin model, and all the calculations for resistances, possible pathways and overall permeability values were performed using the COSMOtherm software package. The predicted values for Equations (9)–(11) for individual compounds are gathered in Table 5.

The compartment with the largest resistance for CAF and FA is the *stratum corneum* ($\log R_{sc} = -5.61$ and -5.51 respectively), while for CHA, the largest resistance is the *stratum spinosum* ($\log R_{ss} = -7.06$). This means that while for CAF and FA the *stratum corneum* is the main barrier in the penetration process, for CHA it manages to penetrate up to the *stratum spinosum*. Regarding the penetration pathway, both CAF and FA prefer the trans-corneocyte route ($R_{sc, inter} \gg R_{sc, trans}$), while CHA prefers the transcellular route of the *Stratum spinosum*, called the interstitial matrix ($R_{sc, inter} \ll R_{sc, trans}$). The overall resistances, R_{skin} , including the shunt pathway, are $R_{skin} = R_{skin} = 7.74 \times 10^7$, 1.86×10^9 and 3.74×10^7 for CAF, CHA and FA, respectively. Translating them using Equation (9), the permeability values for each compound were $\log K_p = -5.89$ for CAF, $\log K_p = -7.27$ for CHA and $\log K_p = -5.57$ for FA. These values are corrected by a constant offset ($\Delta \log K_p = -1.12$ cm/s) [46], and the final permeability values are $\log K_p = -7.01$, -8.39 and -6.69 for CAF, CHA and FA, respectively. Table 5 also shows the average calculated permeability values of CAF and FA in skin by Zhang et al. [85], and experimental permeability values from Caco-2 cells for CAF, CHA and FA [86,87], as well as the deviation of our corrected values $\log K_p$. It can be seen that our $\log K_p$ corrected values fit better to $\log K_p$ (calc) of skin by Zhang et al. (deviation = 0.16 and -0.46 for CAF and FA) than to the values of $\log K_p$ (exp) of Caco-2 cells (deviation = 1.17, 2.79 and 1.71 for CAF, CHA and FA respectively). This may be due to the fact that Caco-2 cell lines are used as a model of intestinal absorption and the estimation of oral bioavailability [88], and therefore, their permeability differs from the permeability of the skin. For a compound to be considered toxic, it must reach a certain layer of the skin. *Stratum corneum*, consisting mainly of dead cells, is considered a safe layer in which toxicity or irritation does not occur [89]. This makes both CAF and FA safe for cosmetic use. CHA, on the other hand, reaches a deeper layer of the epidermis, but does not reach the dermis, and furthermore, its permeability coefficient is lower than the desquamation rate coefficient ($\log K_D = -9$) [90], which also makes it safe for cosmetic use. This desquamation rate coefficient indicates that even if a compound penetrates beyond the *stratum corneum*, the skin regenerates and prevents the compound from penetrating deeper in the epidermis [89].

Table 5. Detailed model parameters of resistances and K_p (predicted, calculated, experimental and their deviations) for CAF, CHA and FA for each compartment and their permeation path.

Parameter	Caffeic Acid	Chlorogenic Acid	Ferulic Acid
Vehicle	water	water	water
Skin membrane	epidermis	epidermis	epidermis
Rate limiting step	SC via polar trans-corneocyte pathway	SS via interstitial space	SC via polar trans-corneocyte pathway
$\log K_{\text{vehicle:water}}$	0.00	0.00	0.00
$R_{\text{SC,inter}}$ (s/m)	2.15×10^{12}	8.20×10^{16}	2.55×10^{11}
$R_{\text{SC,trans}}$ (s/m)	4.07×10^7	1.76×10^8	$3.23\text{E} \times 10^7$
R_{SC} (s/m)	4.07×10^7	1.76×10^8	$3.23\text{E} \times 10^7$
$\text{Log}R_{\text{SC}}$ (cm/s)	-5.09	-6.71	-4.21
$R_{\text{SG,inter}}$ (s/m)	1.26×10^8	5.14×10^8	1.23×10^8
$R_{\text{SG,trans}}$ (s/m)	1.34×10^7	5.13×10^{11}	1.63×10^6
R_{SG} (s/m)	1.22×10^7	$5.13\text{E} \times 10^8$	1.61×10^6
$\text{Log}R_{\text{SG}}$ (cm/s)	-5.32	-7.06	-4.46
$R_{\text{SS,inter}}$ (s/m)	2.86×10^8	1.17×10^9	2.80×10^8
$R_{\text{SS,trans}}$ (s/m)	2.26×10^7	8.54×10^{11}	2.91×10^6
R_{SS} (s/m)	2.09×10^7	1.16×10^9	2.88×10^6
$\text{Log}R_{\text{SS}}$ (cm/s)	-4.57	-5.91	-3.80
$R_{\text{SB,inter}}$ (s/m)	1.98×10^7	8.07×10^7	1.94×10^7
$R_{\text{SB,trans}}$ (s/m)	$4.58\text{E} \times 10^6$	1.71×10^{11}	6.50×10^5
R_{SB} (s/m)	3.72×10^6	8.06×10^7	6.29×10^5
$\text{Log}R_{\text{SB}}$ (cm/s)	-5.89	-7.27	-5.57
R_{cells} (s/m)	7.75×10^7	1.93×10^9	$3.74\text{E} \times 10^7$
R_{shunt} (s/m)	5.00×10^{10}	5.00×10^{10}	5.00×10^{10}
R_{skin} (s/m)	7.74×10^7	1.86×10^9	$3.74\text{E} \times 10^7$
$\log K_p$ (pred.) (cm/s)	-5.89	-7.27	-5.57
$\log K_p$ (pred.) + cte offset (cm/s)	-7.01	-8.39	-6.69
$\log K_p$ (calc.) epidermis (cm/s)	-6.85	-	-7.15
Deviation	0.16	-	0.46
$\log K_p$ (exp.) Caco-2 (cm/s)	-5.84	-5.60	-4.98
Deviation	1.17	2.79	1.71

4. Conclusions

The combination of two advanced separation techniques applied to *Calendula officinalis* flowers was successfully used to obtain extracts of interest in cosmetics. The initial supercritical extraction with CO₂ (SCE) carried out, the yield of which was 8.3% and the subsequent maceration in ethanol applied, the yield of which was 8%, showed results similar to those obtained in works by other authors. Subsequently, the ability of the supercritical antisolvent fractionation (SAF) technique to fractionate the ethanolic extract to obtain an enriched fraction in the tracked compounds (CHA, FA, CAF) was satisfactorily evaluated through a Response Surface Methodology (RSM) based on Central Composite Design (CCD). Chlorogenic acid, ferulic acid and caffeic acid were obtained almost exclusively in the precipitated fraction, thus obtaining a fraction enriched in antioxidant compounds of great interest in the cosmetic industry and even with possible applications in the pharmaceutical or food industry. The CCD design also made it possible to deduce the pressure and CO₂ flow rate conditions to obtain optimal yields and enrichment values were 153 bar and 42 g/min (composite desirability = 0.673).

Regarding the skin permeability model used, it was possible to evaluate the computational permeability of CAF, CHA and FA. In all cases, none of the compounds pass through the epidermis completely, which means that they are safe compounds for topical

use on the skin. The final permeability values predicted by the model were $\log K_p = -7.01$, -8.39 and -6.69 for CAF, CHA and FA, respectively and were compared with experimental values for both abdominal skin cells and Caco-2 intestinal cells, concluding that the skin model is a good model for predicting permeabilities and behaviours of compounds in the epidermis.

Although the SCE was carried out to favour obtaining the antioxidant phase, the extracts obtained through this technique are of great value due to their composition, and they are widely used in the cosmetic industry. In fact, a cosmetic formulation has been prepared containing extracts of *C. officinalis*, obtained under the conditions used in this work, that has been approved by the French agency ASNM (L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé), and it is now being tested on human volunteers at MEDES (Institut de Médecine et de Physiologie Spatiales, Toulouse, France). All this makes these two advanced separation techniques (SCE and SAF), together with the experimental design and the skin permeability model used, powerful tools for obtaining, concentrating and evaluating compounds of interest to the cosmetic industry.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/article/10.3390/antiox11010096/s1, Info S1: Cartesian Coordinates for Optimized Geometries in Gas Phase at bvp86.

Author Contributions: Conceptualization, Resources, Supervision, Project administration and Funding acquisition, A.M.M. and J.S.U.; Methodology and software, R.M. and A.M.M.; Validation, A.M.M.; Formal analysis, R.M.; Investigation, R.M. and A.M.M.; Data curation, R.M., E.L., M.R.P.-O. and A.M.M.; Writing—original draft preparation, R.M.; Writing—review and editing, R.M., E.L., M.R.P.-O., J.S.U. and A.M.M.; Visualization, E.L., M.R.P.-O. and A.M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors thank to EFA188/16/SPAGYRIA (Este proyecto está cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)) and Gobierno de Aragón: Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento: Group E39_20R.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article and the Supplementary Materials.

Acknowledgments: The authors acknowledge generous allocations of computer time in the Hermes Cluster from the Aragon Institute for Engineering Research (I3A)—University of Zaragoza. The authors thank T. V. for her technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Arora, D.; Rani, A.; Sharma, A. A Review on Phytochemistry and Ethnopharmacological Aspects of Genus *Calendula*. *Pharmacogn. Rev.* **2013**, *7*, 179–187. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.120520>.
2. Barnes, J.; Anderson, L.A.; Phillipson, J.D. *Herbal Medicines*, 3rd ed.; Pharmaceutical Press: London, UK; Grayslake, IL, USA, 2007; ISBN 978-0-85369-623-0.
3. European Scientific Cooperative on Phytotherapy. *ESCOP Monographs, The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Online Series. Calendulae Flos (Calendula Flower)*; ESCOP: Exeter, UK, 2019; ISBN 978-1-901964-61-5.
4. European Medicines Agency Overview of Comments Received on Community Herbal Monograph on *Calendula officinalis* L., Flos. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-calendula-officinalis-l-flos-revision-1_en.pdf (accessed on 26 July 2021).
5. World Health Organization Geneva. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*; WHO Graphics: Malta, 2002; Volume 2; ISBN 92-4-154537-2.
6. Mishra, A.; Mishra, A.; Chattopadhyay, P. *Calendula officinalis*: An Important Herb with Valuable Therapeutic Dimensions—An Overview. *J. Global Pharma. Technol.* **2010**, *10*, 2. <https://doi.org/10.1234/JGPT.V2I10.288>.
7. European Commission CosIng—Cosmetics—*Calendula officinalis* Callus Extract. Available online: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=95567 (accessed on 21 July 2021).
8. European Commission CosIng—Cosmetics—*Calendula officinalis* Flower Oil. Available online: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=74930 (accessed on 21 July 2021).

9. European Commission CosIng—Cosmetics—*Calendula officinalis* Flower Water. Available online: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=83485 (accessed on 21 July 2021).
10. Mishra, A.; Chattopadhyay, P. Assessment of In Vitro Sun Protection Factor of *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*) Essential Oil Formulation. *J. Young Pharm. JYP* **2012**, *4*, 17–21. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.93575>.
11. Efstratiou, E.; Hussain, A.I.; Nigam, P.S.; Moore, J.E.; Ayub, M.A.; Rao, J.R. Antimicrobial Activity of *Calendula Officinalis* Petal Extracts against Fungi, as Well as Gram-Negative and Gram-Positive Clinical Pathogens. *Complement. Ther. Clin. Pract.* **2012**, *18*, 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2012.02.003>.
12. Klouček-Popova, E.; Popov, A.; Pavlova, N.; Krůsteva, S. Influence of the Physiological Regeneration and Epithelialization Using Fractions Isolated from *Calendula Officinalis*. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* **1982**, *8*, 63–67.
13. Duran, V.; Matic, M.; Jovanović, M.; Mimica, N.; Gajinov, Z.; Poljacki, M.; Boza, P. Results of the Clinical Examination of an Ointment with Marigold (*Calendula officinalis*) Extract in the Treatment of Venous Leg Ulcers. *Int. J. Tissue React* **2005**, *27*, 101–106.
14. Fonseca, Y.M.; Catini, C.D.; Vicentini, F.T.M.C.; Cardoso, J.C.; Cavalcanti De Albuquerque Junior, R.L.; Vieira Fonseca, M.J. Efficacy of Marigold Extract-Loaded Formulations Against UV-Induced Oxidative Stress. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 2182–2193. <https://doi.org/10.1002/jps.22438>.
15. ZitterlEglseer, K.; Sosa, S.; Jurenitsch, J.; SchubertZsilavec, M.; DellaLoggia, R.; Tubaro, A.; Bertoldi, M.; Franz, C. Anti-Oedematous Activities of the Main Triterpenoid Esters of Marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *57*, 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00061-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00061-5).
16. Loggia, R.D.; Tubaro, A.; Sosa, S.; Becker, H.; Saar, S.; Isaac, O. The Role of Triterpenoids in the Topical Anti-Inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Flowers. *Planta Med.* **1994**, *60*, 516–520. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959562>.
17. Ukiya, M.; Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Tokuda, H.; Suzuki, T.; Kimura, Y. Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula Officinalis*) Flowers. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1692–1696. <https://doi.org/10.1021/np068016b>.
18. Jimenez-Medina, E.; Garcia-Lora, A.; Paco, L.; Algarra, I.; Collado, A.; Garrido, F. A New Extract of the Plant *Calendula officinalis* Produces a Dual In Vitro Effect: Cytotoxic Anti-Tumor Activity and Lymphocyte Activation. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-119>.
19. Shivasharan, B.D.; Nagakannan, P.; Thippeswamy, B.S.; Veerapur, V.P.; Bansal, P.; Unnikrishnan, M.K. Protective Effect of *Calendula officinalis* Linn. Flowers against 3-Nitropropionic Acid Induced Experimental Huntington’s Disease in Rats. *Drug Chem. Toxicol.* **2013**, *36*, 466–473. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.776583>.
20. Ray, D.; Mukherjee, S.; Falchi, M.; Bertelli, A.; Braga, P.C.; Das, D.K. Amelioration of Myocardial Ischemic Reperfusion Injury with *Calendula officinalis*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2010**, *11*, 849–854. <https://doi.org/10.2174/138920110793261971>.
21. Urbaniak, A.; Kujawski, J.; Czaja, K.; Szelag, M. Antioxidant Properties of Several Caffeic Acid Derivatives: A Theoretical Study. *C. R. Chim.* **2017**, *20*, 1072–1082. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2017.08.003>.
22. Zdunska, K.; Dana, A.; Kolodziejczak, A.; Rotsztejn, H. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Ski. Pharmacol. Physiol.* **2018**, *31*, 332–336. <https://doi.org/10.1159/000491755>.
23. Agunloye, O.M.; Oboh, G.; Ademiluyi, A.O.; Ademusun, A.O.; Akindahunsi, A.A.; Oyagbemi, A.A.; Omobowale, T.O.; Ajibade, T.O.; Adedapo, A.A. Cardio-Protective and Antioxidant Properties of Caffeic Acid and Chlorogenic Acid: Mechanistic Role of Angiotensin Converting Enzyme, Cholinesterase and Arginase Activities in Cyclosporine Induced Hypertensive Rats. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *109*, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.044>.
24. Kim, S.R.; Jung, Y.R.; An, H.J.; Kim, D.H.; Jang, E.J.; Choi, Y.J.; Moon, K.M.; Park, M.H.; Park, C.H.; Chung, K.W.; et al. Anti-Wrinkle and Anti-Inflammatory Effects of Active Garlic Components and the Inhibition of MMPs via NF-KB Signaling. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073877>.
25. Dias Alves, G. de A.; de Souza, R.O.; Ghislain Rogez, H.L.; Masaki, H.; Vieira Fonseca, M.J. Cecropia Obtusa Extract and Chlorogenic Acid Exhibit Anti Aging Effect in Human Fibroblasts and Keratinocytes Cells Exposed to UV Radiation. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216501>.
26. Girsang, E.; Ginting, C.N.; Lister, I.N.E.; Gunawan, K.Y.; Widowati, W. Anti-Inflammatory and Antiaging Properties of Chlorogenic Acid on UV-Induced Fibroblast Cell. *PeerJ* **2021**, *9*, e11419. <https://doi.org/10.7717/peerj.11419>.
27. Kaczmarek, B.; Lewandowska, K.; Sionkowska, A. Modification of Collagen Properties with Ferulic Acid. *Materials* **2020**, *13*, 3419. <https://doi.org/10.3390/ma13153419>.
28. Saija, A.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Trombetta, D.; Proteggente, A.; De Pasquale, A.; Uccella, N.; Bonina, F. Ferulic and Caffeic Acids as Potential Protective Agents against Photooxidative Skin Damage. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 476–480. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3<476::AID-JSFA270>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<476::AID-JSFA270>3.0.CO;2-L).
29. Zhu, H.; Zhao, H.; Zhang, Z.; Wang, W.; Yao, S. Laser Flash Photolysis Study on Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acid Derivatives. *Radiat. Environ. Biophys.* **2006**, *45*, 73–77. <https://doi.org/10.1007/s00411-006-0041-8>.
30. Staniforth, V.; Chiu, L.-T.; Yang, N.-S. Caffeic Acid Suppresses UVB Radiation-Induced Expression of Interleukin-10 and Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Mouse. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 1803–1811. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl006>.
31. Taofiq, O.; Gonzalez-Paramas, A.M.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I.C.F.R. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules* **2017**, *22*, 281. <https://doi.org/10.3390/molecules22020281>.

32. Reverchon, E.; De Marco, I. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Natural Matter. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *38*, 146–166. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>.
33. de Melo, M.M.R.; Silvestre, A.J.D.; Silva, C.M. Supercritical Fluid Extraction of Vegetable Matrices: Applications, Trends and Future Perspectives of a Convincing Green Technology. *J. Supercrit. Fluids* **2014**, *92*, 115–176. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>.
34. Burt, S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—A Review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
35. Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibanez, E. Sub- and Supercritical Fluid Extraction of Functional Ingredients from Different Natural Sources: Plants, Food-by-Products, Algae and Microalgae. A Review. *Food Chem.* **2006**, *98*, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>.
36. Giacometti, J.; Bursac Kovačević, D.; Putnik, P.; Gabrić, D.; Bilušić, T.; Krešić, G.; Stulić, V.; Barba, F.J.; Chemat, F.; Barbosa-Cánovas, G.; et al. Extraction of Bioactive Compounds and Essential Oils from Mediterranean Herbs by Conventional and Green Innovative Techniques: A Review. *Food Res. Int.* **2018**, *113*, 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>.
37. Hamburger, M.; Adler, S.; Baumann, D.; Forg, A.; Weinreich, B. Preparative Purification of the Major Anti-Inflammatory Triterpenoid Esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia* **2003**, *74*, 328–338. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00051-0).
38. Danielski, L.; Campos, L.M.A.S.; Bresciani, L.F.V.; Hense, H.; Yunes, R.A.; Ferreira, S.R.S. Marigold (*Calendula officinalis* L.) Oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and Composition Profile. *Chem. Eng. Process.* **2007**, *46*, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.05.004>.
39. Petrovic, L.; Lepojevic, Z.; Sovilj, V.; Adamovic, D.; Tesevic, V. An Investigation of CO₂ Extraction of Marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Serb. Chem. Soc.* **2007**, *72*, 407–413. <https://doi.org/10.2298/JSC0704407P>.
40. Petrovic, L.; Lepojevic, Z.; Sovilj, V.; Adamovic, D.; Tesevic, V. Composition of Essential Oil Obtained from Tubular, Head and Ligulate Flowers of *Calendula officinalis* L. by Steam Distillation of Plant Material and CO₂ Extracts. *J. Essent. Oil Res.* **2010**, *22*, 143–146. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700287>.
41. Gimenez-Rota, C.; Langa, E.; Urieta, J.S.; Hernaiz, M.J.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Fractionation of Antioxidant Compounds from *Lavandula Luisieri* (Rozeira) Riv.-Mart. *J. Supercrit. Fluids* **2020**, *161*, 104821. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104821>.
42. Martin, L.; Gonzalez-Coloma, A.; Adami, R.; Scognamiglio, M.; Reverchon, E.; Della Porta, G.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Fractionation of Ryanodol from *Persea Indica*. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *60*, 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.03.012>.
43. Sanchez-Camargo, A.P.; Mendiola, J.A.; Valdes, A.; Castro-Puyana, M.; Garcia-Canas, V.; Cifuentes, A.; Herrero, M.; Ibanez, E. Supercritical Antisolvent Fractionation of Rosemary Extracts Obtained by Pressurized Liquid Extraction to Enhance Their Antiproliferative Activity. *J. Supercrit. Fluids* **2016**, *107*, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.07.019>.
44. Gimenez-Rota, C.; Loran, S.; Mainar, A.M.; Hernaiz, M.J.; Rota, C. Supercritical Carbon Dioxide Antisolvent Fractionation for the Sustainable Concentration of *Lavandula luisieri* (Rozeira) Riv.- Mart Antimicrobial and Antioxidant Compounds and Comparison with Its Conventional Extracts. *Plants* **2019**, *8*, 455. <https://doi.org/10.3390/plants8110455>.
45. Langa, E.; Pardo, J.I.; Gimenez-Rota, C.; Gonzalez-Coloma, A.; Hernaiz, M.J.; Mainar, A.M. Supercritical Anti-Solvent Fractionation of *Artemisia Absinthium* L. Conventional Extracts: Tracking Artemetin and Casticin. *J. Supercrit. Fluids* **2019**, *151*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.05.003>.
46. Schwöbel, J.A.H.; Klamt, A. Mechanistic Skin Penetration Model by the COSMOperm Method: Routes of Permeation, Vehicle Effects and Skin Variations in the Healthy and Compromised Skin. *Comput. Toxicol.* **2019**, *11*, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.comtox.2019.02.004>.
47. Tsakovska, I.; Pajeva, I.; Al Sharif, M.; Alov, P.; Fioravanzo, E.; Kovarich, S.; Worth, A.P.; Richarz, A.-N.; Yang, C.; Mostrag-Szlichtyng, A.; et al. Quantitative Structure-Skin Permeability Relationships. *Toxicology* **2017**, *387*, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.008>.
48. Ates, G.; Steinmetz, F.P.; Doktorova, T.Y.; Madden, J.C.; Rogiers, V. Linking Existing In Vitro Dermal Absorption Data to Physicochemical Properties: Contribution to the Design of a Weight-of-Evidence Approach for the Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients with Low Dermal Bioavailability. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *76*, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.01.015>.
49. Williams, F.M.; Rothe, H.; Barrett, G.; Chiodini, A.; Whyte, J.; Cronin, M.T.D.; Monteiro-Riviere, N.A.; Plautz, J.; Roper, C.; Westerhout, J.; et al. Assessing the Safety of Cosmetic Chemicals: Consideration of a Flux Decision Tree to Predict Dermally Delivered Systemic Dose for Comparison with Oral TTC (Threshold of Toxicological Concern). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *76*, 174–186. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.01.005>.
50. Wilcox, R.A.; Deyoe, C.W.; Pfost, H.B. A Method for Determining and Expressing the Size of Feed Particles by Sieving. *Poult. Sci.* **1970**, *49*, 9–13. <https://doi.org/10.3382/ps.0490009>.
51. Mur, R.; Pardo, J.I.; Pino-Otin, M.R.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Fractionation of Antioxidant Compounds from *Salvia Officinalis*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9351. <https://doi.org/10.3390/ijms22179351>.
52. Marqués, J.L.; Porta, G. Della; Reverchon, E.; Renuncio, J.A.R.; Mainar, A.M. Supercritical Antisolvent Extraction of Antioxidants from Grape Seeds after Vinification. *J. Supercrit. Fluids* **2013**, *82*, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.07.005>.

53. Klamt, A. Conductor-Like Screening Model for Real Solvents—A New Approach to the Quantitative Calculation of Solvation Phenomena. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 2224–2235. <https://doi.org/10.1021/j100007a062>.
54. Klamt, A. COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics. In Proceedings of the 28th European Symposium on Computer Aided Process Engineering, Graz, Sunday, 10–13 June 2018; Friedl, A., Klemes, J.J., Radl, S., Varbanov, P.S., Wallek, T., Eds.; Elsevier Science Bv: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 43, p. 9. ISBN 978-0-444-64235-6.
55. Buggert, M.; Cadena, C.; Mokrushina, L.; Smirnova, I.; Maginn, E.J.; Arlt, W. COSMO-RS Calculations of Partition Coefficients: Different Tools for Conformational Search. *Chem. Eng. Technol.* **2009**, *32*, 977–986. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800654>.
56. Klamt, A.; Huniar, U.; Spycher, S.; Keldenich, J. COSMOmic: A Mechanistic Approach to the Calculation of Membrane-Water Partition Coefficients and Internal Distributions within Membranes and Micelles. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12148–12157. <https://doi.org/10.1021/jp801736k>.
57. Jakobtorweihen, S.; Zuniga, A.C.; Ingram, T.; Gerlach, T.; Keil, F.J.; Smirnova, I. Predicting Solute Partitioning in Lipid Bilayers: Free Energies and Partition Coefficients from Molecular Dynamics Simulations and COSMOmic. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 045102. <https://doi.org/10.1063/1.4890877>.
58. Droge, S.T.J.; Hermens, J.L.M.; Gutsell, S.; Rabone, J.; Hodges, G. Predicting the Phospholipophilicity of Monoprotic Positively Charged Amines. *Environ. Sci.-Process. Impacts* **2017**, *19*, 307–323. <https://doi.org/10.1039/c6em00615a>.
59. Yordanova, D.; Ritter, E.; Gerlach, T.; Jensen, J.H.; Smirnova, I.; Jakobtorweihen, S. Solute Partitioning in Micelles: Combining Molecular Dynamics Simulations, COSMOmic, and Experiments. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 5794–5809. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b03147>.
60. Bittermann, K.; Linden, L.; Goss, K.-U. Screening Tools for the Bioconcentration Potential of Monovalent Organic Ions in Fish. *Environ. Sci.-Process. Impacts* **2018**, *20*, 845–853. <https://doi.org/10.1039/c8em00084k>.
61. Klamt, A.; Schwoebel, J.; Huniar, U.; Koch, L.; Terzi, S.; Gaudin, T. COSMOplex: Self-Consistent Simulation of Self-Organizing Inhomogeneous Systems Based on COSMO-RS. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 9225–9238. <https://doi.org/10.1039/c9cp01169b>.
62. Naegel, A.; Heisig, M.; Wittum, G. Detailed Modeling of Skin Penetration—An Overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 191–207. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.009>.
63. Baumann, D.; Adler, S.; Gruner, S.; Otto, F.; Weinreich, B.; Hamburger, M. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Marigold at High Pressures: Comparison of Analytical and Pilot-Scale Extraction. *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 226–230. <https://doi.org/10.1002/pca.772>.
64. Lopez-Padilla, A.; Ruiz-Rodriguez, A.; Reglero, G.; Fornari, T. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of *Calendula Officinalis*: Kinetic Modeling and Scaling up Study. *J. Supercrit. Fluids* **2017**, *130*, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.033>.
65. Hamzawy, M.A.; El-Denshary, E.S.M.; Hassan, N.S.; Mannaa, F.A.; Abdel-Wahhab, M.A. Dietary Supplementation of *Calendula Officinalis* Counteracts the Oxidative Stress and Liver Damage Resulted from Aflatoxin. *ISRN Nutr.* **2013**, *2013*, e538427. <https://doi.org/10.5402/2013/538427>.
66. Quintana, S.E.; Villanueva-Bermejo, D.; Reglero, G.; Garcia-Risco, M.R.; Fornari, T. Supercritical Antisolvent Particle Precipitation and Fractionation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extracts. *J. CO₂ Util.* **2019**, *34*, 479–489. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.032>.
67. Martin, A.; Gutierrez, L.; Mattea, F.; Cocero, M.J. Precipitation of Mandelic Acid with a Supercritical Antisolvent Process: Experimental and Theoretical Analysis, Optimization, and Scaleup. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 1552–1562. <https://doi.org/10.1021/ie0608051>.
68. Huang, D.; Zhu, Z.; Wang, Q.; Qin, B.; Dai, L.; Jiang, F.; Liu, W.; Qian, H. Prediction Model, Experimental Optimization, and Verification for Yield of High-Pressure Crystallization: A Case Study of Citric Acid. *Sep. Sci. Technol.* **2020**, *55*, 135–143. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1561717>.
69. Reverchon, E.; Caputo, G.; De Marco, I. Role of Phase Behavior and Atomization in the Supercritical Antisolvent Precipitation. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, *42*, 6406–6414. <https://doi.org/10.1021/ie0302138>.
70. Cardoso, M.A.T.; Cabral, J.M.S.; Palavra, A.M.F.; Geraldies, V. CFD Analysis of Supercritical Antisolvent (SAS) Micronization of Minocycline Hydrochloride. *J. Supercrit. Fluids* **2008**, *47*, 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.08.008>.
71. Sikroria, T.; Kushari, A.; Syed, S.; Lovett, J.A. Experimental Investigation of Liquid Jet Breakup in a Cross Flow of a Swirling Air Stream. *J. Eng. Gas Turbines Power-Trans. ASME* **2014**, *136*, 061501. <https://doi.org/10.1115/1.4026244>.
72. Rantakyla, M.; Jantti, M.; Aaltonen, O.; Hurme, M. The Effect of Initial Drop Size on Particle Size in the Supercritical Antisolvent Precipitation (SAS) Technique. *J. Supercrit. Fluids* **2002**, *24*, 251–263. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(02\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(02)00034-7).
73. Werling, J.O.; Debenedetti, P.G. Numerical Modeling of Mass Transfer in the Supercritical Antisolvent Process. *J. Supercrit. Fluids* **1999**, *16*, 167–181. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(99\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(99)00027-3).
74. Werling, J.O.; Debenedetti, P.G. Numerical Modeling of Mass Transfer in the Supercritical Antisolvent Process: Miscible Conditions. *J. Supercrit. Fluids* **2000**, *18*, 11–24. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(00\)00054-1](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(00)00054-1).
75. Mukhopadhyay, M.; Dalvi, S.V. Mass and Heat Transfer Analysis of SAS: Effects of Thermodynamic States and Flow Rates on Droplet Size. *J. Supercrit. Fluids* **2004**, *30*, 333–348. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2003.10.001>.
76. Baldyga, J. Mixing and Fluid Dynamics Effects in Particle Precipitation Processes. *KONA Powder Part. J.* **2016**, *33*, 127–149.
77. Cardoso, F. a. R.; Vogel, E.M.; Souza, M.F.; Cardozo-Filho, L. Mathematical Modeling to Predict the Size and Nucleation Rate of Micro and Nanoparticles Using the Scale-up Process with Supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* **2019**, *154*, 104608. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104608>.

78. Dukhin, S.S.; Shen, Y.; Dave, R.; Pfeffer, R. Development in Modeling Submicron Particle Formation in Two Phases Flow of Solvent-Supercritical Antisolvent Emulsion. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *134–135*, 72–88. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.04.022>.
79. Kumar, R.; Thakur, A.K.; Banerjee, N.; Chaudhari, P. Investigation on Crystallization Phenomena with Supercritical Carbon Dioxide (CO₂) as the Antisolvent. *Int. J. Chem. React. Eng.* **2021**, *19*, 861–871. <https://doi.org/10.1515/ijcre-2020-0189>.
80. De Marco, I.; Reverchon, E. Influence of Pressure, Temperature and Concentration on the Mechanisms of Particle Precipitation in Supercritical Antisolvent Micronization. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *58*, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.06.005>.
81. Mihalovits, M.; Horvath, A.; Lorincz, L.; Szekely, E.; Kemeny, S. Model Building on Selectivity of Gas Antisolvent Fractionation Method Using the Solubility Parameter. *Period. Polytech.-Chem. Eng.* **2019**, *63*, 294–302. <https://doi.org/10.3311/PPch.12855>.
82. Mihalovits, M.; Korosi, M.; Szekely, E. New Formula for the Hydrogen-Bonding Hansen Component of Methanol, Ethanol, and n-Propanol for Non-Ambient Conditions-Application in Gas Antisolvent Fractionation-Based Optical Resolution. *ACS Omega* **2021**, *6*, 18964–18974. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02223>.
83. Pasca, M.B.; Pallag, A.; Gitea, D. The quantitative determination of active principles from *Calendula officinalis* L. *Inflorescences* **2013**, *XII*, 317–320.
84. Ferreira, C.; Pereyra, A.; Patriarca, A.; Mazzobre, M.; Polak, T.; Abram, V.; Buera, M.; PoklarUlrihd, N. Phenolic Compounds in Extracts from Eucalyptus Globulus Leaves and *Calendula officinalis* Flowers. *J. Nat. Prod. Resour.* **2016**, *2*, 53–57.
85. Zhang, K.; Sun, W.; Fahr, A.; Zeng, X.; Ge, L.; Chen, M.; Yang, L.; Wu, S.; Fei, J.; Zhou, B. Skin-Permeating Components of *Lonicera Japonica* Flos: A Comprehensive Study from Observations and Model Computations. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 12538–12547. <https://doi.org/10.1039/c9nj01123d>.
86. Farrell, T.L.; Poquet, L.; Dew, T.P.; Barber, S.; Williamson, G. Predicting Phenolic Acid Absorption in Caco-2 Cells: A Theoretical Permeability Model and Mechanistic Study. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 397–406. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.041665>.
87. Mortelet, O.; Jorissen, J.; Spacova, I.; Lebeer, S.; van Nuijs, A.L.N.; Hermans, N. Demonstrating the Involvement of an Active Efflux Mechanism in the Intestinal Absorption of Chlorogenic Acid and Quinic Acid Using a Caco-2 Bidirectional Permeability Assay. *Food Funct.* **2021**, *12*, 417–425. <https://doi.org/10.1039/d0fo02629h>.
88. Artursson, P.; Palm, K.; Luthman, K. Caco-2 Monolayers in Experimental and Theoretical Predictions of Drug Transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *22*, 67–84. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00415-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00415-2).
89. Sugino, M.; Todo, H.; Suzuki, T.; Nakada, K.; Tsuji, K.; Tokunaga, H.; Jinno, H.; Sugibayashi, K. Safety Prediction of Topically Exposed Biocides Using Permeability Coefficients and the Desquamation Rate at the Stratum Corneum. *J. Toxicol. Sci.* **2014**, *39*, 475–485. <https://doi.org/10.2131/jts.39.475>.
90. Kimura, E.; Kawano, Y.; Todo, H.; Ikarashi, Y.; Sugibayashi, K. Measurement of Skin Permeation/Penetration of Nanoparticles for Their Safety Evaluation. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 1476–1486. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00103>.

Esta memoria se terminó de
confeccionar en Zaragoza en el mes de
febrero de MMXXII.