

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química-Física Aplicada
Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)



FACULTAD DE
CIENCIAS

CIAL



**ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRACTOS
DE PLANTAS Y DE SUS COMBINACIONES**

ERIKA VÁZQUEZ RODRÍGUEZ

Tesis Doctoral
Madrid, Noviembre 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química-Física Aplicada
Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)

**ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRACTOS
DE PLANTAS Y DE SUS COMBINACIONES**

Memoria presentada por:
Erika Vázquez Rodríguez

Para optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. Tiziana Fornari Reale
(Universidad Autónoma de Madrid)

Dra. Mónica Rodríguez García-Risco
(Universidad Autónoma de Madrid)

D^a. Tiziana Fornari Reale, Dra en Ingeniería Química y Profesora Titular de la Universidad Autónoma de Madrid y D^a. Mónica Rodríguez García-Risco, Dra en Ciencias Químicas y Profesora Contratada Doctora de la Universidad Autónoma de Madrid.

INFORMAN:

Que el presente trabajo titulado: “Actividades biológicas de extractos de plantas y de sus combinaciones” y que constituye la memoria que presenta Dña. Erika Vázquez Rodríguez para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ha sido realizado en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación de la Universidad Autónoma de Madrid bajo su dirección.

Y para que así conste firman el presente informe en Madrid a 3 de Noviembre de 2015.

Fdo: Dra. Tiziana Fornari Reale

Fdo: Dra. Mónica Rodríguez García-Risco

A mi amor, mi amigo y compañero.

Iván

AGRADECIMIENTOS

En todos estos años he tenido la suerte de conocer personas muy especiales que no solo me han aportado conocimientos y saber hacer a nivel profesional, sino que me han ayudado a crecer como persona y en la mayoría de los casos han llegado a ser mucho más que compañeros, amigos.

En primer lugar, quería agradecer a Tiziana y Mónica que hayan hecho posible este trabajo, pero sobre todo por brindarme la oportunidad de hacer realidad mi sueño ser doctora. Gracias por creer en mí y por guiarme en este camino. No solo habéis sido mentoras, sino confidentes y amigas. Gracias por vuestro trabajo, apoyo y cercanía.

Al Dr. Guillermo Reglero por permitirme formar parte de este grupo de investigación, que ha sido mi familia durante estos años.

A las Dras. Laura Jaime y Susana Santoyo por formar parte de esta tesis y por sus enseñanzas a lo largo de estos años. Vuestro trabajo ha sido fundamental para que esto fuera posible.

Quería agradecer especialmente al Dr. Marin Prodanov por darme esa primera oportunidad y hacer posible que comenzara mi carrera investigadora, y por compartir conmigo sus conocimientos científicos (y musicales).

A todos los Doctores que forman parte del Departamento, porque todos habéis aportado vuestro granito de arena y por el trato recibido durante estos años. Un agradecimiento especial a la Dra. Montserrat González por su apoyo, sus consejos, por los momentos compartidos y por estar siempre ahí para todos nosotros.

A toda la gente del CIAL (personal, becarios, doctores...) con los que he tenido la suerte de cruzarme en este camino y a José (Mendiola), que siempre ha estado dispuesto a resolvernó todas las dudas que nos surgían (¡que paciencia has tenido!).

Por supuesto, gracias a todos mis compañeros de laboratorio por hacer esta experiencia aún mejor. Piticli (ahora conocido como Dr. Villanueva) y Juanan, que buenos momentos, risas, charlas, me siento muy afortunada por haber podido conocerlos y compartir estos años con vosotros (sois dos grandes personas), me llevo dos amigos. Tengo que agradecer especialmente a Maika y a Ana, no solo por ser dos grandes amigas, sino por haber dejado su huella en esta tesis. Y no me olvido de toda esa gente extraordinaria: Inés, Alba, Ali, Laila, Gonzalo, Elena... y tantos otros.

A los que más tengo que agradecer, es sin lugar a dudas a mi familia. A mis padres, por apoyarme y darme todas las herramientas para que haya podido llegar hasta aquí, pero sobre todo por quererme (y aguantarme) y hacerme la persona que soy hoy. A mi hermana y a mi abuelo Luis (muchas gracias por sentirte orgulloso de mí), os quiero. Indudablemente, te lo agradezco a ti Iván, por ser mi pilar durante estos 18 años y por estar ahí tanto en los momentos buenos como en los malos (este trabajo también es tuyo).

ÍNDICE

Abreviaturas	III
Resumen	VI
1. Introducción	1
1.1 Fitoquímicos isoprenoides para el diseño de extractos bioactivos	5
1.1.1 Monoterpenos y sesquiterpenos	7
1.1.2 Diterpenos fenólicos	14
1.1.3 Ácidos triterpénicos	17
1.1.4 Tetraterpenos: carotenos y xantofilas	23
1.2 Fuentes naturales de compuestos terpénicos	29
1.2.1 Albahaca	30
1.2.2 Mejorana	32
1.2.3 Romero	34
1.2.4 Caléndula	39
1.2.5 Espinaca	42
1.2.6 Brezo	44
1.3 Tecnologías de extracción con fluidos comprimidos	45
1.3.1 Extracción con líquidos presurizados	46
1.3.2 Extracción con CO ₂ supercrítico	49
1.4 Actividades biológicas	53
1.4.1 Actividad antioxidante	53
1.4.2 Actividad antiinflamatoria	55
1.4.3 Actividad antiviral: Anti-Hepatitis C	60
2. Objetivos y Plan de Trabajo	67
3. Materiales y métodos	73
3.1 Matrices vegetales y su preparación	73
3.2 Procedimientos de extracción	74
3.2.1 Extracción sólido-líquido	74
3.2.2 Extracción con líquidos presurizados	74

3.2.3	Extracción con fluidos supercríticos	75
3.3	Análisis cromatográfico de los fitoquímicos	77
3.4	Otros métodos de cuantificación	78
3.4.1	Determinación de polifenoles totales	78
3.4.2	Determinación de carotenoides totales	79
3.5	Determinación de actividades biológicas de los extractos	80
4.	Resultados y discusión	85
4.1	Actividad antioxidante	85
4.1.1	Fuentes de compuestos fenólicos: albahaca, mejorana y romero	90
4.1.2	Fuentes de carotenoides: espinaca y caléndula	99
4.1.3	Estudio de la actividad antioxidante de extractos combinados	106
4.1.3.1	Mezclas de extractos de mejorana y espinaca	113
4.1.3.2	Mezclas de extractos de romero y espinaca: Simultaneous extraction of rosemary and spinach leaves and its effect on the antioxidant activity of products.	116
4.2	Actividad antiinflamatoria	152
4.2.1	Fuentes de ácidos triterpénicos: caléndula y brezo	152
4.2.2	Estudio de la actividad antiinflamatoria de extractos combinados de brezo y caléndula	156
4.2.3	Actividad antiinflamatoria de extractos de espinaca: Extraction of functional ingredients from spinach (<i>Spinacia oleracea</i> L.) using liquid solvent and supercritical CO ₂ extraction.	164
4.3	Actividad antiviral	198
4.3.1	Estudio de la actividad anti-VHC del brezo: Supercritical fluid extraction of heather (<i>Calluna vulgaris</i>) and evaluation of anti-hepatitis C virus activity of the extracts.	198
5.	Discusión	229
6.	Conclusiones	239
7.	Bibliografía	243
Anexo:	Otras publicaciones	293

ABREVIATURAS

SFE: extracción con fluidos supercríticos (Supercritical Fluid Extraction)

PLE: extracción con líquidos presurizados (Pressurized Liquid Extraction)

SLE: extracción sólido-líquido (Solid Liquid Extraction)

VHC: virus hepatitis C

IPP: pirofosfato de isoprenilo

BHT: hidroxitolueno butilado

BHA: hidroxianisol butilado

LPS: lipopolisacárido

GSH: glutatión

SOD: superóxido dismutasa

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante beta 1

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

LDL: lipoproteína de baja densidad (Low Density Lipoprotein)

ox-LDL: lipoproteína de baja densidad oxidada

ORAC: capacidad de absorción de radicales de oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

FRAP: poder antioxidante de reducción férrica (Ferric Reducing Antioxidant Power)

TEAC: capacidad antioxidante equivalente de Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

ABTS: 2,20-azonobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

SCCO₂: dióxido de carbono supercrítico

EPA: ácido eicosapentaenoico

DHA: ácido docosahexaenoico

IL-1 β : interleuquina 1 beta

IL-6: interleuquina 6

IL-10: interleuquina 10

ACTH: hormona adrenocorticotropa

PGE-1: prostaglandina E1

PGE-2: prostaglandina E2

MAPK: mitogen-activated protein kinases

NF- κ B: factor nuclear κ B

AP-1: proteína activadora 1

COX-1: ciclooxigenasa 1

COX-2: ciclooxigenasa 2 o prostaglandina endoperóxido sintasa

ROS: especies reactivas de oxígeno

VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)

VSMC: células vasculares del musculo liso

ARN: ácido ribonucleico

ADN: ácido desoxirribonucleico

IFN- γ : interferón gamma

GC: cromatografía de gases

FID: detector de ionización de llama

MS: espectrómetro de masas.

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

UV-DAD: detector haz de diodos (ultravioleta/visible)

KOH: hidróxido de potasio

THP-1: línea celular de leucemia monocítica

RESUMEN



RESUMEN

Desde la antigüedad las plantas han sido utilizadas en la medicina tradicional por sus diversas propiedades terapéuticas; la producción de medicamentos a partir de ellas y su uso para la prevención, atenuación o curación de dolencias y enfermedades dieron lugar a la fitoterapia y ha ido sentando las bases de la farmacopea actual.

En las últimas décadas se ha intensificado el estudio de la acción farmacológica de ciertas plantas, buscando el conocimiento e identificación de los compuestos responsables de estos efectos, sustancias denominadas fitoquímicos o compuestos bioactivos. Estos compuestos pueden ser de una variada naturaleza química y han demostrado proporcionar un gran número de propiedades tales como antioxidante, antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, sedante, entre otras, atractivas desde en el punto de vista farmacológico o cosmético, y también interesantes en el marco de los alimentos funcionales.

Sin embargo, es difícil atribuir cierta propiedad funcional a un único componente de la planta, siendo generalmente la acción sinérgica de varias sustancias las que producen el efecto bioactivo. Así, resulta interesante plantear la posibilidad de obtener productos enriquecidos en compuestos que presenten esta habilidad de actuar sinérgicamente, ya sea mediante la extracción conjunta de varias plantas o la mezcla de extractos de diferentes plantas. Estos procedimientos pueden proporcionar un medio para la obtención de extractos de alto valor añadido que permitan la formulación de nuevos productos.

Esta tesis se desarrolló en el marco del proyecto “Nuevos Ingredientes Saludables para el Diseño de Alimentos Funcionales Innovadores a partir de Plantas de Origen Mediterráneo” (INNSAMED) (2010-2013) dentro del subprograma INNPACTO, siguiendo uno de los objetivos principales del proyecto, esto es, el desarrollo de ingredientes alimentarios saludables innovadores a partir de especies vegetales típicas de la alimentación mediterránea, mediante la aplicación de tecnologías de extracción novedosas. Así, la tesis se centra en la obtención de extractos bioactivos a partir de romero, albahaca, mejorana, caléndula, espinaca y brezo, así como en la búsqueda de efectos sinérgicos entre sus mezclas. Para ello se aplicaron diferentes técnicas de extracción basadas en el uso de fluidos comprimidos, como la extracción supercrítica (SFE) y la extracción con líquidos presurizados (PLE), y se estudiaron los extractos obtenidos y sus combinaciones desde el punto de vista del contenido de compuestos bioactivos conocidos y de sus actividades biológicas (antioxidante, antiinflamatoria y antiviral).

En el primer capítulo se presentan los resultados de la investigación sobre la composición y actividad antioxidante de extractos SFE y PLE obtenidos a partir de albahaca, mejorana, romero, espinaca y caléndula. En base a los resultados, se seleccionaron el romero y la espinaca para estudiar la extracción simultánea de una mezcla de romero y espinaca, utilizando también la SFE y PLE como tecnologías de extracción. El objetivo fue investigar un potencial aumento de la actividad antioxidante, debido a posibles efectos sinérgicos entre los diterpenos fenólicos del romero (ácido carnósico y carnosol) y los carotenoides de la espinaca (β -caroteno y luteína). El producto obtenido de la extracción conjunta se comparó con los extractos obtenidos a partir de las plantas individuales, así como con la mezcla de

los extractos individuales. Los resultados del estudio dieron lugar a la publicación “*Simultaneous extraction of rosemary and spinach leaves and its effect on the antioxidant activity of products*” (Journal of Supercritical Fluids 82 (2013) 138-145). En el artículo se muestra un incremento de la actividad antioxidante del producto obtenido por extracción conjunta de las plantas y se demuestra que este incremento se debe a un aumento en el contenido de ácido carnósico del romero, posiblemente debido a un efecto cosolvente en la extracción simultánea, sin embargo no se observa un efecto sinérgico entre los compuestos fenólicos del romero y los carotenoides de la espinaca.

El segundo capítulo, muestra los resultados de los estudios de actividad antiinflamatoria de los extractos obtenidos mediante fluidos supercríticos de caléndula y brezo, así como de sus combinaciones y la extracción conjunta de ambos, analizando la posible correlación entre el contenido en ácido oleanólico y ácido ursólico de los extractos y su actividad antiinflamatoria. Asimismo se estudió el efecto del procedimiento de extracción (extracción sólido-líquido a presión ambiente, PLE y SFE) en la composición de los extractos de espinaca, con el objetivo de comprobar la influencia del contenido de compuestos fenólicos y carotenoides en la actividad antiinflamatoria y antioxidante de estos extractos. Los resultados de este estudio constituyen el artículo titulado “*Extraction of functional ingredients from spinach (*Spinacia oleracea* L.) using liquid solvent and supercritical CO₂ extraction*” (Journal of the Science and Food Agriculture 95 (4) (2015) 722–729). Tanto los extractos enriquecidos con compuestos fenólicos como en carotenoides mostraron una alta actividad antioxidante. Además, los extractos SFE concentrados en carotenoides son los que demostraron la mayor actividad antiinflamatoria, lo que parece indicar que los carotenoides de la espinaca son capaces

de ejercer mayor actividad anti-inflamatoria que los compuestos fenólicos de esta planta.

Finalmente, el alto contenido de ácidos triterpénicos observado en los extractos de brezo, y la potencial actividad de estos compuestos contra el virus de la hepatitis C, recientemente publicada en la bibliografía, motivaron el estudio de la actividad anti-VHC de los extractos SFE de brezo y resultaron en la tercera contribución de esta tesis: “*Supercritical fluid extraction of heather (Calluna vulgaris) and evaluation of anti-hepatitis C virus activity of the extracts*” (Virus Research 198 (2015) 9-14). Se evaluaron diferentes condiciones de extracción, con el objetivo de optimizar la extracción de los ácidos triterpénicos oleanólico y ursólico, y se estudió la actividad antiviral mediante la inhibición del ciclo de vida completo del virus y la inhibición de la entrada viral. Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de poder utilizar estos extractos en el tratamiento del virus de la hepatitis.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

La relación entre la dieta y la salud ya era bien reconocida desde la antigüedad. En el libro más antiguo de la medicina tradicional China, el Huang Di Neijing, escrito en forma de diálogo entre el Emperador y su médico de cabecera, se pueden encontrar descripciones de las propiedades curativas de algunas frutas y hortalizas. Por otro lado, el uso con finalidades terapéuticas de algunas plantas no alimenticias, tales como plantas aromáticas y arbustivas, se encuentra referido en algunas tablillas sumerias y mesopotámicas. La tablilla sumeria de Nippur, que data del tercer milenio antes de Cristo, hace referencia a la preparación de extractos de peral, abeto, higuera o palmera entre otros, con finalidades médicas. Por otra parte, los textos de la cultura mesopotámica recogen más de ciento ochenta productos de origen vegetal ordenados en tres columnas: la primera con el nombre del fármaco, la segunda indicando la enfermedad para la que se empleaba y la tercera el modo de empleo.

Posteriormente se han escrito numerosos textos de enfoque médico que recogen la relación de la alimentación y la salud y que han llegado hasta nuestros días. Desde los diversos tratados hipocráticos como “De diaete”, “De diaeta in acutis”, “De salubri diaeta” de los siglos V-IV a. C., hasta las obras de Galeno (siglo II a. C.), Oribasios (siglo IV a. C.), Antimo (siglo VI a. C.) y la obra “Herbatius” de Discórides en el siglo I a. C. Es de destacar, el planteamiento de Hipócrates en una de sus obras respecto del uso de ciertas especias con fines curativos, y la práctica de tratamientos para curar o paliar determinadas dolencias haciendo uso de más de 400 tipos de plantas entre vegetales y especias [1].

Durante toda la Edad Media la carne pasa a ser uno de los alimentos más importantes de la dieta, esencialmente entre los nobles y las clases altas, ya que las verduras habían sido asignadas a la gente del pueblo, por considerarlas alimentos toscos, indigestos, y hasta indignos. Sin embargo, esto comienza a cambiar en siglos posteriores y las verduras comenzaron a ser vistas en las buenas mesas entre otras razones por prescripciones médicas. De hecho, durante el siglo XVI y comienzos del XVII, el médico adquiere una mayor autoridad sobre las prácticas alimentarias, y la dietética fue una disciplina de la que se ocupaban médicos de altura, como los que trataban a reyes tales como Francisco I, Enrique IV o Luis XIII [1].

Con la llegada de las especias de oriente, estas comienzan a incorporarse no solo a la cocina como condimento, sino también a la farmacopea. En esta época, entre los siglos XVII y XVIII los franceses tienden a separar en los diccionarios las especias-medicamentos de las que solo consideran especias aromáticas. Así, el “Dictionnaire de Trévoux” (1704) define *Especias (plural)*: *Se dice también de las drogas medicinales que vienen de Oriente...* [1]

Pero quizás, uno de los acontecimientos que revolucionó y cambió radicalmente nuestra visión acerca de los alimentos y la relación entre su composición y la salud, fue la llamada popularmente “vitaminomanía” o más concretamente la *Newer Nutrition*, un nuevo modelo alimentario elaborado en torno a las vitaminas que surge en Estados Unidos en 1928. En este momento histórico las clases medias y altas estaban dispuestas a anteponer las inquietudes vinculadas con la salud a las meramente gastronómicas. Esto, junto con una gran industrialización de la producción alimentaria, da lugar a la aparición de abundantes reclamos publicitarios que se hacen eco de las virtudes de sus

productos, ya sean naturales o procesados, debido a la presencia de determinadas vitaminas. Es así como, por ejemplo, la leche (hasta entonces un producto prácticamente destinado a los niños) pasa a ser el “alimento perfecto” para todas las edades, gracias a que es fuente de casi todos los nutrientes necesarios y a la incorporación de vitamina D. De hecho, fueron industrias lácteas las mayores impulsoras de esta “vitaminomanía”, la cual se extiende a otras ramas de la industria alimentaria. A finales de 1930, las vitaminas ya se sintetizaban y producían comercialmente en forma de píldoras o reconstituyentes por industrias farmacéuticas [1].

De esta manera, la alimentación y más concretamente los constituyentes de los alimentos habían comenzado a llamar la atención de los consumidores y de la industria alimentaria, y se había abierto un nuevo campo de estudio. La búsqueda de una explicación científica de esta relación entre los alimentos y la salud ha ido creciendo continuamente hasta nuestros días. Actualmente, numerosos estudios avalan la relación que existe entre determinadas dietas y el estado de salud [2-6]. La idea de reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades a través de la alimentación, ha promovido el desarrollo de un nuevo campo de investigación dentro de las Ciencias de la Alimentación: el de los alimentos funcionales [7].

El término Alimento Funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80 con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU) y que se refiere a aquellos alimentos procesados que contienen ingredientes capaces de desempeñar una función específica en las funciones fisiológicas del organismo, más allá de su contenido nutricional. Un alimento funcional se define como:

cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales que favorecen a la salud, la capacidad física y/o el estado mental de una persona.

La demanda de alimentos funcionales ha ido creciendo en el mercado, particularmente en la última década. A principios del 2000 se estimaba que el mercado de alimentos funcionales aumentaría a tasas del 15% mientras que el de la industria alimentaria tradicional crecía a tasas de sólo 1% a 3%. La reconocida consultora Datamonitor, daba datos en el año 2007 de que la combinación del mercado de Europa, USA y Asia Pacífico alcanzaba los US\$72,3 billones. Según el informe elaborado por la consultora Leatherhead Food Research, el mercado global de alimentos funcionales alcanzará los \$54 mil millones en el 2017, lo cual representa un crecimiento del 25% comparado con los datos de 2013.

En la actualidad, la investigación y desarrollo de alimentos funcionales forma parte de las políticas de los países desarrollados. Países como Japón, Estados Unidos, Canadá, y países la Unión Europea, han impulsado el desarrollo y regularización del sector de los alimentos funcionales, como una vía estratégica para una población más sana y con un mejor estilo de vida. Los productos vegetales constituyen una fuente natural de un variado número de ingredientes funcionales o compuestos bioactivos, que pueden ser aprovechados para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, nutracéuticos o suplementos. [8, 9]

El estudio de las propiedades terapéuticas de las plantas y la forma en la que actúan en la prevención, atenuación o curación de una enfermedad, es lo que se denomina fitoterapia. Fue Dioscórides, médico y farmacólogo griego, quien con su

obra “De materia médica” sentó las bases de la fitoterapia y el uso farmacéutico de las plantas, ya que dicha obra es un tratado de productos vegetales con propiedades medicinales, la patología que se puede tratar con ellas y la parte que hay que utilizar de las mismas en cada caso.

Hoy en día la ciencia ha confirmado las acciones farmacológicas de ciertas plantas y ha determinado que este efecto se debe a la presencia de determinados compuestos químicos (fitoquímicos) denominados compuestos bioactivos o compuestos con actividades funcionales. Los compuestos bioactivos se definen como sustancias químicas no nutrientes que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas y ciertos alimentos (como frutas, verduras, nueces, aceites y granos integrales). En función de su estructura se pueden distinguir diferentes clases de compuestos como glucosinolatos, compuestos órgano-sulfúricos, fitosteroles, saponinas, fitoestrógenos, terpenos y compuestos polifenólicos, entre otros [10].

1.1 FITOQUÍMICOS ISOPRENOIDES PARA EL DISEÑO DE EXTRACTOS BIOACTIVOS

Los terpenos son sustancias que se constituyen a partir de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), por lo que también se les llama isoprenoides. Cuando los terpenos se modifican químicamente suelen denominarse también terpenoides. Pueden ser divididos en base a su esqueleto carbonado según se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Clases de terpenos

Terpenos	Nº átomos de carbono	Nº subunidades de isopreno
Monoterpeno	10	2
Sesquiterpeno	15	3
Diterpeno	20	4
Triterpeno	30	6
Tetraterpeno	40	8
Politerpeno	>40	>8

En la síntesis de los terpenos el compuesto precursor es el pirofosfato de isopentenilo (IPP), pero dependiendo del organismo que lo sintetiza, existen dos vías diferentes para llegar a él. En plantas superiores y microorganismos se sigue la vía mavelónica, en la que se parte del mavelonato; mientras que en otras plantas, algas y bacterias, el IPP se sintetiza a partir del 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP).

La unión de dos monómeros de acuerdo a la Regla Isoprénica de Wallach (los esqueletos carbonados de los terpenos son divisibles por un número entero de unidades isoprénicas conectadas cabeza-cola) pueden dar el precursor de los monoterpenos, pirofosfato de geranilo (GPP). La incorporación de otra unidad isoprénica da como producto el pirofosfato de farnesilo (FPP), precursor de los sesquiterpenos. Una unidad más forma el pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), compuesto base para formar diterpenos. El escualeno, precursor de triterpenos y esteroides, se forma por la dimerización de dos unidades de FPP, mientras que el

fitoeno, compuesto base para los carotenoides, se obtiene de manera homóloga por dimerización del GGPP. Los politerpenos se forman por uniones isoprenicas múltiples y repetitivas, y por regla general no presentan ciclaciones [11]. En la Figura 1, se muestra un esquema del ciclo de síntesis de los compuestos terpénicos.

Aunque los terpenos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, la mayoría de los terpenos bioactivos se han encontrado en las plantas superiores. Los monoterpenos y sesquiterpenos están presentes principalmente en plantas que poseen aceites esenciales, mientras que los triterpenos se hallan especialmente en los bálsamos vegetales [12, 13]. Por otro lado, los terpenoides parecen jugar un importante papel ecológico al actuar como mensajeros internos y externos, ya que actúan como agentes alelopáticos, repelentes o atrayentes en las interacciones planta-planta o planta-patógeno/herbívoro [14].

1.1.1 Monoterpenos y sesquiterpenos

Los monoterpenos y sesquiterpenos son los principales componentes de los aceites esenciales de las plantas. Representan una pequeña fracción de su composición y se caracterizan por contener las sustancias responsables de su aroma característico. Son fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, solubles en disolventes orgánicos y con una densidad generalmente más baja que la del agua.

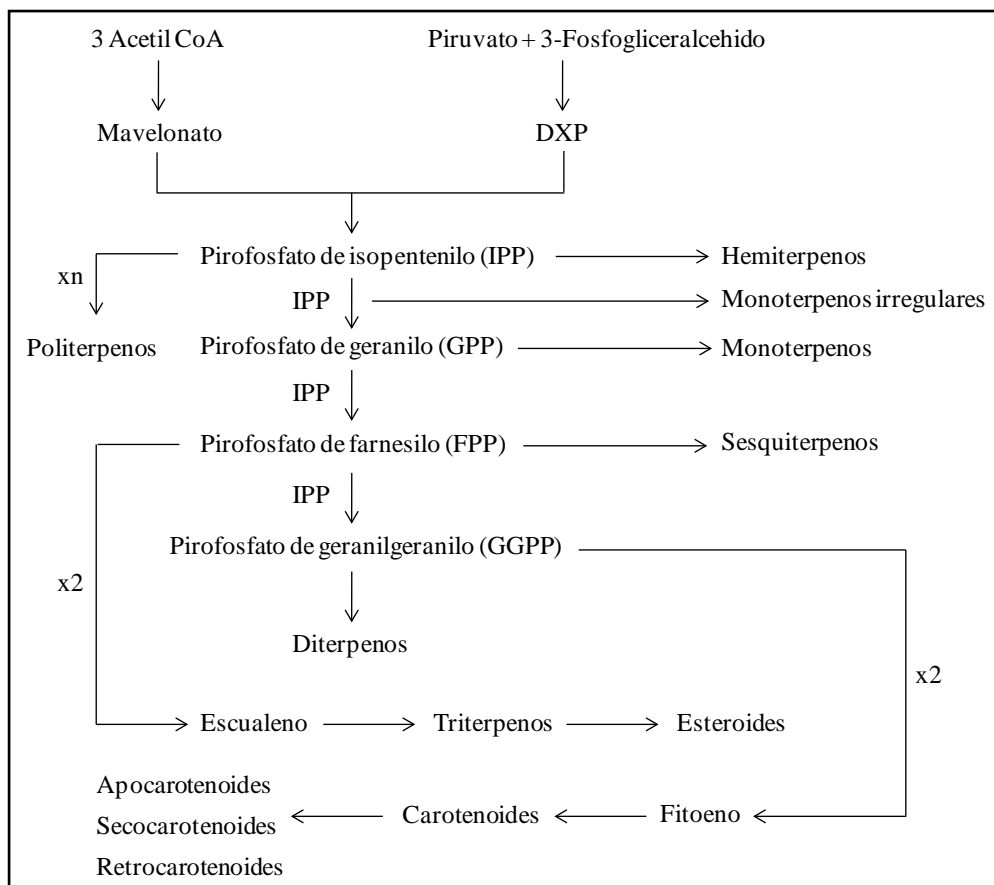


Figura 1. Ciclo de síntesis de los compuestos terpénicos

Los aceites esenciales se han venido utilizando desde la Edad Media como bactericidas, fungicidas, antiparasitario, insecticidas y aplicaciones medicinales y cosméticas. Hoy en día se emplean tanto en productos farmacéuticos como antimicrobianos [15, 16], analgésicos [17], sedantes [18, 19], anti-inflamatorios [20, 21], así como en la industria agrícola y alimentaria como conservantes [22-24] y en el campo de la cosmética por ejemplo en la formulación de perfumes [25].

Actualmente los aceites esenciales se han convertido en un objetivo para la recuperación de sustancias bioactivas naturales. Por ejemplo, desde el año 2000 hasta el 2012 han sido publicados cerca de 4000 artículos en los que "aceite esencial" o "aceite volátil" aparece como palabra clave y en torno a 3000 también incluyen la palabra "bioactivo" o "bioactividad" en el texto del artículo [26].

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Por lo general, son familias de plantas que se encuentran en zonas templadas como el Mediterráneo y los países tropicales donde representan una parte importante de la farmacopea tradicional. Se les puede encontrar en diferentes órganos de la planta: en las hojas (albahaca, eucalipto, hierbabuena, mejorana, menta, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, azafrán, cúrcuma, jengibre, valeriana, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, etc.), en las flores (lavanda, manzanilla, tomillo, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, pimienta, etc.) y se almacenan en las células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares [27,28].

La principal función biológica de los aceites esenciales en el reino vegetal es la de actuar como agentes alelopáticos, ya sea como repelentes o atrayentes en las interacciones planta-planta o planta-patógeno o influyendo en el crecimiento y desarrollo de otras especies vegetales [29-31]. Otras funciones que han sido descritas son su implicación en la defensa y la curación de heridas en algunas especies de árboles, o en el aumento de termotolerancia en plantas [32]. Los

sesquiterpenos por su parte, suelen actuar como feromonas y hormonas juveniles en las plantas [16].

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. La composición del aceite esencial es muy variable, de esta manera la cantidad de una determinada sustancia en distintas plantas puede variar desde trazas hasta proporciones muy altas (por ejemplo, alrededor de 80-90 % (% en peso) de δ -limoneno está presente en el aceite esencial de naranja). Sin embargo, los componentes presentes en trazas también son importantes, ya que todos ellos son responsables del aroma característico [26]. Además, el aceite esencial de una determinada especie puede variar en calidad, cantidad y composición en función del clima, la composición del suelo, la irrigación, el órgano de la planta, la edad y el ciclo vegetativo [33-35].

Los monoterpenos son las moléculas más representativas del aceite esencial, ya que constituyen alrededor de un 90% del mismo. Se forman a partir del enlace de dos unidades de isopreno (C10) y pueden estar formados por una gran variedad de estructuras (Figura 2) [28]. Los sesquiterpenos se forman a partir de la unión de tres unidades de isopreno (C15). Esta extensión de la cadena aumenta el número de ciclaciones, incrementando las posibilidades estructurales (Figura 3) [28].

Aunque en los aceites esenciales tanto los monoterpenos como los sesquiterpenos se encuentran en forma libre, más recientemente se han investigado

los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal [36].

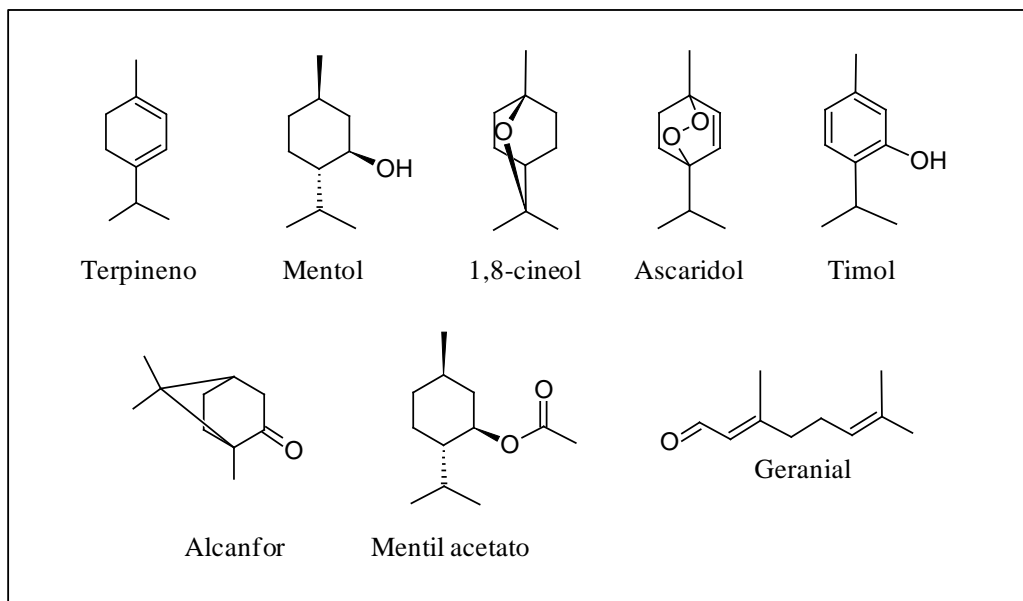


Figura 2. Monoterpenos

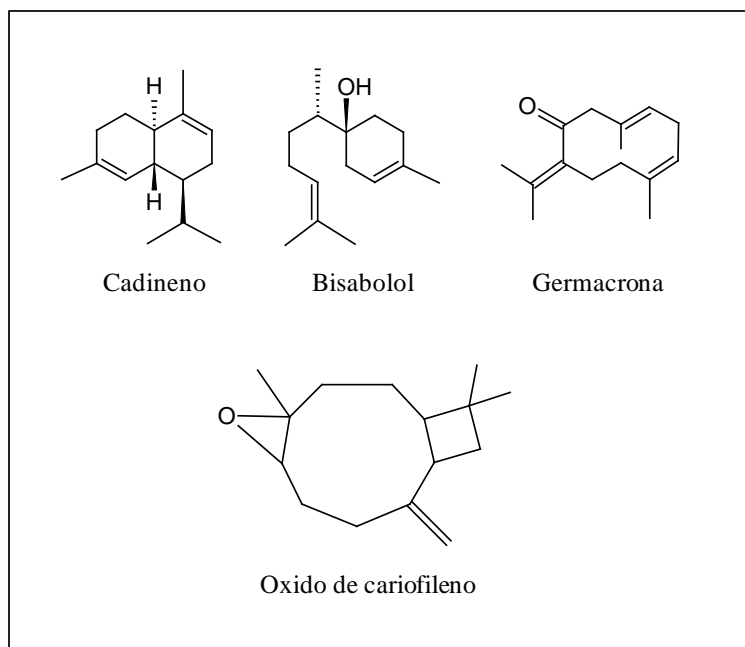


Figura 3. Sesquiterpenos

Los aceites esenciales son muy utilizados en la formulación de remedios de la fitoterapia, así como en fórmulas de la farmacopea clásica [37]. En la actualidad es reconocida su propiedad como antioxidantes [38, 39], por lo que se utilizan como aditivos de conservación en la industria alimentaria [40, 41]. Esta aplicación se debe también a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas contra patógenos que vigila la industria, como diferentes tipos de *Staphylococcus* [42, 43], *Salmonella* [44], *Escherichia coli* [45], *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y diferentes tipos de *Bacillus* [46], así como el hongo *Aspergillus* y sus aflatoxinas [47, 48]. Gracias a la investigación, se han identificado componentes individuales que se aplican como conservantes y antimicrobianos, como es el caso del eugenol en la conservación de zumos de fruta [49].

Otra propiedad biológica ampliamente reconocida en los aceites esenciales es la antiinflamatoria. En la actualidad, se ha demostrado que intervienen en el proceso inflamatorio [50, 52], comprobando que algunos de estos aceites esenciales tienen un potencial antiinflamatorio similar al de fármacos utilizados para este fin como es el diclofenaco [46] presentándose por tanto como una alternativa más natural a la medicación actual. Por otro lado, también han sido estudiados algunos de los componentes aislados de estos aceites esenciales. El linalool por ejemplo, uno de los principales constituyentes de la mayoría de los aceites esenciales [26], es capaz de ejercer una actividad antiinflamatoria semejante a la observada por su aceite esencial de procedencia [51].

Actualmente, existen también estudios sobre la actividad anticancerígena de los aceites esenciales. Esta actividad ha sido evaluada en diferentes líneas celulares tales como cáncer de lengua, de pecho, de ovario y melanoma [53, 54] dando resultados positivos, incluso en células tumorales resistentes a la quimioterapia [55]. Se ha comprobado que este efecto anticancerígeno puede producirse a través su actividad antiapoptótica y antiangiogénica, evitando por lo tanto la proliferación de las células cancerosas y la migración de las mismas [56]. Un interesante estudio realizado por Wang y col. [57] comparó la actividad anticancerígena del aceite esencial de romero con la que mostraban sus principales componentes: 1,8-cineole (27.23%), α -pinene (19.43%) and β -pinene (6.71%), representando estos porcentajes la abundancia del compuesto en el aceite esencial de romero. Los resultados mostraron que la citotoxicidad evaluada en tres tipos de líneas celulares cancerígenas iba en el orden: aceite esencial de romero > α -pineno > β -pineno > 1,8-cineol. Este estudio revela que la complejidad de la composición del aceite esencial es determinante en su potencial terapéutico, puesto que la actividad

biológica puede deberse al posible efecto sinérgico de algunos de los compuestos presentes en él.

1.1.2 Diterpenos fenólicos

Los diterpenos pueden clasificarse como lineales, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos y macrocíclicos según su estructura. En la naturaleza se suelen encontrar en formas polioxigenadas con grupos ceto e hidroxilo, estos últimos a menudo esterificados con ácidos aromáticos o estructuras alifáticas de pequeño tamaño [58].

En la Figura 4 se muestra la estructura química de dos diterpenos fenólicos, el ácido carnósico y el carnosol, ambos ampliamente estudiados por su potente actividad antioxidante [59, 60] y antiinflamatoria [61-63].

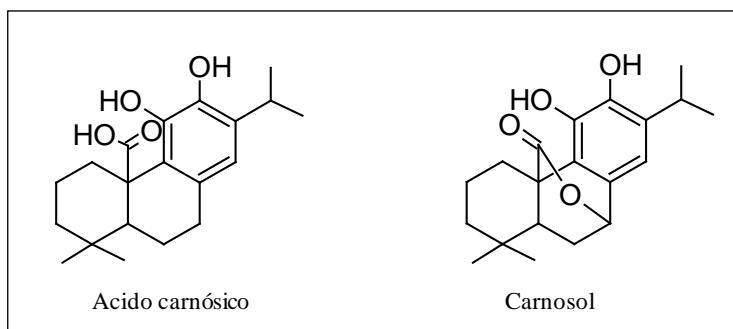


Figura 4. Estructuras del ácido carnósico y el carnosol.

El ácido carnósico fue descubierto por primera vez por Linde [64] en *Salvia officinalis* L. Más tarde, Wenkert y col. [65] encontraron ácido carnósico en niveles mucho más altos (alrededor del 3 % en hojas secas) en *Rosmarinus officinalis* L. Este diterpeno ha sido identificado en unas pocas especies de la familia *Lamiaceae*. Tan sólo algunos de los 70 géneros de la tribu *Menthae* contienen ácido carnósico: *Salvia*, *Rosmarinus*, *Lepechinia*, *Oreganum*, *Thymus*, *Hyssopus*, *Perovskia* y *Melissa*. El ácido carnósico también ha sido encontrado en el género *Ocimum* de la tribu *Ocimeae*. Actualmente, *R. officinalis* se considera la fuente más abundante de ácido carnósico, seguido de un número de especies de *Salvia* [66]

El ácido carnósico no se distribuye de manera uniforme en las plantas, estando principalmente presente en las partes aéreas. En el romero, se encuentra principalmente en los tejidos fotosintéticos: hojas, sépalos y pétalos, siendo las hojas donde se encuentra en mayor abundancia abundante (10-15 mg/ g peso fresco), seguido por los sépalos (5-10 mg/ g peso fresco) y pétalos (< 2 mg/ g peso fresco) [66, 67].

La capacidad de eliminación de radicales del ácido carnósico parece seguir un mecanismo análogo a la de otros antioxidantes, como α -tocoferol, y se debe principalmente a la presencia de los dos grupos hidroxilo en posición orto que se encuentran en C11 y C12.

La estabilidad del ácido carnósico y por tanto la capacidad de prevenir la oxidación, depende de las condiciones oxidativas. Schwarz y col. [68] demostraron que el ácido carnósico se degrada menos en comparación con otros diterpenos fenólicos, en diferentes condiciones que implican un aumento de la temperatura.

Esta resistencia al calor implica una capacidad superior para proteger de la oxidación. Además, diferentes estudios indican que el ácido carnósico ejerce una actividad antioxidante mayor que otros antioxidantes habitualmente utilizados, tales como antioxidantes sintéticos como hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA) o los tocoferoles [66].

Por otro lado, Wenkert y col. [65] demostraron que el carnosol es un 'artefacto' oxidativo derivado del ácido carnósico. La formación de este compuesto se lleva a cabo en presencia de oxígeno tanto después de la cosecha como tras el secado de las hojas. El carnosol también exhibe propiedades antioxidantes y ha sido reportado que ambos, el ácido carnósico junto con el carnosol, son los responsables del 90 % de la actividad antioxidante del romero [69].

La capacidad antioxidante y anti-inflamatoria de estos compuestos les sugiere también como interesantes compuestos anticancerígenos, por lo que han sido estudiados en diferentes líneas celulares y mediante diferentes métodos *in vivo*, probando su potencial contra diferentes tipos de cáncer como leucemia [70], melanoma [71], cáncer de colon [72,73], cáncer hepático [74], de pecho y de próstata [72]. Como se ha dicho anteriormente, esta propiedad se debe en gran medida a su actividad antioxidante [75, 76], aunque se ha determinado que estos compuestos son capaces de dificultar la progresión de la enfermedad mediante la inducción a la apoptosis [53] o restringiendo la habilidad invasiva de las células cancerosas mediante la regulación de la expresión de determinados factores celulares [71, 72] e inhibiendo la angiogénesis [77-79].

1.1.3 Ácidos triterpénicos

Los triterpenos son estructuralmente un grupo diverso de productos naturales que contienen aproximadamente 30 átomos de carbono. Están presentes tanto en organismos procariotas como eucariotas. Se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y materiales naturales resinosos, hongos y bacterias [80].

Como se muestra en la Tabla 2, los triterpenoides se clasifican en dos grupos principales; tetracíclicos y pentacíclicos. Los triterpenoides tetracíclicos tales como oleandrina, euphol y cucubitacinas son esteroides metilados. El grupo de triterpenoides pentacíclicos es mucho mayor, y se pueden clasificar como oleanos (ácido oleanólico, eritrodiol, β -amirina), ursanos (ácido ursólico, uvaol) y lupanos (ácido betulínico, betulina, lupeol), dependiendo de su esqueleto [81] (Figuras 5 y 6). Dentro de estos, los ursanos y oleananos son los dos principales grupos triterpénicos presentes en las plantas superiores, incluyendo los alimentos vegetales de consumo habitual [80].

Los triterpenoides pentacíclicos son metabolitos secundarios producidos por las plantas para una acción generalmente protectora. Estos compuestos no solo se encuentran en las plantas en forma libre, sino también como ésteres y conjugados glucosídicos llamados saponinas. Estas formas difieren en su polaridad y solubilidad en agua, y, en consecuencia, se acumulan en diferentes órganos de la planta y compartimentos celulares. Los compuestos de baja polaridad en formas libres y/o esterificadas se encuentran en abundancia en la corteza del tallo o en las cutículas, incluyendo los de frutas y hojas comestibles. Por esa razón, los

triterpenoides que se producen en las frutas se pierden con frecuencia como resultado de la peladura de fruta o por la transformación de estas en productos como zumos [82, 83]. El contenido de triterpenos en plantas varía en función de parámetros tales como la especie, la temporada y el suelo [80].

De los 50.000 triterpenoides pentacíclicos conocidos, los ácidos oleanólico (3b-hydroxiolean-12-en-28-oico) y ursólico (3-hidroxi-urs-12-en-28-oico) son los principales ácidos triterpenoides en plantas y frutas, habiendo sido aislado el primero en más de 1620 especies de plantas [84]. Así, estos dos triterpenoides han sido muy estudiados en la bibliografía y fueron hallados en forma natural en gran variedad de especies de plantas, incluyendo frutas y hierbas aromáticas como albahaca, romero, salvia, tomillo, manzanas y aceitunas, en la forma de ácido libre o agliconas dentro del grupo de saponinas triterpenoides [85-87]. A estos compuestos se les atribuyen una gran variedad de actividades biológicas tales como antibacteriana, anti-oxidante, antiinflamatoria, anti-tumoral, anti-hiperglucémico, anti-VIH, anti-tripanosomas y anti-Leishmania, anti-esclerótica, hepatoprotectora y cardiovascular [88, 89].

Asimismo, el ácido betulínico (3b-hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico) ha sido más recientemente objeto de varios estudios. Una de las principales propiedades biológicas que se le atribuyen es la actividad antiinflamatoria. Nader y col. (2012) [90] llevaron a cabo la evaluación de la actividad antiinflamatoria de este compuesto sobre el daño pulmonar agudo inducido por la endotoxina bacteriana (lipopolisacárido, LPS) en ratas Sprague-Dawley macho. Los pulmones de los animales tratados con LPS mostraron aumento de la peroxidación de lípidos, actividades alteradas de enzimas antioxidantes (GSH y SOD) y aumento de la

expresión de TNF- α , TGF- β 1 y iNOS en comparación con los pulmones de los animales de control, dando lugar a un edema. El tratamiento con ácido betulínico atenuó significativamente todas estas alteraciones. Otras propiedades atribuidas al ácido betulínico son: anticancerígeno, actuando principalmente sobre la apoptosis celular de las células cancerosas [91, 92]; hepatoprotector [93] y antiviral (anti-HIV) [94, 95].

Tabla 2. Clasificación de los triterpenoides pentacíclicos.

Familia Triterpenoide	Triterpeno	R ₁	R ₂
Ursano	Acido ursólico	COOH	
	Uvaol	CH ₂ OH	
	α -amirin	CH ₃	
Oleano	Eritrodiol	CH ₂ OH	H
	β -amirin	CH ₃	H
	Acido oleanólico	COOH	H
	Acido maslínico	COOH	OH
Lupano	Betulín	CH ₂ OH	
	Lupeol	CH ₃	
	Acido Betulínico	COOH	

El ácido oleanólico es también reconocido como agente hepatoprotector [96], aunque este efecto es dosis dependiente, ya que en altas dosis puede ejercer el efecto contrario [97]. También se le atribuyen propiedades anticancerígenas tanto al triterpeno [98] como a las saponinas derivadas de él [99]. Además, puede

prevenir la dermatitis atópica y la dermatitis alérgica de contacto [100], actuar como antiparasitario [101] y como inmunomodulador [102]. El ácido oleanólico podría ser un posible agente bioactivo contra la adipogénesis y la inflamación mediada por las adipoquinas, ya que se ha visto que es capaz de suprimir la diferenciación de los adipocitos [103]; además puede ser un agente neuroprotector contra el envejecimiento por sus efectos antioxidantes, antiapoptóticos y anti-glicativos [104] y se ha visto que mejora la resistencia hepática a la insulina a través de su capacidad como antioxidante, efectos hipolipidémicos y su actividad anti-inflamatoria [105].

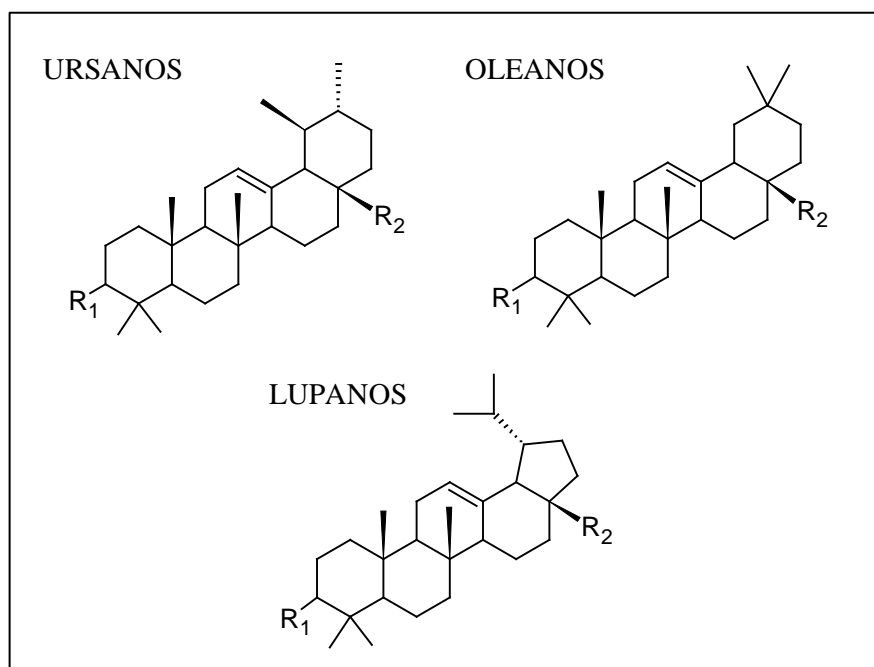


Figura 5. Estructuras generales de los triterpenoides pentacíclicos.

El ácido ursólico fue considerado durante años un compuesto biológicamente inactivo, sin embargo, los numerosos estudios realizados en las últimas décadas han atraído el interés sobre los usos farmacológicos de este compuesto, no solo por sus propiedades biológicas, sino también por su baja toxicidad. Los efectos anti-inflamatorios de ácido ursólico en macrófagos se comenzaron a investigar a principios de 1990. En 1992 se publicó uno de los primeros informes sobre sus efectos anti-inflamatorios, en el que el ácido ursólico fue aislado de las flores del brezo (*Calluna vulgaris*), demostrando su efecto como un inhibidor del metabolismo del araquidonato [106]. Posteriormente, otros estudios demostraron esta actividad utilizando modelos celulares [107 -109]. Sin embargo, algunos estudios demuestran que este triterpeno puede actuar también como pro-antiinflamatorio, dependiendo del estado biológico y el tejido en el que actúa [106].

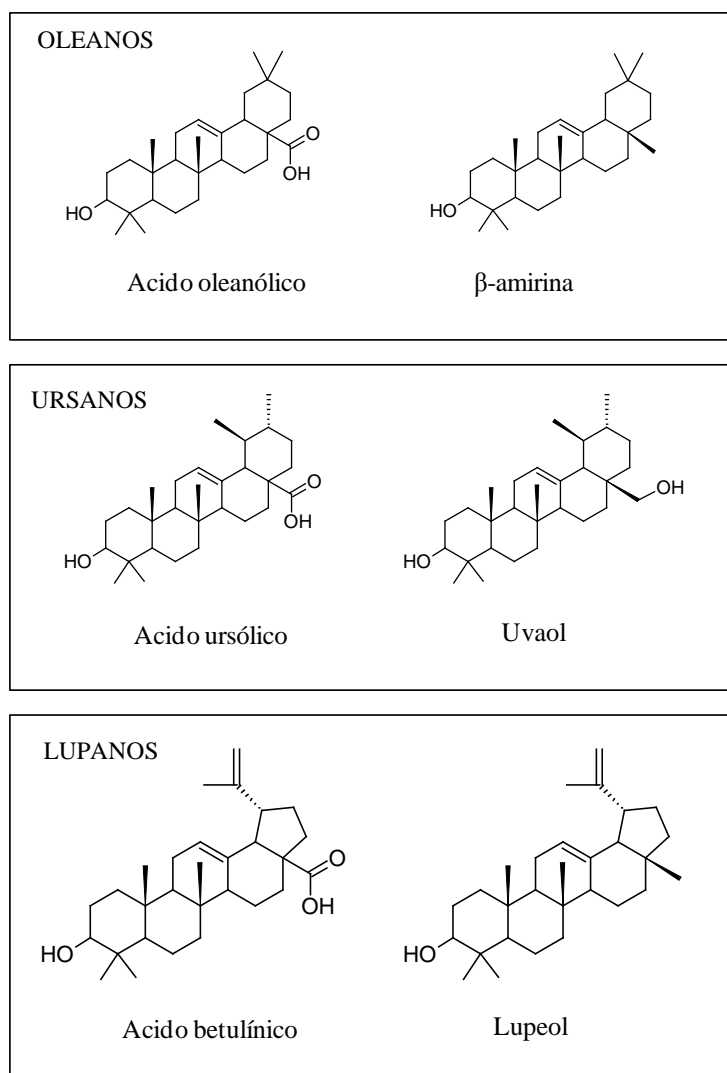


Figura 6. Estructuras de los principales triterpenos pentacíclicos.

Otras propiedades bioactivas de estos ácidos triperpénicos que han sido documentadas en la bibliografía están vinculadas a la protección contra las

dolencias del sistema nervioso tales como demencia, convulsiones, dolor o ansiedad [80], actividad anticancerígena, inhibiendo la mutagenicidad o induciendo la apoptosis [106, 110], y actividad antibacteriana. En este sentido, Fontanay y col. (2008) [111] llevaron a cabo un estudio en el que evaluaron la actividad bacteriana de los ácidos triterpénicos betulínico, oleanólico y ursólico con diferentes patógenos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*) comprobando que a pesar de la estructura similar de estos compuestos, presentaban una actividad antibacteriana muy diferente, no siendo observada para el betulínico y más destacable en el ursólico.

Asimismo, se ha descrito que el ácido ursólico presenta propiedades hepatoprotectoras [112] y, recientemente, un estudio indica actividad contra el virus de la hepatitis C de los ácidos oleanólico y ursólico [113].

1.1.4 Tetraterpenos: carotenos y xantofilas

El principal grupo de tetraterpenos son los carotenoides, que se encuentran abundantemente en la naturaleza como pigmentos. Han sido aislados más de 600 carotenoides diferentes. Su estructura básica es un esqueleto tetraterpénico simétrico formado por la conjugación de dos unidades C₂₀. Todos los carotenoides derivan de una unidad acíclica y se originan mediante diferentes etapas de reacción, que implican hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, o reacciones de oxidación.

Los carotenoides pueden dividirse en función de sus grupos funcionales. Aquellos que contienen sólo átomos de carbono e hidrógeno son denominados carotenos y aquellos con al menos una función oxigenada se conocen como xantofilas. Además de esta clasificación, se puede apuntar una subclasificación distinguiéndose dentro de los carotenos: carotenos acíclicos (licopeno), monocíclicos (γ y δ -caroteno) y bicíclicos (α y β -caroteno). Por otro lado dentro de la categoría de xantofilas destacan: monohidroxiladas (α y β -criptoxantina), dihidroxiladas (luteína, zeaxantina), epoxicarotenoides (violaxantina, neoxantina, luteoxantina) y cetocarotenoides (cantaxantina, astaxantina). Las Figuras 7 y 8 muestran las estructuras de algunos de estos carotenos y xantofilas más representativas.

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en bacterias, y muy pocos se han encontrado en animales, particularmente en invertebrados marinos como las esponjas, estrellas, pepinos y erizos de mar. Se han encontrado en otros animales como la trucha y formando parte de la yema de huevo. La mayoría de los carotenoides vegetales se encuentran en los cromatóforos de las plantas, principalmente en las partes aéreas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo tomate, pimentón, etc.), y en menor proporción en raíces (por ejemplo la zanahoria). La concentración y diversidad de estos compuestos en las plantas es muy variable, dependiendo no solo de la variedad genética, sino también de factores ambientales [114]. Además, la composición en carotenoides está influenciada por la variedad [115], el estado de maduración, el clima y estación del año, así como la zona geográfica de producción [116]. Sin embargo, además de estos factores, el contenido de carotenoides depende de la

parte de la planta utilizada [117] y de factores vinculados al tratamiento de la materia prima y/o al almacenamiento de la misma [118-120]. Condiciones de altas temperaturas y/o luz durante el procesamiento o almacenamiento, pueden causar cambios en estos compuestos (isomerización, fosforilación, degradación, transformación estructural o decoloración) lo que altera tanto la calidad del producto como sus propiedades funcionales [121, 122].

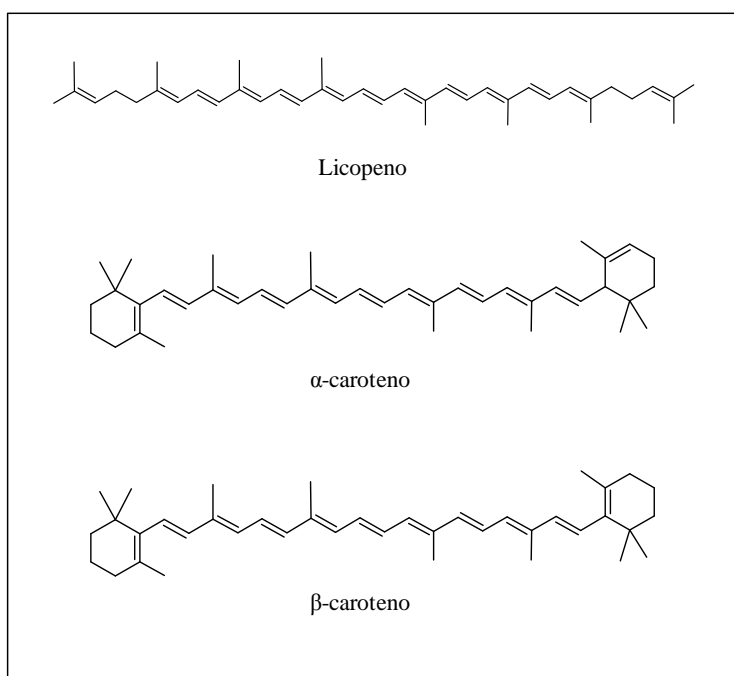


Figura 7. Estructuras de carotenos.

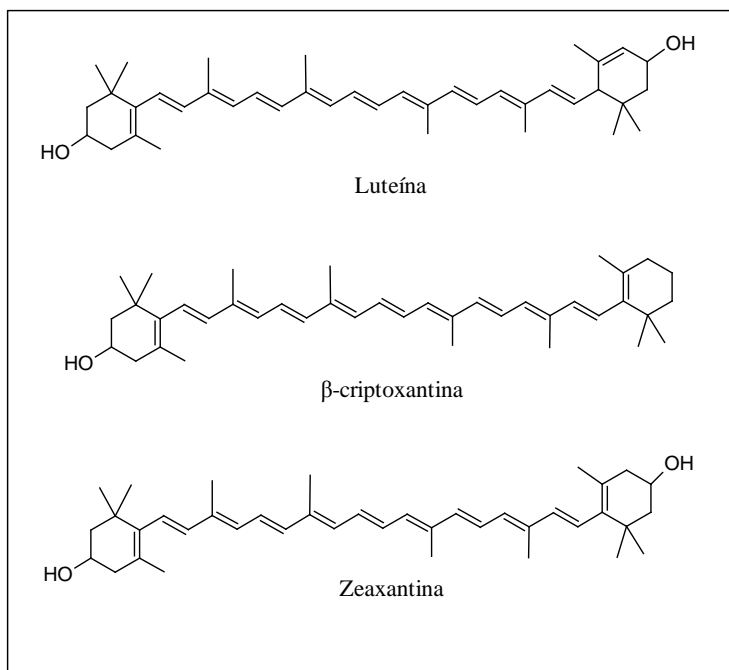


Figura 8. Estructuras de xantofilas.

Los carotenoides desempeñan un papel importante en la salud. La función de retinol (vitamina A) en la visión se conoce desde hace mucho tiempo. Aunque el retinol se forma principalmente por escisión simétrica de β -caroteno, proceso que ocurre en el intestino gracias al complejo enzimático dioxigenasa, existen otros 50 carotenoides que pueden funcionar como provitamina A, como el α -caroteno, β -criptoxantina y el *cis*- β -caroteno [10, 123-125].

Las propiedades y, por tanto, las funciones de una molécula de carotenoide dependen principalmente de su estructura química y en particular, al sistema de doble enlace conjugado $C = C$ que es el que participa en las reacciones de

transferencia de energía [126]. Una de las principales actividades biológicas de los carotenoides es su capacidad como antioxidante [126], la que ha sido ampliamente descrita [127]. El descubrimiento de Foote y Denny en 1968 [128] de que los carotenoides podrían neutralizar el oxígeno singlete $^1\text{O}_2$ fue un avance importante en la comprensión de la efectividad de los carotenoides en la prevención de daños en los sistemas fotobiológicos y en el conocimiento de su forma de actuación como antioxidantes. Se estima, que una sola molécula de β -caroteno es capaz de desactivar 1000 moléculas de oxígeno singlete [129].

Se han llevado a cabo numerosos estudios epidemiológicos que relacionan el consumo de alimentos ricos en carotenoides o suplementos de los mismos, con la reducción del riesgo de padecer diferentes enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como cardiovasculares, aterosclerosis y osteoporosis. [14, 130-134]. Los carotenoides pueden interactuar con los radicales libres de tres formas principalmente; mediante la transferencia de electrones (ecuación [1]), a través de la sustracción de un hidrógeno (ecuación [2]) y por la adición de una especie radical (ecuación [3]) [126].



Sin embargo, esta actividad antioxidante depende en parte, de las concentraciones de oxígeno presentes, ya que se ha comprobado que a presiones

altas de oxígeno estos pueden actuar como prooxidantes. Además, estos compuestos son muy susceptibles de sufrir reacciones de autooxidación. [126, 127, 129, 135].

El efecto sinérgico entre los carotenoides y otros compuestos tales como compuestos fenólicos por ejemplo, quercitina, o vitaminas como la C y la E, ha sido ampliamente estudiado [127, 136-139]. Por un lado, se ha comprobado que la reacción sinérgica entre carotenoides y compuestos fenólicos depende del número de enlaces conjugados y de los grupos sustituyentes presentes en el carotenoide. Así, esta reacción mejora con el aumento del número de enlaces conjugados y disminuye con la presencia de grupos hidroxilo y ceto [140].

Burkea y col. [138], compararon la actividad sinérgica de tres carotenoides, β -caroteno, luteína y zeaxantina, con la Vitamina C, y comprobaron que las propiedades de reparación de esta vitamina eran similares para β -caroteno y zeaxantina, pero menor para la luteína. Otro estudio similar demostró también una sinergia entre el β -caroteno y la vitamina C en la protección contra la oxidación de las LDL [127]. También se estudiaron actividades sinérgicas entre carotenoides como la astaxantina con el β -caroteno, y la astaxantina con el licopeno [141], y de combinaciones de carotenoides con otros compuestos terpénicos, como el monoterpeno terpinoleno, en la oxidación de LDL [142].

La actividad antioxidante de los carotenoides ha sido estudiada principalmente mediante metodologías *in vitro* como ORAC, FRAP, TEAC y DPPH [119]. Volker Böhm y col. [143] llevaron a cabo la evaluación de la actividad antioxidante de 17 isómeros geométricos de carotenoides mediante el método fotométrico *in vitro*

TEAC. Determinaron, que los isómeros Z poseían una actividad antioxidante significativamente mayor que los isómeros E. Mueller y col. [144] también ensayaron la actividad antioxidante de diferentes isómeros de β -caroteno mediante diferentes métodos *in vitro*, FRAP y TEAC. Comprobaron que efectivamente, el potencial antioxidante es dependiente de la longitud de la cadena y del carácter del sustituyente terminal. Otro tipo de método *in vitro* utilizado para la determinación de la capacidad antioxidante simula el proceso digestivo y utilizan cultivos de células Caco-2 [114]. En ocasiones, la medida de la actividad antioxidante se lleva a cabo mediante la medida de oxidación de LDL [135, 145].

La actividad antioxidante de carotenoides como licopeno, β -caroteno, luteína, zeaxantina o β -criptoxantina ha sido también considerada señalando a estos compuestos como moléculas protectoras contra el cáncer [130, 146-148]. Varios estudios han evaluado la capacidad de los carotenoides para proteger el sistema inmunológico [148, 149], la inducción de apoptosis [150] y su potencial antimutagénico [151].

1.2 FUENTES NATURALES DE COMPUESTOS TERPÉNICOS

Las especies productoras de diterpenos son muy numerosas, aunque principalmente se encuentran distribuidos en las familias de plantas *Lamiaceae*, *Thymelaeaceae*, *Euphorbiaceae*, *Asteraceae* y *Taxaceae*. Estos compuestos se hallan esencialmente en las hojas, como en el caso del ácido carnósico en el romero, o en la corteza o partes leñosas, como el taxol del tejo [37]. En esta tesis se

estudiaron tres variedades de la familia *Lamiaceae* (albahaca, mejorana y romero) como fuentes de diterpenos fenólicos, caléndula y espinaca como fuentes de carotenoides, y el brezo y la caléndula como fuentes naturales de ácidos triterpénicos. Las características de estas plantas se describen a continuación.

1.2.1 Albahaca (*Ocimum basilicum* L.)

La albahaca (Figura 9) es una hierba aromática anual de la familia *Lamiaceae* nativa de Irán, India y otras regiones tropicales de Asia, aunque también es muy importante su cultivo en todo el Mediterráneo, donde fue introducida por los griegos. Es cultivada como perenne en climas tropicales, llega a medir entre 30 y 130 cm y se caracteriza por poseer hojas opuestas de un verde lustroso cuyo tamaño varía en función de la variedad de la planta. En Europa es más conocida como basil o basílico, palabra que proviene del griego basiliko, sin embargo en España a esta planta se la conoce como albahaca debido a la influencia árabe que hubo en la península, ya que proviene del término al-habak.

Los usos tradicionales de esta planta no se limitan a los culinarios, sino que ya era conocida y utilizada popularmente por sus propiedades digestivas, carminativas, antitusivas, como sedante suave, diurético, y externamente como antiséptico, analgésico y cicatrizante, entre otros usos [37].



Figura 9. Planta de albahaca.

Las principales partes utilizadas de esta planta son las hojas y las sumidades floridas. Esta constituida en un 0.04-0.7% de de aceite esencial, el cual contiene cineol y eugenol y es rico en estragol o metilcavicol, linalol, que puede representar hasta un 75% del total de los compuestos presentes en algunos quimiotipos. La albahaca también contiene otros compuestos como saponósidos y ácidos fenólicos como ácido caféico, ferúlico y rosmarínico, además de flavonoides como (+)-catequina y kemferol [37].

En la bibliografía se encuentra principalmente tres métodos de extracción aplicados a la obtención de extractos y aceite esencial de albahaca. Uno es la hidrodestilación [152, 153] y la destilación a presión reducida [154], otro es la extracción por fluidos supercríticos [26, 155-157] y por último extracciones sólido-líquido utilizando metanol o etanol como agentes de extracción [158-162] y, en menor medida, con disolventes como el diclorometano [154, 155]. Los extractos obtenidos por hidrodestilación o con CO₂ supercrítico están constituidos principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos, siendo los principales compuestos identificados el linalol y el eugenol [26, 155]. Por otro lado, en las extracciones con metanol los compuestos obtenidos son esencialmente compuestos

fenólicos, tales como el ácido rosmarínico, ácido cafeico y ácido ferúlico y, flavonoides como la (+)-catequina [158]. Respecto a los extractos obtenidos con etanol como disolvente, los compuestos predominantes son el ácido rosmarínico, el ácido chicorico y ácido caftárico [161].

Asimismo, Phippen y col. [158] estudiaron la extracción de antocianinas de la albahaca, utilizando metanol acidificado. Las antocianinas identificadas eran derivadas de cianidinas y peonidinas. El contenido total de antocianidinas determinado en los extractos de la albahaca, y en comparación con otras fuentes naturales, fue superior al hallado en Salvia, pero inferior al que se puede encontrar en la uva.

1.2.2 Mejorana (*Origanum majorana* L.)

Esta planta (Figura 10), al igual que la albahaca, es una hierba aromática perenne perteneciente a la familia de las *Lamiaceae*. Es natural del este de Asia y la región mediterránea, donde su cultivo y uso están muy extendidos, principalmente como hierba aromática culinaria. Puede alcanzar una altura de 60 cm y presentar ramas leñosas; se caracteriza por unas hojas de pequeño tamaño aovadas de color verde-blanquecino y diminutas flores que pueden ser rosadas o blancas. Además de su uso culinario, la mejorana ha sido utilizada popularmente por sus propiedades como carminativa, digestiva, antiespasmódica en problemas intestinales, expectorante y descongestionante nasofaríngea, utilizando para estos usos las hojas y las sumidades floridas [37].



Figura 10. Planta de mejorana.

Esta planta contiene un 0.7-3% de aceite esencial, rico en terpineol, timol y carvacrol principalmente. Además contiene ácidos fenólicos como cafeico, clorogénico y rosmarínico y flavonoides como derivados del apigenol, luteolol y kemferol [37]. Otros terpenos encontrados en la mejorana son triterpenos como el ácido ursólico y ácido oleanólico y tetraterpenos como β -caroteno [163].

Las principales técnicas de extracción utilizadas y documentadas en la bibliografía para la mejorana son la extracción supercrítica empleando CO_2 [164-166], la extracción con disolventes líquidos [167-169] y la hidrodestilación [166, 168]. Los compuestos mayoritarios encontrados en los extractos supercríticos son cis-sabineno (cis-sabineno hidratado, acetato de cis-sabineno hidratado), α -terpineol y 4-terpineol. En el caso de la extracción con pentano el resultado es muy similar, aunque también se ha observado la extracción de fenoles como el carvacrol [169]. Utilizando metanol como disolvente se encuentran en los extractos ácidos fenólicos, como el ácido rosmarínico, y diterpenos fenólicos, como ácido carnósico y carnosol [168]. En la extracción con agua subcrítica, además de los compuestos anteriormente mencionados, el compuesto mayoritario hallado es el eucaliptol.

1.2.3 Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

El romero (Figura 11) es un arbusto leñoso de hojas perennes perteneciente a la familia *Lamiaceae* que puede llegar a medir 2 metros de altura. Es una planta que se desarrolla en todo el Mediterráneo, generalmente en suelos áridos, secos y algo arenosos. Las hojas que presentan forma lineal son pequeñas y muy abundantes y de un color verde oscuro en el revés de la hoja y color blanquecino en el envés. Las flores son de color azul violeta pálido, rosa o blanco.

Inicialmente, el nombre de romero se interpretó directamente tomado del latín *ros marinus*, “rocío marino”, pero probablemente derive del Griego $\rho\acute{o}\psi$, *rhaps* que significa “arbusto” y $\mu\upsilon\rho\acute{\iota}\nu\omicron\varsigma$, *myrinos*, “aromático”, es decir, “arbusto aromático”.

El romero es una planta aromática comúnmente usada en cocina y en la elaboración de alimentos procesados por su propiedad conservante, aunque debido a su fácil cultivo y mantenimiento también ha sido usada de forma ornamental y es frecuente encontrarla en jardines.

Las propiedades del romero ya eran conocidas en la antigüedad. En Europa en la Edad Media existió un tratado atribuido a varios autores, que trataba sobre las virtudes del romero [170]. Tradicionalmente ha sido usada para preparar infusiones, extractos, bálsamos, aceite esencial, alcoholes, humo..., ya sea para su uso externo o interno, debido a que se le atribuyen propiedades antisépticas (antibacteriano y antifúngico), antiespasmódicas, anticonvulsivas y posee acción estimulante de la circulación, antiinflamatoria, colerética y colagoga, además de estar demostrado su potencial como antioxidante. En medicina popular, la esencia

de romero era usada como estimulante del cuero cabelludo y el preparado de alcohol de romero, para tratar dolores reumáticos y musculares o como antiséptico externo [37].



Figura 11. Planta de romero.

El romero quizá sea una de las plantas de las que se encuentran un mayor número de preparados comercializados como remedio natural. Tan solo en España se pueden encontrar más de 50 empresas dedicadas a la venta de remedios derivados de esta planta. Según ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy), los preparados de hoja de romero se emplean por vía interna para el tratamiento de trastornos digestivos, principalmente en casos de deficiencias hepatobiliares. Por vía externa, los preparados de romero pueden presentarse en forma de aceites, pomadas o alcohol, para el tratamiento de dolores reumáticos, alteraciones circulatorias periféricas, cicatrización de heridas y antiséptico [37].

El romero puede contener entre 1-2.5% de aceite esencial en sus hojas, está constituido principalmente por 1,8-cineol (eucaliptol), el cual le otorga el aroma característico a la planta, α -terpineol, α -pineno, alcanfor y borneol, entre otros. Sin

embargo, esta composición suele variar según el quimiotipo de la planta, así como de factores externos y de desarrollo. Por ejemplo, en la zona mediterránea se encuentran esencialmente dos tipos de romero que se diferencian por su contenido en 1,8-cineol, uno más rico en este compuesto, localizado en Marruecos y Túnez y otro con un contenido menor en España. Por otro lado, también se encuentran en su composición diterpenos como el carnosol y el ácido carnósico y polifenoles como ácido rosmarínico y ácido caféico, además de flavonoides tales como apigenina y luteolina. [26, 37, 171,172].

Las interesantes actividades del ácido carnósico y el carnosol, principalmente su potente actividad antioxidante [10], apoyaban la hipótesis del posible empleo del extracto de romero, el cual es muy rico en estos compuestos, como aditivo alimentario, según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el 2008. En la actualidad, el extracto de romero es ya un aditivo alimentario (E392) tras la aprobación de la Directiva 2010/67 de la Comisión Europea y posteriormente por el Reglamento Europeo EU 231/2012 y 1333/2008. Además, en 2011 se aprobó un Reglamento Europeo por el que se aprobaba el extracto de romero como aditivo antioxidante para productos alimenticios ecológicos (Reglamento Europeo 344/2011/EU de 8 de abril de 2011).

El Reglamento 1333/2008 establece que este extracto debe ser producido por medio extracción con disolventes (etanol, acetona o etanol seguido de hexano) o mediante extracción con CO₂ supercrítico, el cual puede llevar una pequeña cantidad de etanol como cosolvente. Este extracto debe ser desodorizado y decolorado y debe contener unos niveles determinados de los diterpenos carnósico y carnosol (que comprenden no menos del 90 % de los diterpenos fenólicos

totales), los cuales se identifican como compuestos antioxidantes de referencia. De hecho, las limitaciones de dosificación se expresan como niveles de ácido carnósico y el carnosol, en lugar de todo el extracto de romero. El reglamento también establece un criterio basado en la relación de compuestos antioxidantes de referencia (ácido carnósico y carnosol) y compuestos volátiles (constituyentes aromáticos del aceite esencial: borneol, acetato bornilo, alcanfor, 1, 8-cineol, verbenona). Por lo tanto, proporciona información sobre el nivel de desodorización de extractos de romero y en sus capacidades antioxidantes.

La Unión Europea no ha sido la única en aprobar el extracto de romero como aditivo alimentario. En Japón, los extractos de romero se enumeran con el número 365 en la lista de los aditivos existentes y se definen como "una sustancia compuesta principalmente de ácido carnósico, carnosol y rosmanol obtenido a partir de hojas de romero o flores". Según la regulación china GB2760-2011, se aprueba el uso de extractos de romero bajo la numeración CNS 04.017.

La utilización de los fluidos supercríticos para la extracción de los compuestos bioactivos del romero ha sido ampliamente estudiada [173-176]. Las condiciones de presión habitualmente empleadas para obtención de extractos de romero van desde los 300-400 bar, cuando se utiliza CO₂ puro [173, 177], a 150 bar utilizando un 7% de etanol como cosolvente [177, 178], siendo en todos los casos la temperatura empleada de 40 °C. Los principales compuestos extraídos en estas condiciones de trabajo son ácido carnósico y carnosol. Herrero y col. [178], evaluaron cuatro condiciones de extracción supercrítica, tres diferentes presiones (100, 300 y 400 bar) utilizando CO₂ puro y 150 bar con 7% de etanol como cosolvente. En este trabajo se observa que las mayores concentraciones de ácido

carnósico y carnosol se obtienen utilizando 150 bar, 40 °C y 7% de etanol, siendo estos extractos los que presentan una mayor actividad antioxidante. Por otro lado, R. García-Risco y col. [173] comprobaron que en la extracción supercrítica el contenido de ácido carnósico del extracto se incrementa con el tiempo de extracción.

También han sido utilizadas otras técnicas de fluidos presurizados para la obtención principalmente de extractos ricos en ácido carnósico y ácido rosmarínico, usando para ello como disolventes metanol [168], etanol [178] o agua [179]. En el caso del agua subcrítica las temperaturas más habitualmente empleadas son 100-200 °C. Herrero y col. [178], comprobaron que los mejores resultados de extracción, para la obtención de extractos ricos en ácido carnósico y carnosol, se logran utilizando 150 y 200 °C, mientras que los extractos más concentrados en ácido rosmarínico se obtienen a 100 °C. Se ha demostrado que existe una influencia directa de la temperatura en la extracción de ácido carnósico y carnosol de romero cuando esta se hace con agua subcrítica. Ambos compuestos comienzan a extraerse a los 100 °C, sin embargo, mientras el carnosol va decreciendo con el incremento de la temperatura, el ácido carnósico se extrae preferiblemente a 200 °C [180].

También han sido utilizadas otras técnicas para la extracción de romero como son la extracción asistida con microondas (MAE) y la extracción asistida con ultrasonidos (USAE) [181, 182]. Jacotet-Navarro y col. [181] indican que mientras los ultrasonidos consiguen una mayor extracción de compuestos del romero como el ácido carnósico y el ácido ursólico, los microondas parecen ser una técnica más apropiada para la extracción de ácido rosmarínico.

1.2.4 Caléndula (*Calendula officinalis* L.)

Es una planta herbácea de la familia de *Asteraceae* de floración anual (Figura 12), de hecho, su nombre genérico caléndula deriva del latín *kalendae*, que proviene de calendas, primer día del mes, utilizada por los romanos para indicar que la floración se producía durante todo el año en una zona. Su tallo puede llegar a medir de 20 a 55 cm de altura y ser leñoso en su base. Se caracteriza por sus flores liguladas de color amarillo o naranja que se cierran durante la noche y se abren al amanecer [37].



Figura 12. Flor de caléndula.

Aunque principalmente tiene carácter ornamental y suele ser muy utilizada en jardines tanto en los países mediterráneos como en el oeste de Europa, su uso terapéutico y cosmético también está muy extendido, esencialmente para el tratamiento de afecciones de piel, como antiinflamatorio y cicatrizante. Aunque en la medicina tradicional ha sido usado también como antihemorrágica, antiséptica,

estimulante de la actividad hepática y biliar, diurético, digestivo y para tratar trastornos ginecológicos [183].

La calendula contiene entre un 0.1-0.4% de aceite esencial, constituido principalmente por α -cadinol, τ -cadinol, τ -muurolol, γ -cadineno y α -muuroleno [184-187]. También contiene triterpenos como el α y β -amirina, taraxasterol y esterres de faradiol, ácidos triterpénicos (ursólico y oleanólico) y flavonoides (ácidos caféico, clorogénico, p-cumárico, vainílico, kaempferol, quercetina y rutina) [188-190] y abundantes variedades de carotenoides. La Tabla 3 muestra el contenido en carotenoides de las diferentes partes de la planta de caléndula.

En la bibliografía se encuentran diversos trabajos en los que la extracción de carotenoides de caléndula se lleva a cabo mediante el uso de disolventes orgánicos como metanol [117], acetona [115] o hexano [191]. En todos los casos la composición es muy similar, predominando luteína, β -caroteno, flavoxantina, luteoxantina y violaxantina, como compuestos principales del extracto.

Tabla 3. Carotenoides presentes en las diferentes partes de la planta de caléndula.

Compuesto	Hojas	Tallos	Pétalos	Polen
Luteína	34.93 ^(a)	28.08 ^(a)	5.69 ^(a) 2.00 ^(b)	11.78 ^(a)
(9Z)-Luteína			0.60 ^(b)	
9/9'Z-Luteína	2.57 ^(a)	5.42 ^(a)	2.64 ^(a)	6.44 ^(a)
13/13'Z-Luteína	2.07 ^(a)	2.35 ^(a)	1.79 ^(a)	2.41 ^(a)
β-caroteno	26.70 ^(a)	20.82 ^(a)	6.46 ^(a) 3.40 ^(b)	6.54 ^(a)
α-caroteno			5.67 ^(a) 0.80 ^(b)	5.00 ^(a)
Flavoxantina			21.09 ^(a) 28.50 ^(b)	32.45 ^(a)
Neoxantina	0.65 ^(a)	1.41 ^(a)	1.22 ^(a)	0.93 ^(a)
Violaxantina	10.02 ^(a)	1.98 ^(a)	0.32 ^(a)	0.36 ^(a)
Luteoxantina	1.97 ^(a)	2.83 ^(a)	11.81 ^(a) 11.00 ^(b)	2.23 ^(a)

(a) Concentraciones expresadas en % de área de pico según cromatograma HPLC a 450nm.

Extracciones realizadas con metanol y posterior saponificación [117].

(b) Concentraciones expresadas en % de área de pico según cromatograma HPLC a 450nm.

Extracciones realizadas con dimetil cetona y posterior saponificación [115].

La caléndula ha sido también estudiada por su actividad antiinflamatoria, la que se atribuye principalmente a su contenido en triterpenos, tales como esteres de faradiol [192-194]. También han sido estudiadas su actividad antioxidante [188], antimicrobiana [195-197] y antígenotóxica [198]. En la extracción de triterpenos de caléndula mediante fluidos supercríticos [189, 199-203] las condiciones de extracción son determinantes en la composición del extracto final, mientras que a presiones de extracción altas (500 bar) los compuestos principales son esteres de triterpenoides como el faradiol-3-O-laurato, palmitato o myristato, a presiones menores se obtienen triterpenos e hidrocarburos alifáticos.

1.2.5 Espinaca (*Spinacia oleracea* L.)

La espinaca (*Spinacia oleracea* L.) es una planta anual de la familia de las *Amaranthaceae*, perteneciente a la subfamilia de las quenopodioideas (Figura 13). Fue cultivada por primera vez en Persia y de ahí deriva su nombre: esfenaj. Los árabes la introdujeron en España hacia el siglo XI y se extendió por toda Europa alrededor del s.XV. Es cultivada principalmente como planta comestible, rica en nutrientes como vitaminas A, C, K₁ y del grupo B, y minerales como Ca, Fe, K y Zn. Además de su uso culinario, tradicionalmente ha sido usada como vitamínico, antianémico y como normalizador del tránsito intestinal [37, 204].



Figura 13. Hojas de espinaca.

Las hojas de espinaca contienen compuestos fenólicos, tales como los isómeros cis y trans del ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, y flavonoides como la patuletina, espinacetina, espinatosido o 6-metoxikaempferol [205-211]. También, han sido identificados glicoglicerolípidos, tales como galactosil diacilglicerol y digalactosil diacilglicerol [212, 213], y el ácido lipoico y sus derivados [214, 215]. Los carotenoides son una parte importante de la composición de la espinaca. Entre los carotenoides encontrados en sus hojas predominan luteína, β -caroteno, violaxantina y neoxantina.

Para la extracción de carotenoides de vegetales los disolventes más extendidos son la acetona, tetrahidrofurano (THF), hexano, etanol (EtOH), metanol (MeOH) y mezclas de ellos. De manera más concreta, para la extracción de carotenoides de espinaca es habitual la extracción sólido-líquido, empleando como disolventes acetona [216], mezclas de etanol, acetato de etilo y éter de petróleo (1:1:1) [120], acetona, agua y ácido acético (70:29.5:0.5) [217] o acetona (15% acetato de trietil amónio) [218]. Sin embargo, Por otro lado, son escasos los trabajos en la bibliografía en los que use la tecnología de CO₂ supercrítico para la extracción de carotenoides de la espinaca [116].

1.2.6 Brezo (*Calluna vulgaris* L.)

El brezo (*Calluna vulgaris* L.) (Figura 14), pertenece a la familia de las *Ericaceae*, siendo por lo tanto, una especie arbustiva, que puede alcanzar de 20-50 cm de altura. Se caracteriza por tener numerosas hojas pequeñas y flores también pequeñas de color rosa. Crece en zonas templadas o frías y se extiende tanto por Europa, como por el Norte de África y América. Debido a que suele crecer en suelos estériles, la presencia de esta planta en un bosque significa un empobrecimiento del suelo.

Los usos tradicionales del brezo suelen estar orientados a su empleo como planta ornamental. No tiene usos culinarios ya que no aporta una gran fragancia, sin embargo si se encuentra formando parte de algunos alimentos como la miel, obtenida a partir de sus flores. El uso farmacológico del brezo ha sido tradicionalmente como diurético (para facilitar la eliminación de líquidos en casos de gota, hipertensión arterial, edemas, etc.), como terapia de lavado de las vías urinarias en casos de afecciones infecciosas o inflamatorias, antidiarreico, antiespasmódico, tranquilizante y cicatrizante cuando se aplica de forma externa, en casos de heridas, eccemas, ulceraciones, etc. Sin embargo, todas estas acciones farmacológicas aún no han sido aprobadas por la Comisión Europea [37].

La mayoría de los trabajos que se encuentran en la bibliografía acerca del brezo son publicaciones muy recientes. En cambio otras ericáceas como *Erica cinerea*, *Erica arborea*, *Erica australis* o multiflora, han sido anteriormente estudiadas [219-222].



Figura 14. Planta de brezo

Los trabajos que estudian la composición del brezo (*Calluna vulgaris* L.) principalmente se centran en su contenido en compuestos fenólicos [223-225]. Si bien se conoce que contiene proantocianidinas y flavonoides, en los últimos años el brezo ha comenzado a ser investigado por su contenido en compuestos triterpénicos: ácidos ursólico, oleanólico y betulínico, α y β -amirina, lupeol, taraxasterol y friedelin [226, 85].

1.3 TECNOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN CON FLUIDOS COMPRIMIDOS

La extracción sólido-líquido es una técnica que se basa en el uso de disolventes y la aplicación de calor y agitación para favorecer la disolución de los compuestos de interés en el disolvente. Es un método sencillo y económico de obtener extractos naturales y sus compuestos bioactivos. El factor más importante en esta técnica de extracción es la selección del disolvente adecuado, es decir un disolvente en el que los compuestos de interés tengan alta solubilidad. En el caso de los compuestos con afinidad lipídica, como es el caso de los compuestos terpénicos, los disolventes

adecuados son fracciones derivadas del petróleo, tales como hexano, éter de petróleo u otros disolventes orgánicos como el diclorometano. Sin embargo todos estos disolventes presentan una alta toxicidad, por lo que es necesario buscar alternativas más seguras para la salud y respetuosas con el medio ambiente. En este sentido, la extracción con fluidos comprimidos se presenta como una alternativa más eficiente, segura y ecológica.

1.3.1 Extracción con líquidos presurizados

En 1996, Richter y col. [227] describieron por primera vez esta técnica de extracción que se conoce ahora por varios nombres, extracción con líquidos presurizados (Presurized Liquid Extraction, PLE), extracción acelerada con disolventes (Accelerated Solvent Extraction, ASE), extracción con disolventes mejorada (Enhanced Solvent Extraction, ESE) o extracción con disolventes a alta presión (High Pressure Solvent Extraction, HPSE).

El fundamento de la PLE es la aplicación de altas temperaturas de extracción, más allá del punto de ebullición normal del disolvente, aumentando la presión de extracción para mantener el disolvente en estado líquido. Además, esta presión facilita el proceso de extracción, porque favorece la penetración del disolvente en las células vegetales. La combinación de alta presión y temperatura permite reducir considerablemente la cantidad de disolvente utilizado cuando se la compara con la extracción sólido-líquido [228, 229].

Los principales parámetros a tener en cuenta en esta técnica son, al igual que en la extracción sólido-líquido, la afinidad química del disolvente con el soluto, el

tamaño de partícula, la temperatura y el tiempo de extracción. El uso de altas temperaturas, en ocasiones cercanas al punto crítico del disolvente, disminuye la tensión superficial del disolvente facilitando la difusión del analito, disminuye la viscosidad del disolvente (lo que favorece la penetración de dicho disolvente en la matriz de extracción) y facilita la transferencia de masa ya que disminuyen las fuerzas intermoleculares y se incrementa la velocidad de difusión. De este modo, otra ventaja de la PLE cuando se la compara con la extracción sólido-líquido tradicional es la reducción del tiempo de extracción. Sin embargo, precisamente la utilización de esas altas temperaturas constituye la principal desventaja de la PLE cuando el objetivo es la extracción de compuestos bioactivos termolábiles, que pueden ser degradados o transformados durante la extracción, siendo incluso posible la aparición de nuevos productos [230-232]. Además, las altas temperaturas también producen una disminución en la selectividad, pudiéndose co-extraer un mayor número de analitos.

Hawthorne y colaboradores introdujeron [233] por primera vez la aplicación de agua como disolvente en PLE, demostrando que la disminución de su constante dieléctrica con la temperatura permitía extraer compuestos orgánicos moderadamente polares. Por ejemplo, a 150 °C la extracción de algunos terpenos del aceite esencial de la albahaca es mayoritaria [253]. Además, se ha comprobado que ha esta temperatura la degradación de los terpenos del aceite esencial es sólo de un 10 %, mientras que a temperaturas superiores de 200 °C esta degradación puede llegar a ser del 20-42 % [234]. En forma similar, la extracción con agua subcrítica de ácido carnósico y carnosol mejora con el aumento de la temperatura [178], observándose que el carnosol comienza a extraerse a 100 °C, mientras que el ácido carnósico necesita temperaturas aún mayores, sin embargo a temperaturas

superiores a 200 °C el contenido en carnosol disminuye debido a una posible degradación [180, 235]. En relación con la extracción de ácido rosmarínico, es recomendable emplear temperaturas en torno a los 100-150 °C, ya que se ha comprobado que a temperaturas mayores comienza su degradación.

Generalmente, las temperaturas utilizadas para la extracción PLE de carotenoides oscilan entre los 80-160 °C [236-240] debido a la degradación térmica de estas sustancias, utilizando principalmente hexano y etanol. Mustafa y colaboradores [241] evaluaron dos temperaturas, 60 y 180 °C, comprobando que al aumentar la temperatura se reducía la extracción de α - y β -caroteno. Sanagi y colaboradores [242] en su trabajo también determinaron que a temperaturas mayores de 80 °C se reducía la recuperación de β -caroteno.

En la extracción de triterpenos mediante líquidos presurizados las temperaturas empleadas varían de los 150-190 °C, siendo los disolventes más habitualmente empleados el metanol [243] o mezclas de etanol/agua [244, 245]. Aunque en algunos trabajos se muestra que la utilización de etanol (80%) da como resultado mayores rendimientos de extracción, pero extractos de composición similar a los obtenidos con metanol (80%), en las mismas condiciones de temperatura. Por otro lado, Pinilla y colaboradores [246] en la extracción de ácido betulínico de *Platanus acerifolia* L. observaron que las mayores concentraciones de este triterpeno se obtenía empleando etil acetato como disolvente de extracción, aunque muy similares a las obtenidas con etanol. Asimismo, comprobaron que aunque a 200 °C los rendimientos globales de extracción son mayores, las concentraciones de ácido betulínico son superiores a 100 °C.

1.3.2 Extracción con CO₂ supercrítico

En 1964 Zosel presentó una patente para descafeinar el café utilizando dióxido de carbono supercrítico (SCCO₂) como agente de extracción, siendo este proceso el primero en ser aplicado a la industria alimentaria [247]. Desde entonces esta técnica ha promovido un gran interés y ha ampliado su campo de acción (ver Tabla 3).

Un fluido supercrítico es una sustancia que se encuentra en condiciones de temperatura y presión por encima de su punto crítico. En estas condiciones, las propiedades de la sustancia son intermedias a las de los estados líquido y gas, como capacidad de difusión viscosidad y tensión superficial similares a las de un gas, y densidad y poder de solvatación similar a la de los líquidos. Estas características singulares de los fluidos supercríticos hacen que sean particularmente adecuados para ser utilizados como agentes de extracción, en tiempos relativamente cortos y con altos rendimientos.

El CO₂ supercrítico (SCCO₂) es el disolvente ideal para la SFE (Supercritical Fluid Extraction) debido a que las condiciones de presión y temperatura que se necesitan para que alcance condiciones supercríticas son muy accesibles. La temperatura crítica del CO₂ (31°C) es cercana a la temperatura ambiente y la presión crítica es relativamente baja (74 bar). Además, la utilización de SCCO₂ como solvente tiene muchas ventajas por no ser tóxico, inflamable, o corrosivo, no ser costoso, eliminarse fácilmente, ser selectivo, manteniendo bajas temperaturas y, por lo tanto, favorable para compuestos termolábiles. Además, está considerado por la industria alimentaria como GRAS (General Recognized As Safe). Sin embargo,

una desventaja es su baja polaridad, aunque esta limitación puede ser superada mediante la utilización de cosolventes. Las principales variables que influyen en la eficacia de la extracción son la presión, la temperatura, el tamaño de partícula y contenido de humedad de la matriz, el tiempo de extracción, la velocidad de flujo de CO₂ y el disolvente utilizado como cosolvente.

Tabla 3. Aplicaciones de la SFE en la industria alimentaria.

Productos	Sustancias extraídas
Lácteos	Triglicéridos Colesterol Ácidos grasos insaturados
Derivados de la pesca	Ácidos grasos poliinsaturados Concentrados de EPA y DHA C14, C16, C18, C20, C22
Vegetales y frutas	Aceites de semillas Aceites esenciales Fosfolípidos Ácidos grasos Oleorresinas Antioxidantes Antocianinas Carotenos Despectinación de zumos de fruta
Café y té	Cafeína y teína
Bebidas alcohólicas	Alcohol Aromas
Cárnicos	Colesterol Lípidos

En la industria alimentaria los fluidos supercríticos están siendo muy usados para la obtención de extractos herbales y aceites esenciales, también se emplea en el desgrasado de alimentos como el cacao o frutos secos y cereales o para la producción de productos dietéticos o bajos en colesterol. En el campo de las empresas de bebidas, son utilizados para la eliminación del alcohol en la fabricación de bebidas desalcoholizadas y para la obtención de extracto de lúpulo para la elaboración de cerveza [248-250]. También son utilizados para la eliminación de contaminantes presentes en los alimentos como por ejemplo del arroz. Por otro lado, dentro de los procesos no extractivos en los que intervienen los fluidos supercríticos es de destacar la desinfección e inactivación enzimática para la conservación de los alimentos o como medio de reacción como es el caso de la hidrogenación de aceites vegetales para producir margarinas, la micronización de principios activos, la encapsulación y la impregnación de materiales como por ejemplo los materiales de envasado [251].

En la actualidad la extracción con fluidos supercríticos está ampliamente documentada en la bibliografía, siendo esta una técnica adecuada para la obtención del aceite volátil de las plantas [26, 252]. Son los extractos obtenidos mediante este método los más ricos en monoterpenos y componentes del aceite esencial, utilizando para ello generalmente unas condiciones de 100-200 bar y 40-50 °C [252]. Por otro lado, son necesarias presiones más altas, 300 bar o superiores, para la extracción de compuestos fenólicos, como son los compuestos de interés ácido carnósico y carnosol [178, 253].

Generalmente, la solubilidad de las sustancias en CO₂ supercrítico se incrementa con el aumento de la presión cuando la temperatura se mantiene

constante, sin embargo algunos estudios muestran que la extracción de carotenoides como el α - y β -caroteno disminuye cuando la presión de extracción se incrementa por encima de 35-50 MPa, pudiendo ser debido a que el aumento de la presión provoca un aumento de la densidad del CO_2 y con ello un incremento de la polaridad del fluido [254]. Por otro lado, el incremento de la temperatura también produce una mejora en la extracción de carotenoides [255] siendo las temperaturas de trabajo en la extracción de carotenoides de 40-70 °C [256, 257, 253]. Además, la elección de las condiciones de presión y temperatura influye en el tipo de carotenoide que se desea extraer. Careri y colaboradores [258] determinaron las temperaturas óptimas de extracción de zeaxantina (80 °C), β -criptoxantina (76 °C) y β -caroteno (60 °C) de *Spirulina pacifica* a una presión constante de 350 bar. Por su parte Montero y colaboradores [259] establecieron que las condiciones óptimas de extracción de estos tres carotenoides de la cianobacteria *Synechococcus* eran de 500 bar, 60 °C para la zeaxantina, 459 bar, 59 °C para la β -criptoxantina y de 358 bar, 50 °C para el β -caroteno. Como se puede observar a medida que aumenta la polaridad del carotenoide se incrementan las condiciones de extracción.

Respecto a la extracción de triterpenos mediante fluidos supercríticos, las condiciones de presión y temperatura de trabajo habituales suelen ser de 200-350 bar y 40-60 °C [192,260-262]. El uso de etanol como cosolvente parece determinante a la hora de extraer estos compuestos. Zhao [85] comprobó que en la extracción de triterpenos de brezo los mejores resultados se obtenían al utilizar un 10 % de etanol como cosolvente. Por otro lado, Domingues y colaboradores [263] determinaron que las condiciones óptimas para la extracción de triterpenos acetilados eran 200 bar, 40 °C y 5 % de etanol, sin embargo, comprobaron que para

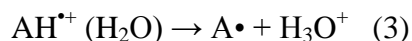
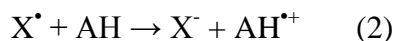
los triterpenos libres la extracción aumenta con el aumento de la presión y el porcentaje de etanol.

1.4 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

1.4.1 Actividad antioxidante

Un antioxidante es por definición una molécula capaz de retardar o evitar la oxidación de otra, generalmente a través de su propia oxidación. Hay multitud de compuestos que actúan como moléculas antioxidantes como por ejemplo algunas enzimas, como la peróxido dismutasa, moléculas biológicas como la ferritina, la albúmina o los estrógenos, sustancias procedentes de fuentes naturales, como vitaminas (C, E), compuestos fenólicos o carotenoides.

Los antioxidantes pueden neutralizar los radicales ($O_2^{\bullet-}$, 1O_2 , HO^{\bullet} , NO^{\bullet} , $ONOO^-$, $HOCl$, $RO(O)^{\bullet}$, $LO(O)$) mediante dos mecanismos principalmente: la transferencia de átomos de hidrógeno (ecuación 1) y la transferencia de electrones (ecuaciones 2, 3, 4, 5):



La forma más extendida de evaluar la actividad antioxidante de una sustancia es mediante métodos *in vitro* espectrofotométricos. Los principales métodos son ORAC, FRAP, TEAC y DPPH. El método ORAC se considera relevante para los sistemas biológicos, ya que mide el radical peróxido, que es el más abundante de los radicales libres [264]. El ensayo FRAP mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo férrico tripiridil triazina. La principal limitación de este método es que la capacidad de reducción no refleja necesariamente la actividad antioxidante [265], dado que el método no proporciona un sustrato oxidable. Por su facilidad de operación, los ensayos DPPH y TEAC son los más extendidos. El ensayo de DPPH se basa en la detección del radical cromógeno DPPH. El inconveniente principal de este ensayo es que este radical, que es un radical de nitrógeno estable, no tiene ninguna similitud con los radicales altamente reactivos y transitorios formados en la peroxidación de lípidos. Por otro lado, el método TEAC se basa en la capacidad de los antioxidantes para captar el radical 2,20-azonobis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato) más conocido como ABTS⁺; sin embargo este radical no se encuentra en los sistemas biológicos, por lo que el ensayo TEAC ha sido criticado por usar un radical no fisiológico.

El ensayo TEAC fue expuesto por primera vez por Miller y col. (1993) [266]. En este ensayo, el ABTS se oxida por los radicales peróxido u otros oxidantes a su catión radical, ABTS^{•+}, el cual se colorea intensamente, y la actividad antioxidante es medida como la capacidad de los compuestos de ensayo para disminuir el color al reaccionar directamente con el radical ABTS^{•+}. Los máximos de absorción del ABTS^{•+} son 415, 645, 734 y 815 nm, aunque son las longitudes de onda de 415 y 734 nm las adoptadas principalmente para la observación espectrofotométrica de la reacción entre los antioxidantes y el radical ABTS^{•+}. En

términos de cuantificación, la medida de la disminución de absorbancia del ABTS^{•+} en presencia de la muestra en un tiempo fijo (4-6 min), se lleva a cabo mediante la comparación con el estándar de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2-carboxílico) proporcionando los resultados de la capacidad antioxidante como equivalentes de Trolox (TE).

Las principales ventajas de este método son que el radical ABTS^{•+} reacciona rápidamente con los antioxidantes, generalmente a los 30 minutos. Además, se puede utilizar un amplio rango de pH y lo que permite estudiar los efectos del pH sobre los mecanismos antioxidantes. Otra ventaja es que el ABTS^{•+} es soluble tanto en disolventes acuosos como orgánicos y no se ve afectado por la fuerza iónica, por lo que se puede utilizar en múltiples medios para determinar las capacidades antioxidantes tanto de sustancias hidrófilas como lipófilas de extractos y de fluidos corporales [267].

1.4.2 Actividad antiinflamatoria

La inflamación es el conjunto de respuestas proporcionada por los tejidos vivos frente a agresiones de diferente naturaleza, que determina una serie de cambios en los sistemas homeostáticos, como la sangre o el tejido conectivo para localizar, aislar, y eliminar el agente agresor y, consecuentemente, reparar el daño ejercido por él. Existen multitud de agentes que pueden causar inflamación, agentes biológicos como bacterias, virus, hongos y parásitos, agentes físicos o químicos como por ejemplo el calor y las toxinas, los traumatismos o determinadas alteraciones inmunitarias.

El proceso inflamatorio tiene un componente local y otro sistémico. En el primero participan los sistemas de complemento, de coagulación y de las quininas, así como metabolitos del ácido araquidónico y varias citoquinas, por lo que se genera vasodilatación local, trasudación de líquidos, formación de edema, aumento de la temperatura local y desplazamiento de células de la sangre hacia el tejido afectado. La respuesta sistémica, en cambio, se caracteriza por fiebre, leucocitosis e incremento de proteínas de fase aguda de inflamación.

Los macrófagos, debido a su capacidad fagocítica, son las células que inician el proceso inflamatorio sintetizando citoquinas. Las citoquinas actúan como mediadores principales en el proceso inflamatorio y la unión de la citoquina a su receptor se traduce en una cascada de señales intracelulares que termina en el control de uno o varios genes. La principal citoquina implicada en el proceso inflamatorio es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), una citoquina proinflamatoria que es sintetizada inicialmente por células de la línea monocítica. La TNF- α activa el endotelio vascular, incrementando su permeabilidad y favoreciendo la entrada de inmunoglobulina (Ig) G, un tipo de anticuerpo humoral cuya principal función es facilitar la fagocitosis por parte de los macrófagos. Otras citoquinas que regulan la inflamación y actúan como mediadores químicos son las interleuquinas IL-1 β e IL-6, las que generalmente son sintetizadas por los macrófagos en el lugar de la inflamación. La IL-1 β está implicada en gran variedad de actividades celulares, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, y la apoptosis; además es la responsable del aumento del flujo sanguíneo local durante el proceso inflamatorio, aumenta la expresión de moléculas de adhesión y tiene acción pirógena. La IL-6 es una glucoproteína segregada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación está inducida por la IL-

1 y se incrementa en respuesta a la TNF- α . Es un pirógeno endógeno que estimula en la hipófisis la producción de la hormona ACTH, además es capaz de atravesar la barrera sangre-cerebro e iniciar la síntesis de la prostaglandina E2 (PGE-2) en el hipotálamo, cambiando de este modo la temperatura de consigna del cuerpo. En el tejido muscular y graso, IL-6 estimula la movilización de la energía que conduce a un aumento de la temperatura corporal. También interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, activa a los linfocitos T citotóxicos, células plasmáticas, modula la hematopoyesis y es la responsable, junto con la IL-1, de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, en especial fibrinógeno. Al unirse IL-1 β al receptor de membrana IL tipo I, se desencadena una señal intracelular vía MAPK, activándose NF- κ B y AP-1, un factor de transcripción, lo que provoca un incremento en la síntesis de genes proinflamatorios, incluida la amplificación autocrina de IL-1 β . La citoquina IL-10, en cambio, actúa como interleuquina antiinflamatoria. Inhibe la secreción de citoquinas, probablemente disminuyendo la expresión de NF- κ B y en presencia de IL-10 en los macrófagos se inhibe la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), así como la adhesión de los monocitos al endotelio.

La prostaglandina E2 (PGE-2) es un mediador que aumenta su síntesis durante el proceso inflamatorio. Causa vasodilatación, aumenta la permeabilidad vascular permitiendo el paso de los leucocitos, actúa como antiagregante plaquetario y estimula las terminaciones nerviosas del dolor, facilitando la progresión de la inflamación. Por otro lado la ciclooxigenasa 2 o prostaglandina endoperóxido sintasa (COX-2) es la enzima encargada de la síntesis de PGE-2 a partir de ácido araquidónico. Existen dos isoformas de COX, COX-1 y COX-2. COX-1 además de intervenir en la producción de prostaglandinas y sintetizar PEG-1, tiene como

función regular la proliferación de las células normales. COX-2 únicamente sintetiza PEG-2 en respuesta a señales proinflamatorias como infecciones, estrés, citoquinas o lipopolisacáridos y su expresión es estimulada por diversos mediadores inflamatorios como interferón γ , TNF- α , IL-1 β o factores de crecimiento, en diversas células tales como monocitos, macrófagos, células endoteliales, sinoviocitos, condrocitos y osteoblastos.

El factor NF- κ B, es un factor de transcripción que regula la expresión de genes vinculados a la proliferación celular, respuesta inflamatoria y la adhesión celular. NF- κ B regula la expresión génica de iNOS, COX-2 y citoquinas como TNF- α , IL-1 β o IL-6.

Algunas de las principales patologías causadas por un proceso inflamatorio crónico son la aterosclerosis, el cáncer, la artritis reumatoide, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [268-271].

Una de las principales patologías que promueven la aparición de cardiopatías y enfermedades cerebrovasculares es la aterosclerosis. Este es un proceso inflamatorio-fibro-proliferativo que ocurre en las arterias en las que se produce una formación progresiva de placas o ateromas, que sobresalen hacia el interior de las arterias, dando lugar a la reducción del flujo sanguíneo y con ello a la aparición de estados isquémicos. El desarrollo de estas placas en el interior de las arterias puede derivar en una trombosis oclusiva o una estenosis gradual, ocasionando en el primer caso la infartación del órgano que es alimentado por esa arteria, como es el ataque al corazón o la apoplejía cuando se ve afectada la arteria cerebral, y en el caso de la estenosis se produce un daño progresivo del órgano afectado. Las

principales causas de la aterosclerosis son la hipertensión, la hipocolesterolemia, la obesidad y la diabetes.

Este proceso inflamatorio está directamente relacionado con las lipoproteínas LDL y las especies reactivas de oxígeno (ROS). En un primer estado las lipoproteínas LDL pueden ser oxidadas por ROS dando lugar a la forma oxidada ox-LDL. Esta ox-LDL contribuye a la migración de los monocitos y los linfocitos a la zona media del endotelio y la conversión de los monocitos en macrófagos, dándose también la agregación plaquetaria. Durante este proceso se produce la activación de factores de transcripción como NF- κ B que promueven la expresión de mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) la interleuquina 6 (IL-6), además VCAM-1 y ICAM-1, dándose la progresión de la inflamación. Cuando la lesión esta en un estado más avanzado se originan placas fibrosas que constan de una capa de tejido conjuntivo con células vasculares del musculo liso (VSMC), situadas sobre acumulación de lípidos, macrófagos y linfocitos. En determinado momento las células T activadas pueden estimular la producción de metaloproteinasa por los macrófagos en las lesiones, promoviendo la inestabilidad de la placa formada. Cuando esta lesión inicial causante de la placa de ateroma se desestabiliza o degrada, se facilita la formación de un trombo, que puede derivar en trombosis y ésta en síndromes coronarios e infartos de miocardio y cerebrovasculares. [272, 273].

1.4.3 Actividad antiviral: Anti-hepatitis C

Para comprender el mecanismo de acción de los fármacos antivirales es necesario considerar el ciclo vital completo de un virus típico, que puede dividirse en 5 etapas:

1. Adhesión: el virus se adhiere a la célula por interacción con un receptor específico situado en la membrana celular.
2. Penetración y pérdida del revestimiento: da lugar a la liberación y activación del genoma viral en el interior de la célula.
3. Replicación: síntesis de enzimas virales específicas, duplicación del genoma viral y producción de proteínas virales tanto estructurales como no estructurales.
4. Montaje y acoplamiento de los componentes virales: Los genomas copiados (ARN y ADN) interactúan con las unidades estructurales sintetizadas recientemente y producen nucleocápsides del virus hijo y el empaquetamiento del material genético viral.
5. Liberación: los viriones maduros lisan la célula mediante enzimas y son liberados al exterior celular.

Los antivirales pueden ser clasificados según la etapa del ciclo de replicación viral en la que interfieren:

Etapa 1. Bloqueantes de la adhesión: anticuerpos antireceptor.

Etapa 2. Bloqueantes de la penetración: bloqueantes de canales iónicos o estabilizadores de la cápside.

Etapa 3. Inhibidores de la síntesis de ADN y síntesis proteica: análogos de nucleósidos, los cuales inhiben la duplicación del ADN viral mediante la terminación prematura de la cadena de ADN en formación o compiten por las polimerasas virales; interferones, que actúan bloqueando la síntesis de proteínas.

Etapa 4. Inhibidores de proteasas y proteínas de ensamblaje.

Etapa 5. Anticuerpos antivirales.

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus pequeño (30 a 38 nm), con envoltura y con una sola cadena de ARN(+), perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Este tiene un genoma de 9,6 kb que codifica una única poliproteína, la cual es posteriormente dividida por las proteasas del virus y el anfitrión en al menos 10 proteínas individuales maduras: cuatro proteínas estructurales (C, E1, E2 y p7) y seis proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B), comenzándose a partir de estas proteínas no estructurales una serie de procesos de replicación de ARN que conduce finalmente a la síntesis de nuevo ARN(+) viral y por tanto, al comienzo de una multiplicación del virus y de amplificación de la infección.

El virus VHC se replica principalmente en los hepatocitos, causando la denominada Hepatitis C, una enfermedad inicialmente asintomática, pero que con el tiempo puede manifestar por cansancio, falta de apetito, náuseas o dolores musculares o articulares y cuando la enfermedad progresa termina en una cirrosis hepática. Según datos de la OMS esta enfermedad afecta en la actualidad a entre 130-150 millones de personas en todo el mundo. Sin embargo, hasta la fecha, no existe una vacuna profiláctica para prevenir la infección de VHC. El actual tratamiento estándar para la hepatitis C crónica incluye la administración de interferón (IFN- γ), en combinación con un nucleósido de ribavirina. Este tratamiento presenta una serie de efectos secundarios desfavorables que incluyen síntomas parecidos a la gripe, anemia hemolítica y efectos teratológicos. Por lo tanto, existe una necesidad médica de descubrir nuevos agentes con un alto índice terapéutico y pocos efectos secundarios para tratar la infección crónica por el VHC.

En la búsqueda de nuevos agentes anti-VHC, han sido investigados los extractos de algunas plantas como la *Acacia confusa* [274], *Eclipta alba* [275], *Lonicera hypoglauca* [276], *Phyllanthus amarus* [277] o el té verde [278]. En la mayoría de estos casos, los componentes principales de los extractos investigados fueron compuestos fenólicos. Asimismo, se encuentran estudios sobre la capacidad de la luteína (tetraterpeno) como un efectivo inhibidor de la Hepatitis B [279] y se asocia la deficiencia de Vitamina A con la infección crónica por hepatitis C y con la falta de respuesta a la terapia antiviral con interferón. Es decir que, una dieta deficiente en carotenoides con actividad provitamina A puede afectar a la infección y el tratamiento del VHC [280].

Recientemente, un estudio de la bibliografía [113] indica que el ácido oleanólico y el ácido ursólico pueden actuar como potentes agentes contra el virus de la hepatitis C. En dicho estudio, Kong y col. (2013) evaluaron la actividad inhibitoria contra el virus VHC en la línea celular Huh7.5.1, de diferentes fracciones de un extracto de *Fructus Ligustri Lucidi*, que actuaban inhibiendo la replicación. Posteriormente, en células HepG2-5B investigaron las mismas fracciones del extracto en relación a su capacidad para reducir la actividad de la proteína viral NS5B, la que tiene como principal función la replicación del ARN viral. Los resultados en este caso fueron similares, siendo las fracciones más activas las que demostraron un alto contenido en ácido ursólico y el ácido oleanólico. Los ácidos triterpénicos puros también fueron evaluados y comprobaron que ambos compuestos actúan inhibiendo la expresión de la proteína NS5A y la actividad de NS5B, ambas responsables de la replicación.

Este estudio sugiere a estos compuestos como potenciales agentes antivirales para tratamientos alternativos o complementarios al existente actualmente.

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La obtención de extractos naturales con actividades biológicas a partir de plantas, para su posterior uso como posibles ingredientes alimentarios o para poder ser aplicados en el campo de la farmacia o la cosmética, constituye un campo atractivo de desarrollo e innovación. Además, la posibilidad de obtener estos extractos mediante tecnologías limpias, más eficientes, menos costosas, que resulten en productos concentrados en compuestos bioactivos, es uno de los principales atractivos de este campo de investigación. De esta manera, la utilización de fluidos comprimidos tales como CO₂ supercrítico o disolventes líquidos presurizados para alcanzar estos objetivos representa una vía interesante de estudio.

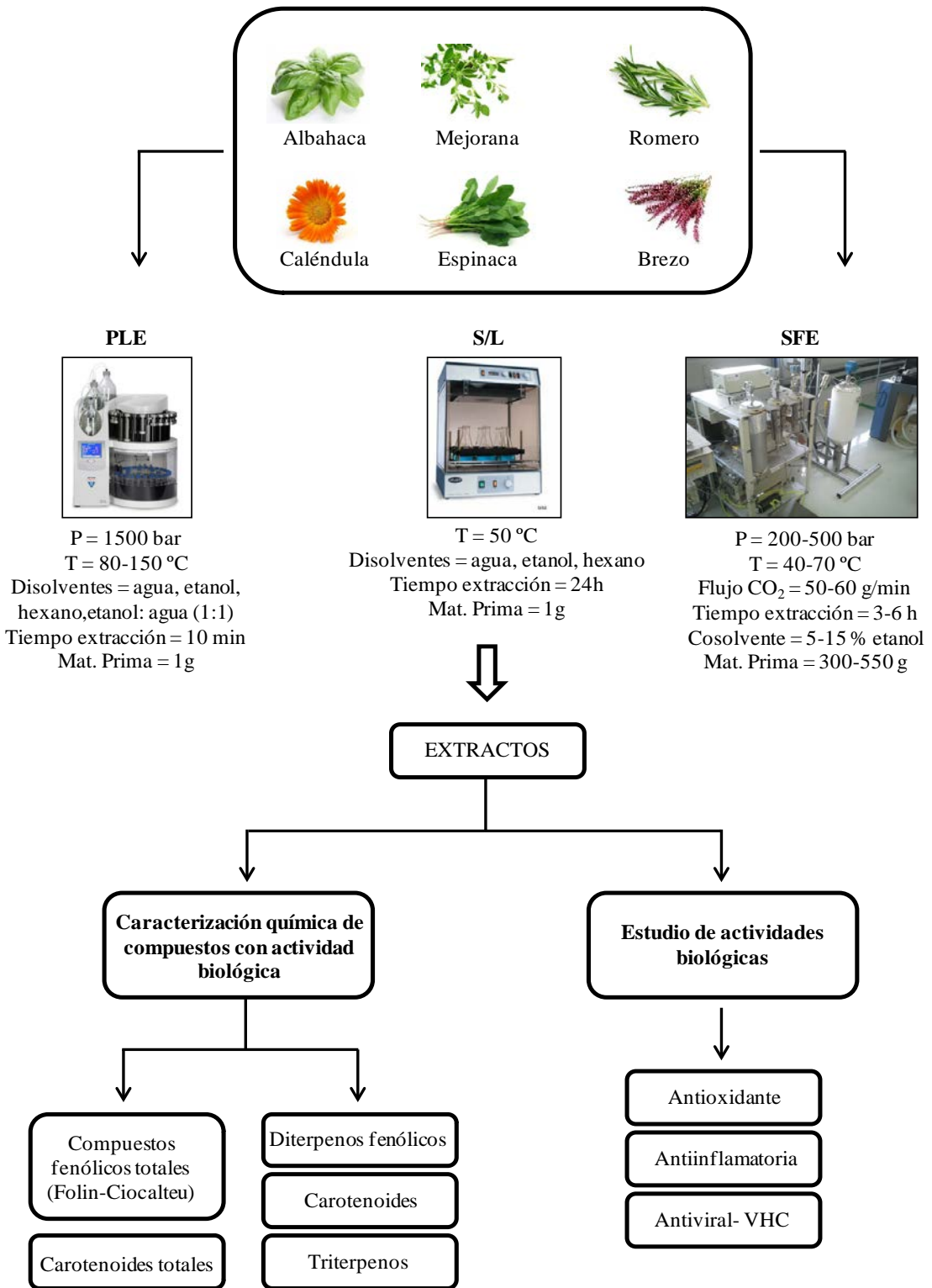
Por estas razones, el objetivo principal de esta tesis ha sido investigar diversas especies de plantas con la finalidad de encontrar extractos útiles por sus actividades biológicas, utilizando las nuevas tecnologías de fluidos presurizados para su obtención. Concretamente, se investigaron la albahaca, la mejorana y el romero como fuentes de compuestos fenólicos, así como la espinaca y la caléndula como fuentes naturales de carotenoides, y el brezo y la caléndula como fuentes de compuestos triterpenoides. Se identificaron y cuantificaron los contenidos de estos compuestos en los extractos obtenidos, buscando una posible relación con las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antivirales que se les atribuyen. Asimismo, se estudiaron combinaciones de estos extractos con el fin de determinar posibles efectos sinérgicos entre los mismos y/o entre los compuestos bioactivos principales que contienen.

Siguiendo este objetivo general como línea de trabajo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la actividad antioxidante de extractos obtenidos mediante extracción supercrítica (SFE) y líquidos presurizados (PLE) a partir de albahaca, mejorana, romero, espinaca y caléndula: analizar la relación entre el contenido de los compuestos fenólicos y/o carotenoides y la actividad antioxidante, determinando posibles efectos sinérgicos.
2. Estudiar el producto de la extracción simultánea de una combinación de plantas, y comparar el resultado con el obtenido a partir de los extractos individuales, observando posibles efectos sinérgicos, así como las diferencias en cuanto a la composición y a la actividad biológica de los extractos individuales y combinados.
3. Aplicar diferentes técnicas de extracción a la espinaca, reconocida tanto por sus compuestos fenólicos como carotenoides, y estudiar comparativamente la influencia que tienen estos compuestos en la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los extractos.
4. Investigar la actividad antiinflamatoria de extractos de caléndula y brezo, y de sus mezclas, y determinar si existe una relación entre esta actividad y el contenido de ácidos triterpénicos.

5. Estudiar la extracción supercrítica de brezo, evaluar diferentes condiciones de extracción con el objetivo de obtener extractos concentrados en ácidos triterpénicos y valorar su potencial actividad anti-HCV debida al contenido de estos ácidos.

En la figura siguiente, se presenta en forma esquemática el plan de trabajo seguido en el desarrollo de esta tesis.



MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATRICES VEGETALES Y SU PREPARACIÓN

Albahaca (*Ocimum basilicum*), mejorana (*Origanum majorana*), romero (*Rosmarinus officinalis*), caléndula (*Calendula officinalis*), espinaca (*Spinacia oleracea*) y brezo (*Calluna vulgaris*) fueron las matrices vegetales utilizadas como fuentes de obtención de los compuestos bioactivos. Todas ellas suministradas por la empresa española Murciana de Herboristería, S.A.L. (Murcia, España) en sacos de 10 kg que se almacenaron a temperatura ambiente y protegidos de la luz y la humedad hasta su utilización.

Las diferentes partes de la planta que se utilizaron para el estudio (hojas de la albahaca, romero y espinaca, flores y pétalos, de la caléndula y hojas y flores del brezo) fueron sometidas a una molienda y posteriormente, mediante un equipo de tamices vibratorios se determinó su distribución del tamaño de partícula. El material utilizado fue el comprendido entre 200-600 μm . El material molido se almacenó en oscuridad y protegido de la humedad y se utilizó dentro de los 15 días posteriores a la molienda.

El contenido de humedad del material vegetal molido se determinó por diferencia de peso de muestras de 25 g de cada una de las plantas tras ser mantenidas en estufa durante tres días a una temperatura de 80-90°C.

Tras el proceso de secado los contenidos de humedad determinados fueron: albahaca, 10 %; caléndula, 10.3 %; espinaca, 4.9 %; mejorana, 7.7 %; romero, 8.3 % y brezo 8.4 %.

3.2 PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

3.2.1 Extracción sólido-líquido (*Solid Liquid Extraction, SLE*)

Las extracciones SLE se llevaron a cabo utilizando 1 g de planta molida y 100 mL de disolvente (agua, etanol, hexano) durante 24 horas en un agitador orbital Stuart Orbital S150 con una velocidad de agitación de 150 rpm y a una temperatura de 50°C. Todas las extracciones se realizaron por duplicado. Transcurrido el tiempo de extracción, las muestras fueron filtradas a vacío y el precipitado lavado 3 veces con 10 mL del disolvente correspondiente. Por último, el extracto se llevó hasta sequedad eliminando el disolvente por evaporación a vacío en un rotavapor con temperatura controlada a 35°C. Para asegurar la completa eliminación de todo el disolvente, el extracto se mantuvo en corriente de N₂ hasta peso constante. Los extractos acuosos fueron liofilizados durante 48 horas para la eliminación completa del agua. Todos los extractos secos se mantuvieron en oscuridad y a -20°C hasta su análisis.

3.2.2 Extracción con líquidos presurizados (*Pressurized Liquid Extraction, PLE*)

Las extracciones PLE se realizaron en un equipo ASE 350 de Dionex equipado con un reservorio para tres disolventes, una bomba de disolventes, una entrada de N₂ y de aire comprimido, un conjunto de válvulas neumáticas, un carrusel de 24

celdas de muestras de acero inoxidable (10 mL) así como un carrusel de 24 viales colectores, un horno (rango de temperatura de 20 a 200°C) y un panel de control desde donde se automatiza el proceso.

Las extracciones se realizaron introduciendo en la celda de extracción de 10 mL de volumen 1g de planta molida y 1g de arena de mar en modo sándwich para evitar la obstrucción de la salida de la celda [253]. Finalizado el tiempo de extracción, se lleva a cabo un ciclo de lavado en el que una pequeña cantidad de disolvente es bombeado de nuevo al interior de la celda. Por último el disolvente con los compuestos disueltos se extrae de la celda purgando con N₂. Igual que en la SLE, los extractos PLE se llevaron a sequedad eliminando el disolvente por evaporación a vacío en un rotavapor con temperatura controlada a 35°C y posteriormente en corriente de N₂ hasta peso constante. Los extractos acuosos fueron liofilizados durante 48 horas para la eliminación completa del agua. Todas las muestras secas se mantuvieron en oscuridad y a -20°C hasta su análisis.

3.2.3 Extracción con fluidos supercríticos (*Supercritical Fluid Extraction, SFE*)

Las extracciones se llevaron a cabo en un extractor de escala piloto (Thar Technology, Pittsburgh, PA, EE.UU., modelo SF2000). El equipo está formado por una celda de extracción cilíndrica de 2 L con una relación altura/diámetro de 5,5 (0,42 m de altura, 0,076 m de diámetro interno) y dos separadores (S1 y S2), de 0,5 L de capacidad y con control independiente de temperatura y presión. El equipo de extracción incluye también un sistema de recirculación, donde el CO₂ se condensa y se bombea hasta la presión de extracción deseada.

Para las extracciones se utilizaron entre 300 y 550 g de material vegetal molido dependiendo de la planta. El rango de temperatura estudiado fue de 40-70°C, y las presiones utilizadas estuvieron comprendidas entre 200 y 500 bar. Los flujos de CO₂ fueron de 50 o 60 g/min y los tiempos de extracción variaron entre 3 y 6 h. Las extracciones en las que se empleó co-solvente, este fue en todos los casos etanol y los porcentajes fueron de 5, 10 y 15 %.

En las extracciones en las que se llevó a cabo fraccionamiento en cascada, el primer separador (S1) se mantuvo a una presión intermedia entre la presión de la celda de extracción y la del segundo separador (S2), el que se mantuvo bien a la presión del sistema de recirculación (60 bar) o a presión ambiente, en el caso de utilizar co-solvente durante la extracción.

Finalizada la extracción, el equipo se despresuriza y los extractos obtenidos en los dos separadores se recogen lavando el separador con una pequeña cantidad de etanol para asegurar la completa recuperación de la muestra. Igual que en los extractos obtenidos por las técnicas anteriores se eliminó el disolvente por evaporación a vacío en rotavapor y posteriormente en corriente de N₂ hasta peso constante. Todos los extractos secos se mantuvieron en oscuridad y a -20°C hasta su análisis.

3.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS FITOQUÍMICOS

El análisis de los aceites esenciales se llevó a cabo por cromatografía de gases con detector de ionización de llama y acoplado a un espectrómetro de masas (GC-FID-MS). Para ello se empleó un equipo de GC de Agilent Technologies modelo 7890A, equipado con un inyector split/splitless, con control electrónico de presión, un inyector automático G4513A con capacidad para 16 viales y con dos detectores, uno de ionización de llama (FID) y un espectrómetro de masas triple-cuadrupolo (Axis 5975C). El software de control del equipo fue GC-MS Solution. Los análisis se realizaron con una columna capilar de HP-5MS (Agilent 19091S-433UI), de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 de espesor de fase, inyectando en modo Split 1/10, 1 μ L de la muestra disuelta en etanol en concentraciones entre 1 y 5 mg/mL dependiendo del origen del extracto. El método aplicado se describe en [174]. Los compuestos fueron identificados por comparación con los espectros de masas de la biblioteca NIST MS 2.0.

El análisis de los diterpenos fenólicos se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) mediante el método propuesto por Almela y col. (2006) [281]. El equipo utilizado fue un HPLC (Varian Pro-Star 230), equipado con una columna MICROSORB-MV-100 C18 (Varian) de 250 mm \times 4.6 mm de diámetro y 5 μ m de tamaño de partícula. Para la cuantificación del ácido carnósico y el carnosol se realizaron sus correspondientes rectas de calibrado con los patrones comerciales de alta pureza.

El análisis de los ácidos triterpénicos también fue realizado por cromatografía líquida. El método de análisis utilizado se basa en el propuesto por Martelanc y col.

(2007) [282]. Para la cuantificación de los compuestos de la muestra se realizaron rectas de calibrado con los patrones de ácido betulínico, oleanólico y ursólico comerciales de alta pureza.

La identificación y cuantificación de los carotenoides luteína y β -caroteno se realizó mediante cromatografía líquida, empleando un equipo de HPLC Agilent 1260 Infinity provisto de un detector UV-DAD: se empleó una columna KROMASIL 100 C18 de 25 mm x 4,6 mm y 3,5 μ m de tamaño de partícula. El método de análisis utilizado fue propuesto por Breithaupt y col. (2004) [283]. Para la cuantificación se realizaron rectas de calibrado con estándares comerciales de alta pureza de luteína y β -caroteno.

3.4 OTROS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

3.4.1 Determinación de polifenoles totales.

El contenido de polifenoles totales se determinó siguiendo el método propuesto por Singleton y col. (1999) [284]. 50 μ L de muestra o patrón disuelto se mezclan con 3 mL de agua Milli Q, se añaden 250 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agita enérgicamente durante 10 segundos. La mezcla se deja en reposo durante 3 minutos para que se produzca la reacción entre los compuestos fenólicos y el reactivo. Durante este tiempo, el color amarillo del reactivo Folin-Ciocalteu cambia a un color verde u ocre (según la cantidad de polifenoles de la muestra). Posteriormente, se añaden en este orden 0,75 mL de Na_2CO_3 (20 %, w/v) y 0,95 mL de agua. Por último, la mezcla se deja en reposo durante 2 horas en

oscuridad y pasado ese tiempo, se mide la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico GAE (mg de ácido gálico /g extracto), utilizando una recta de calibrado realizada con el mismo procedimiento un estándar comercial de ácido gálico.

3.4.2 Determinación de carotenoides totales.

Para la determinación de los carotenoides totales por espectrofotometría se llevó a cabo previamente una saponificación de los extractos partiendo del método propuesto por Granado y col. (2001) [285]. Esta saponificación permite la obtención de una fracción enriquecida en carotenoides, la ruptura de los enlaces éster de carotenoides esterificados, y la eliminación de las clorofilas, las cuales pueden interferir en la posterior medición espectrofotométrica. Para ello, se disuelven 40 mg de extracto en 8 mL de etanol, se adiciona 1 mL de una disolución de KOH (40%, w/v) en etanol:agua (1:1) y se mantiene en agitación y en la oscuridad durante 30 min. Pasado ese tiempo, la mezcla se lleva a un embudo de decantación y se añaden 20 mL de agua y 20 mL de dietil éter, sin agitar la mezcla para evitar la formación de una emulsión. Se separa la fase orgánica, y la fase acuosa se lava dos veces con 20 mL de dietil éter. Las tres fracciones de dietil éter obtenidas se mezclan y se le añade una pequeña cantidad de Na_2SO_4 anhidro para retener el agua que pudiese estar presente. Por último, una vez filtrada la muestra, se elimina el disolvente por evaporación a vacío en un rotavapor.

La medida espectrofotométrica de los carotenoides se llevó a cabo disolviendo el extracto seco obtenido de la saponificación en éter de petróleo, a una concentración de 1 mg/mL. La absorbancia se midió a una longitud de onda de

450 nm, previo blanco con éter de petróleo. La cuantificación de los carotenoides se obtiene por extrapolación de los resultados de las determinaciones espectrofotométricas utilizando una recta de calibrado de β -caroteno, y expresando los resultados como g β -caroteno/100 g extracto.

3.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS EXTRACTOS

Las actividades biológicas de los diferentes extractos de las matrices vegetales se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Actividades Biológicas del Departamento de Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos del CIAL (actividad antioxidante y antiinflamatoria) y con el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (actividad antiviral).

Para la medida de la actividad antioxidante se utilizó el método TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox) siguiendo el procedimiento desarrollado por Re y col. (1999) [286].

La actividad antiinflamatoria de los extractos se estudió en la línea celular de macrófagos diferenciados a partir de monocitos THP-1 (American Type Culture Collection, ATCC, Barcelona, España) estimulados con LPS [287]. La cuantificación de citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) liberadas al medio extracelular se llevó a cabo empleando un kit de enzimo inmunoensayo ELISA (BD Biosciences, Madrid, España), siguiendo las especificaciones del fabricante. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

La actividad antiviral se evaluó sobre la línea celular Huh7.5 (células de hepatoma humano). El cultivo celular VHC (HCVcc) del virus derivado a partir del plásmido, Jc1FLAG2 (P7-nsGluc2A) se utilizó para infectar células Huh 7.5, siguiendo un protocolo descrito por Perales y col. (2013) [288]. Se determinó la concentración inhibitoria del 50% y 90% (CI50 y CI90) de los extractos vegetales en células Huh7.5 infectadas, comparando las unidades formadoras de focos en muestras tratadas y no tratadas con extracto. Las desviaciones estándar se calcularon a partir de 4 repeticiones. Para investigar específicamente las primeras etapas del ciclo de vida viral (entrada viral), se usó un gen reporter de luciferasa HCV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Empleado las técnicas de extracción con líquidos presurizados (PLE) y extracción supercrítica (SFE) en diferentes condiciones se obtuvieron extractos de caléndula, espinaca, romero, albahaca y mejorana.

En las extracciones PLE se utilizaron como disolventes de extracción, etanol, agua, una mezcla de etanol:agua (1:1) y hexano. Las temperaturas se fijaron en 80°C para evitar la posible degradación de carotenoides cuando la materia prima fue caléndula o espinaca y en 150 °C para las otras tres plantas estudiadas, albahaca, mejorana y romero. El tiempo de extracción en todos los casos (extracción estática) fue de 10 min.

En base a la experiencia previa del grupo de investigación, se establecieron las condiciones de extracción SFE en presiones de 300 y 400 bar, para el romero, la albahaca y la mejorana, y de 250 y 350 bar para la caléndula y la espinaca. En todos los casos las temperaturas estudiadas fueron de 40 y 60°C, el caudal de 60 g/min de CO₂ y el tiempo de extracción de 5 h. El fraccionamiento del extracto se llevó a cabo fijando una presión de descompresión de 100 bar en el primer separador (S1) y 60 bar en el segundo separador (S2) con el objetivo de separar los diterpenos fenólicos (extracto S1) del aceite esencial de la planta (extracto S2) en el caso de las plantas labiadas, y para valorar la posible separación de xantofilas (extracto S1) y carotenos (extracto S2), en el caso de la caléndula y la espinaca.

Con este procedimiento, se obtuvieron dos fracciones de diferente composición y más concentradas en los compuestos de interés.

Las Figuras 15 (romero, albahaca y mejorana) y 16 (espinaca y caléndula) muestran los rendimientos PLE obtenidos para las diferentes plantas estudiadas, en función del disolvente empleado. Como era de esperar, el disolvente empleado es el principal factor que influye en el rendimiento de la extracción. Tanto para la albahaca como para la mejorana, los mayores rendimientos se obtuvieron utilizando agua o la mezcla de agua-etanol (1:1) como disolvente de extracción, siendo estos resultados muy similares entre sí. Para el romero, los mayores rendimientos se obtuvieron con etanol, observándose una tendencia inversa a la que presentan las otras dos plantas estudiadas, donde el rendimiento aumenta a medida que se incrementa el contenido en etanol en el extractante. El mayor rendimiento en las extracciones en el caso de la caléndula se obtuvo utilizando agua como disolvente y con la mezcla de agua/etanol en el caso de la espinaca.

Es importante destacar que únicamente cuando la materia prima utilizada es la caléndula, se observa un claro incremento del rendimiento de extracción con la polaridad del disolvente, no así en las otras plantas, en las que como por ejemplo, en la extracción de la espinaca se obtiene con agua un rendimiento casi dos veces menor que con la mezcla agua/etanol.

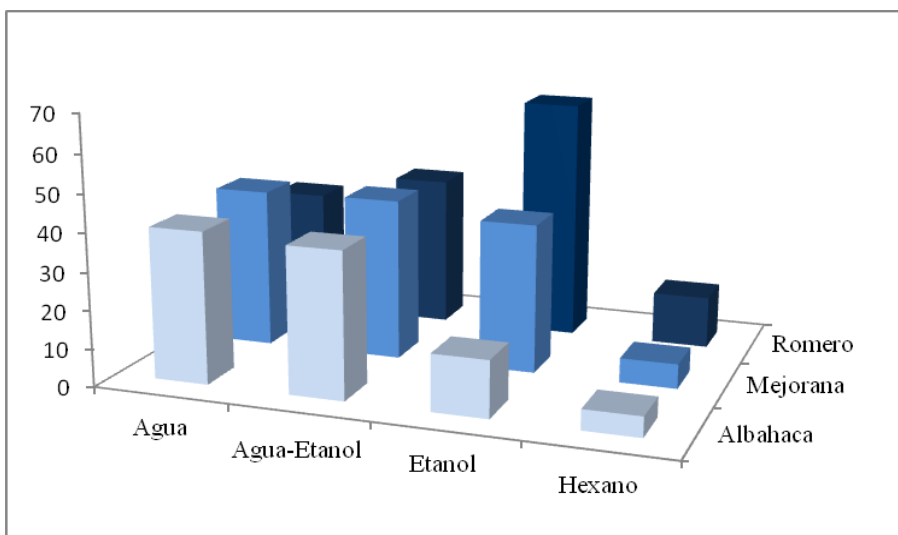


Figura 15. Rendimientos de las extracciones PLE (masa extracto / masa material vegetal x 100) de romero, albahaca y mejorana en función del disolvente empleado.

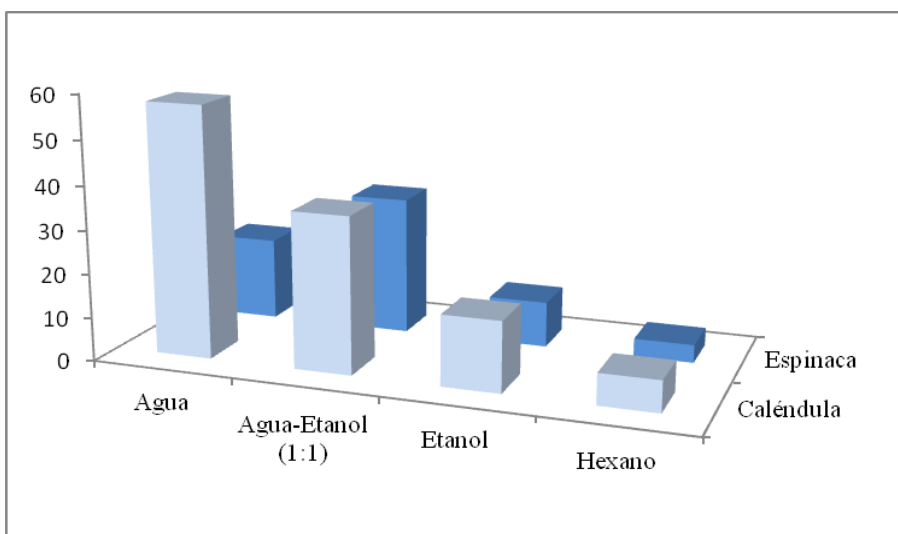


Figura 16. Rendimientos de las extracciones PLE (masa extracto / masa material vegetal x 100) de espinaca y caléndula en función del disolvente empleado.

En la extracción con fluidos supercríticos (Tabla 4) de las plantas labiadas, los rendimientos más altos se alcanzaron para el romero (3-5%). Para esta especie el rendimiento total sigue la tendencia esperada aumentando, de manera evidente, con la presión de extracción. En el caso de la extracción de mejorana y albahaca los rendimientos son considerablemente inferiores (menores a un 2%) y las diferencias cuantitativas en función de las condiciones de extracción no son relevantes. En cuanto al fraccionamiento en los separadores S1 y S2, puede observarse un aumento considerable del rendimiento de extracción en S1 cuando se emplea la temperatura más alta (70°C).

Tabla 4. Rendimientos (%) obtenidos en las extracciones con CO₂ supercrítico de romero, mejorana y albahaca. S1: primer separador; S2: segundo separador.

		Presión y temperatura de extracción	S1	S2	Total (S1 + S2)
			(%)	(%)	(%)
Romero		300 bar - 40°C	0.55	2.56	3.11
		400 bar - 40°C	1.20	2.94	4.14
		300 bar - 70°C	2.24	2.58	4.82
		400 bar - 70°C	2.48	2.85	5.32
Mejorana		300 bar - 40°C	0.30	1.73	2.03
		400 bar - 40°C	0.41	1.25	1.66
		300 bar - 70°C	0.91	0.85	1.76
		400 bar - 70°C	1.49	0.59	2.08
Albahaca		300 bar - 40°C	0.21	1.75	1.96
		400 bar - 40°C	0.22	1.83	2.05
		300 bar - 70°C	0.27	1.57	1.84
		400 bar - 70°C	1.19	0.39	1.58

Los resultados presentados en la Tabla 5 muestran que en las extracciones SFE de caléndula los rendimientos varían de 4.5 a 6.9 % en función de la combinación de los parámetros de presión y temperatura seleccionados. Estos resultados obtenidos están en el mismo orden que datos publicados en la bibliografía para la extracción supercrítica de caléndula. Por ejemplo, Hamburger y col. [199] realizaron extracciones SFE a 500 bar y 50 °C durante 3 horas obteniendo rendimientos aproximados del 5%. En el caso de la espinaca los rendimientos oscilan en 1.4-2.2 % y el mayor rendimiento se obtuvo cuando la temperatura de extracción fue de 40 °C y la presión de 250 bar.

Tabla 5. Rendimientos (%) obtenidos en las extracciones con CO₂ supercrítico de caléndula y espinaca. S1: primer separador; S2: segundo separador.

Presión y temperatura de extracción		S1	S2	Total (S1 + S2)
		(%)	(%)	(%)
Caléndula	250 bar - 40°C	2.63	2.79	5.42
	350 bar - 40°C	2.41	2.60	5.01
	250 bar - 70°C	3.43	1.04	4.47
	350 bar - 70°C	5.81	1.10	6.91
Espinaca	250 bar - 40°C	0.10	2.06	2.16
	350 bar - 40°C	0.12	1.97	2.09
	250 bar - 70°C	0.63	0.81	1.44
	350 bar - 70°C	1.06	0.53	1.59

Los resultados anteriores ponen de manifiesto que para todas las plantas estudiadas la técnica con la que se consiguieron mayores rendimientos globales fue la extracción con líquidos presurizados, presumiblemente debido a la menor selectividad de este método de extracción. Sin embargo es necesario continuar evaluando la composición de los extractos para cuantificar la concentración de los compuestos de interés en cada uno de ellos y valorar la eficacia del proceso de extracción.

4.1.1 Fuentes de compuestos fenólicos: albahaca, mejorana y romero

Los extractos de romero, mejorana y albahaca fueron analizados como fuentes de compuestos fenólicos. Concretamente se cuantificó el contenido de ácido rosmarínico (componente con una reconocida actividad antioxidante) en todos los extractos y los resultados se muestran en la Tabla 6. Debido a la polaridad de este compuesto, el ácido rosmarínico no fue extraído cuando se empleó hexano como disolvente en las extracciones PLE, ni tampoco en las extracciones SFE utilizando CO₂ supercrítico. Teniendo en cuenta los resultados de la tabla, tanto el romero como la mejorana fueron las plantas de las que más se extrajo este compuesto antioxidante. En este caso, se observa que la elección del disolvente juega un papel fundamental si el objetivo es la extracción de este compuesto y obviamente también depende de la matriz vegetal de partida. El extracto PLE de mejorana fue el que presentó, en general, mayor concentración de ácido rosmarínico independientemente del disolvente empleado como agente extractante.

Tabla 6. Contenido de ácido rosmarínico (% en peso) determinado en los extractos PLE.

	Albahaca	Mejorana	Romero
	(%)	(%)	(%)
Agua	1.76	4.75	5.79
Agua/Etanol	2.60	5.48	4.93
Etanol	2.88	5.29	2.49
Hexano	--	--	--

En los extractos de romero fueron también cuantificados el ácido carnósico y el carnosol, sustancias también conocidas por su gran capacidad antioxidante (Tabla 7). No así, en los extractos de mejorana y albahaca, donde probablemente las cantidades extraídas eran muy pequeñas e inferiores al límite de detección del método utilizado.

Comparando los dos tipos de extracción en cuanto a la concentración de estos compuestos antioxidantes, se observa que la extracción con CO₂ supercrítico, independientemente de las condiciones empleadas, muestra unas concentraciones de ácido carnósico similares a las determinadas en el extracto PLE con hexano. Respecto a las condiciones de extracción SFE, a mayor presión, mayor es la concentración de estos compuestos en el S1, mientras que manteniendo la presión constante, una menor temperatura favorece la concentración de estas sustancias bioactivas.

Tabla 7. Contenido de ácido carnósico y carnosol (% en peso) determinado en los extractos SFE y PLE de romero.

Extracción	Ácido carnósico		Carnosol		
	(%)		(%)		
	S1	S2	S1	S2	
SFE	300 bar - 40°C	14.98	12.14	1.13	0.98
	400 bar - 40°C	17.99	11.97	2.66	1.68
	300 bar - 70°C	13.23	13.54	2.17	1.47
	400 bar - 70°C	14.22	14.22	2.24	1.32
PLE	Agua	--	--	--	--
	Agua/Etanol	--	--	2.56	--
	Etanol	4.63	--	0.25	--
	Hexano	13.41	--	0.96	--

La determinación del contenido de compuestos fenólicos totales en todos los extractos de romero, mejorana y albahaca, también se llevó a cabo y los resultados se expresaron respecto a un patrón de ácido gálico como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg GAE/g extracto). En las Tablas 8 y 9 se recogen los resultados obtenidos para los extractos PLE y SFE, respectivamente.

Tabla 8. Contenido en compuestos fenólicos totales (TPC, mg GAE/g extracto) de los extractos de albahaca, mejorana y romero obtenidos con PLE.

	Albahaca	Mejorana	Romero
	TPC (valor medio \pm S.D.)	TPC (valor medio \pm S.D.)	TPC (valor medio \pm S.D.)
Agua	93.429 \pm 9.490	218.317 \pm 16.087	232.088 \pm 35.223
Agua/Etanol	178.893 \pm 10.537	257.336 \pm 11.379	256.526 \pm 14.316
Etanol	99.595 \pm 3.978	108.438 \pm 3.662	86.994 \pm 8.263
Hexano	17.777 \pm 3.073	53.915 \pm 5.296	44.014 \pm 7.473

Como se puede observar en la Tabla 8, las concentraciones más altas de compuestos fenólicos en los extractos se obtienen tanto con el empleo de agua como con la mezcla de etanol: agua como disolvente de extracción. En general, con el empleo de etanol puro las concentraciones se reducen en más de un 50 % y cuando se emplea hexano, las cantidades obtenidas son muy pequeñas debido como era de esperar, a su polaridad. Los resultados de la mejorana y el romero fueron muy similares entre sí, mientras que la albahaca presentaba en general un contenido muy inferior a las otras plantas.

Tabla 9. Contenido en compuestos fenólicos totales (TPC, mg GAE/g extracto) de los extractos de albahaca, mejorana y romero obtenidos con SFE.

	Albahaca	Mejorana	Romero
	TPC (valor medio \pm S.D.)	TPC (valor medio \pm S.D.)	TPC (valor medio \pm S.D.)
S1 300 bar -40°C	48.42 \pm 3.96	21.97 \pm 1.79	103.48 \pm 3.25
S2 300 bar -40°C	73.86 \pm 2.94	54.46 \pm 1.41	104.86 \pm 1.31
S1 300 bar -70°C	53.13 \pm 4.32	31.88 \pm 2.81	122.64 \pm 5.36
S2 300 bar -70°C	88.34 \pm 3.09	34.79 \pm 2.72	130.72 \pm 4.51
S1 400 bar -40°C	40.67 \pm 6.63	24.61 \pm 4.41	144.40 \pm 10.24
S2 400 bar -40°C	67.70 \pm 7.86	22.41 \pm 1.46	123.00 \pm 4.31
S1 400 bar -70°C	57.75 \pm 5.30	49.20 \pm 3.49	108.56 \pm 4.14
S2 400 bar -70°C	75.53 \pm 3.15	41.02 \pm 1.62	140.79 \pm 3.78

En los extractos supercríticos el mayor contenido en polifenoles totales se encontró en los extractos de romero, independientemente de las condiciones de temperatura y presión utilizadas, siendo de 2-5 veces superiores a los valores determinados en los extractos de mejorana o albahaca y en todos los casos muy inferiores al contenido de los extractos PLE.

Los extractos se analizaron también por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para analizar su composición en monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos más volátiles que pudiesen contribuir a la actividad antioxidante. Se estudiaron todos los extractos obtenidos por PLE y el extracto 5 de la extracción supercrítica (300 bar y 40 °C) representando los extractos SFE. En general, los extractos PLE presentaron pequeñas cantidades de este tipo de

compuestos, siendo el hexano el mejor disolvente, seguido de los extractos etanólicos. Por otro lado, la extracción con fluidos supercríticos, como está ampliamente documentada en la bibliografía, es una técnica adecuada para la obtención de aceites esenciales [252] y los extractos obtenidos mediante SFE resultaron más ricos en componentes del aceite esencial de las plantas. Como ejemplos de los análisis realizados por GC-MS se muestra en las Figuras 17, 18 y 19 los cromatogramas obtenidos para el extracto 5 SFE de albahaca, mejorana y romero, respectivamente. Los resultados cuantitativos del análisis de estos extractos se expresaron como porcentaje de área de pico respecto del área total del cromatograma y se muestran en la Tabla 10.

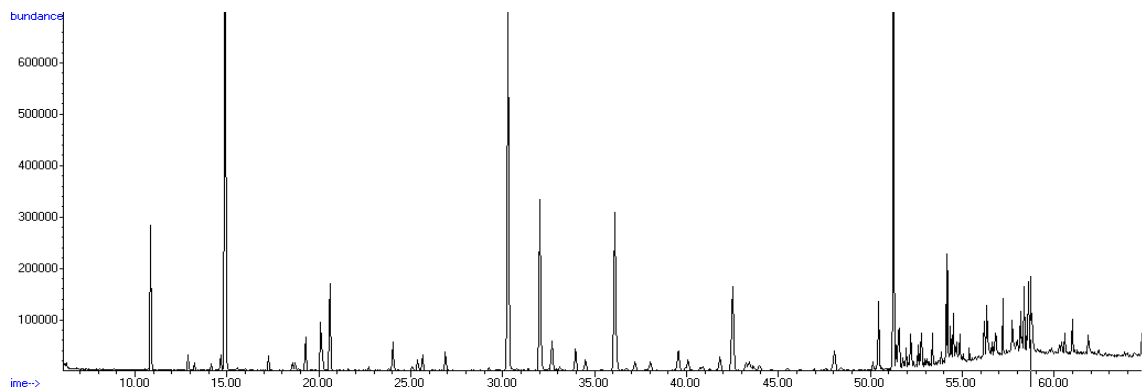


Figura 17. Cromatogramas GC-MS del extracto de albahaca obtenido a 300 bar y 40 °C en el separador S2.

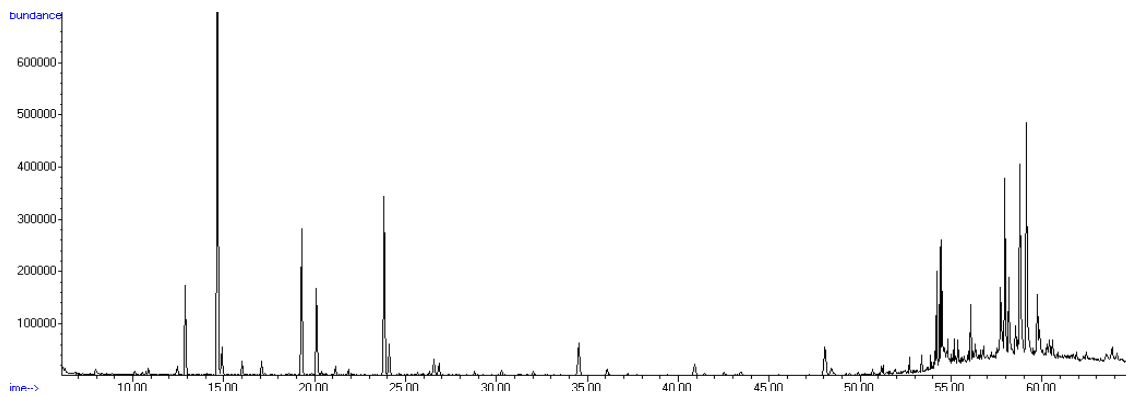


Figura 18. Cromatogramas GC-MS del extracto de mejorana obtenido a 300 bar y 40 °C en el separador S2.

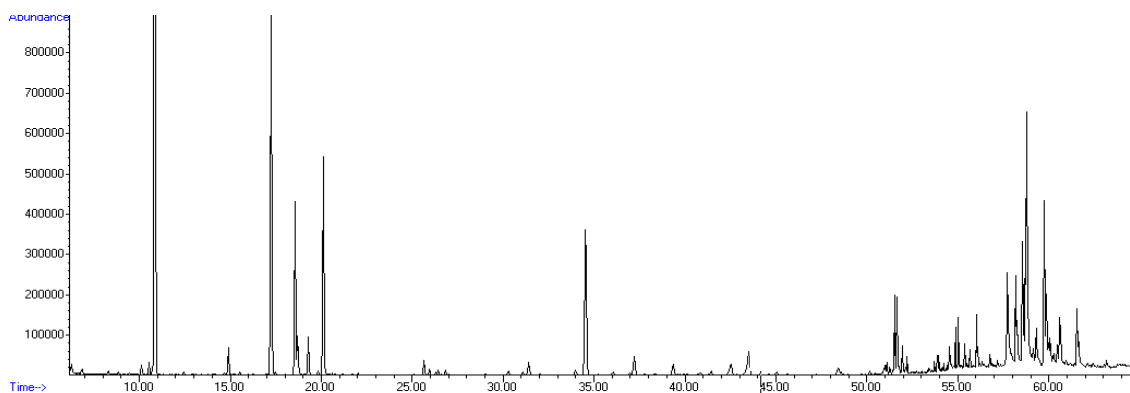


Figura 19. Cromatogramas GC-MS del extracto de romero obtenido a 300 bar y 40 °C en el separador S2.

En los extractos PLE de albahaca de hexano y etanol se identificaron como compuestos mayoritarios linalol (17.6 % área de pico) y α -terpineol (~ 2 % área de pico), aunque también se encontraron 1,8-cineol y 4-terpineol. Los extractos supercríticos de esta planta eran más ricos en compuestos del aceite esencial,

destacando como mayoritario β -linalol, el cual se distribuye preferiblemente en el S2. Predominan también eugenol y tau-cadinol, seguidos de ácido cinámico metil ester, α -bergamotene, γ -cadinene, spathulenol, cubenol, α -terpineol, estragol y 1,8-cineol el cual se encuentra principalmente en S2.

Los extractos de mejorana obtenidos mediante líquidos presurizados tienen un menor contenido en compuestos del aceite esencial respecto a la albahaca, destacando únicamente 5-isopropil-2-metil biciclo (3.1.0) hexan-2-ol como principal componente, representando un 28.5 %, seguido de 4-terpineol, α -terpineol y γ -terpineno. Por otro lado, los extractos supercríticos se presentan algo más ricos en compuestos, siendo el componente principal (-)- β -pineno (36.5 %) además de 4-terpineol (12-13 %), α -terpineol (5.4-8.3 %), espatulenol, cariofileno, cis- β -terpineol y β -linalol.

Por otro lado, el extracto PLE acuoso de romero es el único en el que se consiguieron identificar pequeñas cantidades de dos compuestos pertenecientes al aceite esencial, como son el borneol y α -terpineol. Estos dos compuestos fueron también los únicos identificados de los extractos de agua/etanol. En los extractos etanólicos y de hexano se encuentran como compuestos mayoritarios 1,8-cineol (43.5-53.4 %, respectivamente), alcanfor (19.2-16.2 %, respectivamente), borneol y α -terpineol.

Tabla 10. Caracterización (% área pico) de los extractos SFE (300 bar, 40 °C) de albahaca, mejorana y romero por GC-MS.

t_R	Compuesto	Albahaca		Mejorana		Romero	
		S1	S2	S1	S2	S1	S2
7.77	Canfeno	-	-	-	-	-	0.17
10.52	m-cimeno	-	-	-	-	0.7	0.47
10.85	Cineol	0.56	4.42	0.81	-	56.66	40.26
12.87	cis- β -terpineol	-	0.46	6.49	6.95	-	-
14.65	(-)- β -pineno	-	0.49	36.59	36.38	-	-
14.89	β -linalol	2.98	21.34	2.46	2.06	0.94	1.12
17.25	Alcanfor	-	0.5	-	-	22.19	18.98
18.56	Borneol	-	0.21	-	-	4.27	7.09
19.27	4-terpineol	-	1.14	13.13	12.57	1.17	1.69
20.1	α -terpineol	1.75	2.18	8.35	7.57	5.41	9.99
20.6	Estragol	-	2.87	-	-	-	-
21.1	Verbenona	-	-	-	0.7	-	-
23.82	NI	-	-	14.71	15.35	-	-
24.02	Chavicol	0.63	0.95	-	-	-	-
25.64	Borneol acetato	-	0.57	-	-	0.67	0.67
26.56	Terpineno-4-acetato	-	-	1.46	1.33	-	0.16
30.28	Eugenol	22.78	17.19	-	-	-	0.19
31.41	Copaeno	-	-	-	-	-	0.7
32.01	Acido cinámico metil éster	11.3	7.95	-	-	-	-
33.96	Eugenol metil éter	1.26	0.97	-	-	-	0.27
34.5	Cariofileno	-	0.53	3.79	4.04	5.91	10.22
36.09	α -bergamoteno	5.24	8.81	-	-	-	0.17
37.19	α -cariofileno	0.25	0.45	-	-	0.59	1.23
39.55	Germacreno D	4.78	1.13	-	-	0.31	0.76
42.5	γ -cadineno	6.4	5.01	-	-	0.3	0.97
43.5	δ -cadineno	-	-	-	-	0.51	2.29
48.04	Espatulenol	2.37	1.18	7.39	4.23	-	-
48.42	Oxido de cariofileno	-	-	-	0.96	0.37	-
50.45	Cubenol	3.91	1.72	-	-	-	-
51.25	tau-cadinol	33.27	16.48	-	-	-	-

Los extractos supercríticos presentaron una composición similar, siendo los compuestos más representativos 1,8-cineol (56.6-40.2 % en S1 y S2, respectivamente), alcanfor (22.2-18.9 %), borneol, α -terpineol, cariofileno y 4-terpineol; en menor proporción también se encuentran β -linalol, α -cariofileno, γ -cadineno y δ -cadineno, los cuales se concentran principalmente en el S2. Los resultados de la caracterización del aceite esencial de romero coinciden con los obtenidos en trabajos realizados anteriormente en el grupo de investigación [26].

4.1.2 Fuentes de carotenoides: espinaca y caléndula

La caléndula y la espinaca se seleccionaron principalmente como fuentes de carotenoides. Para la determinación de carotenoides en los extractos de estas plantas se llevó a cabo previamente una saponificación de los mismos con el objetivo de hidrolizar los ésteres de carotenoides que podrían estar contenidos en los extractos y cuantificar con mayor exactitud todos los carotenoides libres.

En todos los extractos se realizó una identificación en cromatografía de líquidos en base a los máximos de absorción de los picos obtenidos en los cromatogramas. Los resultados se presentan en las Tablas 11 (caléndula) y 12 (espinaca).

Tabla 11. Identificación de carotenoides en los extractos supercríticos de caléndula.

t_R	Compuesto	Posible identificación	Máximos de absorción	III/II %
8.62	Carotenoide	Luteoxantina	400, 420, 448	100
9.25	Carotenoide	Isómero luteoxantina	398, 422, 448	110
9.53	Carotenoide	Luteína	423, 446, 473	57
9.96	Carotenoide CIS	Isómero de luteína	330, 420, 442, 468	57
10.52	Carotenoide	Anteraxantina	424, 446, 474	59
11.49	Carotenoide CIS	Isómero de luteína	330, 420, 440, 468	57
11.82	Carotenoide CIS	Isómero zeaxantina	345, 424, 446, 472	27
14.38	Carotenoide	Isómero de luteína	425, 448, 476	59
15.98	Carotenoide	Isómero de Z-luteína	416, 444, 470	40
16.88	Carotenoide CIS	Rubixantina	352, 438, 460, 490	40
17.14	Carotenoide TRANS	Isómero de β -caroteno	282, 440, 460, 488	16
17.59	Carotenoide TRANS	Isómero de α -caroteno	270, 426, 446, 474	52
20.29	Carotenoide	Mutatoxantina	406, 428, 454	54
20.58	Carotenoide	Isómero de α -caroteno	425, 444, 472	56
22.89	Carotenoide TRANS	Isómero de licopeno	288, 440, 462, 492	48
23.15	Carotenoide TRANS	α -caroteno	268, 424, 446, 474	62

Tabla 12. Identificación de carotenoides en los extractos supercríticos de espinaca.

t_R	Compuesto	Posible identificación	Máximos de absorción	III/II %
2.40	Clorofila		410, 506, 538, 609, 667	
6.42	Carotenoide	Isómero de violaxantina	416, 436, 464	66
6.70	Carotenoide TRANS	Isómero de violaxantina	266, 416, 440, 470	63
7.28	Carotenoide	Luteoxantina	398, 421, 450	115
11.53	Carotenoide CIS	Z-luteína	330, 421, 440, 468	58
12.22	Carotenoide CIS	Isómero de Z-luteína	331, 418, 438, 466	40
15.24	Clorofila		464, 600, 650	
16.27	Clorofila		414, 434, 530, 601, 654	
16.74	Clorofila		436, 525, 556, 598, 652	
17.48	Clorofila		436, 524, 560, 597, 652	
17.81	Clorofila		436, 526, 560, 598, 652	
18.08	Clorofila		408, 504, 532, 610, 668	
18.31	Clorofila		408, 504, 532, 610, 668	
18.48	Clorofila		414, 474, 536, 612, 668	
19.72	Clorofila		408, 506, 538, 610, 668	
21.61	Carotenoide	Isómero de β -caroteno	420, 452, 477	44
22.89	Carotenoide TRANS	Isómero de β -caroteno	276, 426, 452, 478	23
22.99	Carotenoide TRANS	β -caroteno	272, 426, 452, 476	15
23.88	Clorofila		412, 444, 474, 532, 610, 668	
24.82	Clorofila		416, 446, 474, 536, 610, 668	
25.20	Carotenoide	Isómero de α -caroteno	424, 446, 474	54
25.67	Carotenoide	Isómero de α -caroteno	423, 446, 474	65

En vista de los resultados de los diferentes análisis cromatográficos, los carotenoides mayoritarios en ambas plantas fueron luteína y β -caroteno, por lo que se realizó una cuantificación en todos los extractos de estos dos compuestos. La Tabla 13 muestra el contenido de estos dos carotenoides en los extractos PLE de caléndula y espinaca mientras que la Tabla 14 los resultados de los extractos SFE.

Tabla 13. Contenido de β -caroteno y luteína (mg/g) determinado en los extractos PLE de caléndula y espinaca.

Disolvente	Caléndula	Espinaca	
	β -caroteno (mg/g)	β -caroteno (mg/g)	Luteína (mg/g)
Agua	--	--	--
Agua/Etanol	--	--	38.21
Etanol	0.22	3.91	14.08
Hexano	0.28	17.19	0.29

Como era de esperar, no se hallaron estos compuestos en los extractos PLE con agua. Los contenidos de luteína en la caléndula no se incluyen en la tabla, ya que estos fueron inferiores al límite de cuantificación. Como se observa, los extractos de espinaca fueron los que contenían la mayor concentración de carotenoides.

Tabla 14. Contenido de β -caroteno y luteína (mg/g) determinado en los extractos SFE de caléndula y espinaca.

Condiciones de extracción	S1		S2	
	β -caroteno	Luteína	β -caroteno	Luteína
Caléndula	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
250 bar - 40°C	0.26	0.05	0.79	0.04
350 bar - 40°C	0.23	0.05	0.37	0.01
250 bar - 70°C	0.14	0.01	0.45	0.06
350 bar - 70°C	0.15	0.05	0.32	0.05
Espinaca				
250 bar - 40°C	10.4	17.3	6.6	0.6
350 bar - 40°C	8.0	20.8	4.8	0.4
250 bar - 70°C	10.4	5.8	5.8	0.4
350 bar - 70°C	17.0	4.9	7.1	0.9

Los mayores contenidos de luteína y β -caroteno se encontraron en los extractos SFE de espinaca. Como se puede observar de forma más clara en la Tabla 14, la mayor parte de la luteína se concentra en el separador 1, indicando que la variación de la presión entre los separadores promueve el fraccionamiento de este compuesto; este hecho se debe a la menor solubilidad de las xantofilas en CO₂ puro debido a la presencia de grupos oxigenados. El β -caroteno se encuentra en mayor concentración también en el separador 1 pero la concentración en el separador 2 no es despreciable, poniendo de manifiesto que con las condiciones de extracción y fraccionamiento utilizadas no hay un fraccionamiento claro y este compuesto se reparte entre los dos separadores.

En general, en los extractos de caléndula se observa una disminución del contenido de carotenoides a medida que se incrementa la temperatura, sin embargo esta tendencia no se observa en los extractos de espinaca. En este sentido, los mejores resultados de extracción de luteína fueron empleando 350 bar y 40 °C y para el β -caroteno de 350 bar y 70 °C.

Igual que en los extractos de las plantas labiadas, se llevó a cabo el análisis por cromatografía de gases de los extractos de espinaca y caléndula, tanto ASE como SFE. En todos los extractos ASE, tanto de caléndula como de espinaca, así como en los extractos de espinaca obtenidos mediante fluidos supercríticos, no se encontró ningún monoterpeneo o sesquiterpeneo en concentración destacable. En los extractos SFE de caléndula se encontraron como compuestos mayoritarios los triterpenos α - y β -amirina, los fitosteroles estigmasterol y γ -sitosterol, así como los compuestos sesquiterpenoides α -cubebene, α -cadinol, tau-muurolol y γ -cadineno. Otros compuestos presentes en menores cantidades fueron β -eudesmol, α -muuroleno y germacreno D. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la bibliografía [184-187].

Las determinaciones del contenido de carotenoides totales se realizaron, tanto para las materias primas originales como para los extractos PLE y SFE de las ambas plantas en las diferentes condiciones de extracción. El análisis de los pétalos de caléndula mostró un contenido en carotenoides totales de 23 mg β -caroteno/100 g materia seca, mientras que en las hojas de espinaca fue de 153 mg β -caroteno/100 g materia seca. La Tabla 15 muestra los contenidos de carotenoides totales en los

extractos SFE; los contenidos de carotenoides totales obtenidos para los extractos PLE no se muestran ya que estos fueron inferiores al límite de cuantificación.

Tabla 15. Carotenoides totales (g β -caroteno/100 g materia seca) en los extractos supercríticos de caléndula y espinaca.

Materia prima		S1	S2
		(g β -caroteno/100 g materia seca)	
Caléndula	250 bar - 40°C	0.12	0.16
	350 bar - 40°C	0.13	0.11
	250 bar - 70°C	0.09	0.14
	350 bar - 70°C	0.12	0.15
Espinaca	250 bar - 40°C	4.28	1.58
	350 bar - 40°C	6.52	1.30
	250 bar - 70°C	3.25	1.45
	350 bar - 70°C	4.15	1.18

Como se había destacado anteriormente en los análisis de los carotenoides individuales, en el caso de la espinaca se ve un claro fraccionamiento de estos compuestos entre los separadores 1 y 2, siendo más concentrado en carotenoides el extracto obtenido en S1. En los extractos de caléndula sin embargo, no se observa esta tendencia de fraccionamiento y no se ven diferencias importantes con la variación de las condiciones de extracción. De forma general, los extractos de espinaca son mucho más ricos en carotenoides que los de caléndula, siendo de 32-50 veces mayores en el separador 1 y de 8-12 veces superior en el separador 2. De

todos ellos, el extracto de espinaca más enriquecido en carotenoides es el que se obtuvo a 350 bar y 40 °C.

Teniendo en cuenta los contenidos de carotenoides totales en el material vegetal y los resultados de la Tabla 15, se observa que la recuperación de carotenoides obtenida en ambas plantas fue del orden del 20-40 % (ver Tabla 16). Además, para ambas variedades, la mayor recuperación de carotenoides se obtuvo a 350 bar y 70°C.

Tabla 16. Recuperación de carotenoides (mg/100 g materia seca) en los extractos SFE de caléndula y espinaca.

Materia Prima	250 bar	350 bar	250 bar	350 bar
	40°C	40°C	70°C	70°C
Caléndula	32.7	25.8	21.1	37.6
Espinaca	24.1	21.9	21.1	32.8

4.1.3 Estudio de la actividad antioxidante de extractos combinados

En este apartado se evaluó la actividad antioxidante de todos los extractos de plantas obtenidos mediante la extracción con fluidos presurizados (PLE y SFE).

La Tabla 17 muestra los resultados para los extractos PLE de albahaca, mejorana y romero. Se observa claramente que la mezcla de etanol/agua es la que dio como resultado los extractos de mayor actividad antioxidante para todas las

plantas, seguido del agua, el etanol y el hexano. Los extractos que presentan una actividad antioxidante mayor fueron los obtenidos a partir de romero utilizando etanol/agua y agua como disolvente de extracción.

Tabla 17. Valores TEAC (mmoltrolox/g extracto) de los extractos obtenidos con PLE.

	Albahaca	Mejorana	Romero
	Media \pm S.D.	Media \pm S.D.	Media \pm S.D.
Hexano	0.272 \pm 0.009	0.203 \pm 0.029	0.649 \pm 0.045
Etanol	0.356 \pm 0.011	0.406 \pm 0.036	0.396 \pm 0.022
Etanol/agua	0.846 \pm 0.056	1.045 \pm 0.055	1.384 \pm 0.098
Agua	0.410 \pm 0.032	0.820 \pm 0.034	1.274 \pm 0.166

La Tabla 18 muestra la actividad antioxidante de los extractos SFE de albahaca, romero y mejorana expresada como valor TEAC. Los extractos más activos, al igual que en la extracción PLE, correspondieron a los obtenidos a partir de romero con valores de actividad antioxidante de 2-5 veces superiores a la albahaca y de 5-13 veces mayores que la mejorana.

Tabla 18. Valores TEAC (mmol trolox/g extracto) de los extractos obtenidos con SFE.

	Albahaca	Mejorana	Romero
	Media \pm S.D.	Media \pm S.D.	Media \pm S.D.
S1 300 bar - 40°C	0.250 \pm 0.018	0.085 \pm 0.011	0.932 \pm 0.040
S2 300 bar - 40°C	0.335 \pm 0.018	0.184 \pm 0.005	0.916 \pm 0.021
S1 300 bar - 70°C	0.195 \pm 0.003	0.103 \pm 0.003	0.971 \pm 0.056
S2 300 bar - 70°C	0.474 \pm 0.022	0.112 \pm 0.004	1.055 \pm 0.033
S1 400 bar - 40°C	0.200 \pm 0.010	0.081 \pm 0.003	1.115 \pm 0.017
S2 400 bar - 40°C	0.363 \pm 0.007	0.088 \pm 0.006	0.981 \pm 0.038
S1 400 bar - 70°C	0.238 \pm 0.016	0.170 \pm 0.006	0.885 \pm 0.044
S2 400 bar - 70°C	0.385 \pm 0.013	0.132 \pm 0.003	1.077 \pm 0.036

Las Figuras 20 (extractos PLE) y 21 (extractos SFE) muestran la correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos totales para los extractos analizados y en función de la planta estudiada. Los extractos PLE de romero y mejorana presentan un alto grado de correlación lineal, mientras que en el caso de la albahaca los resultados son más dispersos (Figura 20). En cuanto a los extractos SFE, se observa también una mejor correlación para los extractos de romero y mejorana, y ligeramente más dispersa en el caso de la albahaca, con coeficiente de regresión de 0.88.

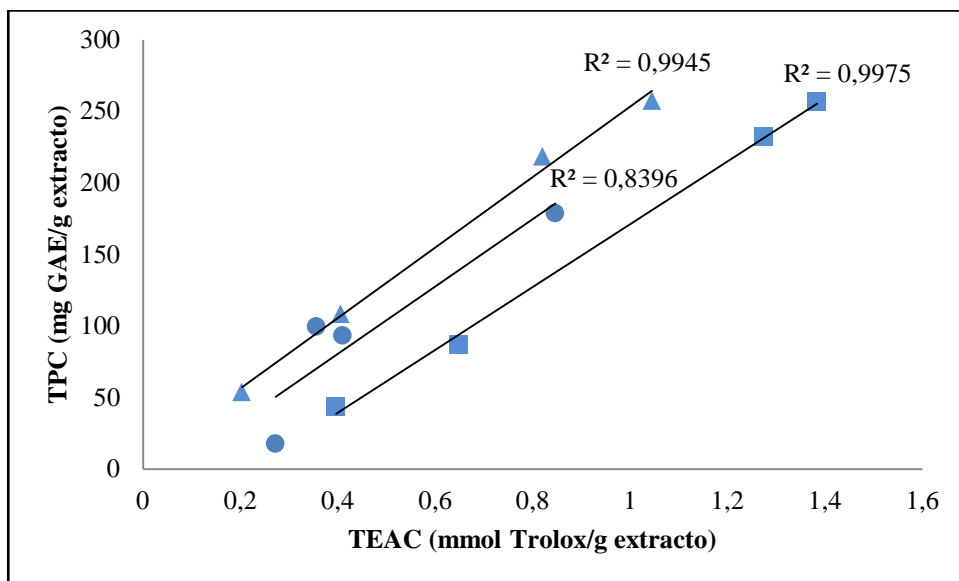


Figura 20. Recta de regresión entre la actividad antioxidante y el contenido en polifenoles de los extractos obtenidos mediante PLE de albahaca (●), mejorana (▲) y romero (■).

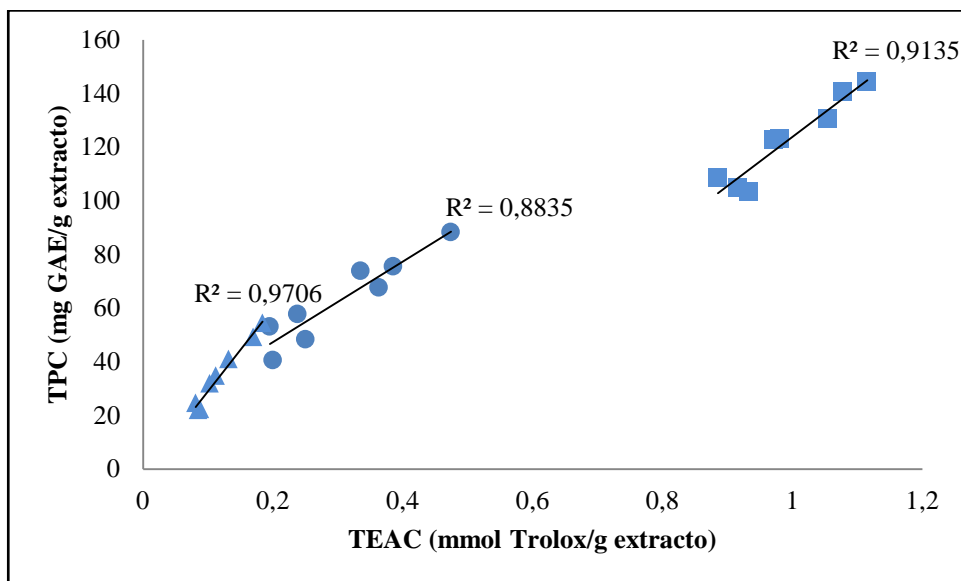


Figura 21. Recta de regresión entre la actividad antioxidante y el contenido en polifenoles de los extractos obtenidos mediante SFE de albahaca (●), mejorana (▲) y romero (■).

Los valores TEAC (mmol trolox/g extracto) obtenidos para los extractos PLE y SFE de caléndula y espinaca se muestran en las Tablas 19 y 20. En general, para el mismo procedimiento de extracción, la actividad antioxidante de estos extractos es menor que la de los correspondientes extractos de las plantas labiadas estudiadas, albahaca, romero y mejorana.

Tabla 19. Valores TEAC (mmol trolox/g extracto) de los extractos de espinaca y caléndula obtenidos con PLE.

	Espinaca	Caléndula
	Media ± S.D.	Media ± S.D.
Hexano	0.186 ± 0.018	0.308 ± 0.013
Etanol	0.314 ± 0.011	0.066 ± 0.009
Etanol/agua	0.369 ± 0.013	0.342 ± 0.017
Agua	0.329 ± 0.013	0.016 ± 0.002

Tabla 20. Valores TEAC (mmol trolox/g extracto) de los extractos de espinaca y caléndula obtenidos con SFE.

	Espinaca	Caléndula
	Media ± S.D.	Media ± S.D.
S1 250 bar - 40°C	0.190 ± 0.008	0.013 ± 0.001
S2 250 bar - 40°C	0.080 ± 0.004	0.022 ± 0.001
S1 250 bar - 70°C	0.132 ± 0.005	0.019 ± 0.001
S2 250 bar - 70°C	0.086 ± 0.003	0.032 ± 0.001
S1 350 bar - 40°C	0.275 ± 0.012	0.014 ± 0.002
S2 350 bar - 40°C	0.080 ± 0.001	0.020 ± 0.000
S1 350 bar - 70°C	0.153 ± 0.004	0.017 ± 0.001
S2 350 bar - 70°C	0.104 ± 0.004	0.063 ± 0.004

Además, se evaluó una posible correlación lineal entre la actividad antioxidante de los extractos SFE obtenidos a partir de caléndula y espinaca y el contenido de carotenoides totales presentes en estos extractos. Se puede observar en la Figura 22 que todos los extractos SFE presentan un alto coeficiente de regresión lineal ($R^2 = 0.9496$). No obstante (resultados no mostrados en la gráfica), esta correlación es menos significativa si se vincula la actividad antioxidante con el contenido de β -caroteno + luteína en los extractos de espinaca ($R^2 = 0.8239$) y prácticamente no existe en el caso de la caléndula ($R^2 = 0.0257$), indicando un importante efecto de otros carotenoides presentes en los extractos de caléndula sobre su actividad antioxidante.

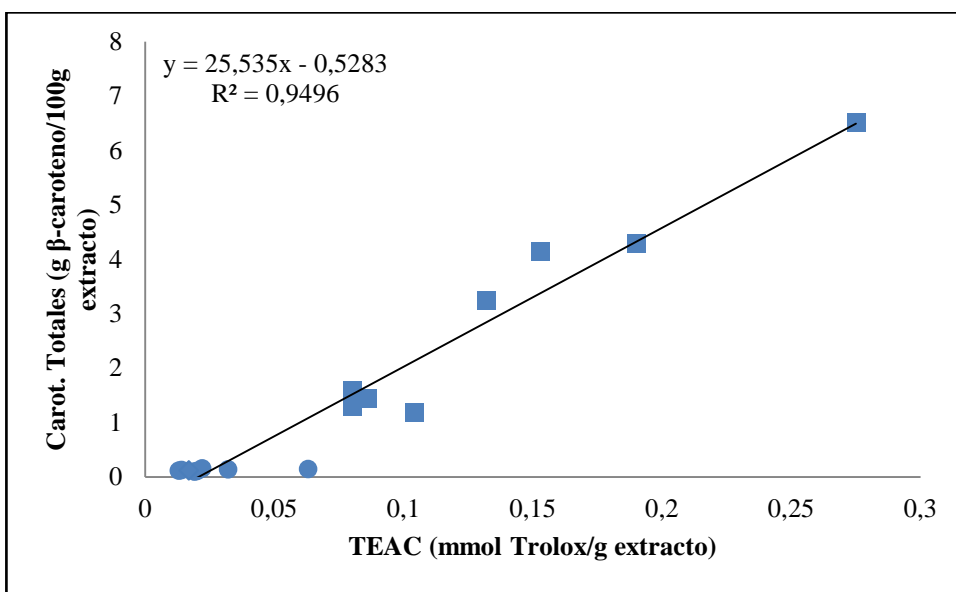


Figura 22. Recta de regresión entre la actividad antioxidante y el contenido en carotenoides totales de los extractos obtenidos mediante SFE de espinaca (■) y caléndula (●).

4.1.3.1 Mezclas de extractos de mejorana y espinaca

La capacidad que tienen algunos compuestos con actividad antioxidante de poder actuar de forma sinérgica entre ellos es ampliamente reconocida, sin embargo, en la bibliografía solo se encuentra un reducido número de estudios que evidencian estas sinergias [289, 290]. Es de destacar el trabajo realizado por Hadad y colaboradores [291] sobre los efectos sinérgicos antiinflamatorios entre el ácido carnósico y combinaciones de diferentes carotenoides, encontrando una evidente sinergia antiinflamatoria entre ambos tipos de compuestos, atribuida principalmente a la capacidad antioxidante de estos compuestos bioactivos.

Con el objetivo de estudiar el posible comportamiento sinérgico de los terpenos fenólicos y los carotenoides, se llevó a cabo un estudio de la actividad antioxidante de dos extractos ricos, respectivamente, en compuestos fenólicos y carotenoides. Se tomaron como muestras para este estudio los extractos PLE de mejorana obtenidos con etanol y hexano y los extractos PLE de espinaca obtenidos con los mismos disolventes. Para evaluar la posible sinergia, se mezclaron estos extractos en diferentes proporciones (25/75, 50/50, 75/25) y se midió la actividad antioxidante de dichas mezclas así como de los extractos puros.

Los resultados, que se exponen en las Tablas 21 y 22, muestran que no se encontró ningún tipo de sinergia en ninguna de las mezclas propuestas, ya que como se puede observar, los valores TEAC determinados experimentalmente no tienen diferencias significativas con los valores teóricos calculados, considerando

una contribución a la actividad antioxidante proporcional a la masa de extracto utilizada en la formulación de la mezcla.

Tabla 21. Actividad antioxidante de las mezclas de los extractos etanólicos de mejorana y espinaca para evaluar la posible sinergia.

Espinaca Etanol (%)	Mejorana Etanol (%)	Valor TEAC real	Valor TEAC teórico
100	0	0.225 ± 0.015	-
75	25	0.286 ± 0.018	0.285
50	50	0.346 ± 0.021	0.335
25	75	0.398 ± 0.025	0.406
0	100	0.466 ± 0.045	-

Tabla 22. Actividad antioxidante de las mezclas de los extractos de hexano de mejorana y espinaca para evaluar la posible sinergia.

Espinaca hexano (%)	Mejorana hexano (%)	Valor TEAC real	Valor TEAC teórico
100	0	0.154 ± 0.004	-
75	25	0.183 ± 0.017	0.170
50	50	0.169 ± 0.004	0.187
25	75	0.217 ± 0.009	0.203
0	100	0.219 ± 0.006	-

Para completar el estudio, se evaluó un posible efecto sinérgico entre los compuestos puros representativos de estos extractos. Para estos ensayos se tomaron como referencia los compuestos fenólicos y carotenoides mayoritarios detectados en el análisis de los extractos, es decir, ácido rosmarínico en el extracto de mejorana y luteína y β -caroteno en el extracto de espinaca. Como se observa en las Tablas 23 y 24, los compuestos puros tampoco mostraron ningún tipo de sinergia entre ellos, siendo los valores teóricos superiores a los experimentales.

Tabla 23. Actividad antioxidante de las mezclas de los compuestos puros ácido rosmarínico y luteína para evaluar la posible sinergia.

Ác. rosmarínico	Luteína	Valor TEAC real	Valor TEAC teórico
(%)	(%)		
100	0	9.962 ± 0.239	-
75	25	7.771 ± 0.394	8.531
50	50	6.000 ± 0.297	7.100
25	75	4.395 ± 0.208	5.669
0	100	4.238 ± 0.250	-

Tabla 24. Actividad antioxidante de las mezclas de los compuestos puros ácido rosmarínico y β -caroteno para evaluar la posible sinergia.

Ác. rosmarínico	β -caroteno	Valor TEAC real	Valor TEAC teórico
(%)	(%)		
100	0	9.477 ± 0.348	-
75	25	7.430 ± 0.133	8.196
50	50	5.569 ± 0.043	6.915
25	75	4.738 ± 0.126	5.634
0	100	4.353 ± 0.154	-

4.1.3.2 Mezclas de extractos de romero y espinaca

El romero es una fuente rica en los diterpenos fenólicos ácido carnósico y carnosol, compuestos reconocidos por su actividad antioxidante. De igual modo, la espinaca tiene un importante contenido en carotenoides, principalmente luteína y β -caroteno, también ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidantes. Teniendo estos antecedentes en cuenta, se planteó el estudio de la actividad antioxidante y las posibles sinergias existentes entre los extractos combinados de romero y espinaca.

Con este objetivo, se llevó a cabo la extracción PLE y SFE para la obtención de extractos ricos en los compuestos bioactivos mencionados, a partir de romero, espinaca y una mezcla (1:1) de las plantas para la determinación y comparación de la actividad antioxidante de los extractos de cada una de plantas, de la extracción conjunta de ambas plantas y de la mezcla 50:50 de los extractos puros.

La extracción conjunta de plantas distintas es interesante desde el punto de vista de innovación en los procesos de producción y en los productos, así como por las posibles sinergias entre los compuestos presentes en las materias primas, que podrían dar lugar a un producto con características diferentes y una mayor actividad.

Para las extracciones PLE se empleó hexano como disolvente de extracción, por ser este un disolvente adecuado para la extracción de ambos tipos de compuestos, diterpenos fenólicos y carotenoides, y se evaluaron dos temperaturas (100 y 150 °C). En las extracciones SFE se ensayaron dos presiones de extracción diferentes (200 y 300 bar) a 40 °C, con un caudal de CO₂ de 60 g/min, y siendo el tiempo de extracción 5 h sin fraccionamiento del extracto. Los productos se analizaron mediante HPLC, cuantificando el contenido de ácido carnósico, carnosol, luteína y β-caroteno. La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo ABTS.

Los resultados de extracción muestran una correlación lineal entre la materia vegetal utilizada (es decir, romero (R), espinaca (E) y romero:espinaca 50:50 (RE)) y el rendimiento de extracción, independientemente del método o condiciones empleadas. Los análisis de actividad antioxidante mostraron que, en todos los casos, los extractos de romero presentan una actividad antioxidante mayor que los de espinaca. Además, el valor TEAC de la mezcla al 50% de los extractos individuales (R+E), resultaron no tener diferencias significativas respecto de los valores TEAC teóricos (medios) calculados. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre la actividad antioxidante de la mezcla R+E y de los

productos de la extracción conjunta RE, resultando los valores TEAC de RE hasta una 20 % mayor que los de R+E.

El estudio de la composición química de los extractos RE y R+E demostró que la concentración de β -caroteno y luteína disminuyen en los extractos conjuntos, mientras que se observa un incremento de la concentración de ácido carnósico. Por otro lado, no se observaron sinergias entre los principales componentes presentes en el romero (ácido carnósico y carnosol) y los carotenoides de la espinaca (β -caroteno y luteína). Así, la mayor actividad antioxidante de los extractos RE, obtenidos a partir de la extracción conjunta de romero y espinaca, podría deberse al incremento en la concentración de ácido carnósico, y no a efectos sinérgicos entre diterpenos fenólicos y carotenoides.

Los resultados de este estudio dieron lugar al artículo “*Simultaneous extraction of rosemary and spinach leaves and its effect on the antioxidant activity of products*”, publicado en la revista *The Journal of Supercritical Fluids* (2013. 82, 138–145).

SIMULTANEOUS EXTRACTION OF ROSEMARY AND SPINACH LEAVES AND ITS EFFECT ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PRODUCTS

Erika Vázquez, Mónica R. García-Risco, Laura Jaime, Guillermo Reglero and Tiziana Fornari

The Journal of Supercritical Fluids. 2013. 82, 138–145

Abstract

Mixed vegetal extracts are interesting target of new products as nutraceuticals, superior ingredients for the design of functional food, singular ingredients for cosmetics, etc. In this work the extraction of a mixture of spinach and rosemary leaves (50 % weight of each plant) was investigated in terms of its antioxidant activity, and compared with the extraction of the separate species. Phenolic diterpenes of rosemary and carotenoids of spinach were target compounds due their recognized biological activities. Two different extraction techniques were applied, namely pressurized liquid extraction using hexane at two different temperatures (100 and 150°C) and supercritical fluid extraction with pure carbon dioxide at 40°C and two different pressures (20 and 30 MPa). For each extraction technique and conditions three different raw materials were employed: spinach leaves, rosemary leaves and the mixture 50:50 of spinach and rosemary leaves.

The antioxidant activity of the samples produced were evaluated with the ABTS assay and showed to be enhanced when the species are simultaneously extracted, with antioxidant values around 20% higher than the values corresponding to mixing the extracts obtained by separate. A possible synergic effect between carotenoids and phenolic diterpenes was studied, although no specific synergic activity could be observed. However, the enhanced antioxidant activity could be attributed to a definite increase of the concentration of carnosic acid, which was observed in the samples produced by the simultaneous extraction.

Keywords: Supercritical fluid extraction; Pressurized liquid extraction; Antioxidants; Phenolic diterpenes; Carotenoids; Spinach; Rosemary.

1. Introduction

Antioxidants play a very important role in the food, cosmetic and pharmacy industries [1]. Both phenolic compounds and carotenoids have been identified as important antioxidant compounds present in natural matter. Furthermore, it has been reported that some antioxidants may act synergistically, thus being much more effective response against oxidation. The most studied synergism between antioxidants is between β -carotene and vitamins C and E [2-5].

Numerous plants and herbs have been recognized as a source of natural antioxidants. Among them, rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is one of the *Lamiaceae* plants with large antioxidant activity. The substances related with its antioxidant activity are phenolic diterpenes such as carnosol, rosmanol, carnosic acid, methyl carnosate, and phenolic acids such as rosmarinic and caffeic acids.

Particularly, carnosic acid and carnosol are the most abundant antioxidants present in rosemary extracts [6-10].

On the other side, spinach (*Spinacia oleracea*) is an edible flowering plant (*Amaranthaceae* family) native to central and southwestern of Asia, now cultivated all over the world, which is renowned for its high content of carotenoids. Numerous studies about its anti-carcinogenic, antimicrobial and antioxidant activity of spinach have been reported in recent years [11-13]. Besides carotenoids (mainly lutein and β -carotene) [14], other bioactive substances identified in spinach are phenolic compounds, such as flavonoids and phenolic acids (p-cumaric, gallic and ferulic acids) [12, 15] and fatty acid derivative compounds, such as glycoylglycerol lipids [16] and lipoic acid [17].

The extraction of antioxidants from plant matrix could be accomplished by different techniques. Solid-liquid extraction is a traditional and much utilized technology in which varying the solvent the recovery of target molecules could be attained. For example, carotenes are readily extracted using non-polar solvents (hexane, pentane, and petroleum ether) or moderate polar solvents (dichloromethane); phenolic compounds are usually extracted using water [12] and glycoylglycerol lipids using ethanol or methanol [16]. As it is well-known, one of the main drawbacks of solid-liquid extraction is the large consumption of organic solvents. In this respect, pressurized liquid extraction (PLE) and supercritical fluid extraction (SFE) are intensively investigated as more efficient extraction technologies.

Several works were reported about the extraction of carotenoids of spinach using conventional solid-liquid extraction with different solvents. For example, Bunea et al. [14] determined the content of carotenoids in fresh, stored and processed spinach by using a solvent mixture comprised by methanol, ethyl acetate and petroleum ether, Pellegrini et al. [18] extracted carotenoids of fresh spinach with acetone, and Simonovska et al. [19] quantified lutein in spinach extracts obtained using water and triethylammonium acetate. However, there is no bibliographic information, according to our knowledge, about the extraction of carotenoids of spinach by SFE or PLE. The latter has been used to extract flavonoids from spinach but no carotenoids were investigated [15] although this technique is readily used to extract these compounds from other vegetal matrix, such as algae or carrot by-products [20-23]. Moreover, there are very few studies focusing on to determine the antioxidant activity of extracts rich in spinach carotenoids.

With respect to the extraction of the phenolic diterpenes of rosemary many publications could be cited. The reader is referred to the works of García-Risco et al. [24], Fornari et al. [25], Herrero et al. [26, 27] or Hossain et al. [28] in which the most important contributions regarding the SFE or PLE of rosemary are discussed.

Mixed vegetal extracts are of high interest as target of new products due to the synergic effects among certain phytochemicals that could produce a much more active response. In this respect, the simultaneous extraction of a mixture of the different vegetal species is of high interest from a processing point of view, since manufacture costs may be considerable reduced. Thus, the product obtained from

the extraction of the mixture of species should be of similar (or better) quality than the product obtained by mixing the separate extracts.

In this work, the PLE and SFE of a mixture of spinach and rosemary leaves (50 % weight of each plant) was investigated and compared with the extraction of the separate species, with the target of assess the effect on the antioxidant quality of the products obtained. To our knowledge, this is the first time that the simultaneous extraction of spinach and rosemary leaves is studied. Carotenoids and phenolic diterpenes, due to their lipid affinity, can be readily extracted using non-polar paraffinic solvents, such as pentane, hexane or heptane fractions, so as CO₂, which at 12 MPa and 320 K has a density, and thus solvent power, similar to that of liquid pentane (626 kg/m³) [29]. Thus, hexane was employed in PLE assays and pure supercritical CO₂ in the SFE experiments.

The extraction yield and recovery of selected antioxidant substances, namely β -carotene and lutein in spinach, and carnosic acid and carnosol in rosemary, were studied in terms of the composition of the plant matter employed as raw material. Additionally, the antioxidant activity of the different extracts was evaluated in order to determine potential synergic effects among these main antioxidants present in these vegetal species.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Carnosic acid (≥ 96 %) and Carnosol were purchased from Alexis Biochemical (Madrid, Spain). β -carotene (95 %), ABTS [2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] and potassium persulfate were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Lutein (≥ 95 %) was purchased from Extrasynthese (Genay Cedex, France). Ethanol and phosphoric acid (85 %) were HPLC grade from Panreac. Acetonitrile, methanol and methyl-tert-butyl ether were HPLC grade from Lab Scan (Gliwice, Poland). Triethylamine was purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). CO₂ (N38) was supplied from Air Liquid. Washed sea sand (particle size 0.25-0.30 mm) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2 Preparation of samples

Plant material consisted of dried leaves obtained from an herbalist's producer (Murcia, Spain). Water content in the spinach and rosemary samples was, respectively, 4.9 % weight and 8.3 % weight. The samples were ground in a cooled mill and were sieving to the appropriate size (between 200 and 600 μm). Thus, similar particle size was obtained for each batch of plant matrix. The 50:50 mixture of spinach and rosemary was obtained by homogenization of same amounts of ground rosemary and spinach.

2.3 Extraction methods

Pressurized liquid extraction (PLE): extractions with liquid hexane were carried out in an ASE 350 system from Dionex Corporation (Sunnyvale, CA, USA)

equipped with a solvent controller unit. Hexane was selected as PLE solvent due to the good solubility that carotenoids and carnosic acid exhibit in this solvent.

Each extraction cell (10 ml capacity) was filled with 1 g of solid sample and 1 g of sea sand as a sandwich, and then placed into an oven. Then, the cell was filled with hexane up to a pressure of 1500 psi (which ensures the liquid state of the solvent at both temperatures studied) and was heated-up to the desired temperature. Static extractions were performed at 100 and 150°C during 10 minutes. After extraction the cell was washed with the solvent and subsequently the solvent was purged from cell using N₂ gas until complete depressurization was accomplished. The extracts were recovered in glass vials and the solvent was eliminated by evaporation under vacuum and then dried in a stream of N₂. All experiments were carried out by duplicate. The dried samples obtained were stored at 4 °C in the dark until analysis.

Supercritical fluid extraction (SFE): trials were carried out in a pilot-plant scale supercritical fluid extractor (Thar Technology, Pittsburgh, PA, USA, model SF2000) comprising a 2 L cylinder extraction cell with automatic control of temperature and pressure. A detail explanation of the experimental device can be found elsewhere [30].

For each experiment, the cell was filled, respectively, with 0.42 kg of spinach leaves, 0.50 kg of rosemary leaves and 0.46 kg of the mixture 50:50 spinach + rosemary, which correspond to the mean values of the amounts employed for spinach and rosemary. The extractions were performed at 40°C and two different

pressures (20 and 30 MPa) were employed. No cosolvent was employed since both carotenoids and phenolic diterpenes can be satisfactorily extracted using pure CO₂. The extraction time was 5 h, no fractionation of the extract was performed and the supercritical solvent (CO₂) flow rate was set to 60 g/min in all experiments. Extraction conditions were selected on the basis of previous works [24, 30] related with SFE of rosemary. Considering the different amount of raw material loaded to the extraction cell, the CO₂/plant ratio were respectively 43, 39 to 36 kg/kg for spinach, rosemary and the spinach + rosemary mixture.

Ethanol was used to wash out the collector vessel and ensure a complete recovery of the material precipitated in the cell. Ethanol was eliminated by evaporation and the homogeneous solid samples obtained were kept at 4°C in the dark until analysis. All experiments were carried out by duplicate.

2.4 HPLC analysis

Quantification of carnosic acid and carnosol: samples were analyzed employing a HPLC (Varian Pro-star) equipped with a MICROSORB-MV-100 C18 column (Varian) of 250 mm × 4.6 mm and 5 μm particle size. The analyses were carried out at ambient temperature (20°C). The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and 0.1 % (v/v) of phosphoric acid in water (solvent B) applying the following gradient: 0–8 min, 23 % A and 8–25 min, 77 % A. This last composition was kept for 15 minutes and initial conditions were gained in 5 min. Total time analysis was 45 minutes. The flow rate was constant at 0.7 mL/min. Injection volume was 20 μL and the detection was accomplished by using a diode

array detection system Varian storing the signal at a wavelength of 230 and 280 nm.

Quantification of β -carotene and lutein: samples were analyzed employing a HPLC model Agilent 1260 Infinity (Agilent, Santa Clara, USA) equipped with a KROMASIL 100 C18 column (Scharlab, Barcelona, Spain) of 25 mm \times 4.6 mm and 3.5 μ m particle size. The mobile phase is constituted by solvent A, MeOH:H₂O (90:10) and solvent B, MTBE:MeOH:H₂O (90:6:4). 0.1 % (v/v) of triethylamine was added to both solvents. The gradient started with 93 % A to 0 % A from 0 to 34 min and recovers the initial conditions of the method in 4 min. Total time analysis was 38 minutes. During analysis the column was maintained at 25°C. The flow rate was constant at 1 mL/min and the injection volume was 20 μ L. For detection were assigned the wavelength of 450, 470, 550, 660 nm.

2.5 Determination of antioxidant activity

ABTS^{•+} assay. The ABTS^{•+} assay described by Re et al. [31] was used to measure the antioxidant activity of the extracts. Briefly, ABTS^{•+} radical cation was generated by reacting 7 mmol/l ABTS with 2.45 mmol/l potassium persulfate after incubation at room temperature for 16 h in the dark. The ABTS^{•+} radical solution was diluted with ethanol to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. 10 μ l of each extract (previously dissolved) at four different concentrations was added to 0.990 ml of diluted ABTS^{•+} radical solution. The reaction was allowed to stand until the absorbance reached a plateau, and the absorbance was recorded at 734 nm. Trolox was used as reference standard, and results were expressed as TEAC (Trolox

Equivalent Antioxidant Capacity) values (mmol Trolox/g extract). All analyses were done in triplicate.

Synergy assays. Synergy assays were done between carotenoids (β -carotene and lutein) and phenolic compounds (carnosic acid and carnosol) at three different levels. Results were compared with the estimated values calculated to each mixture. Moreover, this synergy assay was also carried out with a mixture of spinach and rosemary extracts.

3. Results and discussion

3.1 Extraction yield

The extraction techniques and conditions investigated are summarized in Table 1. For experiments 1 to 4 of Table 1, the raw materials extracted were (i) spinach leaves, (ii) rosemary leaves and (iii) the mixture comprising 50:50 weight spinach and rosemary leaves.

The extraction yields obtained in the different extractions are given in Table 2 and represented in Figure 1: S denotes spinach leaves (0% rosemary), SR the mixture 50% spinach and 50% rosemary, and R represents 100% rosemary leaves.

While the objective of the present work is the comparison of the simultaneous extraction of spinach + rosemary leaves with the extraction of the isolated species, some conclusions could be derived by comparison of PLE with SFE. As can be observed in Table 2, extraction yields were higher in PLE than in SFE for all

vegetal matter extracted. Furthermore, the temperature increase in PLE from 100°C to 150°C produces a significant increase in yield because higher temperature promotes higher analyte solubility, decreases the viscosity and surface tension of solvents, thus improving extraction rate. On the other hand, increasing the extraction pressure from 20 to 30 MPa in SFE produce a minor increase of extraction yield.

The comparison of the yields obtained (both PLE and SFE assays) in the simultaneous extraction of spinach + rosemary leaves with the yield obtained when extracting the isolated species is depicted in Figure 1. A mixture 50:50 weight of each plant was selected since it is probable that the higher deviations from the mean (linear) behavior should be produced for this mixture.

Table 1. Methods and conditions employed in the extraction of spinach, rosemary and mixed spinach/rosemary (50:50) leaves.

Extraction number	Extraction method	Solvent	T (°C)	P (MPa)	Extraction time	solvent / raw material ratio (kg/kg)
1	ASE	hexane	100	10	10 min	18
2	ASE	hexane	150	10	10 min	18
3	SFE	CO ₂	40	20	5 h	36-43
4	SFE	CO ₂	40	30	5 h	36-43

Table 2. Yields obtained (%) in extractions 1 to 4 of Table 1. S: spinach leaves; SR: spinach/rosemary (50:50) leaves; R: rosemary leaves.

Extraction number	Plant matrix		
	S	SR	R
1	4.26 ± 0.33	6.65 ± 0.62	9.87 ± 0.46
2	7.16 ± 0.27	10.91 ± 0.31	15.63 ± 0.62
3	1.75 ± 0.16	2.66 ± 0.11	3.14 ± 0.36
4	1.82 ± 0.16	2.76 ± 0.35	4.45 ± 0.86

As can be observed in Figure 1, for both extraction methods applied and for all conditions employed, a linear correlation between the composition of the raw material and the extraction yield was obtained. Lineal regression coefficients (R^2) were higher than 0.97 in all cases and thus, it can be stated that the influence of extracting mixed species on extraction yield is not noteworthy. That is, the extraction yields obtained experimentally when processing the mixed leaves (Y_{SR}^{exp}) are very close to the yields calculated as the mean values of the yields obtained in the extraction of the separate plants ($Y_{SR}^{cal} = (Y_S^{exp} + Y_R^{exp}) / 2$).

Figure 2 shows the Y_{SR}^{exp} and Y_{SR}^{cal} values together with the corresponding (experimental and calculated) standard deviations; for all type of extractions and solvents differences between both values are not significant. Then, despite the extraction procedure or conditions applied, the results obtained suggest that yield is

not significantly enhanced or reduced when the mixture spinach/rosemary is extracted in comparison with processing the separate species.

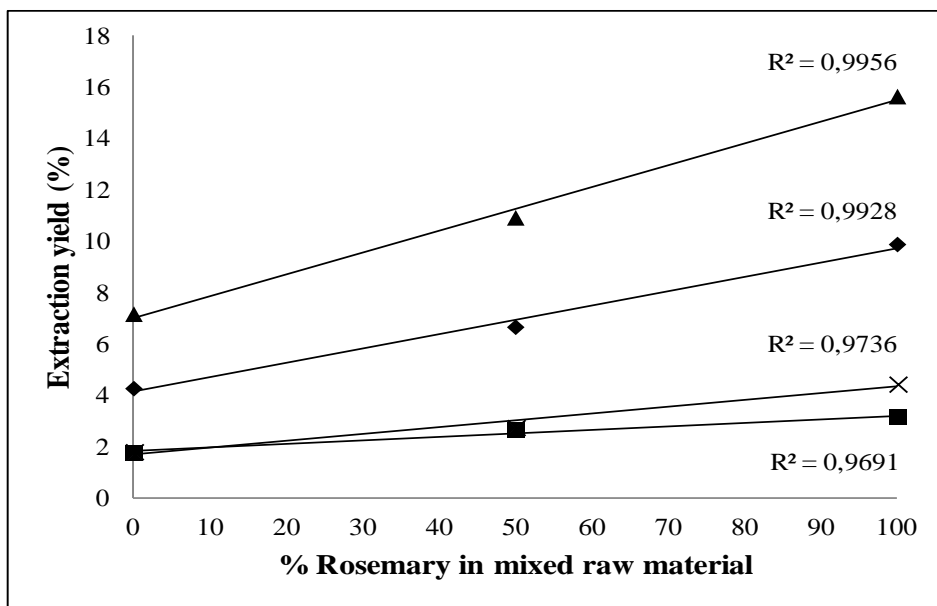


Figure 1. Extraction yield as a function of the percentage of rosemary leaves present in plant raw material: (◆) Hexane ASE at 100°C (Ext. 1); (▲) Hexane ASE at 150°C (Ext. 2); (■) CO₂ SFE at 20 MPa (Ext. 3); (X) CO₂ SFE at 30 MPa (Ext. 4).

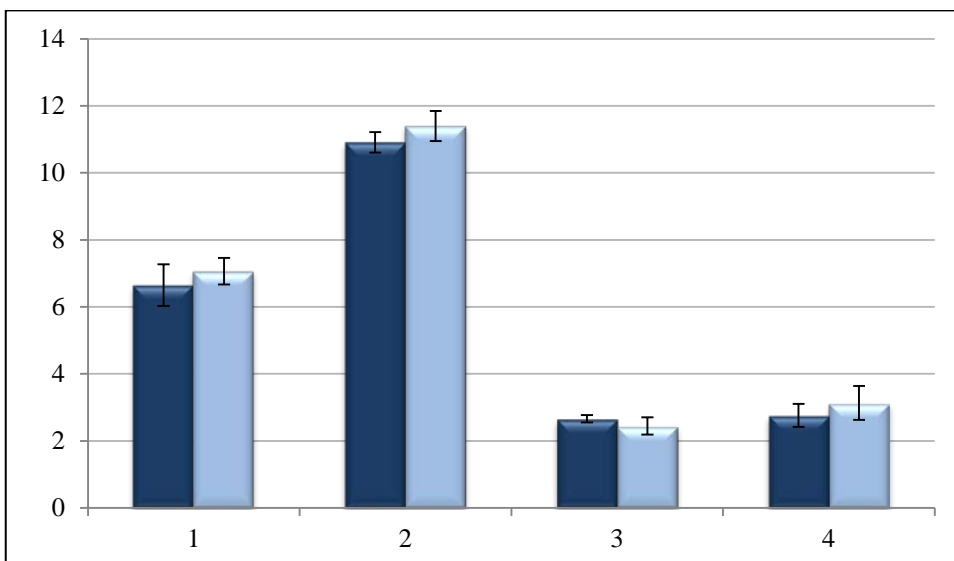


Figure 2. Extraction of spinach/rosemary leaves mixture (50 weight % of each plant): comparison between (■) experimental yields Y_{SR}^{exp} and (□) yields calculated as the mean values of the yields obtained in the extraction of the separate plant $Y_{SR}^{cal} = (Y_S^{exp} + Y_R^{exp}) / 2$. 1 and 2: PLE; 3 and 4: SFE.

3.2 Antioxidant activity and chemical analysis of samples

The antioxidant activity of the samples obtained by extraction of the mixture of species (SR) was compared with the antioxidant activity of the pure extracts (S and R) and their mixture (S+R).

As can be observed in Table 3 for extractions 1 and 4 of Table 1, rosemary extracts (R) are much more active than spinach extracts (S). Chohan et al. [32] and

Tawaha et al. [33] studies showed lower TEAC values for conventional aqueous and methanol rosemary extracts that could be explain for the higher extraction of potent antioxidant components such as carnosic acid or carnosol with SFE or PLE with non-polar solvents. Regarding to spinach activity not many studies have been focused on the study of the antioxidant capacity of lipophilic extracts. In this respect, Isabelle et al. [34] reported similar results using ORAC assay in hexane extracts, whereas Pellegrini et al. [18] observed higher TEAC values in acetone extracts, together with higher carotenoid content, in acetone extracts. Additionally, the sample denoted as S+R in Table 3, which was obtained by mixing equal amounts of S and R, presents TEAC values very close to the corresponding calculated mean value (differences lower than 2.3%). Nevertheless, the product indicated as SR in Table 3, which was obtained by the simultaneous extraction of spinach and rosemary leaves (50:50), resulted in noteworthy higher antioxidant activity. That is, the TEAC values of SR samples are around 20% higher than the TEAC values of the S+R samples. This effect could be attributed to small modifications in the composition of the extracts, due to the presence of both raw materials in the extraction cell, or even to synergistic effect between the antioxidant substances present in spinach and rosemary. In this regard, Hait-Dashan et al. [5] reported a synergistic activity between a spinach extract rich in aromatic polyphenols [32] and some phenolic compounds such as ferulic acid, caffeic acid and epigallocatechin-3-gallate. In order to elucidate whether small increase of certain components or synergistic effect between them explain the higher TEAC values of SR in comparison to S+R mixture, chemical characterization of the extracts was done, the main antioxidant substances in the extracts were identify and the potential synergistic effect between them was investigated using standards.

Table 3. TEAC values of the samples obtained by extraction of spinach leaves (S), rosemary leaves (R), the mixture of species (SR) and by mixing the pure extracts (S+R).

	Experimental value*	Calculated mean value
	(mmol Trolox/g)	(mmol Trolox/g)
PLE, hexane, 100°C (Ext. 1 in Table 1)		
S	0.229 ± 0.005	
R	0.721 ± 0.018	
SR	0.565 ± 0.004	
S+R	0.475 ± 0.008	0.475
SFE, 30 MPa, 40°C (Ext. 4 in Table 1)		
S	0.109 ± 0.001	
R	0.578 ± 0.009	
SR	0.420 ± 0.006	
S+R	0.352 ± 0.002	0.344

*Mean ± Standard Deviation.

The concentrations (mg compound / g extract) of phenolic diterpenes (carnosic acid and carnosol) and carotenoids (β -carotene and lutein) were determined for all extracts obtained and are reported in Table 4. Figure 3 shows an example of chromatograms obtained for SFE extracts obtained by processing only spinach leaves, only rosemary leaves and the mixture 50:50 spinach + rosemary leaves. As expected, carnosic acid and carnosol were not detected to be present in spinach extracts and only very low concentrations of carotenoids were determined in rosemary extracts. Furthermore, taking into account the low polarity of solvents

employed, no phenolic acids, such as rosmarinic acid in rosemary or ferulic acid in spinach, were detected in the samples.

The higher concentrations of carnosic acid were obtained using hexane as solvent (R and SR extracts) and carnosol was found in very low concentrations in all samples studied. About the quantification of carotenoids, significant higher concentrations of β -carotene were obtained in the SFE extracts and, according to the higher polarity of lutein in comparison with β -carotene, higher CO_2 density were required to obtain significant concentration of lutein in the SFE extracts (Extraction 4). Nevertheless, in fact higher amounts of β -carotene were extracted using PLE than SFE from spinach leaves in both experiments, although lower contents were detected in PLE extracts due to their higher extraction yields (32.0, 32.7, 19.9 and 24.2 mg/ 100 of dry spinach leaves, corresponding to 1 to 4 experiments). In this way, β -carotene contents of PLE extracts are in agreement with literature data about β -carotene content of spinach leaves [14, 18], whereas lower amounts of lutein were obtained in all the extracts presented in this study. This result could be due to by the fact that more polar solvents, i.e. acetone, is commonly used for total carotenoid determination, and therefore hexane or supercritical CO_2 only produced a partial extraction of lutein.

Figure 3. Chromatograms of SFE extracts obtained by processing (a) only rosemary leaves, (b) only spinach leaves and (c) the mixture 50:50 spinach + rosemary.

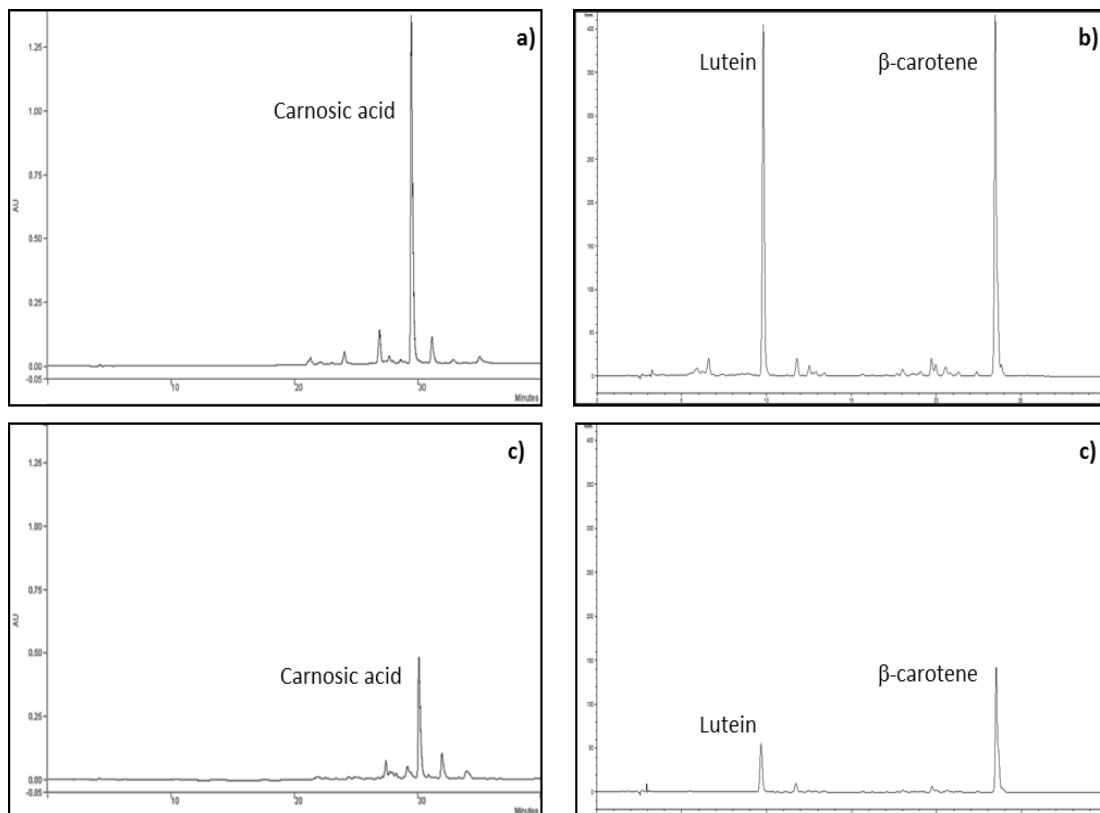


Table 4. Composition (mg of compound / g of extract) of antioxidant compounds identified in the extracts obtained from experiments 1 to 4 of Table 1. S: spinach leaves; SR: spinach/rosemary (50:50) leaves; R: rosemary leaves. EXP: experimental value; MV: calculated mean value.

Extraction number	Plant matrix	Phenolic compounds ^a				Carotenoids ^b			
		Carnosic acid		Carnosol		βcarotene		Lutein	
		Exp.	MV	Exp.	MV	Exp.	MV	Exp.	MV
1	S	n.i.		n.i.		7.52		1.49	
	SR	101.13	80.75	3.93	6.82	1.47	3.88	1.01	0.75
	R	161.49		13.64		0.23		n.i.	
2	S	n.i.		n.i.		4.57		0.88	
	SR	58.13	52.10	1.81	4.81	0.97	2.37	0.64	0.45
	R	104.20		9.62		0.17		0.01	
3	S	n.i.		n.i.		11.38		0.58	
	SR	30.19	26.44	n.i.		4.10	6.01	n.i.	0.29
	R	52.88		n.i.		0.64		n.i.	
4	S	n.i.		n.i.		13.28		4.70	
	SR	54.34	47.42	0.00	3.41	5.08	7.10	0.53	2.35
	R	94.84		6.81		0.92		n.i.	

n.i.: non-identified

^a Mean standard deviations for carnosic acid and carnosol quantification were, respectively, 6.04 and 0.97.

^b Mean standard deviations for β-carotene and lutein quantification were, respectively, 0.22 and 0.03.

Table 4 also reports the expected concentration of antioxidant compounds in SR extracts, calculated as the mean value of the concentrations obtained in the extraction of the separate plants (S and R samples). In the case of β -carotene, it can be clearly stated that its extraction is reduced when the mixed raw material is processed, with experimental concentrations around 1.5 times lower in the SFE extracts, and ca. 2.5 times lower in the hexane PLE extracts. Figure 4 shows a comparison of the experimental β -carotene concentrations obtained in SR extracts and the corresponding mean values. Also represented in the figure are the standard deviations obtained, which indicate that differences are significant and thus, it could be accepted the observed decrease of β -carotene extraction in SR samples. In general, this behavior was also observed for lutein, particularly in the case of the SFE extractions.

On the contrary, according to the results given in Table 4 for carnosic acid, it could be argued that the extraction of carnosic acid is enhanced when the mixed material is processed (see Figure 5).

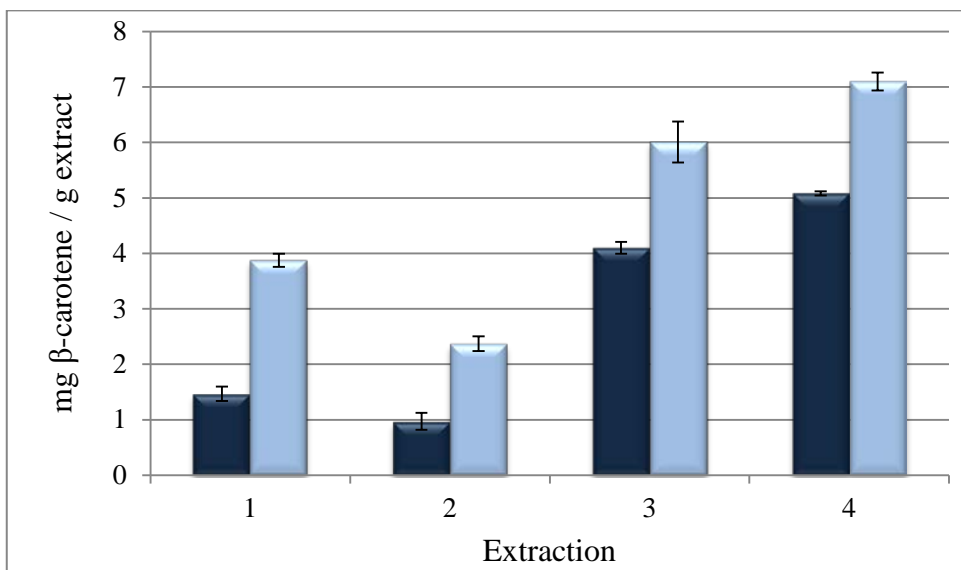


Figure 4. Spinach/rosemary leaves mixture (50 weight % of each plant): comparison between (■) experimental β -carotene concentrations and (□) values calculated as the mean values of the concentrations obtained in the extraction of the separate plants. 1 and 2: PLE; 3 and 4: SFE.

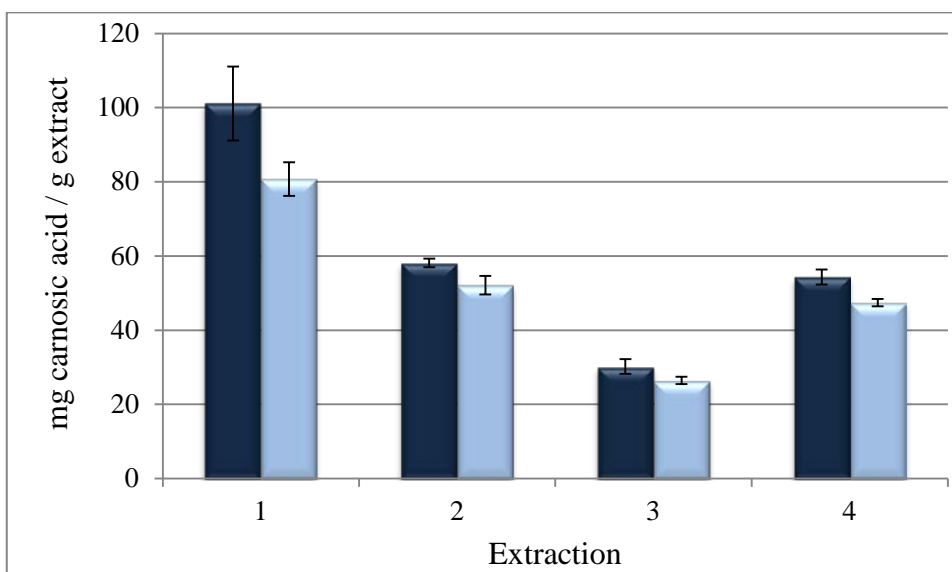


Figure 5. Spinach/rosemary leaves mixture (50 weight % of each plant): comparison between (■) experimental carnosic acid concentrations and (□) values calculated as the mean values of the concentrations obtained in the extraction of the separate plants. 1 and 2: PLE; 3 and 4: SFE.

Among target compounds studied, β -carotene and lutein were the main carotenoids identified in spinach extracts, and carnosic acid and carnosol were the main phenolic diterpenes quantified in rosemary extracts. Thus, synergistic assays between β -carotene or lutein and carnosic acid or carnosol were carry out. The TEAC values obtained for the mixtures of carnosic acid + β -carotene or lutein are given in Table 5 and those corresponding to carnosol + β -carotene or lutein mixtures are reported in Table 6. According to the TEAC values obtained the order of antioxidant capacity of the standards is as follows: carnosic acid > β -carotene >

carnosol \approx lutein. As can be observed in these tables, for all phenolic compound + carotenoid mixtures studied no synergic enhancement of the antioxidant activity was observed when comparing the experimental TEAC value of the mixture with the corresponding calculated mean (linear) TEAC value. On the contrary, it was obtained a general decrease of the TEAC value of the phenolic compound + carotenoid mixture with respect to the corresponding mean theoretical value in certain cases.

As an example, Figure 6 shows the comparison between (a) the variation of TEAC values in carnosic acid + β -carotene mixtures and (b) the TEAC values obtained in the samples produced by extracting spinach, rosemary and a mixture 50:50 of spinach and rosemary leaves (SR) (Extractions 1 and 4 in Table 1). As can be observed in Figure 6, the mixtures of carnosic acid + β -carotene show similar TEAC values than the expected mean values, moreover, TEAC values of S+R showed a similar behavior, whereas the antioxidant activity of SR was significant enhanced in comparison with the expected mean value. Therefore, taking into account the analysis of the composition of the extracts given in Table 6, it could be stated that the observed increase of the antioxidant activity of the SR extracts could be a consequence of an enhancement of the extraction of carnosic acid, produced when both raw materials (spinach and rosemary) are simultaneously extracted, and synergistic effects between carotenoids from spinach and phenolic diterpenes from rosemary could be discarded.

Table 5. TEAC values of carnosic acid, β -carotene, lutein and their mixtures.(a) Carnosic acid + β -carotene

Carnosic acid (%)	β -carotene (%)	TEAC value (mmol Trolox/g)	
		Experimental value*	Calculated mean value
100	0	5.548 \pm 0.076	-
63	37	5.057 \pm 0.192	5.079
36	64	4.710 \pm 0.101	4.737
15	85	4.513 \pm 0.061	4.479
0	100	4.296 \pm 0.104	-

(b) Carnosic acid + lutein

Carnosic acid (%)	Lutein (%)	TEAC value (mmol Trolox/g)	
		Experimental value*	Calculated mean value
100	0	5.722 \pm 0.154	-
57	43	4.821 \pm 0.463	4.911
30	70	4.144 \pm 0.142	4.423
13	87	4.049 \pm 0.060	4.093
0	100	3.859 \pm 0.084	-

*Mean \pm Standard Deviation.

Table 6. TEAC values of carnosol, β -carotene, lutein and their mixtures.(a) Carnosol + β -carotene

Carnosol (%)	β -carotene (%)	TEAC value	
		(mmol Trolox/g)	
		Experimental value*	Calculated mean value
100	0	3.724 \pm 0.058	-
75	25	3.542 \pm 0.093	3.862
50	50	3.837 \pm 0.116	4.000
25	75	3.860 \pm 0.137	4.138
0	100	4.276 \pm 0.044	-

(b) Carnosol + lutein

Carnosol (%)	Lutein (%)	TEAC value	
		(mmol Trolox/g)	
		Experimental value*	Calculated mean value
100	0	3.884 \pm 0.071	-
69	31	3.770 \pm 0.182	3.807
43	57	3.589 \pm 0.058	3.741
20	80	3.676 \pm 0.299	3.683
0	100	3.633 \pm 0.040	-

*Mean \pm Standard Deviation.

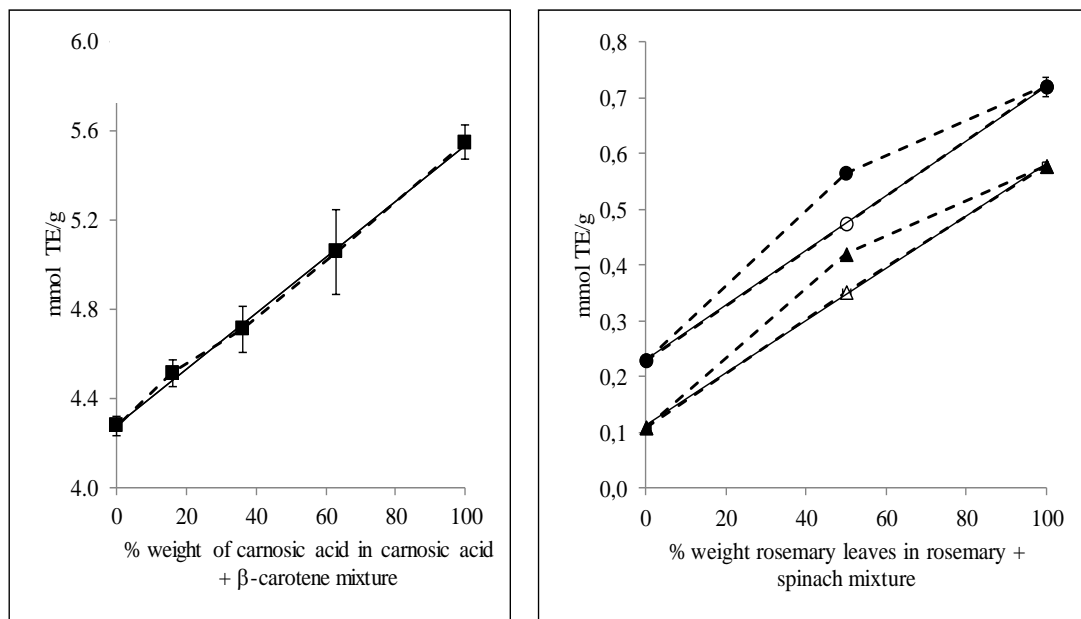


Figure 6. Comparison between (a) the variation of TEAC values in carnosic acid + β -carotene mixtures and (b) the TEAC values obtained in the samples produced by extracting spinach leaves (S), rosemary leaves (R) and a mixture 50:50 of spinach and rosemary leaves (SR). (●) PLE with hexane at 100°C (Ext. 1 in Table 1); (▲) SFE at 30 MPa and 40°C (Ext. 4 in Table 1). Empty symbols represent the mixture of spinach and rosemary extracts (S + R).

Furthermore, Figure 7 shows that the TEAC values of all extracts obtained (S, R, SR and S+R) could be satisfactory correlated with the concentration of carnosic acid present in the sample.

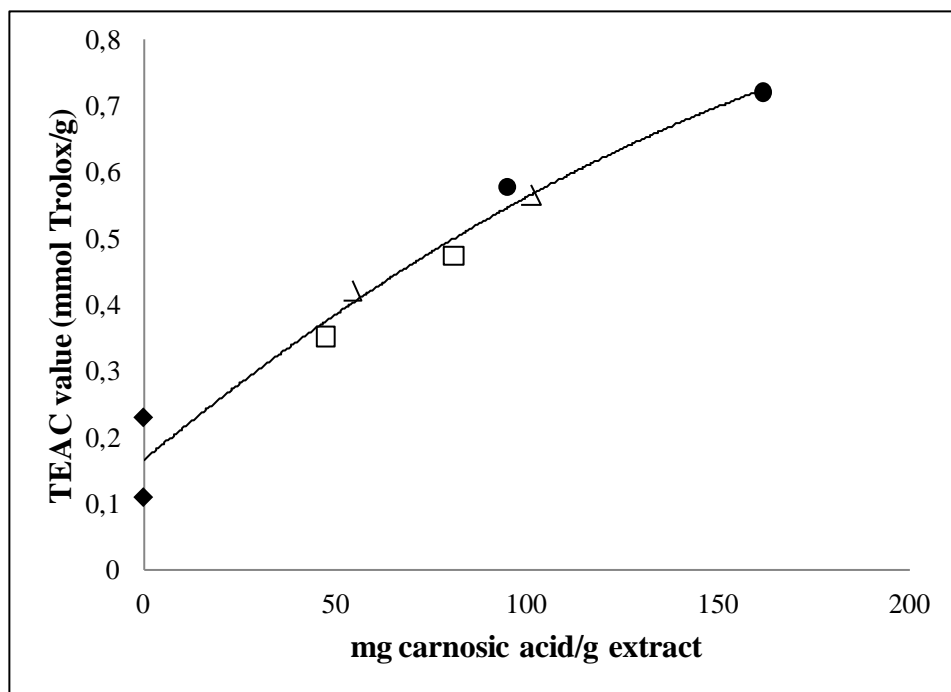


Figure 7. Variation of the TEAC value of the (■) S, (●) R, (△) SR and (◇) S+R extracts obtained from experiments 1 (PLE) and 4 (SFE) of Table 1. Solid line: general trend.

Conclusions

The product obtained from the simultaneous extraction of spinach and rosemary leaves was investigated to ascertain an enhancement of antioxidant activity, due to presumed potential synergic effects between carotenoids from spinach and phenolic diterpenes from rosemary. PLE using hexane and SFE with

pure CO₂ were utilized as extraction technologies; these solvents were selected due to their good affinity to extract carotenoids and carnosic acid.

The product obtained from the extraction of a mixture 50:50 spinach and rosemary leaves (SR) was compared with the extraction of solely spinach (S) and rosemary (R), and with the sample obtained by mixing equal amounts of S and R (S+R sample).

The antioxidant activities of the SR extracts were 20% higher than the antioxidant activities of the S+R samples, which is a very attractive result in order to target new spinach-rosemary mixed products. This effect could be explained by an increase in the concentration of carnosic acid observed in the SR extracts, which was around 10-20% greater than the expected mean values, as not synergic effects between carotenoids (β -carotene and lutein) of spinach and phenolic diterpenes (carnosic acid and carnosol) of rosemary were found.

Acknowledges

This work has been supported by project INNSAMED IPT-300000-2010-34 (subprogram INNPACTO) from Ministry of Science and Innovation (Spain) and project ALIBIRD-S2009/AGR-1469 from Autonomous Community of Madrid.

References

- [1] M. Suhaj, Spice Antioxidants Isolation And Their Antiradical Activity, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (2006) 531-537.
- [2] R. Edge, D.J. Mcgarvey, T.G. Truscott, The Carotenoids As Antioxidants. A Review, *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*, 41 (1997) 189-200.
- [3] N.I. Krinsky, K.J. Yeum, Carotenoid-Radical Interactions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305 (2003) 754-760.
- [4] W. Stahl, H. Sies, Antioxidant Activity Of Carotenoids, *Molecular Aspects of Medicine*, 24 (2003) 345-351.
- [5] R. Hait-Darshan, S. Grossman, M. Bergman, M. Deutsch, N. Zurgil, Synergistic Activity Between A Spinach-Derived Natural Antioxidant (Nao) And Commercial Antioxidants In A Variety Of Oxidation Systems, *Food Research International*, 42 (2009) 246-253.
- [6] E. Ibáñez, A. Kubátová, F.J. Señoráns, S. Cavero, G. Reglero, S.B. Hawthorne, Subcritical Water Extraction Of Antioxidant Compounds From Rosemary Plants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 375-382.
- [7] P. Terpinc, M. Bezjak, H.A. Abramovic, Kinetic Model Of Evaluation Of The Antioxidant Activity Of Several Rosemary Extracts, *Food Chemistry*, 115 (2009) 740-744.
- [8] M.E. Napoli, G. Curcuruto, G. Ruberto, Screening of the Essential Oil Composition Of Wild Sicilian Rosemary, *Biochemical Systematics and Ecology*, 38 (2010) 659-670.

- [9] A. Szumny, A. Figiel, A. Gutierrez-Ortiz, A.A. Carbonell-Barrachina, Composition Of Rosemary Essential Oil (*Rosmarinus Officinalis*) As Affected By Drying Method, *Journal of Food Engineering*, 97 (2010) 253-260.
- [10] Y. Zaouali, T. Bouzaine, M. Boussaid, Essential Oils Composition In Two *Rosmarinus Officinalis* L. Varieties And Incidence For Antimicrobial And Antioxidant Activities, *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) 3144-3152.
- [11] D. Fan, D.M. Hodges, J. Zhang, C.W. Kirby, X. Ji, S.J. Locke, A.T. Critchley, B. Prithiviraj, Commercial Extract Of The Brown Seaweed *Ascophyllum Nodosum* Enhances Phenolic Antioxidant Content Of Spinach (*Spinacia Oleracea* L.) Which Protects *Caenorhabditis Elegans* Against Oxidative And Thermal Stress, *Food Chemistry*, 124 (2011) 195-202.
- [12] M. Bergman, L. Varshavsky, H.E. Gottlieb, S. Grossman, The Antioxidant Activity Of Aqueous Spinach Extract: Chemical Identification Of Active Fractions, *Phytochemistry*, 58 (2001) 143-152.
- [13] M. Bergman, A. Perelman, Z. Dubinsky, S. Grossman, Scavenging Of Reactive Oxygen Species By A Novel Glucurinated Flavonoid Antioxidant Isolated And Purified From Spinach. *Phytochemistry*, 62 (2003) 753-762.
- [14] A. Bunea, M. Andjelkovic, C. Socaciu, O. Bobis, M. Neacsu, R. Verhe, J. Van Camp, Total And Individual Carotenoids And Phenolic Acids Content In Fresh, Refrigerated And Processed Spinach (*Spinacia Oleracea* L.), *Food Chemistry*, 108 (2008) 649-656.
- [15] L. Howard, N. Pandjaitan, Pressurized Liquid Extraction Of Flavonoids From Spinach, *Journal of Food Science*, 73 (2008) 151-157.

- [16] N. Maeda, H. Yoshida, Y. Mizushina, Spinach and Health: Anticancer Effect. In *Bioactive Foods In Promoting Health: Fruits And Vegetables*, ed.; Elsevier, London, 2010, p. 393-405.
- [17] J.K. Lodge, L. Packer, Natural Sources of Lipoic Acid In Plant And Animal Tissues. In *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, ed.; Academy Press, San Diego, California, 1999, p. 121-134.
- [18] N. Pellegrini, B. Colombi, S. Salvatore, Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents, *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 87 (2007) 103-111.
- [19] B. Simonovska, I. Vovka, V. Glavnika, K. Cerneli, Effects of extraction and high-performance liquid chromatographic conditions on the determination of lutein in spinach, *Journal of Chromatography A*, 1276 (2013) 95– 101.
- [20] K.H. Cha, H.J. Lee, S.Y. Koo, D.G. Song, D.U. Lee, C.H. Pan, Optimization of Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids and Chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 793-797.
- [21] S.Y. Koo, K.H. Cha, D.G. Song, D. Chung, C.H. Pan, Optimization of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from *Chlorella Ellipsoidea*, *Journal of Applied Phycology*, 24 (2012) 725-730.
- [22] Y.F. Shang, S.M. Kim, W.J. Lee, B.H. Um, Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, (2011) 237-241.
- [23] A. Mustafa, L.M. Trevino, C. Turner, Pressurized Hot Ethanol Extraction of Carotenoids from Carrot By-Products, *Molecules*, 17 (2012) 1809-1818.

- [24] M.R. García-Risco, G. Vicente, G. Reglero, T. Fornari, Supercritical fractionation of rosemary extracts to improve the antioxidant activity, *Chemical Engineering Technology*, 35 (2012)176-182.
- [25] T. Fornari, G. Vicente, E. Vázquez, M.R. García-Risco, G. Reglero, Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction: Review Article, *Journal of Chromatography A*, 1250 (2012) 34-48.
- [26] M. Herrero, M. Plaza, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2512-2520.
- [27] M. Herrero, D. Arráez-Román, A. Segura, E. Kenndler, B. Gius, M.A. Raggi, E. Ibáñez, A. Cifuentes, Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts, *Journal of Chromatography A*, 1084 (2005) 54-62.
- [28] C. Hossain, A.B. Barry-Ryan, N.P. Martin-Diana, Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology, *Food Chemistry*, 126 (2011) 339-346.
- [29] NIST.WebBook:http://www.ohio.edu/mechanical/thermo/property_tables/C_O2/
- [30] M.R. García-Risco, E. J. Hernández, G. Vicente, T. Fornari, F.J. Señorans, G. Reglero, Kinetic Study Of Pilot-Scale Supercritical CO₂ Extraction Of

- Rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) Leaves, *Journal of Supercritical Fluids*, 55 (2011) 971-976.
- [31] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (1999) 1231-1237.
- [32] M. Chohan, G. Foster-Wilkins, E.I. Opara, Determination of the antioxidant capacity of culinary herbs subjected to various cooking and storage processes using the ABTS^{•+} radical cation assay, *Plant Foods in Human Nutrition*, 63 (2008) 47-52.
- [33] K. Tawaha, F.Q. Alali, M. Gharaibeh, M. Mohammad, T. El-Elimat, Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species, *Food Chemistry*, 104 (2007) 1372-1378.
- [34] M. Isabelle, B.L. Lee, M.T. Lim, W.P. Koh, D. Huang, C.N. Ong, Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore, *Food Chemistry*, 120 (2010) 993-1003.

4.2 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

En esta tesis se aplicaron diferentes técnicas de extracción y diferentes disolventes para obtener extractos, siendo los compuestos fenólicos, los carotenoides y los ácidos triterpénicos objetivos de la extracción. Con este fin se estudiaron la caléndula, el brezo y la espinaca como fuentes de este tipo de compuestos bioactivos con el propósito de determinar la posible actividad antiinflamatoria de los extractos en base a referencias bibliográficas en este sentido.

Los resultados finales del estudio concluyeron con la publicación “*Extraction of functional ingredients from spinach (Spinacia oleracea L.) using liquid solvent and supercritical CO₂ extraction*” en la revista *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(4), 722-729, donde se muestra la influencia de carotenoides y compuestos fenólicos de la espinaca sobre la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los extractos.

4.2.1 Fuentes de ácidos triterpénicos: caléndula y brezo

Los ácidos triterpénicos, tales como el ácido betulínico, oleanólico y ursólico, están ampliamente reconocidos por sus propiedades antiinflamatorias [90, 105, 107]. Por otro lado, en la bibliografía se ha descrito que el brezo y la caléndula son matrices vegetales que contienen estos compuestos principalmente en sus hojas y flores [292].

Por ello, con el objetivo de obtener extractos ricos en ácidos triterpénicos y estudiar su capacidad antiinflamatoria, se llevaron a cabo una serie de ensayos de

extracción con CO₂ supercrítico. Las condiciones de extracción se detallan en la Tabla 25. Para analizar también posibles efectos sinérgicos, se llevó a cabo primeramente la extracción de cada una de las plantas por separado, así como la extracción conjunta de brezo: caléndula, utilizando una relación 50:50 de cada una de las plantas.

Tabla 25. Condiciones utilizadas en la extracción SFE de brezo, caléndula y una mezcla 50:50 de brezo:caléndula.

	P	T	Tiempo	Caudal CO₂	P S1	P S2	T S1	T S2	Co-solvente
	(bar)	(°C)	(h)	(g/ min)	(bar)	(bar)	(°C)	(°C)	(% EtOH)
E1	500	50	4	50	300	60	35	35	0
E2	300	50	4	50	20	0	10	10	10
E3-1	250	50	1,5	50	60	60	35	35	0
E3-2	300	50	2,5	50	20	0	10	10	10

Se aplicaron condiciones y procedimientos de extracción muy diferentes, con el objetivo de obtener también extractos diferentes. En la primera extracción (E1), a 500 bares de presión, se llevó a cabo un fraccionamiento en línea del extracto, manteniendo el primer separador a 300 bar. En la segunda extracción (E2) se evaluó el efecto del empleo de un 10% de etanol como cosolvente. En la tercera (E3) se llevó a cabo una extracción secuencial en dos etapas, donde en la etapa 1 (E3-1) no se usó cosolvente y en la etapa 2 (E3-2) se utilizó un 10 % de etanol.

El rendimiento de las extracciones, así como el contenido en ácidos triterpénicos obtenido mediante los análisis cromatográficos de los extractos de

brezo, caléndula, y la mezcla brezo:caléndula (50:50) se muestran en las Tablas 26 a 28. La cuantificación del ácido betulínico no fue posible en los extractos de caléndula ni en los extractos combinados, debido a que el contenido de este ácido en las muestras se encontraba por debajo del límite de detección.

Tabla 26. Rendimientos de extracción y contenido de ácidos triterpénicos en los extractos de brezo.

	Rendimiento (%)	Ac. Betulínico (mg/g extracto)	Ac. Oleanólico (mg/g extracto)	Ac. Ursólico (mg/g extracto)
E1-S1	0.26	3.89	13.50	98.56
E1-S2	1.94	3.29	2.53	2.95
E2	1.71	17.78	54.04	38.67
E3-1	2.65	2.11	1.44	2.19
E3-2	5.28	28.13	73.14	51.62

Tabla 27. Rendimientos de extracción y contenido de ácidos triterpénicos en los extractos de caléndula.

	Rendimiento (%)	Ac. Oleanólico (mg/g extracto)	Ac. Ursólico (mg/g extracto)
E1-S1	0.33	36.79	19.46
E1-S2	3.04	42.96	22.79
E2	6.94	29.90	15.54
E3-1	2.76	59.96	30.80
E3-2	4.48	8.97	3.59

Tabla 28. Rendimientos de extracción y contenido de ácidos triterpénicos, experimentales y teóricos, en los extractos de brezo:caléndula (50:50).

	Rendimiento		Ácido Oleanólico		Ácido Ursólico	
	(%)		(mg/g extracto)		(mg/g extracto)	
	Exp.	Teórico	Exp.	Teórico	Exp.	Teórico
E1-S1	0.49	0.30	13.73	26.53	21.41	54.32
E1-S2	2.64	2.49	6.23	27.21	12.70	15.06
E2	6.06	4.33	43.64	34.67	58.12	20.11
E3-1	2.04	2.71	12.87	31.29	25.19	16.79
E3-2	3.43	4.88	36.35	43.68	41.95	29.57

En las extracciones de brezo se observó un claro incremento de la extracción de los ácidos triterpénicos cuando se utilizó etanol como cosolvente, principalmente en cuanto a la concentración de los ácidos betulínico y oleanólico, por ser estos compuestos los de mayor polaridad. Si bien este incremento no se observó en los extractos de caléndula, se mantuvo en relación a la concentración de ácido oleanólico obtenida en los productos de la extracción conjunta de las plantas.

Por otro lado, los valores experimentales del rendimiento de extracción obtenidos de la extracción conjunta de brezo:caléndula (50:50) no se correspondieron con los valores medios esperados, con diferencias entre 5 y 40% y sin una tendencia definida. Obviamente, esta respuesta no lineal obtenida en los rendimientos de extracción afecta a la interpretación sobre los resultados de recuperación de ácidos triterpénicos de la extracción conjunta, cuando se los compara con los valores medios esperados (valores teóricos en la Tabla 28). No

obstante, se observa en general una considerable disminución en la concentración de ácido oleanólico cuando la extracción se lleva a cabo de manera conjunta.

4.2.2 Estudio de la actividad antiinflamatoria de extractos combinados de brezo y caléndula

Previamente al estudio de la actividad antiinflamatoria de los extractos de las plantas se determinó la citotoxicidad de los mismos, para establecer el intervalo de concentraciones con las que se podía llevar a cabo el ensayo. Se analizaron dos concentraciones (30 y 40 $\mu\text{g/mL}$) para los extractos SFE de brezo y dos concentraciones (10 y 20 $\mu\text{g/mL}$) para los extractos de caléndula, resultando finalmente como concentraciones no citotóxicas 40 $\mu\text{g/mL}$ y 20 $\mu\text{g/mL}$, para brezo y caléndula respectivamente.

En las Figuras 23 y 24 se muestran los resultados de la secreción de la citoquina pro-inflamatoria $\text{TNF-}\alpha$ e interleuquinas $\text{IL-1}\beta$ y IL-6 , obtenidos con el extracto de brezo (Figura 23) y caléndula (Figura 24). En las figuras se incluye un control positivo que refleja la secreción de macrófagos estimulados con LPS, y un control negativo, donde los macrófagos no han sido estimulados.

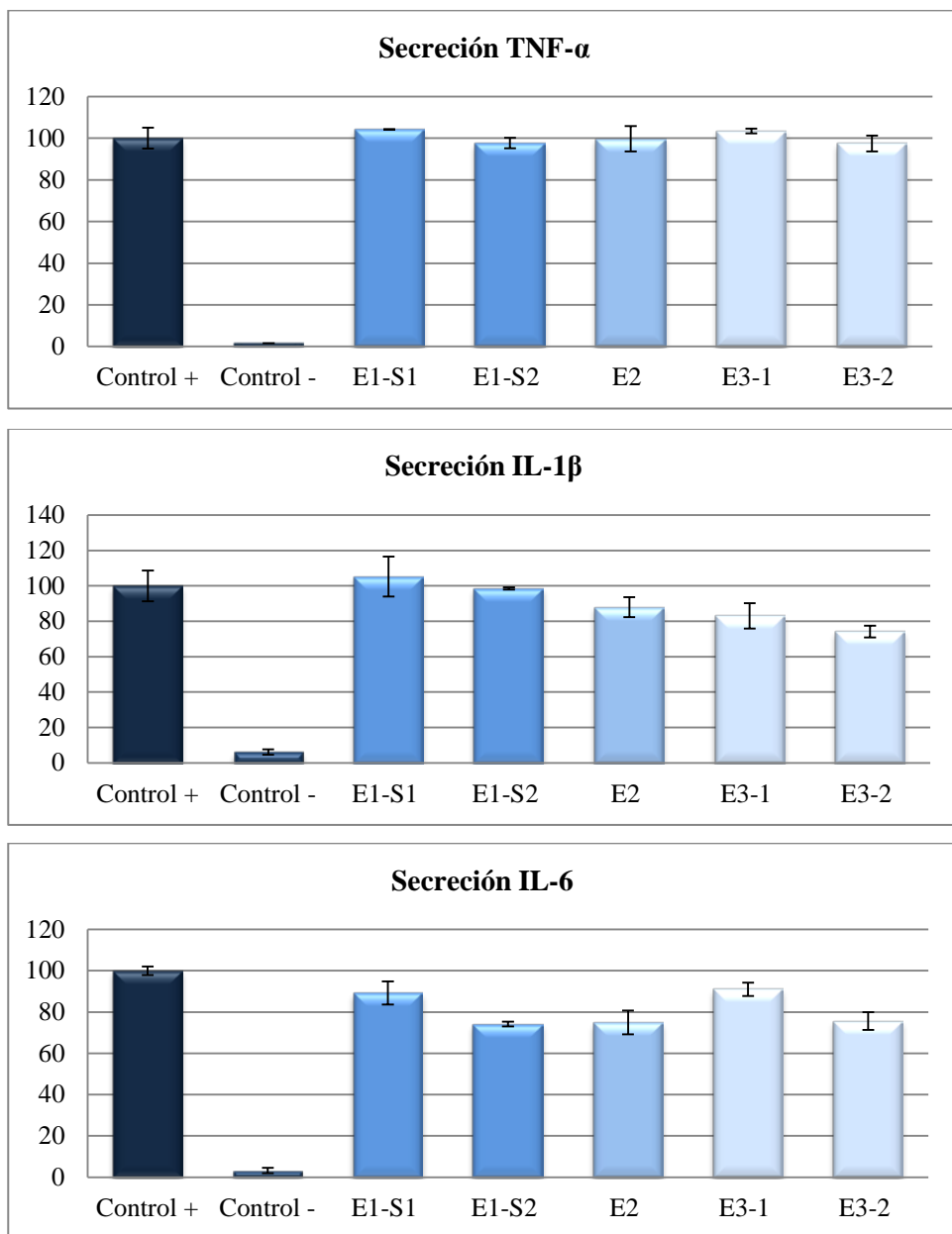


Figura 23. Secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 de los extractos supercríticos de brezo.

Como se puede observar en la Figura 23, ninguno de los extractos supercríticos de brezo provocó una disminución significativa de TNF- α . Por otro lado, los extractos de brezo más concentrados en ácidos triterpénicos (E2 y E3-2) dieron como resultado una reducción significativa de la secreción de las interleuquinas IL-1 β y IL-6, por lo que podría considerarse que existe una relación entre la actividad antiinflamatoria de los extractos SFE de brezo y la concentración de ácidos triterpénicos en los mismos. No obstante, también se observa una disminución significativa de la interleuquina IL-1 β en el extracto E3-1 y de IL-6 en el extracto E1-S2, a pesar de que estos extractos contienen bajas concentraciones de ácidos triterpénicos. Por lo tanto, los resultados respecto a una relación entre la actividad antiinflamatoria de los extractos SFE de brezo y la concentración de ácidos triterpénicos requerirían más experimentos para poder considerarse concluyentes.

En los datos de la actividad antiinflamatoria referentes a la caléndula representados en la Figura 24, se observa que el extracto E1-S1 que presenta una baja concentración de ácidos triterpénicos, muestra un efecto significativo sobre la disminución de la secreción de TNF- α y IL-6, sin embargo no parece afectar a la IL-1 β . En general, para el resto de los extractos de caléndula estudiados, también se observa un efecto de disminución en la secreción de la interleuquina IL-6. No obstante, esta disminución no mantiene una relación con la concentración de ácidos triterpénicos determinada para los extractos (Tabla 27).

Respecto a los estudios realizados con las muestras obtenidas de la extracción conjunta de brezo:caléndula (50:50), los resultados se muestran en la Figura 25. En este caso la concentración no citotóxica del ensayo fue de 40 $\mu\text{g/mL}$ para todas las

muestras. En general, no se observa un efecto de los extractos sobre la secreción de TNF- α , aunque todos producen una pequeña disminución en la secreción de la interleuquina IL-1 β , especialmente en el extracto E1-S1. Además, los extractos E1-S1 y E1-S2 producen la disminución de un 20 % en la secreción de la interleuquina IL-6, ligeramente superior a la del extracto E2. No obstante, cabe destacar de nuevo que los extractos con mayores contenidos de ácidos oleanólico y ursólico (Tabla 28) no son necesariamente los que muestran actividad antiinflamatoria.

También se estudió la actividad antiinflamatoria de una mezcla al 50% de los extractos de brezo y caléndula puros. Para esto, se eligieron dos de los extractos supercríticos, E2 y E3-2, por ser estos los extractos con mayor contenido de ácidos triterpénicos en la extracción conjunta de brezo:caléndula (50:50). Las Figuras 26 y 27 muestran la comparación de la secreción de las citoquinas pro-inflamatoria de estos extractos (B+C) con los obtenidos para brezo (B), caléndula (C), y el extracto conjunto brezo:caléndula (BC).

En las Figuras 26 y 27, para ambas condiciones de extracción (E2 y E3-2) se observa un comportamiento bastante similar en la secreción de TNF- α , IL-1 β y IL-6 cuando se comparan los extractos puros (B y C), el extracto obtenido en forma conjunta (BC) y la mezcla al 50% de los extractos puros (B+C). Prácticamente no se observa disminución importante en la secreción de TNF- α , algo más acusada en la interleuquina IL-1 β (hasta un 20% para los extractos BC y B+C de la E2) y de un 25-30% en la IL-6.

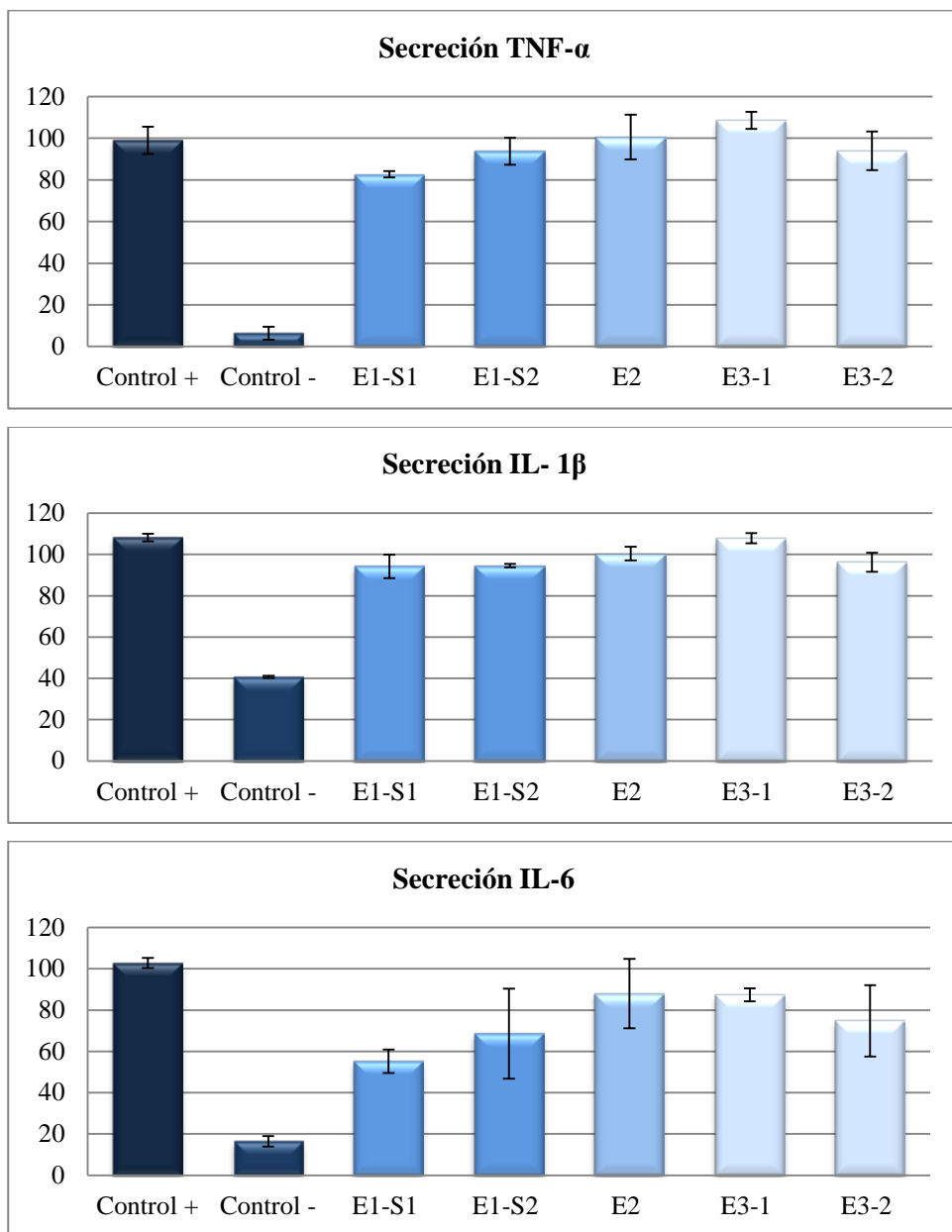


Figura 24. Secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 de los extractos supercríticos de caléndula.

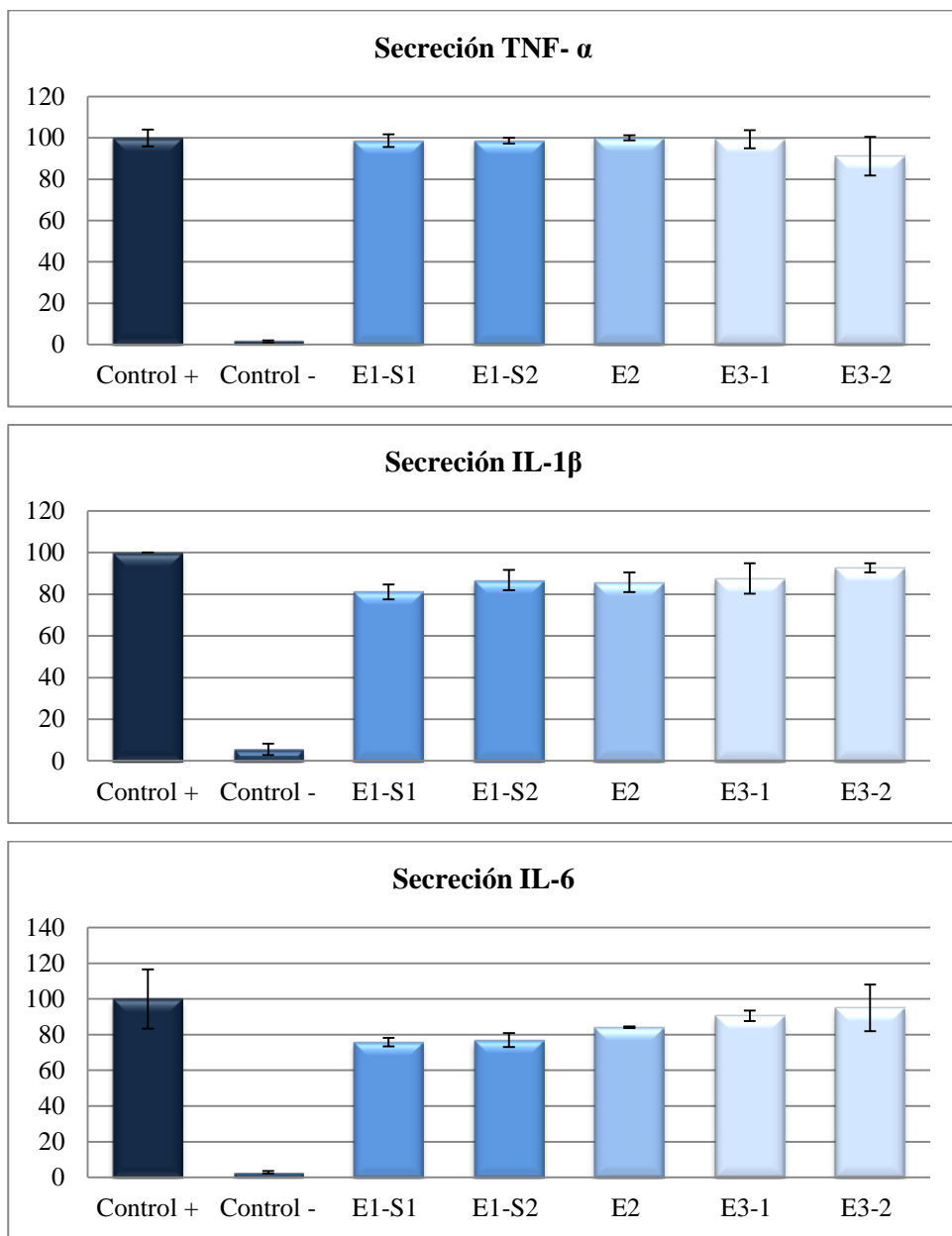


Figura 25. Secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 de los extractos supercríticos de brezo:caléndula (50:50).

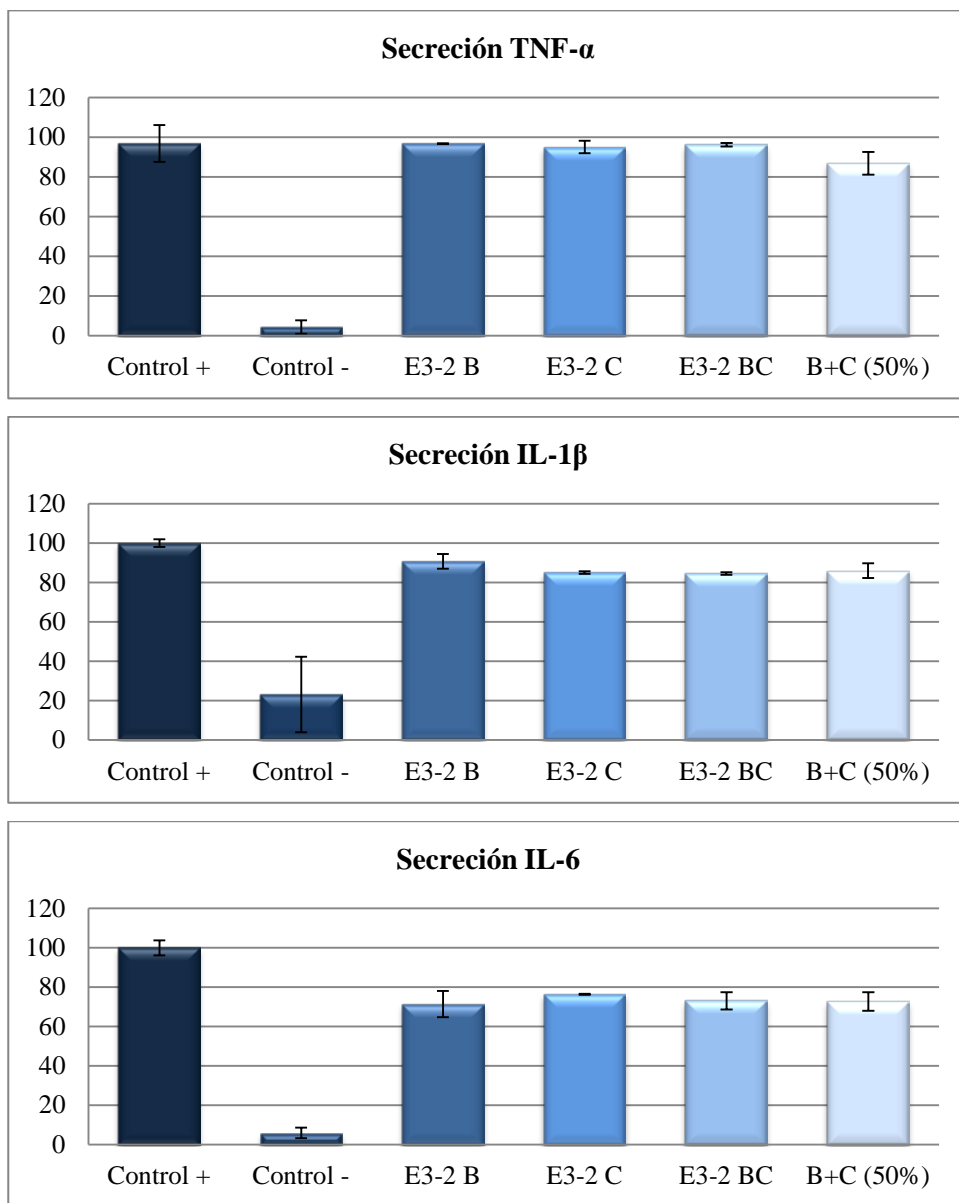


Figura 26. Secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 de los extractos E3-2 de brezo (B), caléndula (C), brezo:caléndula 50:50 (BC) y la mezcla (50:50) de los extractos puros (B+C).

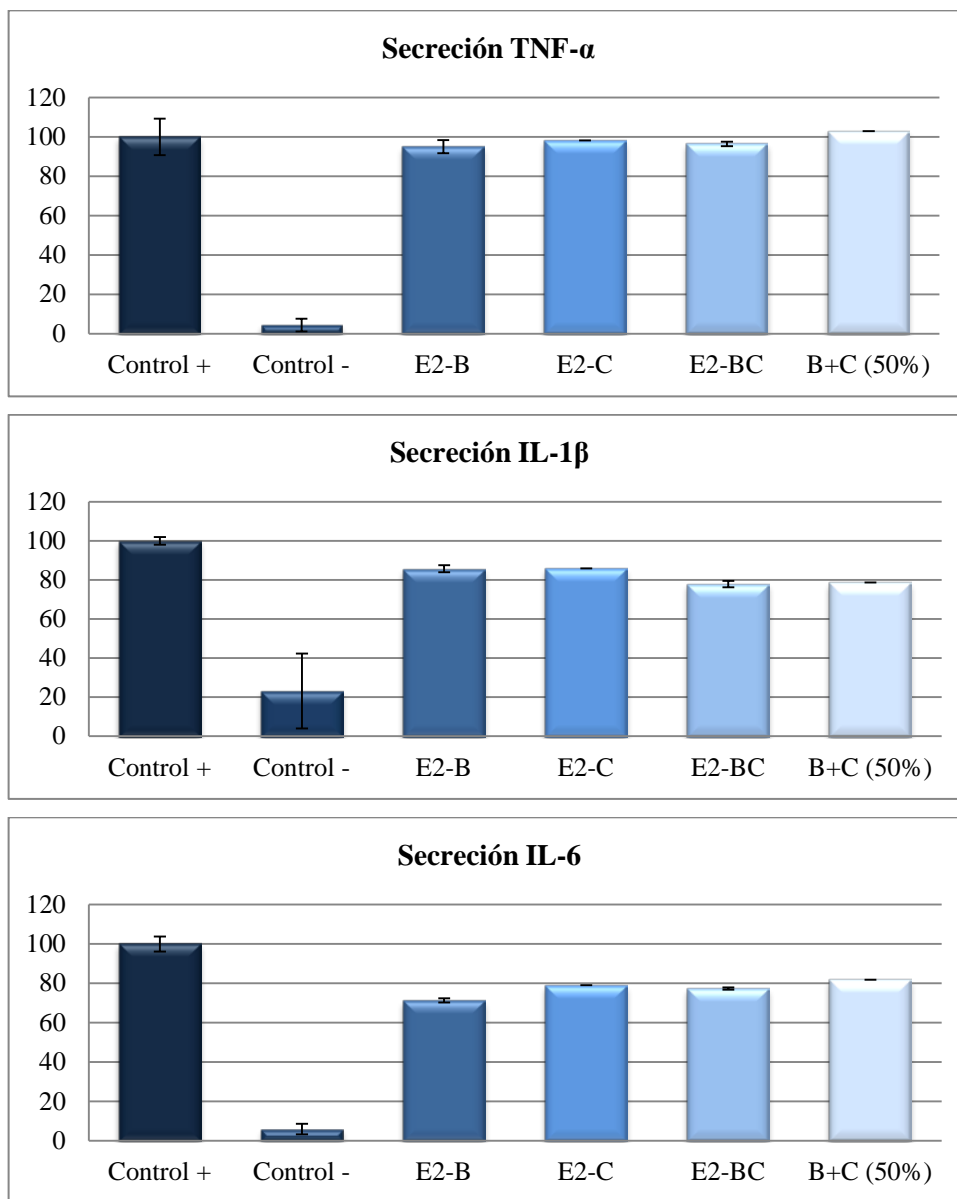


Figura 27. Secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 de los extractos E2 de brezo (B), caléndula (C), brezo:caléndula 50:50 (BC) y la mezcla (50:50) de los extractos puros (B+C).

Como resultado general del estudio comparativo de la actividad antiinflamatoria de los extractos de brezo, caléndula, extractos conjuntos de brezo:caléndula (50:50) y mezclas al 50% de los extractos puros, se puede concluir que la concentración de ácidos triterpénicos, oleanólico y ursólico, no son determinantes en la secreción de las citoquinas estudiadas para valorar la posible actividad antiinflamatoria que puedan poseer los extractos.

4.2.3 Actividad antiinflamatoria de extractos de espinaca

La espinaca (*Spinacia oleracea*) es fuente de un gran número de compuestos reconocidos como bioactivos, entre ellos compuestos fenólicos (como flavonoles y derivados del ácido hidroxicinámico) y carotenoides (β -caroteno, luteína). Ambos tipos de compuestos son reconocidos por presentar actividad antioxidante y antiinflamatoria. En la bibliografía se encuentran numerosas publicaciones dirigidas al estudio de la espinaca por su propiedad antioxidante, principalmente atribuida al contenido de compuestos fenólicos en sus extractos, obtenidos mediante el empleo de agua o disolventes orgánicos polares. Sin embargo, no se encuentran estudios acerca de la actividad antiinflamatoria de extractos lipofílicos de este vegetal.

En esta tesis se aplicaron diferentes técnicas de extracción y diferentes disolventes para obtener extractos de espinaca, siendo los compuestos fenólicos y carotenoides objetivos de extracción. Los extractos se obtuvieron partiendo de hojas de espinaca deshidratada realizando una extracción sólido/líquido (S/L), a 50 °C durante 24 horas, y utilizando como disolventes hexano, etanol y agua.

Asimismo, se llevó a cabo la extracción PLE con hexano, etanol, agua y una mezcla etanol:agua (50:50) a 80 °C y durante un tiempo extracción estática de 10 minutos. Para las extracciones SFE se utilizaron dos temperaturas (40 y 70 °C), dos presiones (250 y 350 bar), manteniendo un caudal de CO₂ de 60 g/min y un tiempo de extracción de 6 horas, para todas las extracciones realizadas. Las extracciones SFE se llevaron a cabo con fraccionamiento mediante despresurización en cascada, manteniendo una presión en el primer separador de 100 bar.

De los extractos obtenidos se estudió la influencia de su composición en la actividad antioxidante y antiinflamatoria dando como resultado la publicación anteriormente citada “*Extraction of functional ingredients from spinach (Spinacia oleracea L.) using liquid solvent and supercritical CO₂ extraction*” (Journal of the Science of Food and Agriculture. 2014. 95 (4), 722-729), que se describe en este apartado.

En ella, se muestra que en general, las extracciones realizadas con disolventes polares dieron como resultado mayores rendimientos de extracción, en comparación con las que se realizaron utilizando hexano o CO₂ supercrítico. Respecto a las extracciones supercríticas, los mayores rendimientos globales de extracción se obtuvieron a 40°C, independientemente de la presión utilizada. Mediante el fraccionamiento en línea se obtuvieron rendimientos significativamente mayores en el segundo separador cuando la temperatura de extracción fue de 40 °C, mientras que cuando la extracción se llevó a cabo a 70 °C se observaron rendimientos similares en ambos separadores.

El β -caroteno y la luteína fueron identificados y cuantificados como los principales carotenoides presentes en las muestras, siendo los extractos S/L con hexano, PLE con etanol y algunos extractos SFE, los que presentaron una mayor concentración de estos compuestos. En particular se encontró una mayor concentración de luteína en el extracto PLE de etanol, debido posiblemente a la mayor polaridad que presentan las xantofilas en comparación con los carotenos, mientras que la recuperación de β -caroteno fue mayor con hexano y con CO_2 supercrítico. De manera general, la concentración de β -caroteno en estas muestras fue mayor que la de luteína, siendo de 3-5 veces mayor en los extractos supercríticos y hasta 10 veces en los extractos S/L de hexano. Es de destacar, que si bien las extracciones SFE a 40 °C dieron como resultados rendimientos mayores, fueron las realizadas a 70 °C las que presentaron concentraciones superiores de carotenoides.

Por otro lado, el fraccionamiento del extracto en las extracciones SFE dio lugar a un fraccionamiento de los carotenoides, concentrándose la luteína en S1 y el β -caroteno en S2, llegando a ser en alguno de los extractos analizados el contenido de β -caroteno hasta 10 veces mayor que el de luteína en el segundo separador.

El análisis de carotenoides totales de las muestras mostró que los valores de estos compuestos en los extractos varían de 16-32 mg/g, representando la luteína y el β -caroteno el 50 % de los carotenoides identificados. Asimismo, se obtuvieron mayores cantidades de carotenoides en S1 que en S2.

También fue analizado el contenido en polifenoles totales de las muestras, encontrando las mayores concentraciones de estos compuestos en los extractos acuosos y etanólicos PLE.

El estudio de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante el ensayo de ABTS. Los resultados mostraron que los extractos que presentaban los mayores valores TEAC fueron los obtenidos mediante PLE, y entre ellos los extractos acuosos los que poseían una actividad antioxidante mayor. Respecto a las extracciones SFE, independientemente de las condiciones de extracción empleadas, fueron las fracciones S1 las que presentaron una mayor actividad antioxidante, pudiendo ser atribuido este hecho al mayor contenido en carotenoides de estas muestras. Además, se observó un efecto de la temperatura sobre la actividad antioxidante, ya que fueron los extractos obtenidos a menores temperaturas los que mostraron actividades antioxidantes mayores.

En general, los resultados revelan que la actividad antioxidante podría estar relacionada con los compuestos fenólicos en el caso de los extractos PLE y S/L obtenidos con agua, mientras que los valores TEAC obtenidos de los extractos SFE y PLE de hexano podrían deberse al contenido en carotenoides, y la actividad antioxidante de los extractos etanólicos relacionarse con ambos tipos de compuestos.

La actividad antiinflamatoria de los extractos de espinaca se llevó a cabo seleccionando dos extractos: el extracto PLE de agua: etanol (50:50) y el extracto SFE-S1 obtenido en a 40 °C y 350 bar, debido a que estos extractos presentaron un

mayor contenido en polifenoles y carotenoides, respectivamente, y en ambos casos una buena y similar actividad antioxidante. Los estudios demostraron que el extracto SFE de espinaca analizado presentaba una importante actividad antiinflamatoria en macrófagos THP-1 humanos activados con LPS. Se comprobó que con este extracto se producía una disminución en la secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 superior, llegando a ser la reducción en la secreción de las citoquinas IL-1 β e IL-6 del 50 % y 80 %, respectivamente.

De esta manera, si bien los extractos ricos en compuestos fenólicos y los extractos ricos en carotenoides presentaron una buena y similar actividad antioxidante, los extractos de espinaca con altos contenidos de carotenoides demostraron una mayor actividad antiinflamatoria.

EXTRACTION OF FUNCTIONAL INGREDIENTS FROM SPINACH (*SPINACIA OLERACEA* L.) USING LIQUID SOLVENT AND SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION

Laura Jaime, Erika Vázquez, Tiziana Fornari, María del Carmen Lopez-Hazas, Mónica R. Garcia-Risco, Susana Santoyo, Guillermo Reglero

Journal of the Science of Food and Agriculture. 2014. 95 (4), 722-729

Abstract

Background: In this work three different techniques were applied to extract dry leaves of spinach (*Spinacia oleracea*): solid-liquid extraction (SLE), pressurized liquid extraction (PLE) and supercritical fluid extraction (SFE) to investigate the influence of extraction solvent and technique on extracts composition and antioxidant activity. Moreover, the influence of carotenoids and phenolic compounds on the antioxidant and anti-inflammatory activities of spinach extracts was also studied.

Results: The higher concentrations of carotenoids and the lower content of phenolic compounds were observed in the supercritical CO₂ extracts; whereas water and/or ethanol PLE extracts presented low amounts of carotenoids and the higher concentrations of phenolic compounds. PLE extract with the highest content

of phenolic compounds shows the highest antioxidant activities, although SFE carotenoid rich extract also shows a high antioxidant activity. Moreover, both extracts present an important anti-inflammatory activity.

Conclusion: PLE seems to be a good technique for the extraction of antioxidant and anti-inflammatory compounds from spinach leaves. Moreover, spinach phenolic compounds and carotenoids present a high antioxidant activity, whereas spinach carotenoids seem to show a higher anti-inflammatory activity than phenolic compounds. It is worth noting that of our knowledge this is the first time the anti-inflammatory activity of lipophilic extracts from spinach leaves is reported.

Keywords: Spinach leaves, extraction techniques, carotenoids, total polyphenol content, antioxidant activity, anti-inflammatory activity

1. Introduction

In the last decades, the search of natural phytochemicals to be applied in foods, cosmetics, etc., has produced a growing interest in extraction and isolation techniques. Solid-liquid extraction is the most traditional technology used to extract active compounds from plant matrix. It is widely known that higher temperatures favor the solubility of the solute in the solvent and thus improve its recovery. Nevertheless, SLE temperature is limited by solvent boiling and in some cases due to the loss of volatile compounds. In this regard, pressurized liquid extraction allows the use of solvents in a liquid state at higher temperatures. Furthermore, a

compression effect is made on the vegetal particle, which also contributes to improve extraction yield, lower amount of solvent is required, extraction is faster, higher yields are attained and the loss of volatiles is minimized.¹

However, both SLE and PLE require a post-extraction procedure to separate the solvent from the extract, while supercritical fluid extraction using pure gases allows the recovery of the extract with high purity, completely free of solvent. The most employed solvent is CO₂ and selectivity is mainly determined by its density, which could be considerably varied by selecting adequate supercritical conditions (temperature and pressure). Carotenes are quite soluble in supercritical CO₂ and thus could be satisfactorily extracted by this technique without using polar cosolvents.² Yet, if ethanol is added as cosolvent the extraction of carotenoids from different vegetables is improved.³ In this case, although the recovery of the extract can be performed in a depressurization stage without additional costs, further separation of the cosolvent from the product is unavoidable.

Spinach (*Spinacia oleracea*) is an edible flowering plant (*Amaranthaceae* family) native to central and southwestern of Asia and widely cultivated all over the world as one of the most popular vegetables. It is identified as a good source of vitamin A, C, E, folic acid, minerals⁴⁻⁶ as well as other bioactive compounds such as phenolics, carotenoids, glycolipids⁷ and lipoic acid.⁸

Several works are available in the literature, reporting the SLE of spinach leaves using water^{9,10}, methanol¹¹ and methanol:water mixtures¹². Also, some studies have been focused on the extraction of spinach leaves with mixtures of

acetone and water⁹. In these extracts, phenolic compounds such as flavonols and flavone glycosides derivatives, together with hydroxycinnamic acid derivatives were identified as the main phenolic compounds.^{11,13} They are mainly reported to possess an important antioxidant activity^{10,14} although other bioactivities such as anti-inflammatory,¹⁵ antimutagenic and antiproliferative properties are also shown in biological systems.¹⁶

Furthermore, spinach has been suggested to be a vegetable that possess one of the highest amounts of lipophilic antioxidants such as carotenoids (mainly lutein, β -carotene and violaxanthin) and β and α -tocopherol.^{6,17} Nevertheless, only few studies reported the antioxidant properties of organic spinach extracts.¹⁸ Furthermore, β -carotene and lutein have been reported to possess anti-inflammatory activity¹⁹⁻²⁰ although, to the best of our knowledge, no reports about anti-inflammatory activities of lipophilic spinach extracts have been published.

PLE of fresh spinach was studied by Barriada-Pereira et al.²¹ to determine the organochlorine pesticides present in the plant. Moreover, to our knowledge, only the work of Howard and Pandjaitan²² reported the PLE of spinach with the target of extracting bioactive compounds. Similarly, not many studies have been conducted about the SFE of spinach, being the main target the recovery of diacylglycerols.²³

In this work the SLE, PLE and SFE of dry spinach leaves were accomplished using different solvents (water, ethanol, ethanol:water mixture, hexane and pure supercritical CO₂) with the target of investigate the influence of extraction solvent and technique on extracts composition and antioxidant activity. Moreover, the

influence of carotenoids and phenolic compounds on the antioxidant and anti-inflammatory activities of spinach extracts was also studied. Temperatures explored were in the range 40-80°C; higher extraction temperatures were not investigated due to the possible thermal degradation of carotenoids.²⁴ Pressures were according to the extraction technology applied, from 0.1 MPa (SLE) to 35 MPa (SFE).

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Standards, chemicals and reagents: Lutein standard ($\geq 95\%$) was purchased from Extrasynthese (Genay Cedex, France) and β -carotene standard ($\geq 95\%$) from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). ABTS [2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] and potassium persulfate were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Methanol, hexane, diethyl ether, petroleum ether and methyl t-butyl ether were HPLC grade from LabScan (Gliwice, Poland), triethylamine was from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and ethanol absolute was purchased from PANREAC (Barcelona, España). Sodium sulfate anhydrous pure was purchased from LabScan (Gliwice, Poland) and potassium hydroxide, Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate and sea sand washed (thin grain) were from PANREAC (Barcelona, Spain).

Preparation of samples: the spinach (*Spinacea oleracea* L.) sample consisted of dry leaves (water content < 49.0 g water kg^{-1} of leaves) purchased from an

herbalist's producer (Murcia, Spain). The sample was ground in a cooled mill and sieved to size between 200 and 500 μm .

2.2 Extraction methods

Solid-liquid extraction (SLE): experiments were carried out using 1 g of sample with 100 mL of hexane, ethanol or water at 50°C in a Stuart Orbital S150 shaker apparatus for 24 h. After extraction, supernatant was filtered through cellulose filter and finally hexane and ethanol were removed by evaporation under vacuum at 35°C using a rotavapor, and the extracts were finally dried up to constant weight in a stream of N_2 . Water extracts were freeze-dried. All experiments were carried out by duplicate. The dried samples obtained were stored at 4°C in the dark until analysis.

Pressurized solvent extraction (PLE): extractions were carried out in an ASE 350 system from Dionex Corporation (Sunnyvale, CA, USA) equipped with a solvent controller unit. Each extraction cell (10 ml capacity) was filled with 1 g of solid sample and 1 g of sea sand as a sandwich, and then placed into an oven. Then, the cell was filled with the corresponding solvent (hexane, ethanol, water or a mixture 50:50 ethanol:water) up to a pressure of 1500 psi and was heated-up to the desired temperature (80°C). Static extractions were performed for 10 min. Preliminary studies (data not shown) revealed that higher extraction times had no significant effect on extraction yield. After extraction the cell was washed with the solvent and subsequently the solvent was purged from cell using N_2 gas until complete depressurization was accomplished. The extracts were recovered in glass

vials and the solvent was eliminated as specified for solid-liquid extractions. All experiments were carried out by duplicate. The dried samples obtained were stored at 4 °C in the dark until analysis.

Supercritical fluid extraction (SFE): trials were carried out in a pilot-plant scale supercritical fluid extractor (Thar Technology, Pittsburgh, PA, USA, model SF2000) comprising a 2 L cylinder extraction cell with automatic control of temperature and pressure. For each experiment, the cell was filled with 0.5 kg of plant raw material. The extractions were performed at 40 and 70°C and two different pressures (25 and 35 MPa) were employed. The extraction time was 6 h and the supercritical solvent (CO₂) flow rate was set to 60 g min⁻¹ in all experiments. The supercritical extract was separated in two fractions by means of a depressurization cascade system comprised by two separators (S1 and S2). Fractionation was accomplished by maintaining S1 at 10 MPa while S2 was set at the recirculation CO₂ pressure (5 MPa).

Ethanol was used to wash out the collector vessel and ensure a complete recovery of the material precipitated in the cell. Ethanol was eliminated by evaporation and the homogeneous solid samples obtained were kept at 4°C in the dark until analysis.

2.3 Chemical analysis

Determination of total carotenoid content: carotenoids were extracted from 40 mg of the dried extracts with 4 mL of methanol. Previous to analysis, samples

were conducted to a saponification reaction in order to remove the chlorophylls that could interfere in the spectrophotometric determination. For saponification the method proposed by Granado et al.²⁵ was followed, but the mixture of petroleum ether plus diethyl ether (50:50) was replaced by diethyl ether (100%). The saponified extracts were dissolved in petroleum ether (1 mg mL^{-1}) and the carotenoid content measured spectrophotometrically at 450 nm. Quantification was performed by using an external standard of pure β -carotene and the results were expressed as equivalents of $\text{mg } \beta\text{-carotene g}^{-1}$ extract.

Identification and quantification of lutein and β -carotene: the analysis of carotenoids was based in the method proposed by Breithaupt²⁶ but using a C18 column instead of a C30 column. Samples obtained after saponification were analyzed employing a HPLC model Agilent 1260 Infinity (Agilent, Santa Clara, USA) equipped with a KROMASIL 100 C18 column (Scharlab, Barcelona, Spain) of $25 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ and $5 \text{ }\mu\text{m}$ particle size. The mobile phase comprises solvent A, which is a mixture of methanol:water (90:10) and triethylamine 1 mL L^{-1} and solvent B, containing methyl-tert-butyl ether:methanol:water (90:6:4) and triethylamine 1 mL L^{-1} . The gradient started with 93 % A to 0 % A from 0 to 34 min and recovers the initial conditions of the method in 4 min. Total time analysis was 38 minutes. During analysis the column was maintained at 25°C . The flow rate was constant at 1 mL min^{-1} and the injection volume was $20 \text{ }\mu\text{L}$. For detection were assigned the wavelength of 450, 470, 550, 660 nm. For quantification of carotenoids calibration curves were performed with commercial standards of β -carotene and lutein, from which straight lines were obtained with a linear regressions of $R^2=0.9984$ and $R^2=0.9996$, respectively.

Determination of total polyphenol content (TPC): total phenolic content was determined using the colorimetric method developed by Singleton et al.²⁷ Results were expressed as gallic acid equivalents (GAE) (mg of gallic acid g⁻¹ extract) using a standard curve of gallic acid. Triplicate measurements were carried out.

2.4 Determination of antioxidant activity

ABTS^{•+} assay. The ABTS^{•+} assay described by Re et al.²⁸ was used to measure the antioxidant activity of the spinach extracts. The reaction was carried out at four different concentrations of extract and was allowed to stand until the absorbance reached a plateau, and the absorbance was recorded at 734 nm. Trolox was used as reference standard, and results were expressed as TEAC values (mmol TE g⁻¹ extract). All analyses were done in triplicate.

2.5 Determination of anti-inflammatory activity

Cell culture and treatment: Human THP-1 monocytes (American Type Culture Collection, ATCC) were cultured in RPMI 1640 culture medium (Gibco, Spain) supplemented with 100 mg kg⁻¹ FBS, 100 U mL⁻¹ penicillin, 100 mg mL⁻¹ streptomycin, 2 mmol L⁻¹-glutamine and 0.005 mmol L⁻¹ β-mercaptoethanol at 37°C in 95% humidified air containing 5% CO₂. Cells were collected and plated at a density of 5x10⁵ cells mL⁻¹ in 24 wells plates. Differentiation to macrophages (THP-1/M cells) was induced by maintaining the THP-1 cells in the presence of 100 ng mL⁻¹ phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, Spain) for 48h. After

differentiation, cells were washed with PBS and incubated with $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ LPS in presence of different concentrations of spinach extracts for 24h in a FBS free medium. Then, the supernatant was frozen at -80°C .

Quantification of cytokines by ELISA: The release of IL-1 β , IL-6 and TNF- α was measured in the supernatants of THP-1/M cells treated with LPS in presence of different concentrations of spinach extracts using ELISA kits (BD biosciences, Spain), according to manufacturer's instructions. The color generated was determined by measuring the OD at 450 nm using a multiscanner autoreader (Sunrise, Tecan).

2.6 Statistical analysis

Experimental results are expressed as means \pm standard deviation (SDs). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to look for differences between means at a 95.0% confidence level. Multiple range test was used to distinguish which means were significantly different from which others. Statistical analyses were performed using Statgraphics v. Centurion XVI for Windows (Statistical Graphics, Washington, USA).

3. Results and discussion

3.1 Extraction yield and content of carotenoids

The tables show the extraction yields obtained in the SLE (Table 1), PLE (Table 2) and SFE (Table 3) of spinach leaves. The data reported correspond to the mean values (MV) obtained between duplicates. Standard deviations (SD) obtained in the SLE and PLE extraction yields are also given in the tables. Relative deviations (SD/MV) were lower than 7% in SLE and 20% in PLE assays. The mean relative deviations obtained in the S1 and S2 fractions collected in the SFE experiments was 8%.

In general, extraction yields obtained when using liquid polar solvents, such as water, ethanol or ethanol: water mixture, are considerably higher (one order of magnitude higher) than yields obtained using non-polar solvents, such as liquid hexane and supercritical CO₂.

In comparison with liquid extraction at ambient pressure and 50°C, PLE produced a 1.5 fold increase in the case of hexane. This important increase of yield could be attributed to the PLE temperature (80°C) which is higher than the normal boiling point of the solvent employed. This significant increase of the solvent power, that is produced when the extraction temperature became higher than its normal boiling point, was previously observed and reported.²⁹ On the contrary, the highest extraction yield using water was obtained in SLE and not in PLE. This lower yield observed in water PLE could be attributed to an extraction temperature lower than water normal boiling point, and the considerable shorter extraction times applied (10 min vs. 24 h).

Iijima et al.²³ reported yields of 14.4 mg g⁻¹ and 351.7 mg g⁻¹ for the ultrasound assisted SLE of freeze-dried spinach using, respectively, hexane and methanol. These values are of the same order of magnitude of the yields obtained in this work (28.4 mg g⁻¹ with hexane, 101.4 mg g⁻¹ with ethanol and 305.8 mg g⁻¹ using water) taking into account the polarity of the solvents employed. No comparison can be established with respect to PLE yields, since no overall extraction yields were reported in previous spinach PLE studies.²¹⁻²²

Extraction yields in the SFE assays were the lower ones. Lower extraction temperature (40°C) produced higher extraction yields (S1+S2), despite the extraction pressure applied. This tendency was also reported by Iijima et al.²³ although the values obtained were slightly larger than the yields obtained in this work. For example, at 25 MPa extraction yields reported are 35.1 and 29.1 mg g⁻¹ at 40 and 70°C, while extraction yields obtained in this work are, respectively, 21.6 and 19.4 mg g⁻¹. Yet, it should be taken into account that, maintaining the same extraction conditions, differences in SFE yields up to 400 mg g⁻¹ were found for different *Spinacia oleracea* subspecies.²³ With respect to the on-line fractionation of the supercritical extract, yields obtained in S2 were considerably higher than those obtained in S1 at 40°C, while similar yields were obtained in S1 and S2 at 70°C.

As mentioned before, the main carotenoids identified in the samples were lutein and β -carotene. Tables 1, 2 and 4 show the content of these carotenoids as determined by the HPLC analysis. Hexane SLE, ethanolic PLE extract and supercritical CO₂ extracts produced the samples with the higher concentration of

these carotenoids. Lutein recovery (mg carotenoid / g dry matter) was significantly higher in the case of the ethanolic PLE extract (0.49 mg/g) in comparison with the hexane SLE extract (0.04 mg/g) or the supercritical CO₂ extracts (0.03-0.06 mg/g). On the contrary, β -carotene recovery was higher in the case of hexane and CO₂ extraction (0.10-0.38 mg/g) in comparison with the ethanolic PLE extract (0.07 mg/g). These differences can be attributed to the higher polarity of xanthophylls in comparison with carotenes, due to the presence of hydroxyl groups in their chemical structure.

Table 1. SLE of spinach leaves: extraction yield (g mass extract kg⁻¹ mass vegetal matrix), content of lutein and β -carotene (mg carotenoid g⁻¹ extract) and antioxidant activity (mmol trolox g⁻¹ extract) obtained in the extracts. Extraction temperature = 50°C.

Solvent	Extraction yield (g kg ⁻¹)	Content of main carotenoids identified		TEAC value (mmol TE g ⁻¹)	TPC (mg GAE g ⁻¹)
		Lutein (mg g ⁻¹)	β -carotene (mg g ⁻¹)		
Water	308.0 ± 22.0 ^a	ND.	ND	0.198 ± 0.012 ^a	25.256 ± 1.354 ^a
Ethanol	101.4 ± 1.2 ^b	2.41	3.05	0.170 ± 0.005 ^b	23.851 ± 0.468 ^b
Hexane	28.4 ± 1.7 ^c	1.40	13.33	0.116 ± 0.002 ^c	5.135 ± 0.043 ^c

^{a,b,c} Different superscript letters within a column denotes statistically significant differences ($P \leq 0.05$) among solvents.

GAE, gallic acid equivalents; ND, not detected; TE, Trolox equivalents; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity; TPC, total polyphenols content. Extraction temperature=50 °C.

Table 2. PLE of spinach leaves: extraction yield (g mass extract kg⁻¹ mass vegetal matrix x 100), content of lutein and β -carotene (mg carotenoid g⁻¹ extract), antioxidant activity (mmol trolox g⁻¹ extract) and total polyphenols content (mg gallic acid g⁻¹ extract) obtained in the extracts.

Solvent	Extraction yield (g kg ⁻¹)	Content of main carotenoids identified		TEAC value (mmol TE g ⁻¹)	TPC (mg GAE g ⁻¹)
		Lutein (mg g ⁻¹)	β -carotene (mg g ⁻¹)		
Water	189.9 \pm 2.7 ^a	ND.	ND	0.329 \pm 0.013 ^b	68.542 \pm 11.289 ^b
Ethanol	93.2 \pm 8.5 ^{bc}	5.27	0.81	0.314 \pm 0.011 ^b	58.236 \pm 3.287 ^c
Ethanol:water (50:50)	104.2 \pm 13.1 ^b	0.12	n.i.	0.369 \pm 0.013 ^a	88.839 \pm 2.345 ^a
Hexane	41.1 \pm 8.2 ^d	1.99	0.23	0.186 \pm 0.018 ^c	12.502 \pm 3.133 ^d

^{a-d}Different superscript letters within a column denotes statistically significant differences ($P \leq 0.05$) among solvents.

GAE, gallic acid equivalents; ND, not detected; TE, Trolox equivalents; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity; TPC, total polyphenols content. Extraction temperature=80 °C.

Table 3. SFE of spinach leaves: extraction yield (g mass extract kg⁻¹ mass vegetal matrix)

T (°C)	P (MPa)	Extraction yield in separators		Overall extraction yield (S1 + S2)
		S1	S2	
40	25	1.0	20.6	21.6
40	35	1.2	19.7	20.9
70	25	6.3	8.1	14.4
70	35	10.6	5.3	15.9

In general, the concentration of β -carotene in these samples is higher than that of lutein (3-5 times higher in S1+S2 supercritical extracts and almost 10 times higher in solid-liquid extraction with hexane). SFE yields were higher at 40°C, however carotenoid concentrations were higher in the assays carried out at 70°C. For example, at 35 MPa, the total content (S1+S2) of lutein and β -carotene were, respectively, 1.6 and 4.9 mg g⁻¹ at 40°C, and 3.5 and 13.7 mg g⁻¹ at 70°C. Furthermore, the cascade depressurization system in SFE resulted in partial fractionation of these carotenoids: in the extraction accomplished at 40°C, the concentration of lutein in S1 samples were around 2 times higher than that of β -carotene, while the concentration of β -carotene in S2 samples were 10 times higher than that of lutein. Table 5 also show the total content of carotenoids determined in the SFE extracts. Values varied from 16 to 32 mg g⁻¹, representing lutein and β -carotene around 50% of the total amount of carotenoids identified.

Table 4. Supercritical fluid extraction of spinach leaves: content of lutein and β -carotene (mg carotenoid g⁻¹ extract).

T (°C)	P (MPa)	lutein			β -carotene			lutein + β - carotene in S1+S2 extracts
		S1	S2	S1+S2	S1	S2	S1+S2	
40	25	17.29	0.64	1.41	10.39	6.61	6.80	8.21
40	35	20.80	0.43	1.60	8.02	4.80	4.94	6.54
70	25	5.81	0.37	2.75	10.42	5.79	7.85	10.59
70	35	4.87	0.87	3.53	17.01	7.10	13.67	17.21

Table 5. Supercritical fluid extraction of spinach leaves: total carotenoid content (mg β -carotene g⁻¹ extract)

T (°C)	P (MPa)	Total carotenoids		
		S1	S2	S1+S2
40	25	42.9	15.8	17.1
40	35	65.2	13.1	16.0
70	25	32.6	14.5	22.4
70	35	41.6	11.9	31.7

Table 6. Supercritical fluid extraction of spinach leaves: antioxidant activity (mmol TE g⁻¹ extract) and total polyphenols content (mg gallic acid g⁻¹ extract) obtained in the extracts

T (°C)	P (MPa)	TEAC value (mmol TE g ⁻¹ extract)		TPC (mg GAE g ⁻¹ extract)	
		S1	S2	S1	S2
40	25	0.190 ± 0.008 ^{b*}	0.080 ± 0.004 ^{c*}	39.17 ± 3.23 ^{a*}	7.86 ± 0.55 ^{d*}
40	35	0.275 ± 0.012 ^a	0.080 ± 0.001 ^c	19.84 ± 0.42 ^d	13.91 ± 0.54 ^c
70	25	0.132 ± 0.005 ^d	0.086 ± 0.003 ^b	27.12 ± 2.50 ^b	17.35 ± 1.45 ^a
70	35	0.153 ± 0.004 ^c	0.104 ± 0.004 ^a	24.79 ± 0.67 ^c	14.82 ± 0.27 ^b

^{a-d}Different superscript letters within a column denotes statistically significant differences ($P \leq 0.05$) among solvents.

GAE, gallic acid equivalents; TE, Trolox equivalents; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity; TPC, total polyphenols content.

Furthermore, increased amounts of total carotenoids were obtained in S1 samples (from 33 to 65 mg g⁻¹) than in S2 samples (from 12 to 16 mg g⁻¹).

Bunea et al.⁶ studied the carotenoid content of fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea*). According to their work, fresh spinach contains 18-31 mg β -carotene kg^{-1} of fresh matter, what represents around 0.2-0.4 mg β -carotene g^{-1} of dried matter (water content in spinach was approximated to be 920 g kg^{-1}). These values are in accordance with those obtained in our work, i.e. the extraction of 0.21 mg of β -carotene g^{-1} dried matter by SFE (at 35 MPa and 70°C, see Table 3) and 0.38 mg of β -carotene g^{-1} dried matter by SLE with hexane.

3.2 Antioxidant activity of the extracts

PLE (Table 2) seems to be a good technique to extract antioxidant compounds from spinach leaves, as higher TEAC values were obtained in PLE extracts compared with conventional solvent extraction (Table 1) and SFE extraction (Tables 3 to 6). Both PLE and SLE showed the same behavior of the extracts regarding the solvent used. Water extracts possessed the highest antioxidant activity, closely to ethanol extracts. The lowest TEAC values were obtained with hexane. These results are in accordance with Pellegrini et al.¹⁸, where better results were achieved using water than chloroform in ultrasound assisted SLE, although slightly higher activities in the extracts were reported, probably due to the use of different cultivars or growing season.¹⁴ Many other studies have shown the antioxidant activity of spinach extracts, however as other methods different to ABTS assay were used no direct comparisons with our results were able to establish.^{22,30}

Regarding to SFE, and in all extraction conditions explored, the samples obtained in S1 presented higher TEAC values than those recovered in S2 (Table 6). This effect could be attributed to the higher content of carotenoids determined in S1 samples (Table 5) as is explained in the following section. Furthermore, TEAC values of S1 SFE extracts were intermediate between PLE and conventional solvent extraction, and in general closely related to the PLE hexane extraction. Furthermore, greater effect of SFE extraction conditions was found on the antioxidant capacity of S1 samples in comparison of S2 samples: better results in S1 extracts were produced when lower extraction temperature were applied (40°C vs. 70°C), whereas only a slight effect on antioxidant capacity were shown increasing extraction pressure.

Aqueous and ethanolic extracts from PLE showed the highest contents of phenolic compounds (Tables 1, 2 and 6), while hexane or SFE extracts possessed considerably lower concentrations. It has been reported that lipophilic substances such as tocopherols or phospholipids can react with Folin-Ciocalteu reagent causing an overestimation of the TPC. In this way, TPC of hexane or SFE extracts could be attributed to interferences with other substances rather than the presence of phenolic compounds in the extracts.³¹ Moreover, no flavonoids or hydroxycinnamic acids are expected to be extracted with non-polar solvents such as hexane or supercritical CO₂.¹⁸

Bunea et al.⁶ also determined the content of total phenolic compounds in spinach using the Folin-Ciocalteu reagent and gallic acid as standard, reporting that fresh spinach contains around 27 mg GAE g⁻¹ of dried matter (again, water content

in spinach was estimated to be 920 g kg⁻¹). According to our work, the maximum amount of phenolic compounds was extracted from spinach by PLE with ethanol, attaining 18.4 mg g⁻¹ dried matter.

Pellegrini et al¹⁸ published an interesting study about the efficiency of extraction of a sequence of solvents on spinach leaves. They found acetone as the best solvent for the extraction of carotenoids followed by chloroform, while water caused no extraction of carotenoids. On the other hand, water turned out a high extraction of phenolic compounds followed by acetone. No polyphenols were found in chloroform extract. Similar results were obtained in this study, since better polyphenolic contents were found in water extracts followed by ethanol, while carotenoids were better extracted with ethanol than hexane in PLE and conventional solvent extraction.

As different polyphenol and carotenoid content were found in the extract regarding to solvent, it seems that TEAC values of PLE and conventional solvent extraction with water is related to the presence of phenolic compounds, opposite to hexane extracts or SFE extracts where antioxidant activity could be due to the presence of carotenoid compounds. Ethanolic extracts antioxidant activity could be related to both, phenolic and carotenoids compounds.

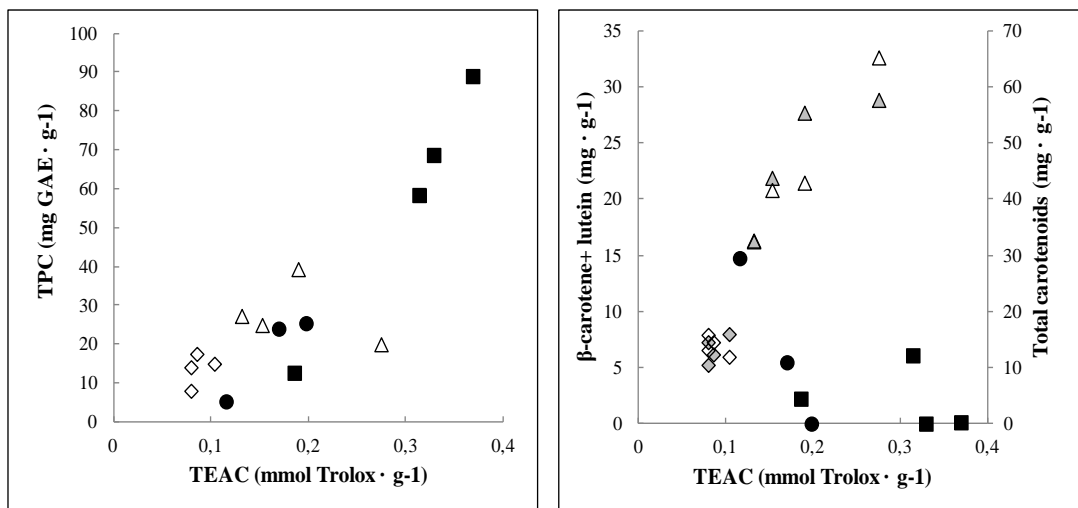


Figure 1. Correlation of TEAC (mmol TE g⁻¹) of spinach extracts with (a) total polyphenols content (TPC) content, (b) carotenoid content: (black squares) PLE; (black circles) SLE; (grey triangles) and (grey diamonds) β -carotene+lutein content in SFE-S1 and SFE-S2 extracts, respectively; (white triangles) and (white diamonds) TPC or total carotenoids in SFE-S1 and SFE-S2 extracts, respectively.

Figure 1 shows the TEAC values obtained for all samples produced as a function of the content of TPC (Figure 1a) and carotenoids (Figure 1b). Despite the antioxidant activity may well be attributed to the presence of carotenoids, phenolic compounds or both type of substances, is clearly deduced from Figure 1 that the content of phenolic compounds has the dominant effect on the antioxidant capacity of spinach extracts, except for the SFE extracts. Many studies have reported a linear relationship between TPC and antioxidant activity in aqueous, ethanolic or methanolic extracts.^{14,32} In this regard, although no linear relationship was found between TPC and TEAC values, the highest antioxidant activity corresponds to the extracts with the higher content of TPC, namely the PLE water:ethanol (50:50)

spinach extract is the one with the higher TEAC value ($0.369 \text{ mmol TE g}^{-1}$) and higher content of phenolic compounds ($88.839 \text{ mg GAE g}^{-1}$). Moreover, carotenoids may exert a clear influence in TEAC value of the SFE extracts with no influence of TPC. Furthermore, while no correlation between the content of β -carotene + lutein and TEAC values can be established in the case of PLE extracts, it is clearly observed in Figure 1b that the content of carotenoids have a great influence on the TEAC values of SFE extracts.

3.3 Anti-inflammatory activity of the extracts.

The anti-inflammatory capacity of the PLE water:ethanol (50:50) spinach extract (80°C) and the SFE S1 extract (40°C and 35 MPa) was measured using THP-1 human macrophages activated with LPS. These extracts were specifically chosen because the PLE extract presented the highest concentration of phenolic compounds and the highest antioxidant activity, while the SFE extract presented the highest content of total carotenoids together with the highest TEAC value of the SFE extracts. In this regard, it is pretended to asses if some particular type of compounds (phenolic compounds or carotenoids) has larger effect on the anti-inflammatory activity of spinach extracts.

The activation of THP-1/M was carried out with the addition of LPS to the medium. These LPS treated cells showed, after an incubation period of 24h, an important increase in the release of all anti-inflammatory cytokines tested ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ and IL-6) compared to non-activated controls (Figure 2). These activated cells were considered as positive controls for all the cytokines tested. When the

activation of THP-1/M was carried out in presence of $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of spinach extracts, a small decrease in TNF- α secreted level was observed when used SFE extract (Figure 2), compared with levels obtained in absence of extracts (positive control). However, no significant decrease in the amount of TNF- α secreted was obtained with $20\mu\text{g mL}^{-1}$ PLE extract. Regarding to IL-1 β secretion by activated cells in presence of spinach extracts (Figure 2), it can be observed an important decrease in the secretion of this cytokine. Thus, $20\mu\text{g mL}^{-1}$ of the SFE extract reduced a 50% the release of IL-1 β , meanwhile PLE extract only presented a 30% of inhibition, compared to positive control. The activation of macrophages in presence of extracts also produced an important decrease in the IL-6 release (Figure 2), overall with SFE extracts which inhibit an 80% the IL-6 secretion. These data indicated that supercritical spinach extract presented an important anti-inflammatory activity in THP-1 human macrophages activated with LPS, since only $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of this extract effectively inhibited the release of pro-inflammatory cytokines. Therefore, a higher anti-inflammatory activity was shown in the SFE extract than in the PLE extract. SFE extract activity could be attributed to the important quantity of lutein and β -carotene detected in the SFE extract, since several studies have reported the anti-inflammatory effects of lutein or β -carotene.³³⁻³⁴ On the other hand, considering that neither lutein nor β -carotene were identified in the PLE extract, its anti-inflammatory activity could be related to the presence of phenolic compounds since several authors have reported the anti-inflammatory effect of these compounds.³⁵ In this regard, carotenoids may play an important role in the anti-inflammatory activity of the lipophilic extracts. Moreover, although more studies should be done it seems that carotenoid-rich

extracts would show a higher anti-inflammatory effect than polyphenol-rich extracts from spinach leaves.

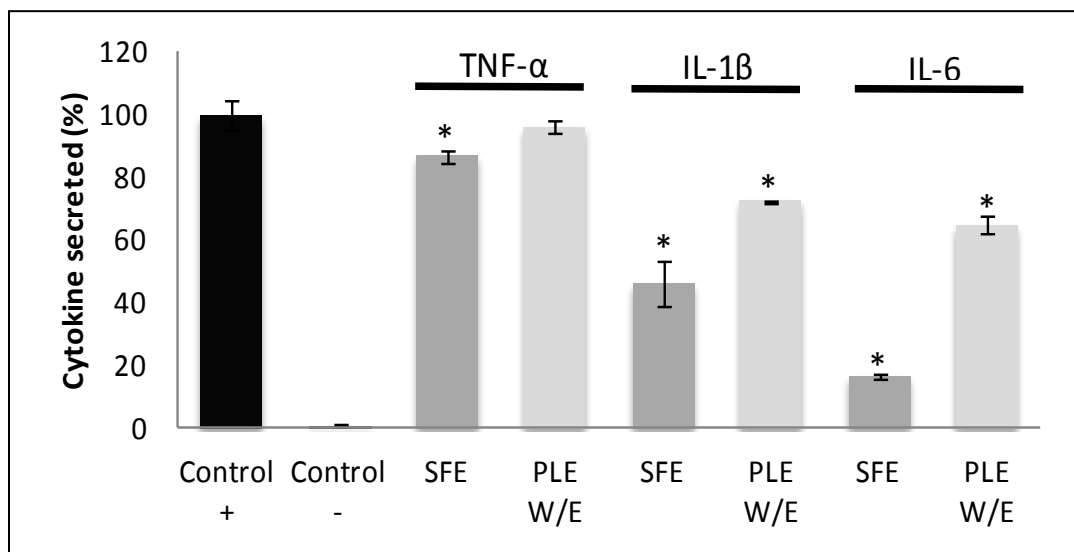


Figure 2. Levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 secreted by THP-1/M activated with LPS in presence of spinach extracts: SFE (supercritical extract) and PLE W/E (extract obtained by pressurised liquids water:ethanol 1:1). Each bar is the mean of three determinations \pm standard deviation. *Denotes statistical differences between control + and the extracts at $p < 0.05$.

Conclusions

PLE seems to be a good technique for the extraction of antioxidant compounds from spinach leaves, although good results were also achieved in some SFE extracts. In this regard, solvent polarity makes conditional the composition of the extracts; that is, pressurized water or ethanol:water at 80°C produced the highest

polyphenols concentration whereas the highest carotenoids concentration was achieved using supercritical CO₂. Both extracts show a high antioxidant activity being attributed to the polyphenol or carotenoid content, respectively. Moreover, both extracts show anti-inflammatory activity too, although higher activity was found in SFE extract. Therefore, it is demonstrated that spinach phenolic compounds and carotenoids present a high antioxidant activity, whereas spinach carotenoids seem to show a higher anti-inflammatory activity than phenolic compounds. Furthermore, it is worth noting that of our knowledge this is the first time the anti-inflammatory activity of lipophilic extracts from spinach leaves is reported.

Acknowledgements

This work has been supported by project INNSAMED IPT-300000-2010-34 (subprogram INNPACTO) from Ministry of Science and Innovation (Spain) and project ALIBIRD-S2009/AGR-1469 from Autonomous Community of Madrid. Laura Jaime, Tiziana Fornari, Mónica R. García-Risco, Susana Santoyo and Guillermo Reglero are members of the IBERCAROT network, funded by CYTED (ref. 112RT0445).

References

- [1] Mendiola JA, Herrero M, Cifuentes A and Ibañez E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *J Chromatogr A* 1152: 234–246 (2007).
- [2] Gómez-Prieto MS, Caja MM, Herraiz M and Santa-María G, Supercritical fluid extraction of all-trans-Lycopene from tomato. *J Agric Food Chem* 51: 3-7 (2003).
- [3] Marsili, R., and Callahan, D, Comparison of a liquid solvent extraction technique and supercritical fluid extraction for the determination of α - and β -carotene in vegetables. *J Chromatogr Sci* 31: 422–428 (1993).
- [4] Gil MI, Ferreres F and Tomás-Barberán FA, Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *J Agric Food Chem* 47: 2213-2217 (1999).
- [5] Toledo MEA, Ueda Y, Imahari Y and Ayaki M; L-ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest Biol Tech* 28: 47-53 (2003).
- [6] Bunea A, Andjelkovic M, Socaciu C, Bobis O, Neacsu M, Verhe R et al, Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chem* 108: 649–656 (2008).
- [7] Maeda N, Yoshida H and Mizushina Y, Spinach and Health: Anticancer Effect, in *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*, ed. by Watson RR and. Preedy VR, Elsevier Inc, London, pp. 393-405 (2010).

- [8] Lodge, J. K. and Packer, L. Natural Sources of Lipoic Acid in Plant and Animal Tissues, in *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, ed. by. Packer L, Hiramatsu M and Yoshikawa T. Elsevier Inc, London, pp. 131-134 (1999).
- [9] Bergman M, Varshavsky L, Gottlieb HE, and Grossman S, The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochem* 58; 143-152 (2001).
- [10] Aehle E, Raynaud-Le Grandic S, Ralainirina R, Baltora-Rosset S, Mesnard F, Prouillet C et al, Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure. *Food Chem* 86: 579–585 (2004).
- [11] Aritomi M and Kawasaki, T, Three highly oxygenated flavone glucuronides in leaves of *Spinacia oleracea*. *Phytochem* 23: 2043-2047 (1984).
- [12] Fan D, Hodges DM, Zhang J, Kirby CW, Ji X, Locke SJ et al, Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L.) which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. *Food Chem* 124: 195–202 (2011).
- [13] Ferreres F, Castañer M and Tomás-Barberan FA, Acylated flavonol glycosides from spinach leaves (*Spinacia Oleracea*). *Phytochem* 45(8): 1701-1705 (1997).
- [14] Pandjaitan N, Howard LR, Morelock T and Gil MI, Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *J Agric Food Chem* 53: 8618-8623 (2005).

- [15] Lomnitski L, Foley J, Ben-Shaul V, Grossman S, Maronpot RR, Moomaw CR et al, Effects of apocynin and natural antioxidant from spinach on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-induced hepatic injury in rat. *Pharmacol Toxicol* 87: 18-25 (2000).
- [16] Nyska A, Suttle A, Bakshi S, Lomnitski L, Grossman S, Bergman M, Ben-Shaul V et al, Slowing tumorigenic progression in TRAMP mice and prostatic carcinoma cell lines using natural antioxidant from spinach, NAO: a comparative study of three antioxidants. *Toxicol Pathol* 31: 39-51 (2003).
- [17] Isabelle, M., Lee, B. L., Lim, M. T., Koh, W. P., Huang, D., and Ong, C. N.. Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chem* 120 (2010), pp. 993–1003.
- [18] Pellegrini N, Colombi B, Salvatore S, Brenna OV, Galaverna G, del Rio D et al, Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. *J Sci Food Agric* 87: 103-111 (2007).
- [19] Haddad N and Levy R, The synergistic anti-inflammatory effects of lycopene, lutein, β -carotene, and carnosic acid combinations via redox-based of NF- κ B signaling. *Free Radical Bio Med* 53: 1381-1391 (2012).
- [20] Kijlstra A, Tian Y., Kelly, E. R., and Berendschot, T. J. M. Lutein: More than a filter for blue light. *Prog Retin Eye Res* 31: 303-3015 (2012).
- [21] Barriada-Pereira M, Gonzalez-Castro MJ, Muniategui-Lorenzo S, Lopez-Mahia P, Prada-Rodríguez D and Fernandez-Fernandez E, Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the

- determination of organochlorine pesticides in vegetables. *Talanta* 71; 1345–1351, (2007).
- [22] Howard, L., and Pandjaitan, N. (2008). Pressurized liquid extraction of flavonoids from spinach. *J Food Sci*, 73, 151-157.
- [23] Iijima, H., Musumi, K., Hada, T., Maeda, N., Yonezawa, Y., Yoshida, H., and Yizushina, Y. Inhibitory Effect of Monogalactosyldiacylglycerol, Extracted from Spinach Using Supercritical CO₂, on Mammalian DNA Polymerase Activity. *J Agric Food Chem* 54: 1627-1632 (2006).
- [24] Rodríguez-Bernaldo de Quirós A and Costa HS, Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *J Food Compos Anal* 19: 97–111(2006).
- [25] Granado F, Olmedilla B, Gil-Martinez E and Blanco IA, Fast, Reliable and Low-cost Saponification Protocol for Analysis of Carotenoids in Vegetables. *J Food Compos Anal* 14: 479-489 (2001).
- [26] Breithaupt DE, Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction. *Food Chem* 86: 449–456 (2004).
- [27] Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventós RM, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method enzymol* 199: 152-179 (1999).
- [28] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans, C, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Bio Med* 26: 1231-1237 (1999).
- [29] Villanueva D, Luna P, Manic MS, Najdanovic-Visak V, Reglero G and Fornari T. Extraction of caffeine from natural matter using a bio-renewable

- agrochemical solvent. *Food Bioprod Process* DOI: 10.1016/j.fbp.2012.11.007 (2013).
- [30] Bergman M, Perelman A, Dubinsky Z and Grossman S, Scavenging of reactive oxygen species by a novel glucurinated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach. *Phytochem* 62; 753–762 (2003).
- [31] Arranz S, Cert R, Perez-Jimenez J, Cert A and Saura-Calixto F, Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chem* 110(4): 985-990 (2008).
- [32] Cho MJ, Howard LR, Prior RL, Morelock T, Flavonoid content and antioxidant capacity of spinach genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Sci Food Agric* 88: 1099-1106 (2008).
- [33] Van Herpen-Broekmans WM, Klopping-Ketelaars IA, Boots ML, Kluft C, Princen H, Hendriks HF et al, Serum carotenoids and vitamins in relation to markers of endothelial function and inflammation. *Eur J Epidemiol* 19: 915-921 (2004).
- [34] Bai SK, Lee SJ, Na HJ, Ha KS, Han JA, Lee H, et al, Beta-carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. *Exp Mol Med* 37: 323-334, (2005).
- [35] Gonzalez-Gallego J, Sanchez-Campos S and Tunon MJ, Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp* 22: 287-293 (2007).

4.3 ACTIVIDAD ANTIVIRAL

4.3.1 Estudio de la actividad anti-VHC del brezo

Aproximadamente el 2,8% de la población mundial está infectada por el virus hepatitis C (VHC) [293]. El tratamiento actual para la infección por VHC incluye el empleo de interferón alfa pegilado junto con la ribavirina, en combinación con nuevos agentes antivirales de acción directa (DAA), como telaprevir, boceprevir y el inhibidor de la polimerasa recientemente aprobado, sofosbuvir [294]. Sin embargo, estos tratamientos provocan un gran número de efectos secundarios como síndromes gripales, pérdida de masa muscular y anemia, además de tener efectos teratogénicos.

La etapa de entrada del ciclo de vida del VHC es clave en el inicio de la enfermedad, sin embargo, la mayoría de los compuestos anti-VHC disponibles actualmente van dirigidos a etapas posteriores del ciclo de vida viral. Por tanto, la búsqueda de compuestos capaces de evitar la entrada del virus y de esta manera la propagación de la enfermedad en el organismo, representa un campo interesante de investigación y una importante vía terapéutica [295].

En la actualidad las investigaciones van orientadas a la inhibición de la NS5B RNA-polimerasa, una polimerasa dependiente de ARN crítica para la replicación viral. Recientemente, ha sido demostrada la actividad antiviral contra el VHC mediante la acción sobre esta enzima de dos compuestos triterpénicos, el ácido oleanólico y el ácido ursólico [113]. En el estudio de los extractos de brezo

realizados en esta tesis se encontraron contenidos importantes de ambos compuestos, por lo que resulta interesante analizar el potencial de estos extractos como agentes con actividad anti-VHC.

Existen pocas referencias bibliográficas acerca de la extracción de compuestos triterpénicos del brezo, y más concretamente de la variedad *Calluna vulgaris*. Uno de los trabajos publicados se refiere al contenido en triterpenos de extractos (realizados con varios disolventes por métodos convencionales) de hojas y flores de brezo [226]. Los resultados muestran que el mayor contenido de ácido oleanólico y ácido ursólico se encuentra en las hojas de la planta, con concentraciones de 125 y 398 $\mu\text{g/g}$ extracto, respectivamente, mientras que en las flores la concentración de estos compuestos es de 28 y 75 $\mu\text{g/g}$ extracto, respectivamente.

La única información disponible en relación a la extracción de brezo con CO_2 supercrítico se encuentra en dos tesis doctorales desarrolladas por Zhao [85] y Hunt [296]. No obstante, no existen datos en la bibliografía respecto de una posible actividad anti-VHC de los extractos de brezo.

Por esto, en esta tesis, se estudió la extracción de brezo mediante CO_2 supercrítico, abarcando diferentes condiciones de extracción y evaluando el efecto de estas condiciones en la recuperación y concentración en el extracto de los ácidos triterpénicos de interés. Además, se comprobó el efecto que tiene el fraccionamiento en cascada del extracto y la operación en etapas secuenciales (la primera etapa sin cosolvente y la segunda utilizando un 10% de cosolvente). Los extractos se estudiaron en cuanto a su actividad anti-VHC buscando una posible

relación entre la actividad antiviral y el contenido de ácidos triterpénicos. Los resultados de esta investigación dieron lugar a la publicación “*Supercritical fluid extraction of heather (Calluna vulgaris) and evaluation of anti-hepatitis C virus activity of the extracts*” en la revista Virus Research Virus Research. 2015. 198, 9–14.

El estudio de la variación del rendimiento con la presión, temperatura y porcentaje de cosolvente demostraron que el efecto más significativo es la adición de etanol como co-solvente del CO₂ supercrítico, aumentando el rendimiento aproximadamente 4 veces (de 2,16 a 7,31%). Este hecho también es evidente al observar los resultados obtenidos de la extracción realizada en dos etapas, ya que se obtuvo un rendimiento de casi el doble en la extracción con 10 % de etanol (segunda etapa) en comparación con la primera etapa en la que no se empleó cosolvente.

Asimismo, el análisis de los extractos y la cuantificación de los dos ácidos (oleanólico y ursólico) demostró que las mayores concentraciones de ácidos triterpénicos se obtuvieron utilizando al menos un 10% de etanol como cosolvente, siendo los valores de concentración de ácidos triterpénicos de 90-220 mg/g de extracto, en comparación con las concentraciones inferiores a 30 mg/g encontradas en los extractos en los que no se empleó cosolvente. Teniendo en cuenta la concentración de estos ácidos triterpénicos en la materia seca según la bibliografía (40 mg/g de ácido ursólico y 10 mg/g de ácido oleanólico) [85, 223] los resultados representan un aumento de 3,5 y 8,3 veces de ácido ursólico y oleanólico, respectivamente.

El fraccionamiento en línea realizado proporciona dos fracciones muy diferenciadas, siendo el extracto producido en el separador 1 considerablemente más concentrado en ácidos triterpénicos (112 mg/g extracto) que la segunda fracción (5.5 mg/g extracto). Por tanto, el fraccionamiento del extracto presenta una alternativa muy interesante para obtener una fracción concentrada en estos ácidos sin utilizar cosolventes.

En cuanto a la cantidad relativa de recuperación de estos ácidos, la relación de ácido oleanólico /ácido ursólico es menor que 1 cuando se utiliza CO₂ puro, y puede llegar a valores mayores que 1 cuando se emplea etanol como cosolvente. Es decir, que la utilización de etanol como cosolvente en la extracción supercrítica produce un cambio en la selectividad hacia una mayor extracción del ácido oleanólico.

Los ensayos de citotoxicidad celular e inhibición de VHC realizados con los extractos supercríticos de brezo permitieron comprobar que, en todos los casos, se produjo una reducción en la infectividad viral de manera dependiente de la dosis, a las concentraciones en las que no se observó citotoxicidad. En general, los extractos con las concentraciones más altas de ácido oleanólico y ursólico son los que mostraron una reducción en la infectividad más notable.

Asimismo, los ensayos orientados a la investigación específica de las primeras etapas del ciclo de vida del virus revelaron que todos los extractos mostraban alguna inhibición de la infectividad del VHC de manera dependiente de la dosis y seis de ellos inhibieron la entrada del 50% del virus, siendo relevante señalar que se

observó una conexión entre la inhibición de la entrada del VHC y la concentración de ácido oleanólico y ursólico. Además, se encontró una correlación mayor entre la concentración de ácido oleanólico y ursólico con la inhibición de la entrada del virus, en comparación con la inhibición del ciclo de vida viral completo. Los resultados del trabajo sugieren que estos dos compuestos tienen propiedades anti-VHC y más concretamente, actuar sobre la etapa de entrada del virus y sería muy interesante profundizar con la investigación para poder obtener resultados más concluyentes.

SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF HEATHER (*CALLUNA VULGARIS*) AND EVALUATION OF ANTI-HEPATITIS C VIRUS ACTIVITY OF THE EXTRACTS

Mónica Rodríguez García-Risco, Erika Vázquez, Julie Sheldon, Eike Steinmann, Nina Riebesehl, Tiziana Fornari, and Guillermo Reglero

Virus Research. 2015. 198, 9–14

Abstract

Previous studies using lipid extracts of Heather (*Calluna vulgaris*) leaves showed the presence of high concentrations of ursolic and oleanolic acid. These two compounds have been reported to present antiviral activity against hepatitis C virus (HCV). In this work, the supercritical fluid extraction of heather was studied with the aim of assessing a potential anti-HCV activity of the extracts owing to their triterpenic acid content. Supercritical extraction assays were carried out exploring the pressure range of 20-50 MPa, temperatures of 40-70 °C and 0-15% of ethanol cosolvent. The content of oleanolic and ursolic acid in the extracts were determined, and different samples were screened for cellular cytotoxicity and virus inhibition using a HCV cell culture infection system. Antiviral activity was observed in most extracts. In general, superior anti-HCV activity was observed for higher contents of oleanolic and ursolic acids in the extracts.

Keywords: supercritical fluid extraction; *Calluna vulgaris* L.; heather; hepatitis C virus; ursolic acid; oleanolic acid.

1. Introduction

For many centuries plants have been used for medicinal purposes, many have led to the discovery of important molecules such as aspirin, morphine and codeine. Heather (*Calluna vulgaris* L.) has been used as an herbal remedy against kidney and urinary infections as well as rheumatism. Several phytochemicals with antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities have been identified in heather (Filip et al., 2012; Orhan et al., 2007; Saaby et al., 2009; Simon et al., 1992). Among these compounds, triterpenoids, in the form of free acids or aglycones of saponins, have gained more attention, and the number of papers describing their biological effects has increased sharply during the last decade (Banno et al., 2004; Checker et al., 2012; Ikeda et al., 2008; Liu, 1995; Yan et al., 2010).

Heather has also been reported to contain high concentrations of ursolic and oleanolic acid (around 40 mg/g and 10 mg/g dry matter, respectively) (Pancost et al., 2002; Zhao, 2011). Ursolic acid (3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic acid) is a pentacyclic triterpenoid carboxylic acid well known for its antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities, combined with a relatively low toxicity (Checker et al., 2012; Ikeda et al., 2008). Oleanolic acid (3 β -hydroxyolean-12-ene-28-oic acid) has been shown to have similar biological activities as ursolic acid (Liu, 1995; Yan et al., 2010). Recently, both of these compounds have been

reported to have antiviral activity against hepatitis C virus (HCV) by inhibiting the NS5B RNA-dependent RNA polymerase (Kong et al., 2013).

Approximately 2.8% of world population is infected with HCV (Mohd Hanafiah et al., 2013). Current standard of care treatment includes pegylated interferon alpha plus ribavirin, combined with the new directly antiviral agents (DAA) such as telaprevir, boceprevir and the recently approved polymerase inhibitor, sofosbuvir (Gilead, 2013).

Most currently available anti-HCV compounds target later stages of the viral lifecycle, such as viral RNA replication, and are intended for use in chronically infected patients. Therefore, the discovery of novel compounds to block HCV cell entry is an area of intense research, with the aim of restricting universal reinfection of the donor liver by circulating virions in the setting of liver transplantation for HCV-associated end stage liver disease. The entry step of the HCV lifecycle is critical for initiation, maintenance, and dissemination of viral infection *in vivo*, and represents an attractive target for therapeutic intervention (Fofana et al., 2014). In the past few years, various natural compounds have been described to have direct or indirect antiviral activities against HCV (Calland et al., 2012; Lindenbach et al., 2005; Reiss et al., 2011).

Supercritical fluid extraction (SFE) using carbon dioxide (CO₂) is progressively replacing the organic solvent extraction, particular in the processing of natural matter. Several applications, such as the extraction of hops and the removal of caffeine from coffee beans, are well known processes performed on an

industrial scale, certainly due to its advantages in comparison with conventional solid-liquid extraction. Supercritical CO₂ is capable of extracting a wide range of diverse compounds, from non-polar or moderately polar compounds to more polar substances by combining CO₂ with a cosolvent, such as methanol, ethanol, acetone, water, diethyl ether, among others. Yet, ethanol may be the better choice in SFE of nutraceuticals and food ingredients because of its lower toxicity.

To our knowledge, the only information available concerning the supercritical CO₂ extraction of heather was reported by Hunt (Hunt, 2006) and Zhao (Zhao, 2011) in their respective PhD theses developed in the University of York, UK. In these works, the extraction of the aerial part of dry plants with different harvest time was investigated, the highest yields obtained were in the range of 3.9 - 4.5 % (depending on plant harvest time) and were produced at 50°C, 35 MPa, employing 10 % of ethanol as CO₂ cosolvent. Ursolic acid and oleanolic acids were identified in these extracts, together with other high valued triterpenoids, such as α -amyrin, β -amyrin, taraxerone and taraxerol.

In this work the SFE of heather was investigated in the temperature range of 40-70°C, pressures of 20-50 MPa and using 0-15 % ethanol cosolvent. The effect of process conditions on extraction yield and content of the triterpenic acids identified, namely ursolic acid and oleanolic acid, was evaluated. Additionally, antiviral activities of each of the extracts were tested against HCV.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Standards, chemicals and reagents: oleanolic acid ($\geq 99\%$) and ursolic acid ($\geq 98\%$) were purchased from Extrasynthese (Genay Cedex, France). Acetonitrile was HPLC grade from LabScan (Gliwice, Poland) and ethanol absolute was purchased from PANREAC (Barcelona, Spain).

Heather sample consisted of dry leaves and flowers (8.4 % w/w water content) purchased from an herbalist's producer (Murcia, Spain). The plant was harvested in Europe in 2010. The vegetal matter was ground in a cooled mill and sieved to sizes between 400 and 600 μm .

2.2 Supercritical Fluid Extraction (SFE)

The extractions were carried out in a pilot-plant scale supercritical fluid extractor (Thar Technology, Pittsburgh, PA, USA, model SF2000) comprising of a 2 L cylinder extraction cell with automatic control of temperature and pressure. For each experiment, the cell was filled with 0.5 kg of plant raw material. The extraction assays were performed at temperatures in the range of 40-70°C and pressures of 20-50 MPa. Table 1 shows the conditions employed in each experiment.

Extracts 11a and 11b in Table 1 were obtained by fractionation of the extract using a depressurization cascade system comprised by two separators (S1 and S2). Fractionation was accomplished by maintaining S1 at 30 MPa while S2 was set at the recirculation CO₂ pressure (6 MPa). Extraction 13 was performed in two steps: the first step (Extract 13a) comprised the extraction with pure supercritical CO₂ (25 MPa, 50°C, 1.5 h), and the second step (Extract 13b) was carried out using ethanol as a co-solvent (30 MPa, 50°C, 2.5 h). In all other extractions the extract was collected in S1 by depressurization down to 6 MPa. The absolute relative deviation between duplicate experiments ($ARD = \text{absolute difference} / \text{mean value}$) observed in the determination of extraction yields was lower than 9.3 %.

Ethanol was used to wash out the collector vessels and ensure a complete recovery of the material precipitated in the cell. Ethanol was eliminated from the extract at low temperature (35°C) using a rotavapor and the homogeneous solid samples obtained were kept at 4°C in the dark until analysis.

2.3 Chemical Analysis

Identification and quantification of triterpenic acids was accomplished employing a HPLC model Varian ProStar (Varian, Palo Alto, CA, USA) equipped with a Col KROMAPHASE C18 column (Scharlab, Barcelona, Spain) of 25 mm × 4.6 mm and 5 mm particle size. The analytical method used comprises of an isocratic gradient of 30 min using a mixture of acetonitrile and water (90:10 % vol) as mobile phase. The flow rate was constant at 1 mL/min and the injection volume was 20 µL. The detection of compounds was carried out at a wavelength of 210 nm. The quantification of triterpenic acids was accomplished by calibration curves

with commercial standards of ursolic, oleanolic and betulinic acids; straight lines were obtained with linear regressions higher than 0.999. A typical chromatogram obtained is shown in Figure 1.

2.4 Cells, Virus, Extract Dilutions

Huh7.5 cells were grown in complete Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) with 10% fetal calf serum (FCS), as previously described in Perales et al (Perales et al., 2013). The HCV cell culture (HCVcc) virus derived from the plasmid, Jc1FLAG2 (p7-nsGluc2A) or the monocistronic luciferase reporter virus JcR2a were used to infect Huh7.5 cells, a viral stocks had been previously generated as described (Perales et al., 2013; Reiss et al., 2011).

Supercritical heather extractions, oleanolic acid and ursolic acid were diluted in absolute ethanol to 50 mg/ml and stored at -80°C, for further dilutions, the extracts were diluted in complete DMEM (Fan et al., 2011).

2.5 Cytotoxicity

To test for cytotoxicity Huh7.5 cells were plated to semiconfluency and incubated at 37°C, 5% CO₂ with each extract in 5-fold dilutions at concentrations 0, 0.64, 3.2, 16, 80, 400, 2,000 and 10,000 µg/ml. After 48 hours, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma) was added to each well at a final concentration of 500 µg/ml and incubated for a further 3 hours, the media was then removed and 100 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma) was

added to each well, the optical density was measured at a wavelength of 550 nm. The 50% cytotoxicity concentration (CC₅₀) was then calculated using the optical density percentage compared to untreated cells. Standard deviations were calculated from 4 replicates.

2.6 HCV inhibition assay

Huh7.5 cells were plated in 96-well plates to semiconfluency (6.4×10^3 per well) and infected with tissue culture infective dose (TCID) of 192 (approximately MOI 0.03) of HCVcc, 5 hours later, each extract was added to the wells in 2-fold dilutions at concentrations 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 and 400 µg/ml and incubated for 48 hours. The cells were then washed with PBS, fixed with methanol and stained for HCV NS5A antibodies (Lindenbach et al., 2005). Foci forming units were counted and compared to wells without extract. Percentages were used to calculate HCV inhibition. Standard deviations were calculated from 4 replicates.

For the HCV entry assay, a monocistronic luciferase reporter virus JcR2a was used (Anggakusuma et al., 2013). Huh7.5 cells were inoculated with JcR2a virus in the presence of increasing concentration of the extracts. The green tea molecule Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) was used as positive control (Ciesek et al., 2011). The inoculum was removed 4 h later and then monolayers were washed and overlaid with fresh medium containing no inhibitors. Infected cells were lysed 3 days later and Renilla luciferase activity was determined as described (Ciesek et al., 2011).

3. Results

3.1 Extraction Yield and Recovery of Triterpenic Acids.

The extraction yield (g extract / g heather) obtained in the different experiments are given in Table 1. Extraction 9 was carried out at similar extraction conditions than those employed by Zhao (2011) (Zhao, 2011) and similar yields were obtained.

Figure 2 shows the variation of extraction yield with temperature (Figure 2a), pressure (Figure 2b) and amount of ethanol cosolvent (Figure 2c). As observed, the most significant effect on extraction yield is produced by the addition of ethanol as cosolvent of the supercritical CO₂ solvent. With respect to pure CO₂, around a 4-fold increase (from 2.16 to 7.31 %) of yield is produced when using ethanol as CO₂ cosolvent.

Additionally, the increase of extraction temperature from 40°C to 60°C favors the recovery of phytochemicals from heather, but a further increase of temperature has the opposite effect.

Extractions 4 and 11 in Table 1 were obtained using the same extraction temperature and pressure, but slightly higher CO₂/plant ratio in extraction 4 (24 kg/kg vs 21.6 kg/kg) and also slightly higher extraction yield was obtained (2.45 vs 2.20 %). Nevertheless, fractionation of the extract in extraction 11 produced two

samples with noticeably different yields: extraction 11a (0.26 % yield, S1 separator) and extraction 11b (1.94 % yield, S2 separator).

Alternatively, extraction 13 was carried out in two steps, using different extraction conditions in each step. Comparing both steps it can be clearly deduced the key effect of ethanol as CO₂ cosolvent, since 5.28 % yield was obtained in the second step when 2.65 % of phytochemicals were already extracted in the first step.

The concentration (mg acid / g extract) of ursolic and oleanolic determined by HPLC in all supercritical extracts produced is shown in Table 2. The higher concentrations of the triterpenic acids were obtained when at least 10 % ethanol was employed as cosolvent (Extracts 9, 10, 12 and 13b) with values in the range of 90-220 mg triterpenic acids / g extract (1.1-2.3 % w/w). In all other experiments no ethanol was employed, and triterpenic acids were present in concentrations lower than 30 mg/g, but as a result of the on-line fractionation procedure, 116 mg/g of triterpenic acids was obtained in the first fraction of extraction 11 (Ext. 11a) without using ethanol, although very low extraction yield was achieved in this fraction (0.26 %).

The highest concentration of triterpenic acids was obtained in extract 10 (82.87 mg/g of oleanolic acid and 141.45 mg/g of ursolic acid) which was produced at moderate pressure (30 MPa) and with the highest ethanol content utilized in this work (15 %). Taking into account the concentration of these triterpenic acids in the dry matter reported in the literature (Jalal et al., 1982; Zhao, 2011), this represents a

3.5 and 8.3 fold increase for, respectively, ursolic and oleanolic acid. Furthermore, this extraction was the one with the highest yield (7.31 %).

Table 1. SFE conditions and yields obtained in the extraction of heather leaves.

Extract	Pressure (MPa)	Temperature (°C)	Time (h)	CO ₂ flow (g/ min)	Co-solvent (% ethanol)	Yield (%)
1	20	50	3	60	0	1.17
2	30	50	3	60	0	2.16
3	40	50	3	60	0	2.32
4	50	50	3	60	0	2.45
5	40	40	3	60	0	2.04
6	40	60	3	60	0	3.35
7	40	70	3	60	0	2.40
8	30	50	3	60	5	3.66
9	30	50	3	60	10	4.68
10	30	50	3	60	15	7.31
11a S1	50	50	4	50	0	0.26
11b S2						1.94
12	30	50	4	50	10	1.71
13a First step	25	50	1.5	50	0	2.65
13b Second step	30	50	2.5	50	10	5.28

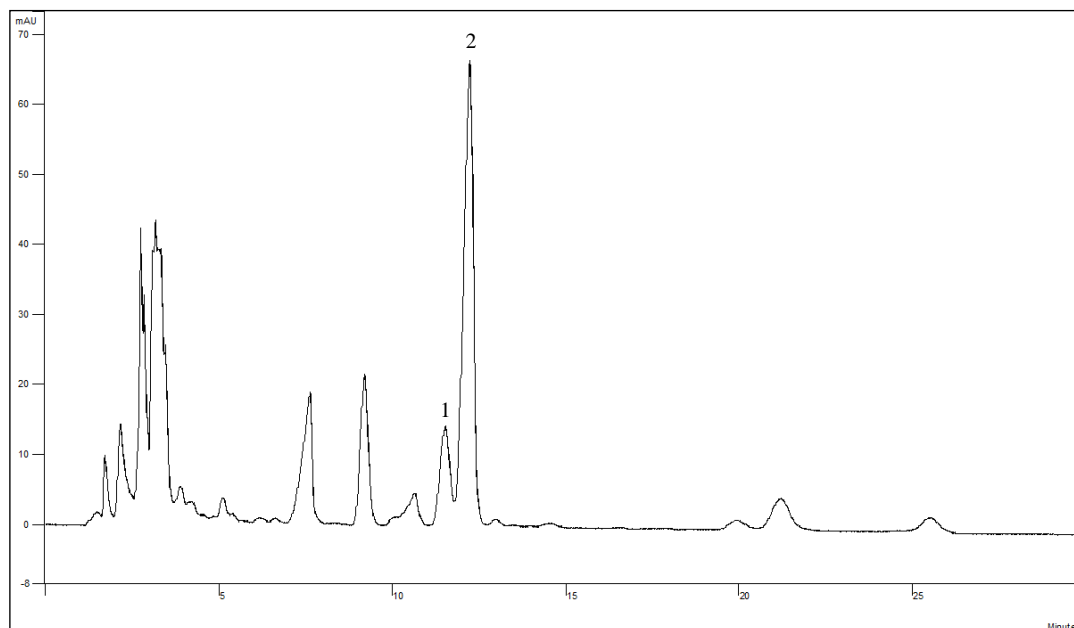


Figure 1. Typical HPLC chromatogram of heather SFE extract. Peaks 1 and 2 correspond, respectively, to oleanolic and ursolic acids.

Additionally, it could be observed from Table 2 that the ratio of oleanolic acid / ursolic acid resulted in values considerably lower than 1 (from 0.14 to 0.43), in the case of extractions with pure CO₂. Unfortunately, no solubility data was found in the literature to support this observed behavior. Nevertheless, this seems to be a reasonable tendency, since ursolic acid is present in heather in higher concentrations than oleanolic acid (oleanolic acid / ursolic acid ratio in heather \approx 0.25). On the contrary, when ethanol is utilized, this ratio becomes very close or greater than 1 and higher concentrations of oleanolic acid with respect to ursolic acid were obtained (oleanolic acid / ursolic acid ratio up to 1.42 in extraction 13b). This result could be related to the higher solubility of oleanolic acid in ethanol in

comparison with ursolic acid solubility (Fan et al., 2011), and is showing a great effect of ethanol as cosolvent in the supercritical extraction, tuning selectivity towards the extraction of oleanolic acid.

Table 2. Content of triterpenic acids identified in heather SFE extracts.

Extract	Oleanolic acid (mg/g extract)	Ursolic acid (mg/g extract)	
1	0.53	16.02	
2	2.36	16.92	
3	3.55	15.49	
4	5.66	18.86	
5	2.49	17.85	
6	5.90	14.31	
7	9.19	21.59	
8	12.41	11.33	
9	69.75	55.57	
10	82.87	141.45	
11	S1	13.50	98.56
	S2	2.53	2.95
12		54.04	38.67
13	First step	1.44	2.19
	Second step	73.14	51.62

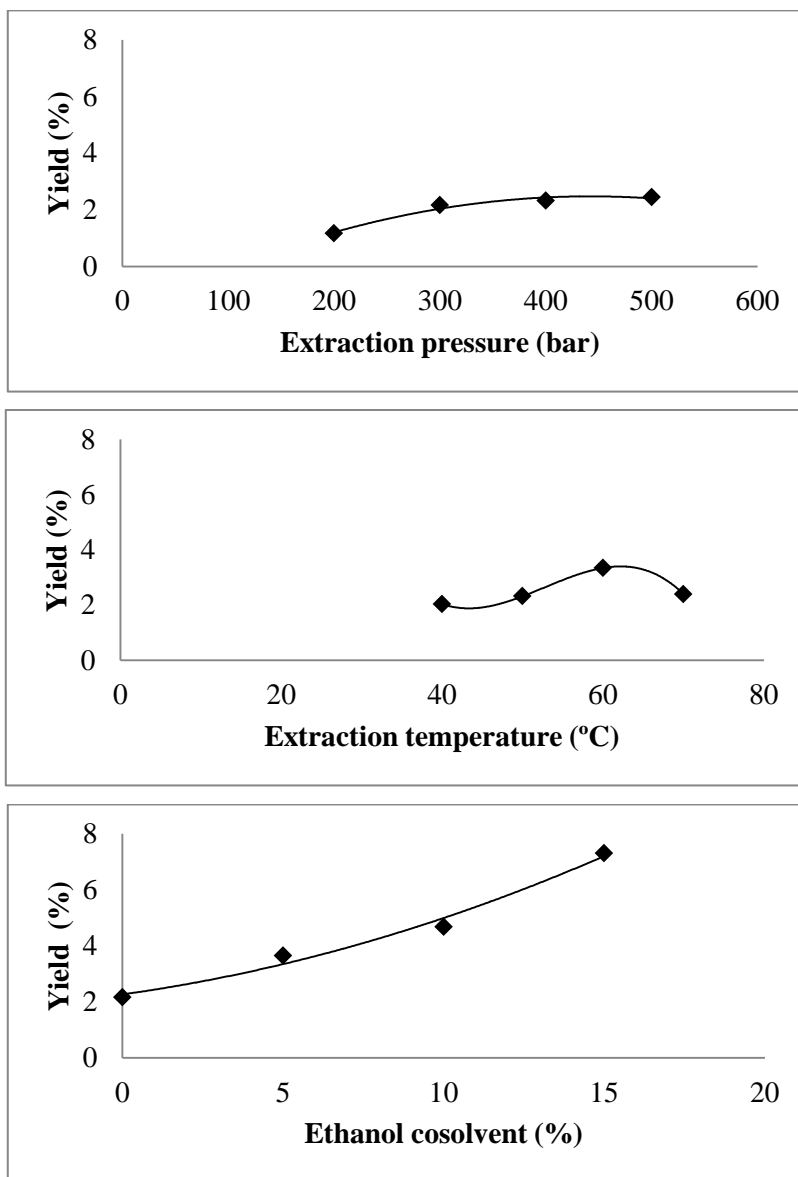


Figure 2. Extraction yields of heather SFE as a function of (a) extraction pressure (50°C, no cosolvent), (b) extraction temperature (40 MPa, no cosolvent) and (c) ethanol cosolvent added to supercritical CO₂ (50°C and 30 MPa). Solid lines: experimental trend.

3.2 Anti-HCV Activity of the Extracts

Previously, Kong et al. (Kong et al., 2013) reported that oleanolic and ursolic acid were able to inhibit the HCV polymerase activity. Considering the high content of oleanolic and ursolic acids found in heather, the anti-HCV activity of heather supercritical extracts produced in this work was evaluated and compared.

All 15 extracts with different contents of oleanolic and ursolic acid, were screened for cellular cytotoxicity and HCV inhibition using the HCV cell culture system (see materials and methods). Moreover, both oleanolic and ursolic compounds were also tested in parallel as controls.

The system uses a full length HCV infectious clone that is able to undergo the complete replication cycle *in vitro*. Cytotoxicity was observed in all extracts at concentrations more than 200 $\mu\text{g/ml}$ and in most extracts at 100 $\mu\text{g/mg}$. Nevertheless, in all cases there was reduction in the viral infectivity in a dose dependent manner at concentrations where cytotoxicity was not observed. In particular, extracts 9 and 13b showed more striking reductions in their infectivity, which coincided with higher levels of oleanolic and ursolic acid (see Figure 3a and Table 2).

To investigate specifically the early steps (viral entry) of the viral life cycle, a luciferase reporter HCV was used. Human hepatoma cells were incubated for 4 hours in the presence of the extracts and virus before washing and replacing with fresh media (Figure 3b). The green tea molecule Epigallocatechin-3-gallate

(EGCG) was used as positive control, as we have previously shown that EGCG inhibits HCV infectivity by blocking the virus entry process (Ciesek et al., 2011). No cytotoxicity was observed at concentrations of 125 $\mu\text{g/ml}$ or less. All extracts showed some inhibition in the HCV infectivity in a dose-dependent manner and 6/15 inhibited at least 50% HCV entry. Again high connection was observed with the inhibition of HCV entry and the concentration of oleanolic and ursolic acid.

To determine whether there was a correlation between the concentration of oleanolic acid or ursolic acid and HCV inhibition, the average infectivity (% of negative control) was represented as a function of the actual amount of oleanolic or ursolic acid utilized in the assays, and calculated as the concentration of each compound for each extract dilution used in the viral entry assay or the complete replication assay. These results are depicted in Figure 4; only extracts which do not exhibit cytotoxicity were included in the representation. As can be observed in Figure 4 although a good correlation was not observed, a certain dependence of the antiviral effect can be attributed to the presence of both ursolic and oleanolic acids, suggesting that both these compounds may have anti-HCV properties. Oleanolic and ursolic acid concentrations correlated more with inhibition of viral entry (Figures 4a and 4c) ($R^2= 0.7948$ and 0.3732 respectively) compared to the inhibition of the full viral lifecycle (Figures 4b and 4c) (oleanolic acid $R^2= 0.2598$ and ursolic acid $R^2= 0.0821$).

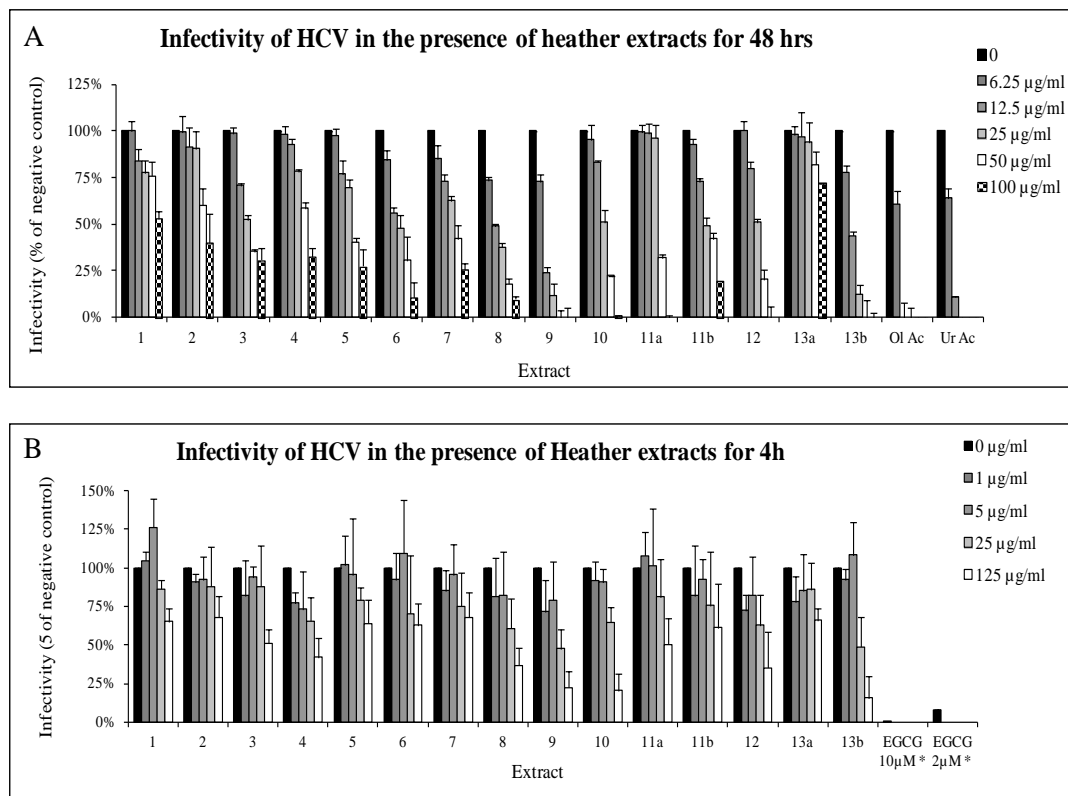


Figure 3. Anti-HCV activity of Heather extracts. (A) Huh7.5 cells were infected with HCVcc at a MOI of 0.03, 5 hours later; each extract was added to the wells in 2-fold dilutions at concentrations 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100µg/ml and incubated for 48 hours. The cells stained for HCV NS5A antibodies and foci forming units were counted and compared to wells without extract (see materials and methods). Percentages were used to calculate HCV inhibition. Standard deviations were calculated from 4 replicates. (*) indicates when cytotoxicity was observed. (B) Huh7.5 cells were inoculated with HCV (JcR2a virus) in the presence of increasing concentration of the extracts. The green tea molecule Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) was used as positive control [23]. The inoculum was removed 4 h later and then monolayers were washed and overlaid with fresh medium containing no inhibitors. Infected cells were lysed 3 days later and Renilla luciferase activity was determined as described [23].

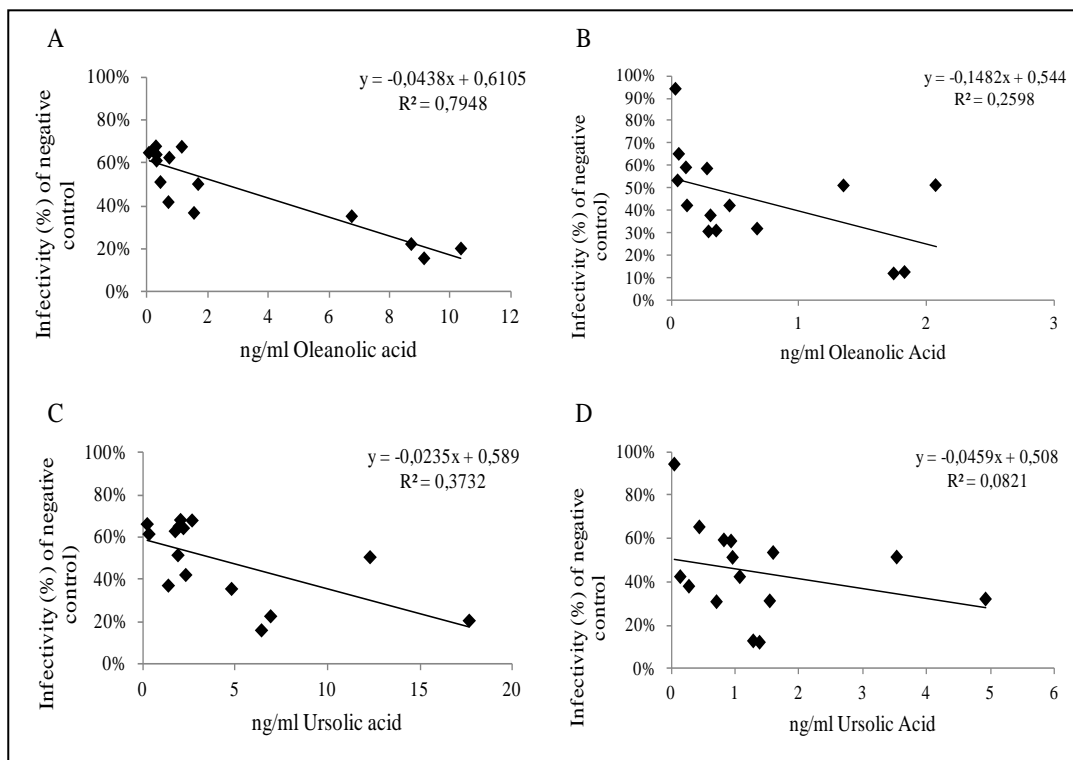


Figure 4. Anti-HCV activity of Oleanolic and Ursolic acids. Concentrations of oleanolic acid (4a, 4b) or ursolic acid (4c, 4d) are plotted against HCV inhibition, for either the 4 h entry assay (4a, 4c) or 48 h full lifecycle assays (4b, 4d). Linear regression analyses are represented in the box at the top right corner of each graph.

Conclusions

Supercritical fluid extraction produced heather extracts with high concentration of triterpenic (oleanolic and ursolic) acids. In this respect, the use of ethanol as cosolvent was crucial. Concentrations up to 80 mg/g of oleanolic acid and 140 mg/g of ursolic acid were attained using 15% ethanol cosolvent, which are significantly higher than those obtained without cosolvent (2-12 mg/g of oleanolic acid and 10-20 mg/g of ursolic acid) despite the extraction pressure (20-50 MPa) or temperature (40-70 °C) applied. Furthermore, the use of ethanol as cosolvent turned the selectivity of the supercritical solvent to favor the extraction of oleanolic acid, despite the lower amount of this triterpenic acid in the vegetal raw matter.

Our results support and extend the recent work of Kong et al, where they investigated HCV antiviral activity in ethyl acetate fractions from the Chinese herb *Fructus Ligustri Lucidi* (FLL). They demonstrated a correlation between fractions containing high concentration of Ursolic and Oleanolic acids and the inhibition of HCV replication and NS5B polymerase activity (Kong et al., 2013). In our study, all 15 Supercritical fluid extractions of heather contained ursolic acid and oleanolic acid and all extracts showed some level anti-HCV activity in a complete life cycle assay. We also tested the extracts in a viral entry assay, which has not been shown before for Ursolic and Oleanolic acid, and remarkably inhibition could also be clearly seen in most of the extracts, suggesting these two compounds may inhibit multiple stages of the HCV life cycle. In agreement with Kong et al, the extracts with higher concentration of ursolic and oleanolic acid showed higher inhibition, and certain dependence of the anti-HCV activity and the presence of ursolic and

oleanolic acid in the extracts was observed. Further studies are required to elucidate the mode of action against this human important virus.

Acknowledges

This work has been supported by project ALIBIRD-S2009/AGR-1469 from Comunidad Autónoma de Madrid. We thank Charles Rice for the Huh7.5 cells, HCVcc and the NS5A MAb 9E10, and Thomas Pietschmann and Esteban Domingo for the use of cell culture equipment.

References

- Anggakusuma, Colpitts, C.C., Schang, L.M., Rachmawati, H., Frentzen, A., Pfaender, S., Behrendt, P., Brown, R.J., Bankwitz, D., Steinmann, J., Ott, M., Meuleman, P., Rice, C.M., Ploss, A., Pietschmann, T., Steinmann, E., 2013. Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells. *Gut*.
- Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Higashihara, H., Ukiya, M., Watanabe, K., Kimura, Y., Hasegawa, J., Nishino, H., 2004. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 68(1), 85-90.
- Calland, N., Dubuisson, J., Rouille, Y., Seron, K., 2012. Hepatitis C virus and natural compounds: a new antiviral approach? *Viruses* 4(10), 2197-2217.
- Checker, R., Sandur, S.K., Sharma, D., Patwardhan, R.S., Jayakumar, S., Kohli, V., Sethi, G., Aggarwal, B.B., Sainis, K.B., 2012. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF-kappaB, AP-1 and NF321 AT. *PLoS one* 7(2), e31318.
- Ciesek, S., von Hahn, T., Colpitts, C.C., Schang, L.M., Friesland, M., Steinmann, J., Manns, M.P., Ott, M., Wedemeyer, H., Meuleman, P., Pietschmann, T., Steinmann, E., 2011. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* 54(6), 1947-1955.
- Fan, J.P., Kong, T., Zhang, L., Tong, S., Tian, Z.Y., Duan, Y.H., Zhang, X.H., 2011. Solubilities of Ursolic Acid and Oleanolic Acid in Four Solvents from (283.2 to 329.7) K. *J Chem Eng Data* 56(5), 2723-2725.

- Filip, G.A., Postescu, I.D., Tatomir, C., Muresan, A., Clichici, S., 2012. *Calluna vulgaris* extract modulates NF-kappaB/ERK signaling pathway and matrix metalloproteinase expression in SKH-1 hairless mice skin exposed to ultraviolet B irradiation. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* 63(4), 423- 432.
- Fofana, I., Jilg, N., Chung, R.T., Baumert, T.F., 2014. Entry inhibitors and future treatment of hepatitis C. *Antiviral research* 104, 136-142.
- Gilead, 2013. US food and drug administration approves gileads sovaldi sofosbuvir for the treatment of chronic hepatitis C. Vol. 2014. Hunt, A.J., 2006. The extraction of high value chemicals from Heather (*Calluna Vulgaris*). Ph.D thesis, University of York.
- Ikeda, Y., Murakami, A., Ohigashi, H., 2008. Ursolic acid: an anti- and pro inflammatory triterpenoid. *Molecular nutrition & food research* 52(1), 26-42.
- Jalal, M., Read, D., Haslam, E., 1982. Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry* 21, 1397-1401.
- Kong, L., Li, S., Liao, Q., Zhang, Y., Sun, R., Zhu, X., Zhang, Q., Wang, J., Wu, X., Fang, X., Zhu, Y., 2013. Oleanolic acid and ursolic acid: novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity. *Antiviral research* 98(1), 44-53.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., Rice, C.M., 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309(5734), 623-626.
- Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of ethnopharmacology* 49(2), 57-68.

- Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A.D., Wiersma, S.T., 2013. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 57(4), 1333-1342.
- Orhan, I., Kupeli, E., Terzioglu, S., Yesilada, E., 2007. Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O-beta-D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. *Journal of ethnopharmacology* 114(1), 32-37.
- Pancost, R.D., Baas, M., van Geel, B., Damste, J.S.S., 358 2002. Biomarkers as proxies for plant inputs to peats: an example from a sub-boreal ombrotrophic bog. *Org Geochem* 33(7), 675-690.
- Perales, C., Beach, N.M., Gallego, I., Soria, M.E., Quer, J., Esteban, J.I., Rice, C., Domingo, E., Sheldon, J., 2013. Response of hepatitis C virus to long-term passage in the presence of alpha interferon: multiple mutations and a common phenotype. *Journal of virology* 87(13), 7593-7607.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.S., Longrich, T., Diehl, S., Ramirez, F., Balla, T., Rohr, K., Kaul, A., Buhler, S., Pepperkok, R., Lengauer, T., Albrecht, M., Eils, R., Schirmacher, P., Lohmann, V., Bartenschlager, R., 2011. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell host & microbe* 9(1), 32-45.
- Saaby, L., Rasmussen, H.B., Jager, A.K., 2009. MAO-A inhibitory activity of quercetin from *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Journal of ethnopharmacology* 121(1), 178-181.

- Simon, A., Najid, A., Chulia, A.J., Delage, C., Rigaud, M., 1992. Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochimica et biophysica acta* 1125(1), 68-72.
- Yan, S.L., Huang, C.Y., Wu, S.T., Yin, M.C., 2010. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24(3), 842-848.
- Zhao, J., 2011. The extraction of high value chemicals from Heather (*Calluna Vulgaris*) and Braken (*Pteridium aquilinum*). Ph.D thesis, University of York.

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

En la búsqueda de compuestos o extractos bioactivos a partir de plantas se han investigado en esta tesis los extractos obtenidos de albahaca, mejorana y romero (familia *Lamiaceae*), espinaca (familia *Amaranthaceae*), caléndula (familia *Asteraceae*) y brezo (familia *Ericaceae*). En la bibliografía existen estudios previos sobre las propiedades bioactivas de estas plantas. Entre las más estudiadas destaca el romero, mientras que el brezo es una de las menos investigadas.

Los extractos se obtuvieron por diversas tecnologías y se analizó, según la planta, el proceso de extracción y/o el disolvente empleado, su composición en compuestos fenólicos, carotenoides y ácidos triterpénicos, buscando una posible relación entre el contenido en estos compuestos y las actividades biológicas (antioxidante, antiinflamatoria y antiviral).

El análisis de la actividad antioxidante de los extractos determinó que las plantas de la familia *Lamiaceae* son las que muestran los mayores valores TEAC, destacando el romero, que tiene una potente actividad antioxidante, muy bien demostrada anteriormente en la bibliografía. Asimismo, los extractos (PLE y SFE) de mejorana y romero presentaron una fuerte correlación lineal entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos, indicando la influencia de estos compuestos en la actividad antioxidante que se les atribuye. En cambio, esta correlación es más dispersa en el caso de los extractos de albahaca. Para las tres plantas, los mayores valores TEAC se obtuvieron para los extractos PLE con agua:etanol (50:50), aunque en el caso del romero y de la espinaca algunos

extractos supercríticos muestran valores similares a los correspondientes extractos PLE.

Aunque con valores TEAC algo menores, los extractos de espinaca también mostraron una actividad antioxidante importante y superior en todos los casos a la de los extractos de caléndula. Además, los valores TEAC de los extractos SFE de espinaca se correlacionaron linealmente con el contenido de carotenoides totales presentes en esta planta ($R^2 = 0.9043$) mientras que esta correlación no se observa en los extractos de caléndula, con un contenido de carotenoides totales muy inferior a los determinados en espinaca.

En base a estos resultados se seleccionaron el romero, por su alto contenido en compuestos fenólicos (ácido carnósico especialmente, y carnosol) y la espinaca, por su alto contenido en carotenoides (principalmente β -caroteno y luteína) para analizar la posibilidad de un efecto sinérgico entre los compuestos fenólicos del romero y los carotenoides de la espinaca.

En la bibliografía existen datos sobre efectos sinérgicos observados, como por ejemplo entre carotenoides y vitamina C [127, 138] entre carotenos y xantofilas [141] y de combinaciones de carotenoides con compuestos terpénicos como el monoterpene terpinoleno [142]. Sin embargo, tan solo existe un estudio previo respecto a posibles efectos sinérgicos entre ácido carnósico y carotenoides. En este estudio, Hadad y colaboradores [291] analizaron de manera específica el efecto antiinflamatorio del ácido carnósico combinado con diferentes carotenoides tales como licopeno, β -caroteno y luteína, encontrando sinergias entre ambos tipos de

compuestos. No existen estudios previos respecto de posibles efectos sinérgicos en la actividad antioxidante del ácido carnósico o carnosol combinados con carotenoides como el β -caroteno o la luteína. La extracción conjunta de plantas constituye un campo interesante de investigación para obtener productos nuevos, hechos a medida, con actividades biológicas diseñadas.

En esta tesis se estudió la extracción de una mezcla de hojas de espinaca y romero (50% de cada planta) y se investigaron los extractos en cuanto a sus propiedades antioxidantes, y en comparación con los extractos obtenidos a partir de las especies separadas. Para los tres lotes, se aplicaron dos técnicas diferentes de extracción: extracción con hexano presurizado (100 y 150 °C) y extracción con CO₂ supercrítico (40 °C, 200 y 300 bar). Estos disolventes fueron elegidos por su capacidad de extraer compuestos con afinidad lipídica, como es el ácido carnósico del romero y los carotenoides de la espinaca.

La actividad antioxidante de las muestras producidas se evaluó con el ensayo ABTS y se compararon los valores TEAC obtenidos para el extracto de romero (R), el extracto de espinaca (E), el extracto de la mezcla romero:espinaca 50:50 (RE) y el extracto obtenido como mezcla (50:50) de los extractos obtenidos por separado (R+E). Los resultados parecían indicar un efecto sinérgico entre los compuestos bioactivos de estas plantas, puesto que se obtuvieron valores TEAC significativamente mayores en RE para todas las técnicas y condiciones de extracción analizadas, con valores mayores que un 20% respecto de los correspondientes a los obtenidos para los extractos R, E y R+E. No obstante, el estudio de los valores TEAC de los carotenoides de la espinaca (β -caroteno y

luteína) y los diterpenos fenólicos del romero (ácido carnósico y carnosol), mezclados en diversas proporciones, conduce a descartar un efecto sinérgico entre estos compuestos (los valores TEAC de las mezclas concuerdan con gran precisión con el valor esperado según las proporciones de la mezcla estudiada). En cambio, se observó un aumento significativo de la concentración de ácido carnósico (10-20% mayores que los valores medios esperados) en las muestras producidas por la extracción simultánea de ambas plantas, lo que podría justificar la mayor actividad antioxidante observada en todos los extractos RE cuando se los compara con los extractos R+E.

Por otro lado, también se investigó la actividad antioxidante de mezclas de extractos de mejorana y espinaca, y no se encontraron sinergias en ninguna de las mezclas ensayadas, ni entre los compuestos puros estudiados (ácido rosmarínico / luteína y ácido rosmarínico / β -caroteno).

Como se mencionó anteriormente, los extractos de espinaca obtenidos con etanol:agua (50:50) y con CO₂ supercrítico (350 bar y 40°C) presentaron valores TEAC similares (0.369 y 0.275 mmol trolox / g extracto, respectivamente), indicando una buena actividad antioxidante en ambos casos. Teniendo en cuenta que las concentraciones más altas de compuestos fenólicos totales y un bajo contenido de carotenoides se observaron en el extracto PLE, mientras que el extracto SFE presentó bajas cantidades de polifenoles totales y la más alta concentración de carotenoides. Se planteó investigar la capacidad antiinflamatoria de estos extractos, sobre un modelo de líneas celulares, con el objetivo de evaluar el efecto de los compuestos fenólicos y de los carotenoides de la espinaca sobre

esta actividad biológica, reconocida y documentada para los extractos de esta planta.

Se observó una pequeña disminución en el nivel de citoquinas TNF- α secretadas por las células activadas en presencia de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto SFE, en comparación con los niveles obtenidos en ausencia de extractos (control positivo). En cambio, no se determinó ninguna disminución significativa en el caso de aplicar 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto PLE. En cuanto a las otras dos citoquinas estudiadas, IL-1 β y IL-6, se observó una disminución del 50% y del 80%, respectivamente, en la secreción de estas citoquinas en presencia del extracto SFE, mientras que el extracto PLE sólo presentó una inhibición del orden del 30% comparado con el control positivo. Por lo tanto, los resultados parecen indicar una actividad antiinflamatoria más alta del extracto SFE comparado con el extracto PLE. Como conclusión se observa que, si bien los compuestos fenólicos y los carotenoides de la espinaca presentaron una buena y similar actividad antioxidante, los carotenoides demostraron una mayor actividad antiinflamatoria en comparación con los compuestos fenólicos de esta planta.

Los estudios sobre la actividad antiinflamatoria y posibles sinergias de los extractos de caléndula, brezo y sus mezclas, se llevaron a cabo utilizando extractos supercríticos de hojas de brezo (*Calluna vulgaris*), flores de caléndula (*Calendula officinalis*) y una mezcla 50:50 de estas matrices vegetales. En general, la disminución en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias observada cuando las células fueron tratadas con los extractos fue moderada, y no se encontró una

relación entre el contenido de ácidos triterpénicos en los extractos con su actividad antiinflamatoria, tanto para el caso de los extractos de brezo como de caléndula.

En las extracciones sin etanol como cosolvente, se observó una disminución respecto de los valores teóricos esperados en la concentración de ácido ursólico y, especialmente, oleanólico en las muestras obtenidas de la extracción conjunta de brezo y caléndula (50% de cada material vegetal). En cambio, utilizando etanol como cosolvente, la concentración de estos ácidos se mantuvo similar o mayor a los valores teóricos esperados. De acuerdo con lo observado para las muestras obtenidas de la extracción de los materiales por separado, tampoco se observó una correlación entre la concentración de ácidos triterpénicos y la actividad antiinflamatoria en los extractos conjuntos. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en la respuesta antiinflamatoria de los extractos puros y de sus mezclas.

Los ensayos de extracción supercrítica de hojas de brezo demostraron que los extractos contienen altas concentraciones de ácido ursólico y oleanólico. Recientemente, se ha publicado en la bibliografía que estos compuestos pueden presentar actividad antiviral contra el virus de la hepatitis C (VHC) [113]. En esta tesis, se evaluó la actividad anti-VHC de los extractos supercríticos de brezo, buscando una correlación con el contenido los ácidos triterpénicos ursólico y oleanólico. Los ensayos de extracción se llevaron a cabo con CO₂ supercrítico, en el rango de presiones de 200 a 500 bar, temperaturas de 40 a 70 °C y 0-15 % de co-disolvente (etanol). Se cuantificó el contenido de ácido oleanólico y ursólico en los

extractos, y se evaluó la citotoxicidad de los extractos y la inhibición de virus utilizando un sistema de cultivo de células infectadas por VHC.

En cuanto al contenido de ácidos triterpénicos, se obtienen las mayores concentraciones utilizando etanol como cosolvente, alcanzando valores de hasta 80 mg / g de ácido oleanólico y 140 mg / g de ácido ursólico con 15 % de etanol. Estas concentraciones son considerablemente superiores a las obtenidas sin cosolvente (2-12 mg / g de ácido oleanólico y 10-20 mg / g de ácido ursólico) independientemente de la presión (200-500 bar) o la temperatura (40-70 °C) de extracción aplicada. Además, cabe destacar que el uso de etanol como cosolvente resultó en una mayor selectividad hacia la extracción de ácido oleanólico, a pesar de la menor cantidad de este ácido triterpénico en la materia prima vegetal.

En cuanto a la actividad anti-VHC, los 15 extractos supercríticos de brezo analizados, mostraron alguna actividad anti-VHC en un ensayo completo del ciclo de vida viral y significativamente superior para aquellos con mayores contenidos de ácidos oleanólico y ursólico. Los resultados de esta tesis apoyan las observaciones de Kong y colaboradores (2013) [113]. También, los extractos mostraron actividad en un ensayo de entrada viral (ensayo no llevado a cabo en estudios previos para los ácidos ursólico y oleanólico) siendo los extractos con mayores contenidos de ácidos triterpénicos los más activos, lo que sugiere que estos dos compuestos pueden actuar principalmente sobre las primeras etapas de infección viral. No obstante, se necesitan más estudios para elucidar el modo de acción contra el virus VHC de estos ácidos triterpénicos y/o de los extractos de brezo.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De los trabajos y resultados obtenidos en el estudio de las propiedades biológicas de extractos de plantas y de los posibles efectos sinérgicos entre los mismos, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. No se encontraron sinergias en ninguna de las mezclas mejorana/espinaca ensayadas, ni entre los compuestos puros (compuestos fenólicos y carotenoides) estudiados.
2. La extracción conjunta de hojas de romero y espinaca, no afecta significativamente el rendimiento global de extracción, pero si la composición del extracto: se reduce la concentración de carotenoides (β -caroteno y luteína) y aumenta la concentración de ácido carnósico. Por tanto, **la mayor actividad antioxidante que presenta el extracto conjunto está relacionada con un aumento de la concentración de ácido carnósico y no es debida a efectos sinérgicos entre los diterpenos fenólicos del romero y los carotenoides de la espinaca.**
3. **Se observó una disminución en la extracción de los ácidos oleanólico y ursólico cuando la extracción de flores de caléndula y hojas de brezo se lleva a cabo de manera conjunta y sin cosolvente, mientras que utilizando etanol como cosolvente la concentración de estos ácidos se mantiene aproximadamente igual (ácido oleanólico) o mayor (ácido ursólico) que los valores medios esperados.** No obstante, no se observó una correlación

directa entre la concentración de estos ácidos y la actividad antiinflamatoria de los extractos, ni se encontraron diferencias significativas en la respuesta antiinflamatoria de los extractos puros y sus mezclas.

4. Los extractos PLE (agua:etanol) y SFE (350 bar y 40°C) de espinaca muestran buena y similar actividad antioxidante, la que puede ser atribuida al contenido de polifenoles o carotenoides, respectivamente. No obstante, se encontró una actividad antiinflamatoria significativamente mayor en el extracto SFE, lo que parece indicar que **los carotenoides de la espinaca presentan una mayor actividad antiinflamatoria que sus compuestos fenólicos.**

5. **El uso de cosolvente (etanol) en la extracción supercrítica de hojas de brezo permite obtener una mayor recuperación de ácidos triterpénicos y afecta la selectividad del proceso hacia la extracción de ácido oleanólico.**

6. **Los extractos supercríticos de brezo presentan actividad anti-VHC y los más concentrados en ácido oleanólico y ursólico producen una reducción en la infectividad más acusada.** Se encontró buena correlación entre la concentración de estos ácidos y la inhibición de la entrada del virus, lo que sugiere que su efecto anti-VHC se produce sobre las primeras etapas de infección.

BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

[1] J. Flandrin y M. Montanari. Historia de la alimentación. Ediciones Trea S.L. 1996.

[2] A. Lasa, J. Miranda, M. Bulló, R. Casas, J. Salas-Salvadó, I. Larretxi, R. Estruch, V. Ruiz-Gutiérrez, M.P. Portillo. Comparative effect of two Mediterranean diets versus a low-fat diet on glycaemic control in individuals with type 2 diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2014. 68 (7), 767-772.

[3] G.R. Wasson, V.J. McKelvey-Martin, C.S. Downes. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis.* 2008. 23 (3), 153-162.

[4] M. Athar, J. Ho Back, X. Tang, K. Ho Kim, L. Kopelovich, D. R. Bickers, A. L. Kim. Resveratrol: A Review of Pre-clinical Studies for Human Cancer Prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007. 224 (3), 274–283.

[5] J. Barona, J. J. Jones, R. E. Kopec, M. Comperatore, C. Andersen, S. J. Schwartz, R. H. Lerman, M. L. Fernandez. A Mediterranean-style low-glycemic-load diet increases plasma carotenoids and decreases LDL oxidation in women with metabolic syndrome. *J. Nutr. Biochem.* 2012. 23, 609–615.

[6] G. Williamson and C. Manach. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005. 81, 243–255.

- [7] I. Astiasarán y A. Martínez. Alimentos, Composición y Propiedades. Mc.Graw-Hill. Interamericana España, 1ª edición. 1999.
- [8] A. E. Sloan. The top 10 functional food trends. Food Technol. 2000. 54, 33-62.
- [9] A. S. Gopalan, C. M. Wai, H. K. Jacobs. Supercritical Carbon Dioxide. Separations and Processes. ACS Symposium Serier 860. Division of Industrial and Engineering Chemistry, Inc. 2003.
- [10] J. Graßmann. Terpenoids as Plant Antioxidants. Vitamins and Hormones. Volumen 72, Capitulo 15. Elsevier Inc. 2005.
- [11] R. M^a Claramunt Vallespí, A. Farrán Morales, C. López García, M. Pérez Torralba, M^a D. Santa María Gutiérrez. Química bioinorgánica y productos naturales. Universidad Nacional de Educación a Distancia. 2013.
- [12] F. Hoffmann, E. Gildemeister, Schimmel and Co. The volatile oils. Volume 1. Ulan Press. 2011.
- [13] W. Sandermann. Naturharze, Terpentinöl, Tallöl. Chemie und Technologie. Springer-Verlag. 1960.
- [14] J. Grassmann, S. Hippeli, E. F. Elstner. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. Plant Physiol. Biochem. 2002. 40, 471-478.

- [15] M.D. Martins, S. Arantes, F. Candeias, M.T. Tinoco, J. Cruz-Morais. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J Ethnopharmacol.* 2014. 151(1), 485-492.
- [16] L. Guerra-Boone, R. Alvarez-Román, R. Salazar-Aranda, A. Torres-Cirio, V.M. Rivas-Galindo, N. Waksman de Torres, G.M. González González, L.A. Pérez-López. Chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils from *Magnolia grandiflora*, *Chrysactinia mexicana*, and *Schinus molle* found in northeast Mexico. *Nat. Prod. Commun.* 2013. 8(1), 135-138
- [17] A. Olapour, K. Behaen, R. Akhondzadeh, F. Soltani, F. Al Sadat Razavi, R. Bekhradi. The Effect of inhalation of aromatherapy blend containing lavender essential oil on cesarean postoperative pain. *Anesth Pain Med.* 2013, 3(1), 203-207.
- [18] J.M. Tankam, M. Ito. Inhalation of the essential oil of *Piper guineense* from Cameroon shows sedative and anxiolytic-like effects in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2013. 36 (10), 1608-1614.
- [19] S.L. Guzmán-Gutiérrez, R. Gómez-Cansino, J.C. García-Zebadúa, N.C. Jiménez-Pérez, R. Reyes-Chilpa. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. *J. Ethnopharmacol.* 2012, 143 (2), 673-679.
- [20] V. Woguem, H.P. Fogang, F. Maggi, L.A. Tapondjou, H.M. Womeni, L. Quassinti, M. Bramucci, L.A. Vitali, D. Petrelli, G. Lupidi, F. Papa, S. Vittori, L.

Barboni. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopiya parviflora*, *Annonaceae*) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. *Food Chem.* 2013. 149, 183-189.

[21] J. Valente, M. Zuzarte, M.J. Gonçalves, M.C. Lopes, C. Cavaleiro, L. Salgueiro, M.T. Cruz. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. *Food Chem. Toxicol.* 2013. 62, 349–354.

[22] L. Espina, D. García-Gonzalo, A. Laglaoui, B.M. Mackey, R. Pagán. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* 2013. 161 (1), 23-30.

[23] Tyagi AK, Gottardi D, Malik A, Guerzoni ME. Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays. *Food Chem.* 2013, 137 (1-4) 108-14.

[24] J. Yun, X. Fan, X. Li. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and quality maintenance of cherry tomatoes treated with gaseous essential oils. *J Food Sci.* 2013. 78(3), 458-464.

[25] M. F. Ortuño Sánchez. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ediciones Aiyana. 2006.

- [26] T. Fornari, G. Vicente, E. Vázquez, M. R. García-Risco, G. Reglero. Review. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr A*. 2012. 1250, 34–48.
- [27] A. Martínez M. Aceites esenciales. Facultad de Química farmacéutica. Universidad de Antioquia. 2001.
- [28] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar. Biological effects of essential oils. A review. *Food Chem. Toxicol.* 2008. 46, 446–475.
- [29] N. Dudareve, E. Pichersky, J. Gershenzon. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 2004. 135, 1893–1902.
- [30] P. W. Pare, J. H. Tumlinson. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* 1999. 121, 325–331.
- [31] M. Wink, B. Latz-Brüning. Allelopathic properties of alkaloids and other natural products: Possible mode of action. In “organisms, processes and applications”. Vol. 582. 117–126. Am. Chem. Soc. Symp. Washington DC. 1995.
- [32] E. L. Singsaas, M. Lerdau, K. Winter, T. D. Sharkey. Isoprene increases thermotolerance of isoprene emitting species. *Plant Physiol.* 1997. 115, 1413–1420.

- [33] V. Masotti, F. Juteau, J.M. Bessi re, J. Viano. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51, 7115–7121.
- [34] A. Angioni, A. Barra, V. Coroneo, S. Dessi, P. Cabras Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 4364–4370.
- [35] K. A. Khalid, J. A. Teixeira da Silva. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. *Sci. Hort.* 2010. 126, 297–305.
- [36] D. Manns. Linalool and cineole type glucosides from *Cunila spicata*. *Phytochemistry.* 1995. 39 (5), 1115-1118.
- [37] B. Vanaclocha, S. Ca nigueral. *Fitoterapia. Vadem cum de prescripci n.* Elsevier. 4^a edici n. 2003.
- [38] G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 2005. 91, 621–632.

- [39] T. Iqbal, A. Ijaz Hussain, S. Ali Shahid Chatha, S. Ali Raza Naqvi, T. Hussain Bokhari. Antioxidant activity and volatile and phenolic profiles of essential oil and different extracts of wild mint (*Mentha longifolia*) from the pakistani flora. *Journal of Anal. Meth. Chem.* 2013. 1-6.
- [40] L. Valgimigli. Essential oils as natural food additives: composition, applications, antioxidant and antimicrobial properties. NOVA Publisher. 2012.
- [41] M. Keshvari, S. Asgary, A. Jafarian-dehkordi, S. Najafi, S. Mojtaba Ghoreyshi-Yazdi. Preventive effect of cinnamon essential oil on lipid oxidation of vegetable oil. *ARYA Atheroscler.* 2013. 9 (5), 280-286.
- [42] R. Chovanová, M. Mikulášová, Š. Vaverková. In vitro antibacterial and antibiotic resistance modifying effect of bioactive plant extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Microbiol.* 2013. 1-7.
- [43] S. Sugumar, V. Ghosh, M. Joyce Nirmala, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. *Ultrason. Sonochem.* 2013. 21 (3), 1044-1049.
- [44] K. Pandima Devi, S. Arif Nisha, R. Sakthivel, S. Karutha Pandian. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.* 2010. 130, 107–115.

- [45] H. Si1, J. Hu, Z. Liu, Z. Zeng. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2008. 53, 190–194.
- [46] E. De Falco, E. Mancini, G. Roscigno, E. Mignola, O. Taglialatela-Scafati, Felice Senatore. Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under different growth conditions. Molecules. 2013, 18, 14948-14960.
- [47] B. Prakash, R. Shukla, Pr. Singh, A. Kumar, P. Kumar Mishra, N. Kishore Dubey. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. Int. J. Food Microbiol. 2010. 142, 114–119.
- [48] A. Kedia, B. Prakash, P. K. Mishra, N.K. Dubey. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. Int. J. Food Microbiol. 2014. 168–169, 1–7.
- [49] V. Ghosh, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage. Colloids Surfaces B. 2014. 114, 392-397.
- [50] M. Sharma, C. Levenson, R. H. Bell, S. A. Anderson, J. B. Hudson, C. C. Collins, M. E. Cox. Suppression of lipopolysaccharide-stimulated

cytokine/chemokine production in skin Cells by sandalwood oils and purified α -santalol and β -santalol. *Phytother. Res.* 2014. 28 (6), 925-932.

[51] H. Maeda, M. Yamazaki, Y. Katagata. Kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil inhibits LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013. 77 (3), 482-486.

[52] M. Nadjib Boukhatem, A. Kameli, M. Amine Ferhat, F. Saidi, M. Mekarnia. Rose geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs. *Libyan J. Med.* 2013. 8, 22520.

[53] Y. Zu, H. Yu, L. Liang, Y. Fu, T. Efferth, X. Liu, N. Wu. Activities of ten essential oils towards propionibacterium acnes and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules.* 2010, 15, 3200-3210.

[54] V. Cardile, A. Russo, C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, N. Apostolides Arnold, F. Piozzi. Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *J. Ethnopharmacol.* 2009. 126, 265–272.

[55] L. Ait M'Barek, H. Ait Mouse, A. Jaâfari, R. Aboufatima, A. Benharref, M. Kamal, J. Bénard, N. El Abbadi, M. Bensalah, A. Gamouh, A. Chait, A. Dalal, A. Ziad. Cytotoxic effect of essential oil of thyme (*Thymus broussonettii*) on the IGR-OV1 tumor cells resistant to chemotherapy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007. 40, 1537-1544.

- [56] R. Beklem Bostancıođlu, M. Kurkcuođlu, K. Hüsñü Can Baser, A. Tansu Koparal. Assessment of anti-angiogenic and anti-tumoral potentials of *Origanum onites* L. essential oil. *Food Chem. Toxicol.* 2012. 50, 2002–2008.
- [57] W. Wang, N. Li, M. Luo, Y. Zu, T. Efferth. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules.* 2012. 17, 2704-2713.
- [58] V. Lanzotti. Diterpenos for therapeutic use. Natural product. *Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes.* Ed. Springer Berlin Heidelberg. 2013.
- [59] A. C. Carvalho, A. C. Gomes, C. Pereira-Wilson, C. F. Lima. Redox-dependent induction of antioxidant defenses by phenolic diterpenes confers stress tolerance in normal human skin fibroblasts: Insights on replicative senescence. *Free Radic. Biol. Med.* 2015. 83, 262-272.
- [60] K. S. Chun, J. Kundu, I. G. Chae, J. K. Kundu. Carnosol: a phenolic diterpene with cancer chemopreventive potential. *J. Cancer Prev.* 2014. 19 (2), 103-110.
- [61] C. W. Tsai, K. L. Liu, Y. R. Lin, W. C. Kuo. The mechanisms of carnosic acid attenuates tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014. 58 (4), 654-64.

- [62] D. Poeckel, C. Greiner, M. Verhoff, O. Rau, L. Tausch, C. Hörnig, D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavec, O. Werz. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 2008. 76, 91–97.
- [63] Kai-Cheng Lian, Jing-Jing Chuang, Chia-Wen Hsieh, Being-Sun Wung, Guan-Da Huang, Ting-Yan Jian, Yung-Wei Sun. Dual mechanisms of NF- κ B inhibition in carnosol-treated endothelial cells. *Toxicol. App. Pharm.* 2010. 245. 21–35.
- [64] H.Linde. Ein neues diterpen aus *Salvia officinalis* L. und eine notiz zur konstitution von pikrosalvin. *Helv. Chim. Acta.* 1964. 47, 1234-1239.
- [65] E.Wenkert, A. Fuchs, J. D. McChesney. Chemical artifacts from the family *Labiatae*. *J. Org. Chem.* 1965. 30, 2931-2934.
- [66] S. Birtic, P. Dussort, F. X. Pierre, A. C. Bily, M. Roller. Carnosic acid. *Phytochemistry.* 2015. 115, 9-19.
- [67] K. Bruckner, D. Božić, D. Manzano, D. Papaefthimiou, I. Pateraki, U. Scheler, A. Ferrer, R. C. de Vos, A. Tissier. Characterization of two genes for the biosynthesis of abietane-type diterpenes in rosemary *Rosmarinus officinalis* glandular trichomes. *Phytochemistry.* 2014. 101, 52-64.

- [68] K. Schwarz, W. Ternes, E. Schmauderer. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1992. 195, 104-107.
- [69] M. E. Cuvelier, H. Richard, C. Berset. Antioxidant activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996. 73, 645-652.
- [70] J. DoÈrrie, K. Sapala, S. J. Zunino. Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells. *Cancer Lett.* 2001. 170, 33-39.
- [71] Shiu-Chen Huang, Chi-Tang Ho, Shoei-Yn Lin-Shiau, Jen-Kun Lin. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappaB and c-Jun. *Biochem. Pharmacol.* 2005. 69, 221-232.
- [72] J. J. Johnson. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Lett.* 2011. 305, 1-7.
- [73] M. González-Vallinas, S. Molina, G. Vicente, A. de la Cueva, T. Vargas, S. Santoyo, M. R. García-Risco, T. Fornari, G. Reglero, A. Ramírez de Molina. Antitumor effect of 5 fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacol. Res.* 2013. 72, 61-68.

[74] G. Vicente, S. Molina, M. González-Vallinas, M. R. García-Risco, T. Fornari, G. Reglero, A. Ramírez de Molina. Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. *J. Supercrit. Fluids*. 2013. 79. 101–108.

[75] S. Manoharan, M. Selvan, V. Selvan, S. Silvan, N Baskaran, A Kumar Singh, V. Vinoth Kumar. Carnosic acid: A potent chemopreventive agent against oral carcinogenesis. *Chem. Biol. Interact.* 2010. 188, 616–622.

[76] O. I. Aruoma, B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Löliger. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*. 1992. 22 (2), 257-268.

[77] A. López-Jiménez, M. García-Caballero, M. Ángel Medina, A. R. Quesada. Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur. J. Nutr.* 2013. 52, 85-95.

[78] T. Kayashima, K. Matsubara. Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. *Biosci. Biotech. Bioch.* 2012. 76, 115-119.

[79] A. López-Jiménez, M. García-Caballero, M. A. Medina, A. R. Quesada. Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur. J. Nutr.* 2013. 52 (1), 85-95.

- [80] S. K. Parmar, T. P. Sharma, V. B. Airao, R. Bhatt, R. Aghara, S. Chavda, S. O. Rabadiya, A. P. Gangwal. Neuropharmacological effects of triterpenoids. *Phytopharmacology*. 2013. 4 (2), 354-372.
- [81] R. Xu, G. C. Fazio, S. P. T. Matsuda. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*. 2004. 65, 261-291.
- [82] J. Pollier, A. Goossens. Molecules of Interest. Oleanolic acid. *Phytochemistry*. 2012. 77, 10–15.
- [83] A. Szakiel, C. Pączkowski, H. Koivuniemi, S. Huttunen. Comparison of the triterpenoid content of berries and leaves of lingonberry *Vaccinium vitis-idaea* from Finland and Poland. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 4994–5002.
- [84] E. Lesellier, E. Destandau, C. Grigoras, L. Fougère, C. Elfakir. Fast separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector. *J. Chromatog. A.* 2012. 1268, 157– 165.
- [85] J. Zhao. The extraction of high value chemicals from heather (*Calluna vulgaris*) and bracken (*Pteridium aquilinum*). Thesis, The University of York. 2011.
- [86] P. Yogeewari, D. Sriram Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties. *Curr. Med. Chem.* 2005. 12, 657-666.

- [87] M. I. Razborsěk, D. Brodnjak Voncřina, V. Dolecěk, E. Voncřina. Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in *Lamiaceae* and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia*. 2008. 67,433-440.
- [88] E. Lesellier, E. Destandau, C. Grigoras, L. Fougère, C. Elfakir. Fast separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector. *J. Chromatogr. A*. 2012. 1268, 157– 165.
- [89] J. Joo Yoon, Y. Jung Lee, J. Sook Kim, D. Gill Kang, H. Sub Lee. Protective role of betulinic acid on TNF-a-induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 2010. 391, 96–101.
- [90] M. A. Nader, H. N. Baraka. Effect of betulinic acid on neutrophil recruitment and inflammatory mediator expression in lipopolysaccharide-induced lung inflammation in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012. 46, 106–113.
- [91] Y. Sun, C. Song, H. Viernstein, F. Unger, Z. Liang. Apoptosis of human breast cancer cells induced by microencapsulated betulínico acid from sour jujube fruits through the mitochondria transduction pathway. *Food Chem.* 2013. 138, 1998–2007.
- [92] D. Kumar, S. Mallick, J. R. Vedasiromoni, B. C. Pal. Anti-leukemic activity of *Dillenia indica* L. fruit extract and quantification of betulinic acid by HPLC. *Phytomedicine*. 2010. 17, 431–435.

- [93] M. Jain, R. Kapadia, R. N. Jadeja , M. C. Thounaojam , R. V. Devkar , S. H. Mishr. Hepatoprotective potential of *Tecomella undulata* stem barkis partially due to the presence of betulínico acid. *J. Ethnopharmacol.* 2012. 143, 194–200.
- [94] Z. Dang, K. Qian, P. Ho, L. Zhu, K. Lee, L. Huang, C. Chen. Synthesis of betulinic acid derivatives as entry inhibitors against HIV-1 and bevirimat-resistant HIV-1 variants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012. 22, 5190–5194.
- [95] P. Yogeewari, D. Sriram. Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. *Curr. Med. Chem.* 2005.12, 657-666.
- [96] J. Pollier, A. Goossens. Molecules of interest. Oleanolic acid. *Phytochemistry* 77 (2012) 10–15.
- [97] J. Liu, Y. Lu, Y. Zhang, K. Connie Wu, F. Fan, C. D. Klaassen. Oleanolic acid alters bile acid metabolism and produces cholestatic liver injury in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013. 272, 816–824.
- [98] B. Chakravarti, R. Maurya, J. Akhtar Siddiqui, H. Kumar Bid, S. M. Rajendran, P. Yadav, R. Konwar. In vitro anti-breast cáncer activity of ethanolic extract of *Wrightia tomentosa*: Role of pro-apoptotic effects of oleanolic acid and urosolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 2012. 142, 72–79.

- [99] Q. Liu, H. Liu, L. Zhang, T. Guo, P. Wang, M. Geng, Y. Li. Synthesis and antitumor activities of naturally occurring oleanolic acid triterpenoid saponins and their derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2013. 64, 1-15.
- [100] J. Kyeong Choi, H. Oh, S. Lee, J. Park, D. Khang, S. Woong Lee, W. Song Lee, M. Rho, S. Kim. Oleanolic acid acetate inhibits atopic dermatitis and allergic contact dermatitis in a murine model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013. 269, 72–80.
- [101] D. da Silva Ferreira, V. Rodrigues Esperandim, M. P. Alonso Toldo, C. Collins Kuehn, J. Clóvis do Prado Júnior, W. R. Cunha, M. L. Andrade e Silva, S. de Albuquerque. *In vivo* activity of ursolic and oleanolic acids during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.* 2013. 134, 455–459.
- [102] J. L. Ríos. Effects of triterpenes on the immune system. *J. Ethnopharmacol.* 2010. 128, 1–14.
- [103] H. Kim, H. Sung, M. Soo Kim, J. Kim, M. Kang, J. Gong, H. Park, Y. Kang. Oleanolic acid suppresses resistin induction in adipocytes by modulating Tyk-STAT signaling. *Nutr. Res.* 2013. 33, 144–153.
- [104] S. Tsai, M. Yin. Anti-oxidative, anti-glycative and anti-apoptotic effects of oleanolic acid in brain of mice treated by D-galactose. *Eur. J. Pharmacol.* 2012. 689, 81–88.

- [105] X. Wang, R. Liu, W. Zhang, X. Zhang, N. Liao, Z. Wang, W. Li, X. Qin, C. Hai. Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013. 376, 70–80.
- [106] Y. Ikeda, A. Murakami, H. Ohigashi. Ursolic acid: An anti- and pro inflammatory triterpenoid. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008. 52, 26–42.
- [107] N. Suh, T. Honda, H. J. Finlay, A. Barchowsky. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.* 1998. 58. 717–723.
- [108] S. Y. Ryu, M. H. Oak, S. K. Yoon, D. I. Cho, G. S. Yoo, T. S. Kim, K. M. Kim. Antiallergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Med.* 2000. 66 (4), 358–360.
- [109] R. Checker, S. K. Sandur, D. Sharma, R. S. Patwardhan, S. Jayakumar, V. Kohli, G. Sethi, B. B. Aggarwal, K. B. Sainis. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS ONE.* 2012. 7 (2).
- [110] S. Yan, C. Huang, S. Wu, M. Yin. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicol. in Vitro.* 2010. 24, 842–848.

- [111] S. Fontanay, M. Grare, J. Mayer, C. Finance, R. E. Duval. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *J. Ethnopharmacol.* 2008. 120, 272–276.
- [112] R. Saravanan, P. Viswanathan, K. Viswanathan Pugalendi. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life Sci.* 2006. 78 (7), 713–718.
- [113] L. Kong, S. Li, Q. Liao, Y. Zhang, R. Sun, X. Zhu, Q. Zhang, J. Wang, X. Wu, X. Fang, Y. Zhu. Oleanolic acid and ursolic acid: Novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity. *Antivir. Res.* 2013. 98, 44–53.
- [114] D. B. Rodriguez-Amaya. Critical review. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *J. Food Compos. Anal.* 2010. 23, 726–740.
- [115] S. Kishimoto, T. Maoka, K. Sumitomo, A. Ohmiya. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005. 69, 2122–2128.
- [116] A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, H. S. Costa. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *J. Food Compos. Anal.* 2006. 19, 97–111.
- [117] E. Bakó, J. Delia, G. Tóth. HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2002. 53, 241–250.

- [118] C. H. Chang, H. Y. Lin, C. Y. Chang, Y. C. Liu. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *J. Food Eng.* 2006. 77, 478–485.
- [119] S. Siriamornpun, O. Kaisoon, N. Meeso. Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, β -carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *J. Funct. Foods.* 2012. 4, 757–766.
- [120] A. Bunea, M. Andjelkovic, C. Socaciu, O. Bobis, M. Neacsu, R. Verhé, J. Van Camp. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L). *Food Chem.* 2008. 108, 649–656.
- [121] R. Aparicio-Ruiz, M. I. Mínguez-Mosquera, B. Gandul-Rojas. Thermal degradation kinetics of lutein, β -carotene and β -cryptoxanthin in virgin olive oils. *J. Food Compos. Anal.* 2011. 24, 811–820.
- [122] F. Khachik. Distribution of Carotenoids in Foods. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Maryland, College Park, Maryland, USA 20742. Carotenoids Society.
- [123] C. Roberta Malacrida. Tesis: Caracterización de aceites extraídos de semillas de frutas: composición de ácidos grasos, tocoferoles y carotenoides. São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. 2009.

[124] D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. HarvestPlus Tech. Monograph. 2004.

[125] A. Martínez Martínez. Carotenoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 2003.

[126] A. J. Young, G. M. Lowe. Minireview. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Arch. Biochem. Biophys. 2001. 385 (1), 20-27.

[127] R. Edge, D. J. McGarvey, T. G. Truscott. The carotenoids as anti-oxidant. A review. J. Photoch. Photobi. B. 1997. 41, 189-200.

[128] C. S. Foote, W. R. Denny. Chemistry of singlet oxygen VII Quenching by β -carotene. J Amer. Chem. Soc, 1968. 90, 6233–6235.

[129] J. Pokorny. N. Yanishlieva, M. Gordon. Antioxidants in foods. Woodhead Publishing. 2001.

[130] A.V. Rao, L.G. Rao. Carotenoids and human health. Pharmacol. Res. 2007. 55, 207–216.

[131] J. Barona, J. J. Jones, R. E. Kopec, M. Comperatore, C. Andersen, S. J. Schwartz, R. H. Lerman, M. L. Fernandez. A Mediterranean-style low-glycemic-load diet increases plasma carotenoides and decreases LDL oxidation in women with metabolic syndrome. J. Nutr. Biochem. 2012. 23, 609–615.

- [132] J. Karppia, T. Nurmia, S. Kurla, T. H. Rissanenb, K. Nyysönen. Lycopene, lutein and β -carotene as determinants of LDL conjugated dienes in serum. *Atherosclerosis*. 2010. 209, 565–572.
- [133] L. Kohlmeier, S. B. Hastings. Epidemiologic evidence of role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995. 62 (6), 1370-1376.
- [134] S. Voutilainen, T. Nurmi, J. Mursu, T. H Rissanen. Carotenoids and cardiovascular health. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006. 83, 1265–1271.
- [135] N. I. Krinsky. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*. 2001. 17, 815– 817.
- [136] E. Miquel Becker, G. Ntouma, L. H. Skibsted. Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organization. *Food Chem.* 2007. 103, 1288–1296.
- [137] R. Hait-Darshan, S. Grossman, M. Bergman, M. Deutsch, N. Zurgil. Synergistic activity between a spinach-derived natural antioxidant (NAO) and commercial antioxidants in a variety of oxidation systems. *Food Res. Int.* 2009. 42, 246–253.
- [138] M. Burkea, R. Edgea, E. J. Landb, T. G. Truscott. Characterisation of carotenoid radical cations in liposomal environments: interaction with vitamin C. *J. Photoch. Photobi. B.* 2001. 60, 1–6.

- [139] W. Stahl, H. Sies. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* 2003. 24, 345–351.
- [140] A. Mortensen, L. H. Skibsted. Importance of carotenoid structure in radical scavenging reactions. *J. Agric. Food Chem.* 1997. 45, 2970–2977.
- [141] J. Liang, Y. Tian, F. Yang, J. Zhang, L. H. Skibsted. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chem.* 2009. 115, 1437–1442.
- [142] J. Graßmann, S. Hippeli, R. Spitzenberger, E.F. Elstner. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and β -carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytomedicine.* 2005. 12, 416–423.
- [143] V. Böhm, N. L. Puspitasari-Nienaber, M. G. Ferruzzi, S. J. Schwartz. Trolox Equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* 2002. 50, 221–226.
- [144] L. Mueller, V. Boehm. Antioxidant activity of β -carotene compounds in different *in vitro* assays. *Molecules.* 2011. 16, 1055–1069.
- [145] J. Karppi, T. Nurmi, S. Kurl, T. H. Rissanen, K. Nyyssönen. Lycopene, lutein and β -carotene as determinants of LDL conjugated dienes in serum. *Atherosclerosis.* 2010. 209, 565–572.

- [146] H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 2004. 58, 100–110.
- [147] H. Nishino, M. Murakoshi, H. Tokuda, Y. Satomi. Cancer prevention by carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 2009. 483, 165–168.
- [148] D. A. Hughes. Dietary carotenoids and human immune function. *Nutrition.* 2001. 17, 823– 827.
- [149] M. S. Santos, S.N. Meydani, L. Leka, D. Wu, N. Fotouhi, M. Meydani, C.H. Hennekens, J.M. Gaziano. Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by beta-carotene supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996. 64, 772.
- [150] P. Ganesan, K. Noda, Y. Manabe, T. Ohkubo, Y. Tanaka, T. Maoka, T. Sugawara, T. Hirata. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011. 1810, 497–503.
- [151] S. Bhagavathy, P. Sumathi, M. Madhushree. Antimutagenic assay of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* using *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA102. *Asian Pac. J. Tropical Disease.* 2011. 308-316.

- [152] O. Politeo, M. Jukic, M. Milos. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chem.* 2007. 101, 379–385.
- [153] A. I. Hussain, F. Anwar, S. T. Hussain Sherazi, R. Przybylski. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem.* 2008. 108, 986-995.
- [154] S. Lee, K. Umamo, T. Shibamoto, K. Lee. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.* 2005. 91, 131–137.
- [155] M. C. Díaz-Maroto, M. S. Pérez-Coello, M. D. Cabezudo. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices. Comparison with simultaneous distillation–extraction. *J. Chromatogr. A.* 2002. 947. 23–29.
- [156] A. Menaker, M. Kravets, M. Koel, A. Orav. Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs. *C. R. Chimie.* 2004. 7, 629–633.
- [157] P. F. Leal, N. B. Maia, Q. A. C. Carmello, R. R. Catharino, M. N. Eberlin, M. A. A. Meireles. Sweet Basil (*Ocimum basilicum*) extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE): global yields, chemical composition, antioxidant activity, and estimation of the cost of manufacturing. *Food Bioprocess Technol.* 2008. 1, 326-338.

- [158] W. B. Phippen, J. E. Simon. Anthocyanins in basil (*Ocimum basilicum* L.). J. Agric. Food Chem. 1998. 46, 1734-1738.
- [159] C. Jayasinghe, N. Gotoh, T. Aoki, S. Wada. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) J. Agric. Food Chem. 2003. 51, 4442-4449.
- [160] C. Proestos, N. Chorianopoulos, G.-J. E. Nychas, M. Komaitis. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. J. Agric. Food Chem. 2005. 53, 1190-1195.
- [161] J. Lee, C. F. Scagel. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. Food Chem. 2009. 115, 650–656.
- [162] P. M. Nguyen, E. M. Kwee, E. D. Niemeyer. Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. Food Chem. 2010. 123, 1235–1241.
- [163] M. Suhaj. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: A review. J. Food Compos. Anal. 2006. 19, 531–537.
- [164] E. Reverchon. Fractional marjoram separation of SCF extracts from leaves: Mass transfer and optimization. J. Supercrit. Fluids. 1992. 5, 256-261.

[165] M. R. A. Rodrigues, E. B. C. Jonathan G. dos Santos, C. Dariva, J. Vladimir Oliveira. The effects of temperature and pressure on the characteristics of the extracts from high-pressure CO₂ extraction of *majorana hortensis* Moench. *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51, 453-456.

[166] E. Vági, B. Simándi, Á. Suhajda, É. Héthelyi. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Res. Int.* 2005. 38, 51–57.

[167] M.M. Jiménez-Carmona, J.L. Ubera, M.D. Luque de Castro. Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil. *J. Chromatogr. A.* 1999. 855, 625–632.

[168] M.B. Hossain, C. Barry-Ryan, A.B. Martin-Diana, N.P. Brunton. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem.* 2011. 126, 339–346.

[169] M. E. Komaitis Composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.). *Food Chem.* 1992. 45, 117-118.

[170] T. M. Capuano. «Las huellas de otro texto médico en Don Quijote: Las virtudes del romero.». *Romance Notes* 45 (3), 303-310. 2005.

- [171] G. Vicente, M. R. García-Risco, T. Fornari, G. Reglero. Isolation of carsonic acid from rosemary extracts using semi-preparative supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 2013. 1286, 208-215.
- [172] F. J. Señoráns, E. Ibañez, S. Cavero, J. Tabera, G. Reglero. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *J. Chromatogr. A*. 2000. 870, 491-499.
- [173] M. R. García-Risco, E. J. Hernández, G. Vicente, T. Fornari, F. J. Señoráns, G. Reglero. Kinetic study of pilot-scale supercritical CO₂ extraction of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *J. Supercrit. Fluids*. 2011. 55 (3), 971-976.
- [174] T. Fornari, A. Ruiz-Rodriguez, G. Vicente, E. Vázquez, M. R. García-Risco, G. Reglero. Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from *Lamiaceae* family. *J. Supercrit. Fluids*. 2012. 64, 1-8.
- [175] O. Bensebia, D. Barth, B. Bensebia, A. Dahmani. Supercritical CO₂ extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modelling. *J. Supercrit. Fluids*. 2009. 49 (2), 161-166.
- [176] R. N. Carvalho Jr., L. S. Moura, P. T.V. Rosa, M. A. A. Meireles. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *J. Supercrit. Fluids*. 2005. 35 (3), 197-204.

[177] I. Borrás Linares, D. Arraez-Roman, M. Herrero, E. Ibañez, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez. Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2011. 1218, 7682–7690.

[178] M. Herrero, M. Plaza, A. Cifuentes, E. Ibañez. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J. Chromatogr. A*. 2010. 1217 (16), 2512-2520.

[179] M. Herrero, D. Arráez-Román, A. Segura, E. Kenndler, B. Gius, M. A. Raggi, E. Ibañez, A. Cifuentes. Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. *J. Chromatogr. A*. 2005. 1084 (1–2), 54-62.

[180] E. Ibañez, A. Kubátová, F. J. Señoráns, S. Cavero, G. Reglero, S. B. Hawthorne. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J. Agric. Food Chem*. 2003. 51, 375-382.

[181] M. Jacotet-Navarro, N. Rombaut, A.-S. Fabiano-Tixier, M. Danguien, A. Bily, F. Chemat. Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from rosemary. *Ultrason. Sonochem*. 2015. 27, 102–109.

- [182] S. Rodríguez-Rojo, A. Visentin, D. Maestri, M.J. Cocero. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J. Food Eng.* 2012. 109, 98–103.
- [183] R. Fonnegra G., S. L. Jiménez R. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. 2007.
- [184] J. C. Chalchat, R. Ph. Garry, A. Michet. Chemical composition of essential oil of *Calendula Officinalis* L. (Pot marigold). *Flavour Frag. J.* 1991. 6, 189-192.
- [185] L. Petrovic, Z. Lepojevic, V. Sovilj, D. Adamovic, V. Tesevic. An investigation of CO₂ extraction of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Serb. Chem. Soc.* 2007. 72 (4), 407–413.
- [186] K. A. Khalid, J. A. Teixeira da Silva. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. *Sci. Hortic-Amsterdam.* 2010. 126, 297–305.
- [187] O. O. Okoh, A. P. Sadimenko, O. T. Asekun, A. J. Afolayan. The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. *Afr. J. Biotechnol.* 2008. 7 (10), 1500-1502.
- [188] G. S. Cetkovic, S. M. Djilas, J. M. Canadanovic-Brunet, V. T. Tumbas. Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Res. Int.* 2004. 37, 643–650.

- [189] M. Hamburger, D. Baumann and S. Adler. Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants—Effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochem. Anal.* 2004. 15, 46–54.
- [190] Y. Gong, X. Liu, W. He, H. Xu, F. Yuan, Y. Gao. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. *Fitoterapia.* 2012. 83, 481–489.
- [191] J. L. Navarrete-Bolaños, C. L. Rangel-Cruz, H. Jiménez-Islas, E. Botello-Alvarez, R. Rico-Martínez. Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. *Food Res. Int.* 2005. 38 (2), 159-165.
- [192] R. Delia Loggia, A. Tubaro, S. Sosa, H. Becker, Sto Saar, O. Isaac. The role of triterpenoids in the topical antiInflarnmatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 1994. 60, 516- 520.
- [193] K. Zitterl-Eglseer, S. Sosa, J. Jurenitsch, M. Schubert-Zsilavec, R. Della Loggia, A. Tubaro, M. Bertoldi, C. Franz. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Ethnopharmacol.* 1997. 57, 139–144.
- [194] S. M. Fuchs, S. Schliemann-Willers, T. W. Fischer, P. Elsner. Protective effects of different marigold (*Calendula officinalis* L.) and rosemary cream

preparations against sodium-lauryl-sulfate-induced irritant contact dermatitis. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2005. 18, 195–200.

[195] M. N. Hamad, H. J. Mohammed, M. A. Merdaw. Antibacterial activity of *Calendula officinalis* flowers *in vitro*. *Ibn Al- Haitham J. For Pure Appl. Sci.* 2011. 24 (3), 143-149.

[196] N. Tanideh, P. Tavakoli, M. A. Saghiri, F. Garcia-Godoy, D. Amanat, A. A. Tadbir, S. M. Samani, A. Tamadon. Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinali*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2013. 115 (3), 332-338.

[197] E. Efstratiou, A. I. Hussain, P. S. Nigam, J. E. Moore, M. A. Ayub, J. R. Rao. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complement. Ther. Clinical Practice.* 2012. 18. 173-176.

[198] J. I. Pérez-Carreón, G. Cruz-Jiménez, J. A. Licea-Vega, E. Arce Popoca, S. Fattel Fazenda, S. Villa-Treviño. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol. In Vitro.* 2002. 16, 253–258.

[199] M. Hamburger, S. Adler, D. Baumann, A. Förg, B. Weinreich. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia.* 2003. 74, 328–338.

- [200] L. Danielski, L. M. A. S. Campos, L. F. V. Bresciani, H. Hense, R. A. Yunes, S. R. S. Ferreira. Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile. *Chem. Eng. Process.* 2007. 46, 99–106.
- [201] A. P. Amala Sujith, T. V. Hymavathi, P. Y. Devi. Supercritical fluid extraction of lutein esters from marigold flowers and their hydrolysis by improved saponification and enzyme biocatalysis. *Int. J. Biol. Life Sci.* 2010. 6 (2), 67-76.
- [202] Y. Gao, X. Liu, H. Xu, J. Zhao, Q. Wang, G. Liu, Q. Hao. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) with vegetable oils as continuous co-solvents. *Sep. Purif. Technol.* 2010. 71 (2) 214-219.
- [203] Y. Gao, B. Nagy, X. Liu, B. Simándi, Q. Wang. Supercritical CO₂ extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound. *J. Supercrit. Fluids.* 2009. 49 (3), 345-350.
- [204] O. Moreiras, Á. Carbajal, L. Cabrera, C. Cuadrado. *Tablas de composición de alimentos.* Ed. Pirámide. 2008.
- [205] M. Aritomi, T. Kawasaki. Three highly oxygenated flavone glucuronides in leaves of *Spinacia oleracea*. *Phytochemistry.* 1984. 23 (9), 2043-2047.

- [206] M. Bergman, L. Varshavsky, H. E. Gottlieb, S. Grossman. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*. 2001. 58, 143–152.
- [207] M. Bergman, A. Perelman, Z. Dubinsky, S. Grossman. Scavenging of reactive oxygen species by a novel glucuronated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach. *Phytochemistry*. 2003. 62, 753–762.
- [208] E. Aehle, S. Raynaud-Le Grandic, R. Ralainirina, S. Baltora-Rosset, F. Mesnard, C. Prouillet, J. Mazière, M. Fliniaux. Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure. *Food Chem*. 2004. 86, 579–585.
- [209] R. Hait-Darshan, S. Grossman, M. Bergman, M. Deutsch, N. Zurgil. Synergistic activity between a spinach-derived natural antioxidant (NAO) and commercial antioxidants in a variety of oxidation systems. *Food Res. Int*. 2009. 42 (2), 246-253.
- [210] D. Fan, D. Mark Hodges, J. Zhang, C. W. Kirby, X. Ji, S. J. Locke, A. T. Critchley, B. Prithiviraj. Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L.) which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. *Food Chem*. 2011. 124, 195–202.

[211] L. Howard, N. Pandjaitan. Pressurized liquid extraction of flavonoids from spinach. *J. Food Sci.* 2008. 73 (3), 151-157.

[212] N. Maeda, H. Yoshida, Y. Mizushina. Spinach and health: anticancer effect. *Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables.* Elsevier. 2010.

[213] H. Iijima, K. Musumi, T. Hada, N. Maeda, Y. Yonezawa, H. Yoshida, Y. Mizushina. Inhibitory effect of monogalactosyldiacylglycerol, extracted from spinach using supercritical CO₂, on mammalian DNA polymerase activity. *J. Agric. Food Chem.* 2006. 54, 1627-1632.

[214] J. K. Lodge, L. Packer. Natural sources of lipoic acid in plant and animal tissues. *Antioxidant food supplements in human health.* Pages 121-124. Academy Press. 1999.

[215] S. Ghibu, C. Richard, S. Delemasure, C. Vergely, C. Mogosan, A. Muresan. An endogenous dithiol with antioxidant properties: Alpha-lipoic acid, potential uses in cardiovascular diseases. *Ann. Cardiol. Angéiologie.* 2008. 57, 161–165.

[216] C. H. de Azevedo-Meleiro, D. B. Rodriguez-Amaya. Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. *J. Food Compos. Anal.* 2005. 18, 845–855.

[217] M. Isabelle, B. Lan Lee, M. Thiam Lim, W. Koh, D. Huang, C. Nam Ong. Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chem.* 2010. 120, 993–1003.

- [218] B. Simonovska, I. Vovk, V. Glavnik, K. Cernelic. Effects of extraction and high-performance liquid chromatographic conditions on the determination of lutein in spinach. *J. Chromatogr. A*. 2013. 1276, 95–101.
- [219] M. Ay, F. Bahadori, M. Öztürk, U. Kolak, G. Topçu. Antioxidant activity of *Erica arborea*. *Fitoterapia*. 2007. 78, 571–573.
- [220] R. D. Pancost, M. Baas, B. van Geel, J. S. Sinninghe Damste´. Biomarkers as proxies for plant inputs to peats: an example from a sub-boreal ombrotrophic bog. *Org. Geochem*. 2002. 33, 675–690.
- [221] R. Nunes, I. S. Carvalho. Antioxidant activities, distribution of phenolics and free amino acids of *Erica australis* L. leaves and flowers collected in Algarve, Portugal. *Nat. Prod. Res*. 2013. 27 (18), 1664–1667.
- [222] E. Küpeli Akkol, E. Yesilada, A. Güvenc. Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Erica* species native to Turkey. *J. Ethnopharmacol*. 2008. 116, 251–257.
- [223] M. Jalal, D. Read, E. Haslam. Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*. 1982. 21, 1397–1401.
- [224] L. Saaby, H.B. Rasmussen, A.K. Jäger. AO-A inhibitory activity of quercetin from *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *J. Ethnopharmacol*. 2009. 121, 178–181.

- [225] M. Monschein, J. Iglesias, O. Kunert, F. Bucar, Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) and its altitudinal alteration. *Phytochemistry Reviews*. 2010. 9, 205–215.
- [226] A. Szakiel, B. Nizynski, C. Paczkowski. Triterpenoid profile of flower and leaf cuticular waxes of heather *Calluna vulgaris*. *Nat. Prod. Res.* 2013. 27 (15), 1404-1407.
- [227] B. E. Richter, B. A. Jones, J. L. Ezzell, N. L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl. Accelerated solvent extraction: a technology for sample preparation. *Anal. Chem.* 1996. 68 (6), 1033–1039.
- [228] J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, A. K. M. Omar. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 2013. 117, 426-436.
- [229] A. Mustafa, C. Turner. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta.* 2011. 703, 8– 18.
- [230] M. Herrero, M. Castro-Puyana, J. A. Mendiola, E. Ibañez. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2013. 43, 67–83.

[231] L. Wang, C. L. Weller. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.* 2006. 17 (6), 300–312.

[232] S. Hamdan, H. G. Daood. Changes in the chlorophyll and carotenoid content and composition of ground thyme leaves as a function of supercritical carbon dioxide and subcritical propane extraction. *Acta Aliment.* 2011. 40 (1), 8–18.

[233] S. B. Hawthorne, D. J. Miller, Direct comparison of soxhlet and low temperature and high-temperature supercritical CO₂ extraction efficiencies of organics from environmental solids. *Anal. Chem.* 1994. 66 (22), 4005–4012.

[234] Y. Yang, B. Kayan, N. Bozer, B. Pate, C. Baker, A. M. Gizir. Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. *J. Chromatogr. A.* 2007. 1152, 262–267.

[235] P. Budrat, A. Shotipruk. Enhanced recovery of phenolic compounds from bitter melon (*Momordica charantia*) by subcritical water extraction. *Sep. Purif. Technol.* 2009. 66, 125–129.

[236] M. Herrero, P. J. Martín-Álvarez, F. J. Señoráns, A. Cifuentes, E. Ibáñez. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chem.* 2005. 93 (3), 417–423.

- [237] M. Herrero, L. Jaime, P. J. Martín-Álvarez, A. Cifuentes, E. Ibáñez. Optimization of the Extraction of Antioxidants from *Dunaliella salina* Microalga by Pressurized Liquids. *J. Agric. Food Chem.* 2006. 54, 5597-5603.
- [238] M. Plaza, S. Santoyo, L. Jaime, G. Garcia-Blairsy Reina, M. Herrero, F.J. Señorans, E. Ibañez. Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharm. Biomed. Anal.* 2010. 51, 450–455.
- [239] L. Jaime, J. A. Mendiola, M. Herrero, C. Soler-Rivas, S. Santoyo, F. J. Señorans, A. Cifuentes, E. Ibañez. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *J. Sep. Sci.* 2005. 28, 2111–2119.
- [240] L. Jaime, I. Rodríguez-Meizoso, A. Cifuentes, S. Santoyo, S. Suarez, E. Ibáñez, F. J. Señorans. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Sci. Technol.* 2010. 43, 105–112.
- [241] A. Mustafa, L. Mijangos Trevino, C. Turner. Pressurized hot ethanol extraction of carotenoids from carrot by-products. *Molecules.* 2012. 17, 1809-1818.
- [242] M. Marsin Sanagi, H. H. See, W. A. Wan Ibrahim, A. A. Naim. Determination of carotene, tocopherols and tocotrienols in residue oil from palm pressed fiber using pressurized liquid extraction-normal phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 2005. 538, 71–76.

- [243] J. B. Wan, C. M. Lai, S. P. Li, M. Y. Lee, L. Y. Kong, Y. T. Wang. Simultaneous determination of nine saponins from *Panax notoginseng* using HPLC and pressurized liquid extraction. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2006. 41, 274–279.
- [244] N. Xynos, G. Papaefstathiou, E. Gikas, A. Argyropoulou, N. Aligiannis, A. L. Skaltsounis. Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.* 2014. 122, 323–330.
- [245] Ö. Güçlü-Üstündağ, J. Balsevich, G. Mazza. Pressurized low polarity water extraction of saponins from cow cockle seed. *J. Food Eng.* 2007. 80, 619–630.
- [246] J. M. Pinilla, A. López-Padilla, G. Vicente, T. Fornari, J. C. Quintela, G. Reglero. Recovery of betulinic acid from plane tree (*Platanus acerifolia* L.). *J. Supercrit. Fluids.* 2014. 95, 541–545.
- [247] K. Zosel. German Patent: 1493,190. 1964.
- [248] M. Herrero, J. A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibañez. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J. Chromatogr. A.* 2010. 1217, 2495–2511.
- [249] A. Ruiz-Rodríguez, T. Fornari, L. Jaime, E. Vázquez, B. Amador, J. A. Nieto, M. Yuste, M. Mercader, G. Reglero. Supercritical CO₂ extraction applied

toward the production of a functional beverage from wine. *J. Supercrit. Fluids*. 2012. 61, 92–100.

[250] Gerd Brunner. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*. Volume 67, Issues 1–2, March 2005, Pages 21–33.

[251] G. Brunner. Applications of supercritical fluids. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2010. 1, 321-342.

[252] E. Reverchon. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. Supercrit. Fluids*. 1997. 10 (1), 1–37.

[253] J. A. Mendiola, M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibáñez. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *J. Chromatogr. A*. 2007. 1152, 234–246.

[254] J. M. Prado, P. C. Vegi, A. M. Meireles. Extraction methods for obtaining carotenoids from vegetables. *Review. Curr. Anal. Chem.* 2014. 10, 29-66.

[255] A. Catarina Guedes, M. S. Gião, A. A. Matias, A. V.M. Nunes, M. E. Pintado, C. M.M. Duarte, F. X. Malcata. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing. *J. Food Eng.* 2013. 116, 478–482.

- [256] R. Marsili, D. Callahan. Comparison of a liquid solvent extraction technique and supercritical fluid extraction for the determination of α - and β -Carotene in vegetables. *J Chromatogr. Sci.* 1993. 31 (10), 422-428.
- [257] M. D. Macías-Sánchez, C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, L. M. Lubián, O. Montero. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll *a* from *Synechococcus* sp. *J. Supercrit. Fluids.* 2007. 39 (3), 323–329.
- [258] M. Careri, L. Furlattini, A. Mangia, M. Musci, E. Anklam, A. Theobald, C. von Holst. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach. *J. Chromatogr. A*, 2001. 912, 61–71.
- [259] O. Montero, M. Dolores Macías-Sánchez, C. M. Lama, L. M. Lubián, C. Mantell, M. Rodríguez, E. M. de la Ossa. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene from a marine strain of the *Cyanobacterium synechococcus* species. *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53, 9701-9707.
- [260] D. J. S. Patinha, R. M. A. Domingues, J. J. Villaverde, A. M. S. Silva, C. M. Silva, C. S. R. Freire, C. Pascoal Neto, A. J. D. Silvestre. Lipophilic extractives from the bark of *Eucalyptus grandis x globulus*, a rich source of methyl morolate: Selective extraction with supercritical CO₂. *Ind. Crop. Prod.* 2013. 43, 340– 348.

- [261] M. M.R. de Melo, E. L.G. Oliveira, A. J.D. Silvestre, C. M. Silva
Supercritical fluid extraction of triterpenic acids from *Eucalyptus globulus* bark. J. Supercrit. Fluids. 2012. 70, 137– 145.
- [262] A. Felfoldi-Gava, S. Szarka, B. Simandi, B. Blazics, B. Simon, A. Kery.
Supercritical fluid extraction of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. J. Supercrit. Fluids. 2012. 61, 55– 61.
- [263] R. M. A. Domingues, M. M. R. Melo, C. P. Neto, A. J. D. Silvestre, C. M. Silva, Mea-urement and modeling of supercritical fluid extraction curves of *Eucalyptus globulus* bark: influence of the operating conditions upon yields and extractcomposition. J. Supercrit. Fluids. 2012. 72, 176–185.
- [264] R. L. Prior, G. Cao. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. J. AOAC Int. 2000. 83, 950–956.
- [265] E.N. Frankel, A.S. Meyer. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. J. Sci. Food Agric. 2000. 80, 1925–1941.
- [266] N. J. Miller, A. T. Diplock, C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin. Sci. 1993. 84, 407-412.

[267] R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53, 4290-4302.

[268] R. Ross. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *Mech. Disease.* 1999. 340 (2), 115-126.

[269] H. Akiyama, S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G. Cole, N. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B. Fiebich, C. Finch, S. Frautschy, W. Griffin, H. Hampel, H. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrak, I. Mackenzie, P. McGeer, M. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk, T. Wyss- Coray. Inflammation and alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 2000. 21, 383-421.

[270] C.Nathan. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002. 420, 846-852.

[271] C. Zhang. The role of inflammatory cytokines endothelial dysfunction. *Basic Res. Cardiol.* 2008. 103, 398-406.

[272] U. Schönbeck, F. Mach, G. K. Sukhova, C. Murphy, J. Y. Bonnefoy, R. P. Fabunmi, P. Libby .Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture?. *Circ. Res.* 1997. 81, 448-54.

- [273] P. Libby. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002. 420, 868-874.
- [274] J. Lee, W. Chen, S. Wu, C. Tseng, C. Chiou, F. Chang, S. Hsu, Y. Wu. Anti-hepatitis C virus activity of *Acacia confusa* extract via suppressing cyclooxygenase-2. *Antivir. Res.* 2011. 89, 35–42.
- [275] D. Manvar, M. Mishra, S. Kumar, V. N. Pandey. Identification and evaluation of anti Hepatitis C virus phytochemicals from *Eclipta alba*. *J. Ethnopharmacol.* 2012. 144, 545–554.
- [276] S. Wang, C. Tseng, K. Tsai, C. Lin, C. Wen, H. Tsay, N. Sakamoto, C. Tseng, J. Cheng. Bioactivity-guided screening identifies pheophytin a as a potent anti-hepatitis C virus compound from *Lonicera hypoglauca* Miq. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 2009. 385, 230–235.
- [277] Y. S. Ravikumar, U. Ray, M. Nandhitha, A. Perween, H. Raja Naika, N. Khanna, S. Das. Inhibition of hepatitis C virus replication by herbal extract: *Phyllanthus amarus* as potent natural source. *Virus Res.* 2011. 158, 89–97.
- [278] D. Haleboua-De Marzio, W. K. Kraft, C. Daskalakis, X. Ying, R. L. Hawke, V. J. Navarro. Limited sampling estimates of epigallocatechin gallate exposures in cirrhotic and noncirrhotic patients with hepatitis C after single oral doses of green tea extract. *Clin. Ther.* 1012. 34 (12), 2279-2285.

[279] R. Pang, J. Y. Tao, S. L. Zhang, L. Zhao, X. Yue, Y. F. Wang, P. Ye, J. H. Dong, Y. Zhu, J. G. Wu. *In vitro* antiviral activity of lutein against hepatitis B virus. *Phytother. Res.* 2010. 24 (11), 1627-30.

[280] D. Bitetto, N. Bortolotti, E. Falletti, S. Vescovo, C. Fabris, G. Fattovich, A. Cussigh, S. Cmet, E. Fornasiere, E. Ceriani, M. Pirisi, P. Toniutto. Vitamin A deficiency is associated with hepatitis C virus chronic infection and with unresponsiveness to interferon-based antiviral therapy. *Hepatology.* 2013. 57 (3), 925-33.

[281] L. Almela, B. Sanchez-Munoz, J. A. Fernandez-Lopez, M. J. Roca, V. Rabe. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material, *J. Chromatogr. A*, 2006. 1120, 221-229.

[282] M. Martelanc, I. Vovk, B. Simonovska. Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 2007. 1164, 145–152.

[283] D.E. Breithaupt. Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction. *Food Chem.* 2004. 86, 449.

- [284] V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 1999. 299, 152–178.
- [285] F. Granada, B. Olmedilla, E. Gil-Martinez, and I. Blanco. Fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. *J. Food Compos. Anal.* 2001. 14, 479-489.
- [286] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Bio. Med.* 1999. 26, 1231–1237.
- [287] J. Kim, C S. Kong, S. Y. Pyun, S-K Kim. Phosphorylated glucosamine inhibits the inflammatory response in LPS-stimulated PMA-differentiated THP-1 cells. *Carbohydr. Res.* 2010. 345, 1851-1855.
- [288] C. Perales, N. M. Beach, I. Gallego, M. E. Soria, J. Quer, J. I. Esteban, C. Rice , E. Domingo, J. Sheldon. Response of hepatitis C virus to long-term passage in the presence of alpha interferon: multiple mutations and a common phenotype. *J. Virol.* 2013. 87 (13), 7593-607.
- [289] F. Dai, W. Chen, B. Zhou. Antioxidant synergism of green tea polyphenols with a-tocopherol and L-ascorbic acid in SDS micelles. *Biochimie.* 2008. 90, 1499-1505.

[290] J. Liang, Y. Tian, F. Yang, J. Zhang, L. H. Skibsted. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chem.* 2009. 115, 1437–1442.

[291] N. Hadad, R. Levy. The synergistic anti-inflammatory effects of lycopene, lutein, b-carotene, and carnosic acid combinations via redox-based inhibition of NF- κ B signaling. *Free Radical Biol. Med.* 2012. 53, 1381–1391.

[292] R. Kowalski. Studies of selected plant raw materials as alternative sources of triterpenes of oleanolic and ursolic acid types. *J. Agric. Food Chem.* 2007. 55 (3), 656–662.

[293] K. Mohd Hanafiah, J. Groeger, A. D. Flaxman, S. T. Wiersma. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology.* 2013. 57, (4), 1333-42.

[294] Gilead US food and drug administration approves gileads sovaldi sofosbuvir for the treatment of chronic hepatitis C. [http://www.gilead.com/news/press-releases/2013/12/us food and drug administration approves gileads sovaldi sofosbuvir for the treatment of chronic hepatitis C](http://www.gilead.com/news/press-releases/2013/12/us-food-and-drug-administration-approves-gileads-sovaldi-sofosbuvir-for-the-treatment-of-chronic-hepatitis-c) (September 2014).

[295] I. Fofana, N. Jilg, R. T. Chung, T. F. Baumert, Entry inhibitors and future treatment of hepatitis C. *Antivir. Res.* 2014. 104, 136-42.

[296] A. J. Hunt. The extraction of high value chemicals from Heather (*Calluna Vulgaris*). Ph.D thesis. University of York. 2006.

ANEXO: OTRAS PUBLICACIONES

ANEXO: OTRAS PUBLICACIONES

Peanuts Bioactivities and Allergies. Chapter 14. Phenolic Compounds: Functional Components in Peanut. (Nova Science Publisher; 2013)

Autores: Erika Vázquez Rodríguez, Iván Lopez Expósito

Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from Lamiaceae family. (The Journal of Supercritical Fluids. 2012. 64, 1-8)

Tiziana Fornari, Alejandro Ruiz-Rodríguez, Gonzalo Vicente, Erika Vázquez, Monica R. Garcia-Risco, Guillermo Reglero

Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. (Journal of Chromatography A. 2012. 1250, 34-48)

Tiziana Fornari, Gonzalo Vicente, Erika Vázquez, Mónica R. García-Risco, Guillermo Reglero

Supercritical CO₂ extraction applied toward the production of a functional beverage from wine. (The Journal of Supercritical Fluids. 2012. 61, 92-100)

Alejandro Ruiz-Rodríguez, Tiziana Fornari, Laura Jaime, Erika Vázquez, Beatriz Amador, Juan Antonio Nieto, María Yuste, Mercè Mercader, Guillermo Reglero