



Extracción supercrítica de antioxidantes naturales a partir de hierbas y especias

L. A. Conde-Hernández* y J. A. Guerrero-Beltrán

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla,
San Andrés Cholula, Pue., México*

Resumen

La extracción con fluidos supercríticos (EFS) es una tecnología usada para la extracción de una gran variedad de compuestos químicos. Los materiales vegetales contienen muchos compuestos químicos con actividad antioxidante. El objetivo de este artículo es presentar información sobre la extracción con fluidos supercríticos de antioxidantes naturales obtenidos a partir de hierbas y especias. Este trabajo presenta información sobre aspectos generales de los antioxidantes naturales, una descripción del proceso de extracción con fluidos supercríticos, aspectos relacionados con las condiciones de operación para la extracción de compuestos antioxidantes, datos disponibles de compuestos antioxidantes obtenidos a partir de hierbas y especias y finalmente algunas aplicaciones de esta tecnología en la industria de alimentos. Las hierbas y especias como una fuente de antioxidantes, son una alternativa al uso de antioxidantes sintéticos. El uso de la EFS (usando CO₂ como el agente de extracción) tiene muchas ventajas y variedad de aplicaciones; sin embargo, es importante establecer adecuadamente las condiciones de operación para la extracción de los compuestos químicos de interés.

Palabras clave: *Antioxidantes, extracción con fluidos supercríticos, hierbas y especias.*

Abstract

Supercritical fluid extraction (SFE) is a technology used to extract a variety of compounds. Vegetable materials may contain chemical compounds with antioxidant activity. The objective of this article is to provide information on the supercritical fluid extraction of natural antioxidants from herbs and spices. This paper presents a compilation and general aspects about natural antioxidants, a description of the supercritical fluid extraction, information regarding operational conditions for the extraction of antioxidant compounds, reported data of antioxidant compounds from herbs and spices, and finally some applications of this technology in the food industry. Spices and herbs, as a source of antioxidants, are a promising alternative to synthetic antioxidants. The use of the SFE (using CO₂ as the extraction agent) could have many advantages and a variety of applications, however, it is important to establish the optimal operation conditions for the extraction of the chemicals.

Keywords: *Antioxidants, supercritical fluid extraction, herbs and spices.*

* Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: lacondeh@hotmail.com

Introducción

Existe un gran interés en los antioxidantes naturales encontrados en ciertas plantas, ya que son una alternativa a los antioxidantes sintéticos. Las más importantes fuentes de antioxidantes naturales son las hierbas y especias (Yanishlieva *et al.*, 2006). Los materiales vegetales contienen muchos compuestos con actividad antioxidante. Algunas plantas han sido estudiadas como fuentes de antioxidantes naturales (Moure *et al.*, 2001). Uno de los primeros trabajos reportados es el de Chipault *et al.* (1956), quienes examinaron más de 70 especias y hierbas. Desde entonces, el interés en la actividad antioxidativa de especias se ha incrementado y ha conducido a un aumento en la información acerca de estos compuestos (Yanishlieva *et al.*, 2006).

El proceso de extracción con disolventes orgánicos puede ser utilizado para extraer antioxidantes, pero esto produce residuos no deseables y los extractos pueden experimentar transformaciones oxidativas durante la eliminación del disolvente. Debido al impacto ambiental negativo que tiene el uso de disolventes orgánicos líquidos en la extracción de productos naturales, hay un gran interés en usar técnicas de extracción alternativas y viables usando fluidos supercríticos. La extracción con fluidos supercríticos está ganando aceptación como una alternativa a la extracción Soxhlet (Verma *et al.*, 2008). En comparación con los disolventes orgánicos, líquidos y convencionales, los fluidos supercríticos tienen una difusividad más alta y menor densidad, viscosidad y tensión superficial. El CO₂ es el disolvente más frecuentemente usado para la extracción con fluidos supercríticos debido a las siguientes ventajas: no es tóxico ni inflamable, es seguro desde el punto de vista ambiental, ampliamente disponible, bajo costo a una alta pureza y es idóneo para extraer compuestos naturales con

baja volatilidad y polaridad. Además de que, cuando el extracto es recuperado en el proceso de separación, el CO₂ es fácilmente separado debido a su alta volatilidad. La EFS permite llevar a cabo la extracción de ingredientes activos a partir de hierbas y especias con una mejor reproducción del sabor y fragancia en comparación con los procesos convencionales. Se evita la degradación térmica y la descomposición de compuestos lábiles, debido a que el proceso opera a temperaturas reducidas, y en ausencia de luz y oxígeno, lo que previene reacciones oxidativas. Este último punto es de especial interés para la extracción de antioxidantes, ya que garantiza la conservación de las propiedades biológicas de los extractos obtenidos (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006).

Numerosos artículos de la EFS en varias hierbas y especias han sido publicados; pimienta negra (Sovová *et al.*, 1995), lavanda, tomillo, anís y salvia (Dapkevicius *et al.*, 1998), jengibre, romero y cúrcuma (Leal *et al.*, 2003), sésamo (Hu *et al.*, 2004), mejorana (Vági *et al.*, 2005), canela (Marongiu *et al.*, 2007), por mencionar sólo algunos ejemplos.

El objetivo de este trabajo es presentar información de la tecnología de extracción con fluidos supercríticos para la obtención de antioxidantes naturales obtenidos a partir de hierbas y especias.

Revisión bibliográfica

Antioxidantes

Los alimentos que contienen grasas y otros lípidos, terpenos e hidrocarburos ramificados, no son estables al almacenamiento prolongado o calentamiento intensivo. Los ácidos grasos insaturados, y particularmente, los poliinsaturados, son

oxidados siguiendo diferentes mecanismos y formando radicales libres, los cuales son convertidos en hidroperóxidos. Los hidroperóxidos no tienen olor ni sabor, pero se descomponen con la formación de compuestos volátiles, tales como alcanalos, alca-2-enalos, alca-2,4-dienalos, diferentes cetonas, alcoholes e hidrocarburos. Estos productos dan lugar a sabores desagradables (rancidez). El valor sensorial, y por tanto la aceptabilidad del alimento se ve sustancialmente deteriorada por la rancidez. La rancidez puede ser prevenida por diferentes métodos; usando materiales grasos pobres en ácidos grasos poliinsaturados, restringir el acceso de oxígeno y por la adición de inhibidores de la oxidación. Los más importantes inhibidores son los antioxidantes, los cuales son capaces de inactivar a los radicales libres formados durante la autooxidación. Estos inhibidores representan una clase de sustancias que varían ampliamente en estructura química y tienen diversos mecanismos de acción. (Pokorný, 2000). De acuerdo a Shahidi y Naczsk (1995), la ruta clásica de la autooxidación incluye reacciones de: iniciación (producción de radicales libres lipídicos), propagación y terminación (producción de productos no-radicales).

Los principales antioxidantes son sustancias fenólicas (heterociclos de nitrógeno). La mayoría de antioxidantes activos contienen *ortho* o *para* grupos hidroxilos disustituidos. En el caso de las sustancias sintéticas, se prefieren los derivados disustituidos *para*, debido a su baja toxicidad, entre los antioxidantes naturales prevalecen los disustituidos *ortho* (Pokorný, 2000).

Por otro lado, los antioxidantes presentes en partes de hierbas y especias, son un beneficio en cuanto a su consumo, ya que ayudan a atrapar los radicales libres formados en el cuerpo y asociados con

enfermedades tales como el cáncer (Yanishlieva *et al.*, 2006).

Fuentes de antioxidantes naturales. Existen diversas fuentes de antioxidantes naturales, entre las que se encuentran: las frutas y verduras, así como sus productos procesados (Robards *et al.*, 1999; Collins y Harrington, 2003). Todos los granos (Decker *et al.*, 2002), cereales (Shahidi y Naczsk, 1995), hongos (Mau *et al.*, 2002), plantas de la orilla del mar (Masuda *et al.*, 1999), y las algas marinas han sido consideradas como fuente de antioxidantes (Lim *et al.*, 2002). Ghiselli *et al.* (2000) reportaron actividad antioxidante para vinos y otras bebidas alcohólicas y Uccella (2001) lo hizo para aceite de oliva. Los téis contienen potentes antioxidantes y han sido estudiados debido a su alto contenido de compuestos fenólicos (Jeong y Kong, 2004). Mau *et al.* (2003) reportaron que los aceites esenciales contienen compuestos con actividad antioxidante (tales como colorantes y flavonoides). Sacchetti *et al.* (2005) encontraron que los terpenos y otros compuestos pueden causar un efecto sinérgico con los antioxidantes. Srinivasan (2005) reporta que las especias y las hierbas, así como las plantas aromáticas y medicinales, contienen principios activos con actividad antioxidante y que tienen efectos fisiológicos para los seres humanos (influencia hipolipidémica, potencial antidiabético, efecto antiinflamatorio, acción digestiva estimulante y antimutagénico). Los desperdicios sólidos y líquidos del procesamiento de alimentos (por ejemplo vinos, téis, papas, aceite de oliva) son fuentes de antioxidantes atractivas (Moure *et al.*, 2001).

Compuestos naturales con actividad antioxidante. Los principales antioxidantes son los fenoles, tales como los ácidos benzoicos y cinámicos (Mansouri *et al.*, 2005), flavonoides (Van Acker *et al.*, 1996),

péptidos y proteínas (Kitts y Weiler, 2003), productos de la reacción de Maillard (Yilmaz y Toledo, 2005), azúcares y polioles (Faraji y Lindsay, 2004), y ácido láctico (Lin y Yen, 1999). Además de los compuestos fenólicos, se encuentran los carotenoides (Modey *et al.*, 1996) vitamina C (Kalt *et al.*, 1999), vitamina E (Quites *et al.*, 2002). Los compuestos mencionados anteriormente se encuentran presentes en hierbas y especies. En la Tabla I se muestran algunos compuestos antioxidantes específicos.

Determinación de la actividad antioxidante. Existen diversos métodos para medir la actividad antioxidante en diversas situaciones (condiciones de operación, oxidantes, iniciadores, condiciones de oxidación, composición y estructura del alimento y disponibilidad de oxígeno), lo cual hace difícil comparar e interpretar los resultados obtenidos en la literatura (Gordon, 2001). Las características consideradas para estandarizar una prueba son presentadas en la revisión realizada por Prior *et al.* (2005). Una variedad de métodos para evaluar la actividad antioxidante está basada en la capacidad depuradora de los radicales libres, ya que la generación de radicales libres está directamente relacionada con la oxidación de alimentos y sistemas biológicos. Los radicales más frecuentemente usados son: superóxidos, hidroxilos, óxido nítrico, alquilperóxidos, N-N, dimetil- *p*-fenilendiamina y DPPH (2,2-

difenil-1-picrilhidrazil) (Gordon, 2001). Un método alternativo a la depuración de radicales fue propuesto por Zaporozhets *et al.* (2004) quien mide la habilidad de quelación. Anese y Nicoli (2003) reportan que el potencial redox da un índice de la efectiva eficiencia de oxidación/reducción de todos los antioxidantes presentes en el medio. La prueba del poder antioxidante reductor ferroso (FRAP, por sus siglas en inglés) está basada en la habilidad de los antioxidantes para reducir un complejo férrico a ferroso (Benzie y Strain, 1996). La velocidad de degradación de una sustancia antioxidante ha sido positivamente correlacionada con la actividad antioxidante (Chimi *et al.*, 1991).

Los fosfolípidos y las lipoproteínas (particularmente de baja densidad) han sido empleadas como sustratos de oxidación (Chu y Liu, 2004). En aceites esenciales se puede probar la habilidad para inhibir la oxidación de hexanal a ácido hexanoico de acuerdo a informes previamente publicados por Wei *et al.* (2001). Wei y Shibamoto (2007) evaluaron el malonaldehído formado en aceites esenciales como una prueba de actividad antioxidante. Frankel y Meyer (2000) publicaron una revisión sobre métodos analíticos para determinar la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos fenólicos puros y antioxidantes naturales.

Tabla I. Antioxidantes aislados de hierbas y especias^a

Especias	Nombre común	Sustancia
Romero	<i>Rosemarinus officinalis</i> (Labiatae)	Ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarinico, rosmanol
Salvia	<i>Salvia officinalis</i> (Labiatae)	Carnosol, ácido carnósico, rosmanol, ácido rosmarinico
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> (Labiatae)	Derivados de ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferoles
Tomillo	<i>Thymus vulgare</i> (Labiatae)	Timol, carvacrol, r-cumeno- 2,3 diol, bifenoles, flavonoides
Jenjibre	<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	Compuestos gingerol, diaryheptanoides
Cúrcuma	<i>Curcuma domestica</i> (Zingiberaceae)	Curcuminas
Pimienta negra	<i>Piper nigrum</i> (Piperaceae)	Amidas fenólicas, flavonoides
Pimiento rojo	<i>Capsicum annuum</i> (Solanaceae)	Capsaicina
Pimiento picante	<i>Capsicum frutescence</i> (Solanaceae)	Capsaicina, capsaicinol
Clavo	<i>Eugenia caryophyllata</i> (Caryophyllaceae)	Eugenol, galatos
Mejorana	<i>Majorana hortensis</i> (Labiatae)	Flavonoides
Bálsamo común	<i>Melissa officinalis</i> (Labiatae)	Flavonoides
Regaliz	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Leguminosae)	Flavonoides, fenólicos regaliz

^a Adaptado de Yanishlieva *et al.* (2006)

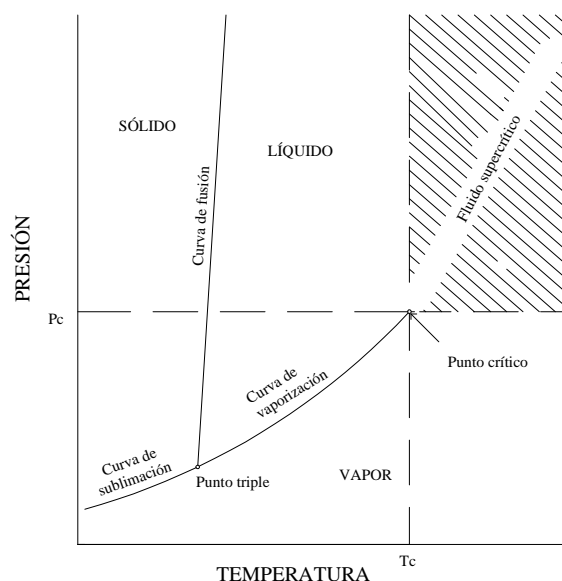


Fig. 1. Diagrama de fases de un material puro. Adaptado de Rizvi *et al.* (1994)

Descripción del proceso de extracción con fluidos supercríticos

Definición de fluido supercrítico. De acuerdo a Raventós *et al.* (2002) la extracción con fluidos supercríticos, extracción con gases supercríticos y la extracción con un gas denso, son términos alternativos para nombrar la operación con un fluido a temperaturas y presiones cerca del punto crítico. El proceso de extracción con fluidos supercríticos es un proceso de separación donde las sustancias son disueltas en un fluido, el cual es capaz de modificar su poder de disolución, bajo condiciones específicas superiores a su temperatura y presión críticas (región supercrítica). Las propiedades de un fluido supercrítico son usadas para extraer selectivamente un compuesto específico o para fraccionar mezclas debido a un cambio en la temperatura y presión, sin un cambio de fase. Los mismos autores definen un fluido supercrítico como un líquido o gas en condiciones atmosféricas el cual es

comprimido por arriba de su presión crítica (50,000-25,000kPa) y es calentado por arriba de su temperatura crítica (20-60°C). La propiedad más importante de estos fluidos es el poder de disolución en su región supercrítica. En el diagrama de fases para un compuesto puro (Figura 1) es posible distinguir los tres estados de la materia: sólido, líquido y vapor. Estos están separados por una curva de fusión o equilibrio sólido-líquido, una curva de sublimación o equilibrio sólido-vapor, y una curva de vaporización o equilibrio líquido-vapor. Este diagrama tiene dos importantes puntos: el punto triple y el punto crítico. El punto triple es el punto en el cual los tres estados coexisten. El punto crítico permanece al final de la curva de vaporización, donde la fase gas y la fase líquida se unen para formar una sola fase fluida homogénea, y más allá de este punto está la región de fluido supercrítico.

Dióxido de carbono, CO₂, el disolvente más utilizado. En la Tabla II se presentan los valores de parámetros críticos de algunas sustancias potencialmente útiles como

Tabla II. Parámetros críticos de diferentes sustancias potencialmente útiles como fluidos supercríticos^a

Sustancia	T _c (°C)	P _c (kPa)	ρ (kg /m ³)
Agua	374.2	21480	320
Amoniaco	132.5	10990	230
Dióxido de carbono	31.1	7200	470
Metano	0.8	4600	170
Etano	32.3	4760	200
Propano	96.7	4240	220
Butano	152.0	7060	230
Pentano	196.0	3290	230
Etileno	11.0	4760	200
Metanol	239.0	7890	270
Etanol	243.3	7200	280
Éter	193.6	6380	270
Acetona	235.0	4700	280

^a Adaptado de Reglero *et al.* (2005)

fluidos supercríticos, aunque generalmente el fluido supercrítico más utilizado es el CO₂ (Reglero *et al.*, 2005). Los productos de origen biológico, tales como conservadores naturales de alimentos o ingredientes funcionales, son algunas veces termolábiles y fácilmente oxidables; consecuentemente, ellos requieren procesos a bajas temperaturas y, si es posible, atmósferas libres de oxígeno. El CO₂ no es oxidante y tiene temperatura crítica de 31.1°C, lo cual lo hace conveniente para la extracción de esos productos (Reglero *et al.*, 2005). Otros fluidos con temperaturas críticas más bajas son tóxicos, explosivos y prohibidos ecológicamente, y es difícil su manipulación y obtención de forma pura. Por lo tanto el CO₂ es el fluido más atractivo para el procesamiento de materiales biológicos y alimenticios (Rizvi *et al.*, 1994).

Desde el punto de vista ambiental, el uso de CO₂ hace el proceso de extracción con un fluido supercrítico, una técnica ecológica. Las plantas comerciales recirculan el CO₂, por lo que su uso como un disolvente de extracción, no aumenta la cantidad ya presente en la atmósfera. Finalmente no es

explosivo ni caro. El CO₂ es muy bien aceptado y es considerado como seguro (GRAS, Generally Regarded as Safe) cuando es usado con buenas prácticas de manufactura (BPM).

Reglero *et al.* (2005) argumentan que los productos alimenticios sin residuos de disolventes pueden ser obtenidos con CO₂ supercrítico, donde a bajas presiones es un gas. Después de la extracción, no es necesario aplicar energía para vaporizar el extractante porque su autoeliminación es espontánea cuando la presión disminuye. Los mismos autores plantean que la principal desventaja de CO₂ supercrítico es su limitada capacidad para extraer compuestos polares.

Estos son componentes comunes de productos usados como conservadores de alimentos o ingredientes funcionales. Este problema tiene una razonable solución: el CO₂ alimentado con etanol a bajo porcentaje, ha sido aplicado para extraer una amplia variedad de compuestos moderadamente polares. Una ventaja es que el etanol también es GRAS. Tsuda *et al.* (1995), extrajeron

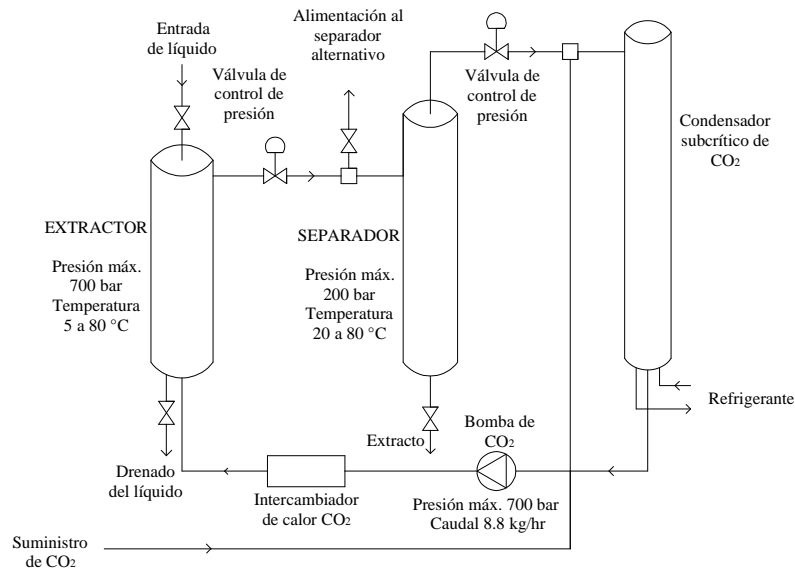


Fig. 2. Diagrama esquemático de una planta piloto de extracción supercrítica con CO₂. Adaptado de Steytler (1996)

componentes antioxidantes de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) usando etanol como modificador.

Componentes esenciales de un equipo de extracción. Los componentes esenciales de un equipo de extracción a nivel planta piloto son: el recipiente de extracción, el recipiente de separación, el condensador y una bomba (Figura 2). El CO₂ es almacenado a su presión de vapor en un condensador, y es bombeado hasta el recipiente de extracción por medio de una bomba de alta presión. El estado del CO₂ en la etapa de extracción y separación es determinado por la temperatura y la presión de los recipientes. La temperatura es controlada por un termostato y la presión es mantenida por una válvula de presión de alivio. Usualmente el extractor esta encaquetado. Las condiciones de temperatura, presión y velocidad de flujo de CO₂ son continuamente monitoreadas y medidas en ciertos puntos estratégicos del sistema (Steytler, 1996).

Descripción del proceso. El proceso EFS consiste de dos pasos esenciales: la extracción y la separación (Raventós *et al.*, 2002). En el proceso de extracción, el material que va a ser extraído es colocado en el extractor, el cual es previamente purgado con CO₂ gaseoso para eliminar todo el aire del sistema. La extracción comienza cuando el CO₂ líquido es bombeado a un intercambiador de calor hacia el recipiente de extracción. La velocidad de flujo, la cual es determinada por la bomba, usualmente se establece de tal forma que permita suficiente tiempo de residencia del CO₂ y se alcance la solubilidad de equilibrio. Entonces la solución pasa al recipiente de separación, donde las condiciones son establecidas para minimizar la solubilidad de los compuestos extraídos. Esto algunas veces involucra la descompresión del CO₂ a un estado de baja densidad ($T > T_c$) o a un estado sobre o debajo de la línea de coexistencia líquido-gas ($T < T_c$). El CO₂ gaseoso entonces pasa al condensador, donde será condensado y almacenado como un líquido (Steytler, 1996). Debido a las altas presiones, los

recipientes están contruidos de paredes gruesas de metal, lo que dificulta el monitoreo del proceso. Si el extracto es un líquido, puede ser eliminado periódicamente del recipiente de separación por una válvula de drenado, pero si es un sólido, es necesario detener la extracción para eliminar los depósitos por medio de un lavado. El proceso de extracción es caro, sin embargo, ofrece muchas ventajas, siendo la principal (para la aplicación en alimentos), la falta de toxicidad del CO₂. En la actualidad los consumidores están considerando la seguridad en los alimentos un factor primordial; esta característica indudablemente promoverá su uso en la industria de alimentos (Steytler, 1996).

Condiciones de operación del proceso de extracción supercrítica

Presión y temperatura. Las condiciones empleadas para extraer compuestos antioxidantes fenólicos son más severas que las usadas en la extracción de aceites esenciales: usualmente los aceites son solubles a presiones menores de 10MPa y a temperaturas en el rango de 39.2-55.2°C, mientras que si aumenta la presión, aumenta la extracción de compuestos polares y de alto peso molecular (incluyendo polifenoles, los principales antioxidantes en los extractos de plantas). Cuando no hay compuestos de alto peso molecular, un aumento de presión no aumenta el rendimiento del extracto (Esquível *et al.*, 1999). Tsuda *et al.* (1995), extrajeron componentes antioxidantes de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) y encontraron que la actividad antioxidante de los extractos aumentó cuando la presión y temperatura aumentaron. El uso de bajas presiones (10MPa) permite un rendimiento similar al obtenido con CO₂ líquido, pero un aumento de presión de 25 a 35MPa duplica el rendimiento de los aceites esenciales (Smelcerovic *et al.*, 2004). Sin embargo el incremento en la presión o temperatura no

garantiza mejoras en la extracción de algunos casos (Scalia *et al.*, 1999). Altas temperaturas pueden proveer una actividad antioxidante más alta, que a temperaturas más bajas, incluso si el rendimiento del extracto pudiera disminuir. Uy *et al.* (1991) reportaron que los compuestos altamente sensibles a la temperatura requieren condiciones de extracción poco severas para evitar alteraciones (por ejemplo algunos compuestos fenólicos pueden ser polimerizados u oxidados a temperaturas más altas de 50°C, aunque otros fenólicos son más resistentes). La temperatura de extracción tiene un efecto diferente sobre la solubilidad de algunos antioxidantes, dependiendo de la presión de operación (Cavero *et al.*, 2005). La solubilidad y la transferencia de masa dependen de la presión y temperatura de CO₂ (Reglero *et al.*, 2005). No es posible generalizar el efecto de la temperatura en la obtención de antioxidantes, ya que depende primordialmente de la hierba o especia a estudiar (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006).

Condiciones mecánicas. De acuerdo a Reglero *et al.* (2005), el método empleado en la preparación de la muestra (por ejemplo el secado y la molienda de la muestra, esto último afectando el tamaño de partícula), influye en el proceso de EFS, así como en la transferencia de masa. La molienda del material permite rendimientos más altos en comparación con el material que no es sometido a molienda. La mayoría de los datos reportados sobre EFS de antioxidantes obtenidos de materiales vegetales fueron obtenidos con partículas finamente molidas, escasas referencias del tamaño de partícula son reportadas.

Velocidad de flujo del disolvente. Reglero *et al.* (2005), reportaron que la velocidad de flujo del disolvente afecta la velocidad de extracción de los solutos fácilmente accesibles, y que es un parámetro relacionado

con la transferencia de masa. Durante las etapas iniciales del proceso, el aumento de la velocidad de flujo del disolvente favorece la extracción. Dependiendo de la situación, una alta velocidad de flujo del disolvente puede causar un efecto negativo (Louli *et al.*, 2004), despreciable o insignificante (Zekovic *et al.*, 2001), o un efecto positivo (Rozzi *et al.*, 2002).

Tiempo de extracción. Los datos reportados varían en un amplio rango, dependiendo del tipo de soluto que va a ser extraído y de las condiciones de operación. Un periodo estático puede ser mantenido (1 min hasta 2 h) antes de que se establezcan las condiciones dinámicas (15 min hasta 8 h), dependiendo principalmente de la cantidad de material vegetal a procesar (Dean y Liu, 2000). Tiempos prolongados de procesamiento reducen la dependencia del rendimiento de los extractos sobre otras variables (tal como la presión), como fue observado para la maravilla (Baumann *et al.*, 2004).

Antioxidantes obtenidos con la tecnología de extracción supercrítica

Díaz-Reinoso *et al.* (2006) han reportado más de 50 materiales de origen vegetal que han mostrado actividad antioxidante, utilizando la tecnología de extracción supercrítica, la cual es recomendable para la extracción y purificación de una gran variedad de compuestos, particularmente aquellos que tienen baja volatilidad y/o son susceptibles a degradación térmica. En la Tabla III se muestran algunos de los compuestos fenólicos que presentan actividad antioxidante y que fueron extraídos con la tecnología de EFS.

Aplicaciones de la EFS en la industria de alimentos

La primera extracción comercial con fluidos supercríticos fue desarrollada en Alemania en 1978 por Hag A.G. para la descafeinación de granos de café verdes. Dos años más tarde Carlton y United Breweries en Australia desarrollaron un proceso para la extracción de sabores usando dióxido de carbono líquido (Palmer y Ting, 1995). Ambas aplicaciones fueron comercialmente exitosas y han ido aumentando a numerosas variaciones y mejoras, las cuales han sido desarrolladas también a escala industrial (Kazlas *et al.*, 1994). Otras importantes aplicaciones de la EFS son la descafeinación de té, extracción de sabores de hierbas (Díaz *et al.*, 1997; Saldaña *et al.*, 1999), extracción de grasas y aceites (Froning *et al.*, 1998), extracción de colesterol de huevo y carne (Froning *et al.*, 1998), fraccionación de grasas y aceites (King, 2000) y dealcoholización de bebidas alcohólicas (Señoráns *et al.*, 2001). En menor escala encontramos la extracción de aromas en jugos (Ollanketo *et al.*, 2001), extracción de colorantes, refinación de grasas y aceites, y extracción de antioxidantes (Fadel *et al.*, 1999), deacidificación de aceite (King, 2000), inactivación de pectinesterasa de jugo de naranja (Palmer y Ting, 1995) y eliminación de grasa de los alimentos (Brunner, 2005). Las bebidas libres de alcohol son otro producto con un mercado en crecimiento (Raventós *et al.*, 2002).

Otra importante aplicación de la EFS en el procesamiento de alimentos es la aplicación combinada de fluidos supercríticos y la tecnología de extrusión. Esta combinación de tecnologías tiene el potencial para producir productos alimenticios inflados, tales como cereales listos para comer, pastas y alimentos confitados, lo cual mejora la textura, color y sabor (Rizvi *et al.*, 1995). Los consumidores en la actualidad están forzando a la industria

Tabla III. EFS de compuestos fenólicos con actividad antioxidante de hierbas y especias^a

Material vegetal	Condiciones del proceso de EFS con CO ₂ P/T/tiempo/vel. flujo ^b	Compuesto activo
Cáscara de la hoja de aloe vera (<i>Aloe barbadensis</i> Miller)	45/32/-/36	Flavonoides
Boldo (<i>Peumus boldus</i> M.)	40/340/2.5/1.5 kg/h	Boldino
Hierba dulce (<i>Lippia alba</i>)	40/60/2/-	Hidrocarburos monoterpenos, monoterpenones, monoterpenos oxigenados
Cáscara de nuez de la india (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	25/40/5/-	Ácido anacárdico, cardolos, cardanolos
Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>)	20/30/0.5/60	Apigenina, apigenina-7-glucosido
Manzanilla (<i>Chamomilla recutita</i>)	10/30/10/2.4 kg/h	α-bisababol, chamazuleno
Semillas de cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	17.7/48/0.25/0.8 kg/h	-
Hojas de eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i> var. <i>Brevirostris</i>)	40/70/2/0.12	Eugenol, timol
Aceite de hojas de eucalipto (E. <i>camaldulensis</i> var. <i>Brevirostris</i>)	20/50/2/0.12	Timol, monoterpenos hidrocarburos, sesquiterpenos, p-cimen-7-ol, O-hidroxicumino
Semillas de hinojo (<i>Foeniculum vulgare</i>)	8/40/4/0.2 kg/h	Monoterpenos hidrocarburos, 1,2- ácido bencenodicarboxílico
Jenjibre (<i>Zingiber officinale</i>)	10/40/5-5.25/0.09 kg/h	Monoterpeno, sesquiterpenos, hidrocarburos
Raíz de ginseng (<i>Panax ginseng</i>)	31/35/4/-	Ginsenosidos
Hojas de guaco (<i>Mikania glomerata</i>)	10.1/70/0.5/-	Coumarino
Espino (<i>Crataegus</i> sp.)	50/50/-/0.036	Galato epigallocatequino, vitexino-2''-O-ramnosido, galato galocatequino
Hojas secas de flor de papel (<i>Helichrysum italicum</i>)	26/50/3/ 50 kg/h	Flavonoides
Escaramujo (<i>Rosa majalis</i> L.)	30/45/1/-	-
Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>)	12-28/40-60/4/1.2 kg/h	Flavonoides
Raíces de Hu Zhang (<i>Polygonum cuspidatum</i>)	30/50/2/20 kg/h	Resveratrol, piceido (glicosido reveratrol)
Magnolia (<i>Magnolia officinalis</i>)	24.5/40/1/0.12	Magnolol
Maravilla (<i>Calendula officinalis</i>)	30/50/3/0.036	Faradiol-3-O-miristato
Mejorana (<i>Origanum vulgare</i>)	30-35/35-40/0.5-1/45 kg/h	-
Nuez moscada (<i>Nigella sativa</i> L.)	20/40/2.8/0.12	Ácido ursólico, carnosol
Hojas de pasiflora (<i>Passiflora edulis</i>)	10.1/70/0.08/-	Vitexino, orientino, rutino
Oleoresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.)	28/45/-/-	Piperina
Cáscara de pistache (<i>Pistachia vera</i>)	35.5/55/0.42/-	
Romero (<i>R. officinalis</i>)	20/30/-/0.252 kg/h	Carvacrol, carnosol, rosmanol, ácido carnósico
Salvia (<i>S. officinalis</i> L.)	25/100/-/3 kg/h	Carnosol, ácido carnósico, rosmadial, rosmanol, epirosmanol y metil carnosato
Semilla negra de sésamo (<i>Sesamum indicum</i> L.)	20/55/3/25	Sesamol, sesamilino, sesaminolo y sesamolol
Harina de soya (<i>Glycine max</i>)	36/40/0.5/0.03	Genistino, genisteino, daidzeino

de alimentos a usar ingredientes naturales, incluso aunque sean menos estables y más caros que los sintéticos alternativos. Las

características sensoriales de productos naturales son muy complicadas de imitar con una combinación de productos artificiales.

Tabla III. EFS de compuestos fenólicos con actividad antioxidante de hierbas y especias^a (continuación)

Material vegetal	Condiciones del proceso de EFS con CO ₂ P/T/tiempo/vel. flujo ^b	Compuesto activo
Hierbas de olor (<i>Satureja hortensis</i> L.)	12/40/2.5/53.5	Carvacrol, linalol, mirceno, mirtenol
Té verde (<i>Camelia sinensis</i>)	31/60/-/-	Galato epigallocatequino, galato galocatequino, epicatequino, ácido gálico
Tomillo (<i>T. vulgaris</i>)	30-35/35-40/0.5-1/ 45 kg/h	Timol, carvacrol, sesquiterpenos, monoterpenos, alcoholes terpenilos
Aceite de cúrcuma (<i>Curcuma longa</i> L.)	30/40/3/0.6	Z-γ-atlantono, E-γ-atlantono

^a Adaptado de Díaz-Reinoso *et al.* (2006)^b P= presión(MPa), T= temperatura (°C), tiempo (h), vel. flujo= velocidad de flujo (L/h)

Lo que es más, el costo de la extracción con CO₂ será balanceada por los altos precios de los extractos, ya que estos son de mayor calidad. La industria de los sabores y fragancias es un campo de aplicación de la EFS, la cual ha sido desarrollada considerablemente y la cual tiene plantas de extracción en varios países. Los antioxidantes naturales producidos por la EFS son también de interés para la industria alimenticia debido a que ellos no alteran el aroma, sabor y color de los alimentos, estos son fácilmente dispersos, altamente solubles, y no se evaporan durante el freído u horneado, como sucede con los antioxidantes sintéticos (Raventós *et al.*, 2002).

Conclusiones

Debido a la demanda de los consumidores, la tecnología de EFS (usando CO₂ como disolvente, debido a que no es flamable, no es tóxico, no contamina, y es fácil de recuperar), aplicada en la obtención de antioxidantes a partir de hierbas y especias, es una buena alternativa, realizando la adecuada selección de las condiciones de operación, tales como: presión, temperatura, velocidad de flujo del disolvente, tiempo de extracción, así como el tratamiento previo de la materia prima. Las principales ventajas de la tecnología de EFS son: alta calidad y pureza de los compuestos obtenidos, extracción rápida, extractos libres de residuos

de disolventes, extracción de compuestos específicos. Sin embargo, la principal desventaja es el alto costo inicial asociado con las altas presiones del equipo.

Referencias

- Anese, M. y Nicoli, M. C. 2003. Antioxidant properties of ready to drink coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(4):942-946.
- Baumann, D., Adler, S., Grüner, S., Otto, F., Weinreich, B. y Hamburger, M. 2004. Supercritical carbon dioxide extraction of marigold at high pressures: Comparison of analytical and pilot scale extraction. *Phytochemical Analysis*. 15(4):226-230.
- Benzie, I. F. F. y Strain, J. J. 1996. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1):70-76.
- Brunner, G. 2005. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*. 67(1):21-33.
- Cavero, S., Jaime, L., Martín-Álvarez, P. J., Señoráns, F. J., Reglero, G. e Ibáñez, E. 2005. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L). *European Food Research and Technology*. 221(3):478-486.
- Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P. y Rahmani, M. 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 68(5):307-311.

- Chipault, J. R., Mizuno, G. R. y Lundberg, W. O. 1956. The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technology*. 10:209-211.
- Chu, Y. F. y Liu, R. H. 2004. Novel low-density lipoprotein (LDL) oxidation model: Antioxidant capacity for the inhibition of LDL oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(22):6818-6823.
- Collins, A. R. y Harrington, V. 2003. Antioxidants; not the only reason to eat fruit and vegetables. *Phytochemistry Reviews*. 1(2):167-174.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. y Linssen J. P. H. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 77(1):140-146.
- Dean, J. R. y Liu, B. 2000. Supercritical fluid extraction of Chinese herbal medicines: investigation of extraction kinetics. *Phytochemical Analysis*. 11(1):1-6.
- Decker, E., Beecher, G., Slavin, J., Miller, H. E. y Marquart, L. 2002. Whole grains as a source of antioxidants. *Cereal Foods World*. 47(8):370-373.
- Díaz, O., Cobos, A., De la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. 1997. El dióxido de carbono supercrítico en la elaboración de alimentos de origen animal. *Alimentación, equipos y tecnología*. 16(7): 55-60.
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H. y Parajo, J.C. 2006. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (7):2441-2469.
- Esquivel, M. M., Ribeiro, M. A. y Bernardo-Gil, M. G. 1999. Supercritical extraction of savory oil: Study of antioxidant activity and extract characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*. 14(2):129-138.
- Fadel, C., Richard, H. y Berset, C. 1999. Antioxidative activity and phenolic compositions of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 73(5):645-652.
- Faraji, H. y Lindsay, R. C. 2004. Characterization of the antioxidant activity of sugars and polyhydric alcohols in fish oil emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(23):7164-7171.
- Frankel, E. N. y Meyer, A. S. 2000. The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(13):1925-1941.
- Froning, G.W., Wehling, R.L., Cuppett, S.L. y Niemann, L. 1998. Moisture content and particle size of dehydrated egg yolk affect lipid and cholesterol extraction using supercritical carbon dioxide. *Poultry Science*. 77(11):1718-1722.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. y Scaccini, C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical review and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*. 29(11):1106-1114.
- Gordon, M.H. 2001. Measuring antioxidant activity. En J. Pokorný, N. Yanishlieva y M. Gordon (Eds). *Antioxidants in food*. CRC Press. Boca Raton. Fla. EE.UU. pp. 71-84.
- Hu, Q., Xu, J., Chen, S. y Yang, F. 2004. Antioxidant activity of extracts of black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) by supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(4):943- 947.
- Jeong, W. S. y Kong, A. N. 2004. Biological properties of monomeric and polymeric catechins: Green tea catechins and procyanidins. *Pharmaceutical Biology*. 42(1):84-93.
- Kalt, W., Forney, C., Martin, A. y Prior, R.L. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(11):4638-4644.
- Kazlas, P.T., Novak, R.D. y Robey, R.J. 1994. Supercritical carbon dioxide decaffeination of acidified coffee. EE.UU. Patent 5 288511.
- King, J.W. 2000. Advances in critical fluid technology for food processing. *Food Science Technology*. 14 (4):186-191.
- Kitts, D. D. y Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources; Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*. 9(16):1309-1323.
- Leal, P. L., Braga, M. E. M., Sato, D. N., Carvalho, J. E., Marques, M. O. M. y Meireles, M. A. A. 2003. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (9): 2520-2525.

- Lim, S. N., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C. y Ang, P. O. 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(13):3862-3866.
- Lin, M. Y. y Yen, C. L. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(4):1460-1466.
- Louli, V., Ragoussis, N. y Magoulas, K. 2004. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry byproducts. *Bioresource Technology*. 92(2):201-208.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Tuveri, E., Sanjust, E., Meli, M., Sollai, F., Zucca, P. y Rescigno, A. 2007. Supercritical CO₂ extract of *Cinnamomum zeylanicum*: chemical characterization and antityrosinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(24):10022-10027.
- Mansouri, A., Makris, D. P. y Kefalas, P. 2005. Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of cinnamic and benzoic acids employing a highly sensitive peroxyoxalate chemiluminescence-based assay: Structure-activity relationships. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39(1):22-26.
- Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., Andoh, T., Shiohara, A. y Nakata, M. 1999. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(4):1749-1754.
- Mau, J. L., Lin, H. C. y Chen, C. C. 2002. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(21):6072-6077.
- Mau, J. L., Ko, P. T. y Chyau, C. C. 2003. Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Research International*. 36(1):97-104.
- Modey, W.K., Mulholland, D.A. y Raynor, M.W. 1996. Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochemical Analysis*. 7(1):1-15.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J. y Pajaró, J. C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72(2):145-171.
- Ollanketo, M., Hartonen, K., Riekkola, M.L., Holm, Y. y Hiltunen, R. 2001. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene in tomato skins. *European Food Research and Technology*. 212(5):561-565.
- Palmer, M. V. y Ting, S. S. T. 1995. Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chemistry*. 52(4):345-352.
- Pokorný, J. 2000. Natural antioxidants. En P. Zeuthen y L. Bogh-Sorensen (Eds). *Food Preservation Techniques*. CRC Press. Boca Raton. Fla. EE.UU. pp. 31-50.
- Prior, R. L., Wu, X. y Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(10):4290-4302.
- Quites, J.L., Ramírez-Tortosa, M.C., Gómez, J.A., Huertas, J.R. y Mataix, J. 2002. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chemistry*. 76(4):461-468.
- Raventós, M., Duarte, S. y Alarcón, R. 2002. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: An overview. *Food Science and Technology International*. 8(5):269-284.
- Reglero, G., Señoráns, J.F. e Ibañez, E. 2005. Supercritical fluid extraction: an alternative to isolating natural food preservatives. En G.V. Barbosa-Cánovas, M.S. Tapia y M.P. Cano (Eds). *Novel Food Processing Technologies*. CRC Press. Boca Raton. Fla. EE.UU. pp 539-550.
- Rizvi, S.S.H., Yu, Z.R., Bhaskar, A.R. y Chidambaram, C.B. 1994. Fundamentals of processing with supercritical fluids. En S.S.H. Rizvi (Eds). *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*. Blackie Academic and Professional. Londres. Reino Unido. pp. 1-10.
- Rizvi, S.S.H., Mulvaney, S.J. y Sokhey, A.S. 1995. The combined application of supercritical fluid and extrusion technology. *Trends in Food Science and Technology*. 6(7):232-240.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swarsitang, P. y Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 66(4):401-436.

- Rozzi, N. L., Phippen, W., Simon, J. E. y Singh, R. K. 2002. Supercritical fluid extraction of essential oil components from lemonscented botanicals. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie*. 35(4):319-324.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M.M. y Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 91(4):621-632.
- Saldaña, M.D.A., Mohamed, R.S., Baer M.G.G. y Mazzafera, P. 1999. Extraction of purine alkaloids from ate (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(9):3804–3808.
- Scalia, S., Giuffreda, L. y Pallado, P. 1999. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 21(3):549-558.
- Señoráns, F.J., Ruiz-Rodríguez, A., Ibáñez, E., Tabera, J. y Reglero, G. 2001. Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of alcoholic beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(4):1895–1899.
- Shahidi, F. y Nazk, M. 1995. Food fenolics. Sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing. Co. Inc. Pensilvania. EE.UU. 105 p.
- Smelcerovic, A., Lepojevic, Z. y Djordjevic, S. 2004. Sub-and supercritical CO₂ extraction of *Hypericum perforatum* L. *Chemical Engineering and Technology*. 27(12):1327-1329.
- Sovová, H., Jez, J., Bártlová, M. y Stastová, J. 1995. Supercritical carbon dioxide extraction of black pepper. *The Journal of Supercritical Fluids*. 8(2):295-301.
- Srinivasan, K. 2005. Spices as influencers of body metabolism: An overview of three decades of research. *Food Research International*. 38(1):77-86
- Steytler, D. 1996. Supercritical fluid extraction and its application in the food industry. En A.S. Grandison y M.J. Lewis (Eds). *Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries*. Technomic Publishing Company, Inc. Pensilvania. EE.UU. pp 17-31.
- Tsuda, T., Mizuno, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. y Osawa, T. 1995. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidative components from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(11):2803-2806.
- Uccella, N. 2001. Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. *Trends in Food Science & Technology*. 11(9): 328-339.
- Uy, N., Frankman, G. y Evans, D. A. 1991. Labiatae derived antioxidant composition. European Patent EP0454097.
- Vági, E., Rapavi, E., Hadolin, M., Peredi, K. V., Balazs, A., Blazovics, A. y Simándi, B. 2005. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(1):17-21.
- Van Acker, S. A., Van den Berg, D. J., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van der Vijgh, W. J. y Bast, A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(3):331-342.
- Verma, A., Hartonen, K. y Riekkola, M. L. 2008. Optimization of supercritical fluid extraction of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* using experimental design methodology. Comparison with other extraction techniques. *Phytochemical Analysis*. 19(1): 52–63.
- Wei, A., Mura K. y Shibamoto, T. 2001. Antioxidative activity of volatile chemicals extracted from beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(7):4097- 4101.
- Wei, A. y Shibamoto, T. 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(5):1737-1742.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. y Pokorny, J. 2006. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 108(9):776–793.
- Yilmaz, Y. y Toledo, R. 2005. Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chemistry*. 93(2):273-278.
- Zaporozhets, O. A., Krushynska, O. A., Lipkovska, N. A. y Barvinchenko, V. N. 2004. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(1):21-25.

Zekovic, Z., Lepojevic, Z. y Tolic, A. 2001. Modeling of the thyme supercritical carbon dioxide extraction system. The influence of carbon dioxide flow rate and grinding degree of thyme. *Separation Science and Technology*. 36(15):3459-3472.