

# Precipitación supercrítica anti-solvente de extractos de Regaliz (*Glycyrrhiza glabra L.*)

Diego Martín Hernández

Máster en Nuevos Alimentos



MÁSTERES  
DE LA UAM  
2018 - 2019

Facultad de Ciencias

# Máster en Nuevos Alimentos

## Precipitación supercrítica anti- solvente de extractos de Regaliz (*Glycyrrhiza glabra* L.)

**Diego Martín Hernández**

Directores: Tiziana Fornari Reali y Somaris Quintana Martínez

Lugar de realización: Instituto de Investigación de Ciencias de la

Alimentación (CIAL) Departamento de Producción y

Caracterización de Nuevos Alimentos



FACULTAD DE  
CIENCIAS

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Formación de partículas utilizando la tecnología de fluidos supercríticos.....	4
1.2. Raíz de regaliz ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> ).....	10
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1. Materiales .....	16
3.2. Métodos y equipamientos utilizados .....	16
3.2.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE) .....	16
3.2.2. Preparación de las disoluciones de extracto de raíz de regaliz para la precipitación SAS	17
3.2.3. Proceso SAS con CO <sub>2</sub> supercrítico.....	17
3.2.4. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales (TPC).....	20
3.2.5. Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo DPPH .....	21
3.2.6. Análisis de las muestras por HPLC-DAD .....	21
3.2.7. Análisis de la distribución del tamaño de partícula.....	22
3.2.8. Análisis de la morfología.....	22
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>23</b>
4.1. Rendimientos.....	23
4.2. Compuestos fenólicos totales (TPC) .....	26
4.3. Capacidad antioxidante (ensayo del radical DPPH).....	29
4.4. Análisis HPLC-DAD de los compuestos analizados.....	32
4.5. Distribución del tamaño de partícula.....	34
4.6. Evaluación de la morfología.....	38
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>1</b>

## **RESUMEN**

El creciente interés en la incorporación de compuestos bioactivos en matrices alimentarias es un campo prioritario de la investigación actual en el área de la alimentación y la salud. Tecnologías más eficaces y medioambientalmente limpias, como la tecnología de fluidos supercríticos, se están estudiando y desarrollando para alcanzar este objetivo. La precipitación supercrítica anti-solvente (SAS) utilizando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) constituye una de estas técnicas, y permite obtener sólidos en partículas de pequeños tamaños para mejorar su incorporación en matrices alimentarias y, además, aumentar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos. En este trabajo se llevó a cabo la precipitación SAS de la raíz de regaliz, una planta utilizada en medicina tradicional por sus compuestos bioactivos con demostradas propiedades beneficiosas para la salud.

La precipitación SAS de un extracto etanólico de raíz de regaliz, obtenido mediante extracción asistida por ultrasonidos, se estudió en el rango de condiciones de 100 - 200 bar, 35 y 40 °C, y 9,6 y 14,2 mg/ml de disolución de extracto. Los productos obtenidos se analizaron en relación a su capacidad antioxidante, contenido de compuestos bioactivos, así como tamaño y morfología de las partículas obtenidas. Los resultados obtenidos demuestran que la técnica SAS permite fraccionar el extracto original, aumentando la actividad antioxidante de los precipitados en comparación con el extracto original, con rendimientos de precipitación de hasta 53 %. Asimismo, se demuestra que es esencial mantener condiciones de operación supercríticas para obtener partículas secas, regulares, y pequeñas, con un tamaño medio de 16 µm, en las condiciones óptimas determinadas (150 bar, 35°C y 9,6 mg/ml).

## **ABSTRACT**

The growing interest in the incorporation of bioactive compounds in food matrices is a priority field of current research in the area of food and health. More efficient and environmentally clean technologies, such as supercritical fluid technology, are being studied and developed to achieve this goal. Supercritical anti-solvent precipitation (SAS) using carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) constitutes one of these techniques, and allows obtaining solids in particles of small sizes to improve their incorporation into food matrices and, in addition, increase the bioavailability of bioactive compounds. In this work the SAS precipitation of licorice root was carried out, a plant used in traditional medicine for its bioactive compounds with proven beneficial health properties.

The SAS precipitation of an ethanolic extract of licorice root, obtained by ultrasonic assisted extraction, was studied in the range of 100-200 bar, 35 and 40 ° C, and 9.6 and 14.2 mg / ml of extract solution. The products obtained were analyzed concerning their antioxidant capacity, content of bioactive compounds, as well as size and morphology of the particles obtained. The results obtained show that SAS technique allows the fractionation of the original extract, increasing the antioxidant activity of the precipitates in comparison to the original extract, with precipitation yields of up to 53%. Likewise, it is demonstrated that it is essential to maintain supercritical operating conditions to obtain dry, regular, and small particles, with an average size of 16 µm, under the optimal conditions determined (150 bar, 35 ° C and 9.6 mg / ml).

## **ABREVIATURAS**

**SLE:** del inglés *solid-liquid extraction* (extracción sólido-líquido)

**LLE:** del inglés *liquid-liquid extraction* (extracción líquido-líquido)

**GRAS:** del inglés *generally recognized as safe* (generalmente reconocido como seguro)

**UAE:** del inglés *ultrasound-assisted extraction* (extracción asistida por ultrasonidos)

**SAS:** del inglés *supercritical antisolvent* (antisolvente supercrítico)

**GAE:** del inglés *gallic acid equivalent* (equivalentes de ácido gálico)

**DPPH:** del inglés *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

**TEAC:** del inglés *Trolox equivalent antioxidant capacity* (capacidad antioxidante equivalente de Trolox)

**IC<sub>50</sub>:** del inglés *half maximal inhibitory concentration* (concentración inhibitoria máxima media)

**DAD:** del inglés *Diode array detector* (detector de arreglo de diodos)

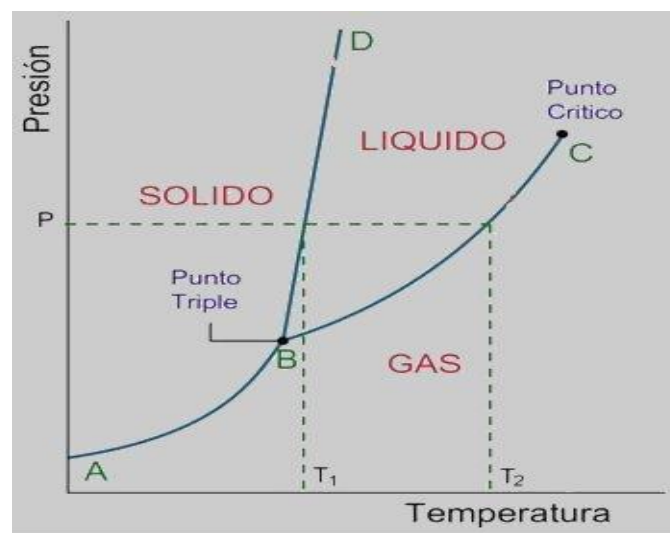
**PCM:** punto crítico de la mezcla

**SCCO<sub>2</sub>:** del inglés *supercritical CO<sub>2</sub>* (CO<sub>2</sub> supercrítico)

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la industria alimentaria está enfocando sus metas de innovación en el diseño de nuevos alimentos con propiedades funcionales, atendiendo al creciente interés de los consumidores hacia alimentos que, además de su valor nutricional, también aporten otros beneficios a nuestro organismo. Estos efectos beneficiosos se atribuyen a ciertos compuestos bioactivos, que pueden encontrarse de manera natural en el alimento o ser añadidos de manera exógena (Alvídrez-Morales *et al.*, 2002). Las materias primas de origen vegetal son una fuente importante y diversa de biomoléculas que pueden utilizarse con fines alimentarios. Existen diferentes técnicas para la extracción de compuestos bioactivos de matrices vegetales, tales como la extracción Soxhlet, extracción asistida por microondas o por ultrasonidos, la extracción con líquidos presurizados, o la extracción con fluidos supercríticos.

Un fluido supercrítico es una sustancia que se encuentra por encima de su punto crítico, definido por su temperatura crítica ( $T_c$ ) y su presión crítica ( $P_c$ ) (ver Figura 1).



**Figura 1.** Diagrama de fases sólido-líquido-gas de una sustancia pura.

Los fluidos supercríticos fueron estudiados por primera vez en 1879 por Hannay y Howarth, pero no se investigaron como alternativa a la extracción sólido-líquido (SLE) y/o líquido-líquido (LLE) hasta 1960. La principal característica de estos fluidos es que en condiciones por encima pero cercanas a su punto crítico tiene propiedades intermedias entre las de un líquido y las de un gas. La densidad es similar a la de los líquidos mientras que su viscosidad

de un fluido supercrítico es similar a la de los gases. Esta característica, y otras propiedades fisicoquímicas de los fluidos supercríticos, se muestran en la Tabla 1 y se comparan con la de los líquidos y gases.

**Tabla 1.** Comparación de las propiedades fisicoquímicas de un fluido supercrítico (FSC), de los líquidos y de los gases.

PROPIEDAD	GAS	FSC	LÍQUIDO
DENSIDAD (KG/M <sup>3</sup> )	1	100-900	600-1600
DIFUSIVIDAD (MM <sup>2</sup> /S)	1-10	0,01-0,1	0,001
VISCOSIDAD, CP	0,01	0,05-0,1	0,5-1,0

Hay distintos compuestos que pueden ser usados para extracción supercrítica, algunos de ellos se muestran en la Tabla 2, pero el CO<sub>2</sub> es el más industrialmente utilizado, especialmente en la industria alimentaria. Esto se debe sus características especiales, ya que no es tóxico, es barato, no es inflamable y posee una alta difusividad. Asimismo, la facilidad para alcanzar su punto crítico (31 °C y 73,86 bar) abarata los costes de operación y permite trabajar con muestras termolábiles. También, siendo un gas a temperatura ambiente, no deja residuos en el extracto obtenido, permite trabajar con muestras fácilmente oxidables porque no es oxidante, no es corrosivo, es inodoro, es incoloro, y en condiciones supercríticas tiene una densidad relativamente alta y una baja tensión superficial (alta penetración). Una de sus mayores ventajas para su uso en la industria alimentaria es su etiqueta como disolvente GRAS.

El principal inconveniente que presenta el CO<sub>2</sub> como disolvente supercrítico es su carácter apolar, hecho que se puede atenuar mediante el uso de co-solventes como el metanol, etanol o agua para aumentar su polaridad en el caso de extracción de componentes más polares (Vázquez de Frutos, 2008; Mendiola *et al.*, 2013).

Además de la extracción, la tecnología de fluidos supercríticos ofrece otras aplicaciones que permiten múltiples oportunidades dentro de la producción de ingredientes alimentarios. Entre ellas, la formación de pequeñas partículas o micronización mediante fluidos supercríticos, presenta particulares ventajas para la alimentación funcional. La micronización se define como una técnica de reducción de tamaño cuya partícula formada tiene menos de 10 µm de tamaño. Esta micronización se usa en la industria principalmente para incorporar compuestos



en matrices donde de manera convencional no se podría por diferencias de polaridad u otras propiedades. También, es bien conocido que la micronización permite aumentar la biodisponibilidad de los principios activos en la industria farmacéutica, y es atractivo aplicar este mismo concepto en la formulación de alimentos con propiedades funcionales dentro de la industria alimentaria, para aumentar su absorción y garantizar su eficacia.

**Tabla 2.** Condiciones críticas de diferentes compuestos. Tc: temperatura en punto crítico, Pc: presión en punto crítico,  $\rho$ : densidad.

<i>FLUIDO</i>	<i>T<sub>c</sub> (°C)</i>	<i>P<sub>c</sub> (bar)</i>	<i><math>\rho</math> (kg/m<sup>3</sup>)</i>
<i>Acetileno</i>	36	62,47	232,14
<i>Acetona</i>	235	47,00	278,00
<i>Agua</i>	374	220,90	322,60
<i>Dióxido de carbono</i>	31	73,86	467,60
<i>Etano</i>	32	48,71	135,75
<i>Etanol</i>	240,4	61,40	276,00
<i>Etileno</i>	9	50,40	195,80
<i>Metano</i>	-83	45,95	161,43
<i>Metanol</i>	239,9	80,90	272,00
<i>Propano</i>	97	42,47	225,64
<i>Propileno</i>	91,8	46,00	232,00

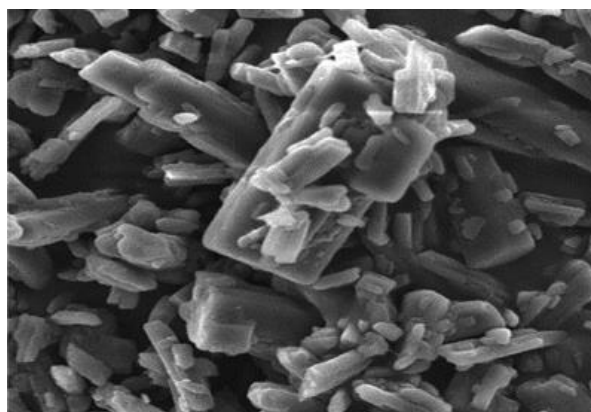
Convencionalmente, los métodos de reducción de tamaño se basaban en técnicas físicas como molienda, trituración, cristalización o corte, pero estas técnicas no permiten tamaños lo suficientemente pequeños (Rasenack y Müller, Dr (hon) Bernd W., 2004). La micronización utiliza nuevas técnicas para disminuir aún más este tamaño de partícula, como el spray-drying, freeze-drying o líquido anti-solvente. Pero la micronización con fluidos supercríticos presenta, además de las ventajas ya comentadas para la extracción, la posibilidad de obtener partículas finas, homogéneas y de tamaños regulares. Así, esta técnica se puede utilizar en la fabricación de fármacos, extractos naturales, pigmentos, superconectores o explosivos (Martín y Cocero, 2008).

## 1.1. Formación de partículas utilizando la tecnología de fluidos supercríticos

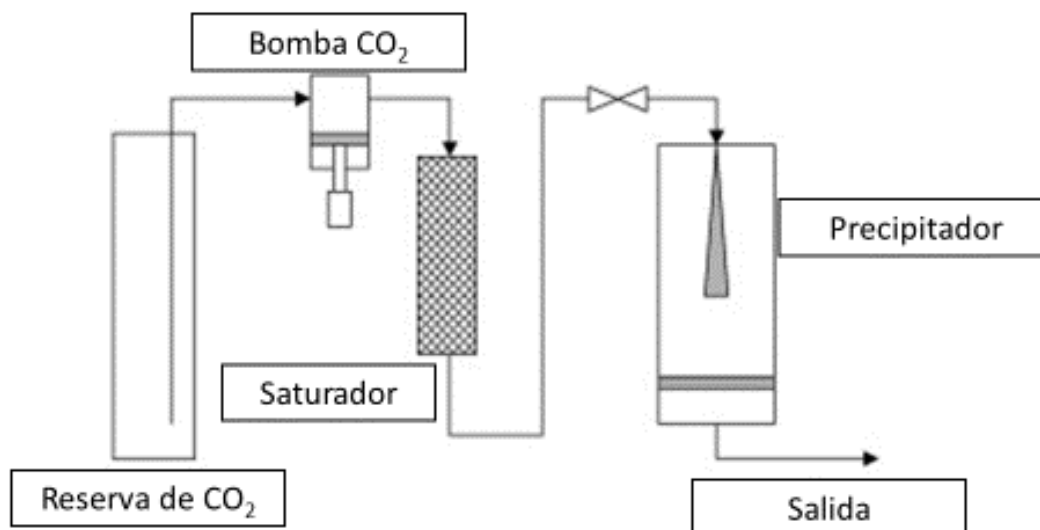
La micronización usando fluidos supercríticos presenta diversas variantes, entre las que destacan:

- RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions): el fluido supercrítico actúa como disolvente.
- SAS (Supercritical Anti-Solvent): el fluido supercrítico actúa como anti-solvente.
- PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions): partículas obtenidas a partir de disoluciones saturadas por el fluido supercrítico.
- SAA (Supercritical Assisted Atomization): secado por aspersion con ayuda de SCCO<sub>2</sub>.

En la técnica RESS el proceso se divide en dos etapas: primero se lleva a cabo la extracción del sustrato que satura el fluido supercrítico (disolvente) y luego la despresurización brusca en una celda disminuye el poder solvente del fluido supercrítico y provoca la precipitación del sustrato. El rápido cambio que sufre el disolvente de fluido supercrítico a gas provoca una alta supersaturación y nucleación generando partículas de sustrato de alta pureza (ver figura 2). Las ventajas que presenta este método son las bajas temperaturas usadas, la formación de cristales y polvos ultrafinos, una distribución homogénea de tamaños y un producto libre de disolventes orgánicos. La principal limitación del RESS es que sólo se puede usar para sustancias que se puedan disolver en el fluido supercrítico, que generalmente es el CO<sub>2</sub>. En la figura 3 se encuentra un diagrama del proceso RESS (Ye y Wai, 2003; Martín y Cocero, 2008; Bagheri *et al.*, 2019).

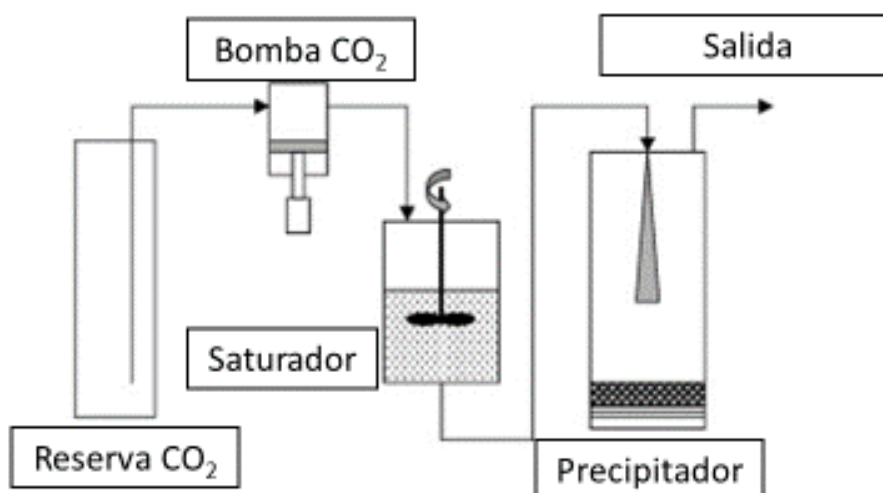


**Figura 2.** Partículas formadas por el método de RESS (Sodeifian *et al.*, 2019)



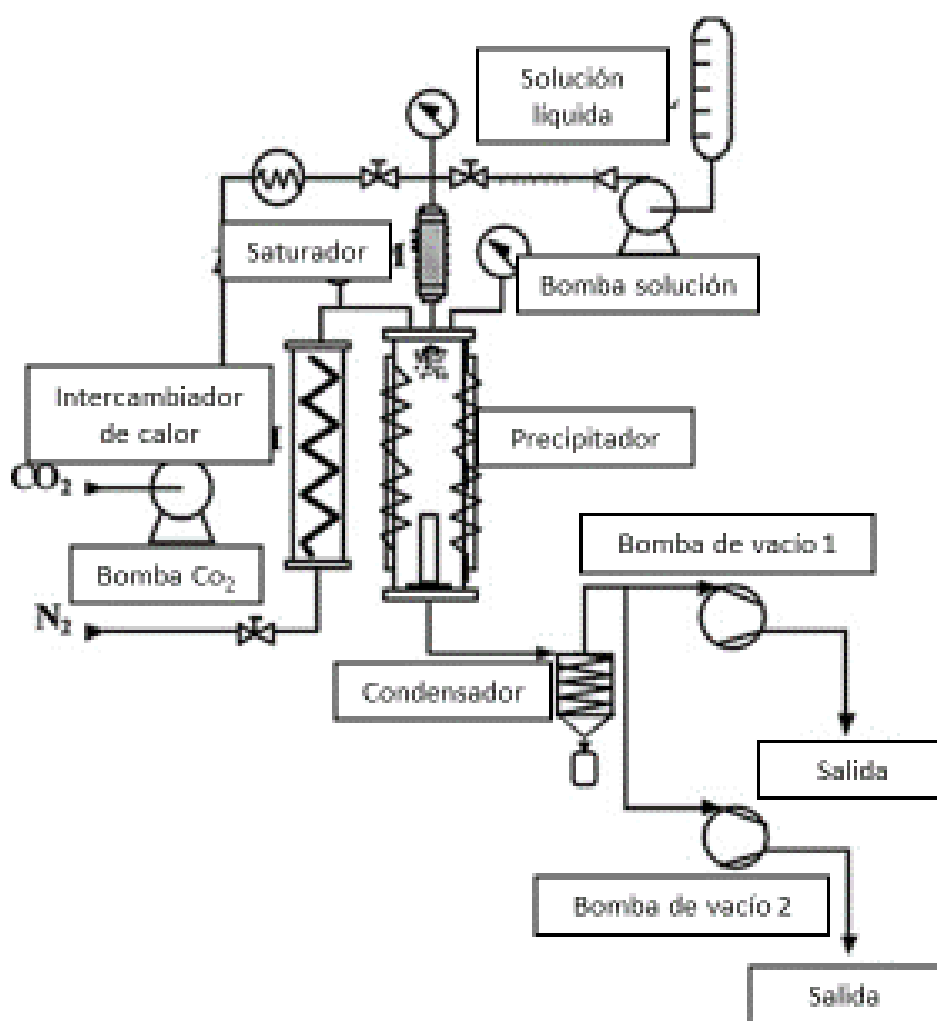
**Figura 3.** Diagrama esquemático de un proceso RESS.

En el método PGSS, el CO<sub>2</sub> supercrítico funciona como un agente de dispersión que produce enfriamiento cuando se lleva a cabo la descompresión del CO<sub>2</sub> supercrítico. En primer lugar el CO<sub>2</sub> se disuelve en el soluto, y la disolución se expande al paso de una boquilla. Esta expansión provoca la evaporación del CO<sub>2</sub> y el efecto de enfriamiento. Las principales ventajas que presenta el PGSS es el uso reducido de CO<sub>2</sub> y su sencillez, ya que se pueden usar presiones atmosféricas en el precipitador. En la figura 4 se puede ver el diagrama de una planta de PGSS (Martín y Cocero, 2008; Silva *et al.*, 2019).



**Figura 4.** Diagrama esquemático de un proceso PGSS.

En la técnica del SAA, una cantidad de CO<sub>2</sub> supercrítico es solubilizado de manera controlada en un líquido que presenta el soluto previamente disuelto. Esta disolución se atomiza a través de una boquilla en una celda de precipitación a presión atmosférica, formando micropartículas por la evaporación de gotitas con nitrógeno caliente. El proceso se produce en dos pasos: la formación de gotas al salir de inyector, seguida de la atomización por descompresión, gracias a la expansión del fluido supercrítico. Para que la técnica se lleve a cabo adecuadamente, la evaporación de las gotas debe de ser rápida y completa para evitar la coalescencia. Existe una limitación en esta técnica, y es la dificultad de su uso en el caso de sustancias termolábiles, puesto que el hecho de trabajar a presión ambiente provoca que se usen altas temperaturas para la evaporación completa del disolvente. En la figura 5 se puede ver el diagrama de una planta de SAA (Adami *et al.*, 2011).

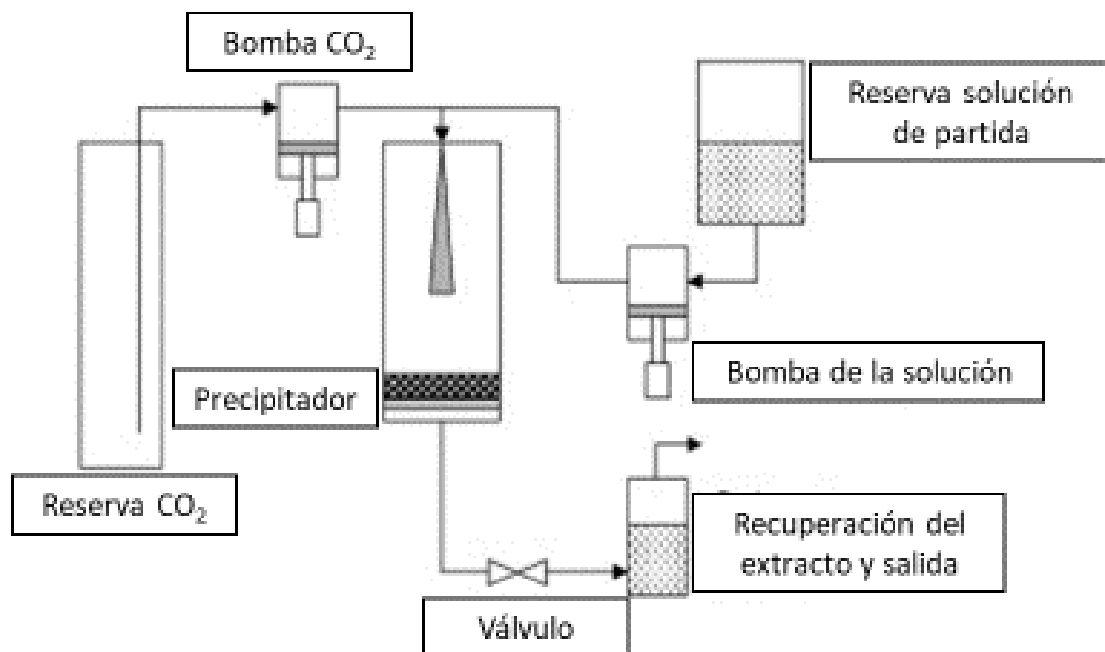


**Figura 5.** Diagrama esquemático de un proceso SAA.

## Precipitación Supercrítica Anti-solvente (SAS)

La precipitación SAS consiste en el contacto continuo entre el  $\text{SCCO}_2$  y la sustancia que se desea precipitar en forma de pequeñas partículas, la que se encuentra disuelta en un disolvente orgánico capaz de disolverse en el  $\text{SCCO}_2$ . La disolución se introduce en una celda de precipitación a través de una boquilla, formando pequeñas gotas, donde también se introduce el  $\text{CO}_2$  en condiciones supercríticas. Cuando se produce el contacto, el  $\text{SCCO}_2$  penetra en las pequeñas gotas de disolvente, provocando la sobresaturación de la disolución y precipitación de la sustancia (efecto anti-solvente). La fase  $\text{SCCO}_2$  + disolvente se extrae de la celda de precipitación, donde se recoge el precipitado en forma de pequeñas partículas sólidas. En la figura 6 se puede ver un esquema del proceso SAS (Martín y Cocero, 2008; Langa *et al.*, 2019).

En la precipitación SAS, las condiciones de temperatura y presión deben estar por encima del punto crítico de la mezcla  $\text{CO}_2$  + disolvente, para asegurar que se forme una fase supercrítica homogénea y el disolvente sea completamente eliminado de la celda de precipitación. Así, las condiciones de operación dependen en gran medida del disolvente orgánico empleado para disolver la sustancia de interés. En el caso de la industria alimentaria, el principal disolvente utilizado en esta técnica es el etanol.

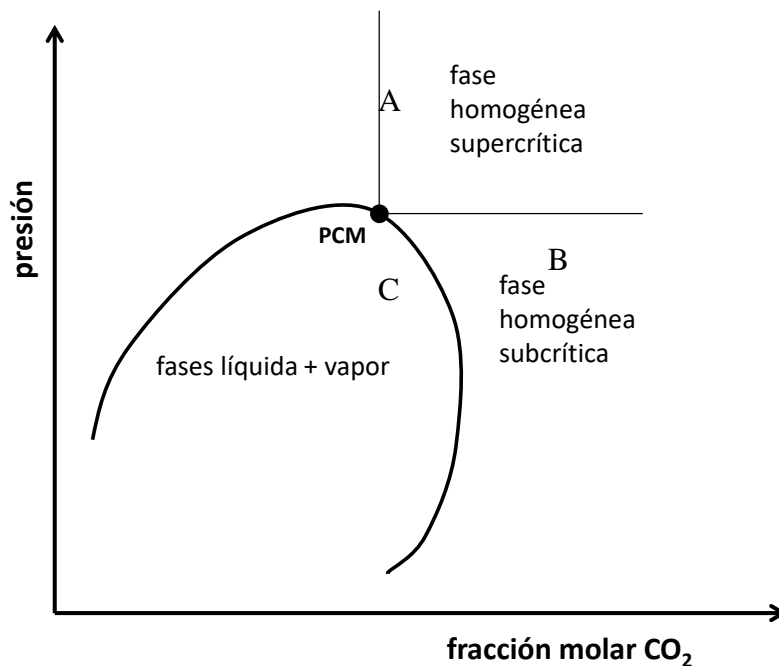


**Figura 6.** Diagrama esquemático de un proceso SAS.

En la técnica SAS para lograr una precipitación de partículas pequeñas y homogéneas, es necesario tener en cuenta diferentes variables de operación como son la presión, la temperatura, la concentración de la disolución de partida, el caudal del CO<sub>2</sub> o el caudal de disolución, variables que deben seleccionarse teniendo en cuenta los puntos críticos de la mezcla (PCM) CO<sub>2</sub> + disolvente, tal y como se explica a continuación.

### Efecto del punto crítico de la mezcla (PCM) en el proceso SAS

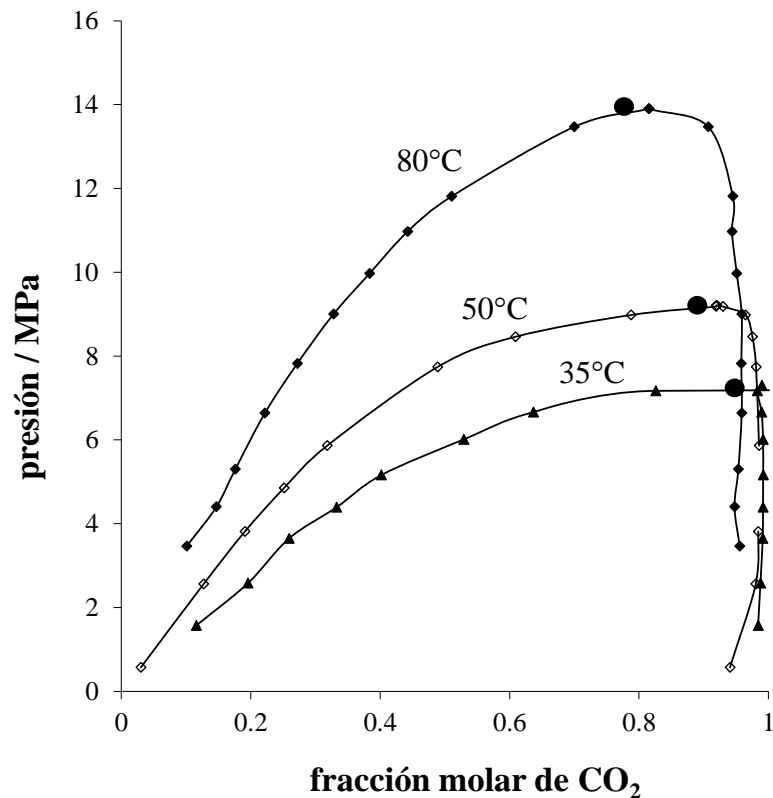
Cuando la fase supercrítica no es una sustancia pura sino una mezcla, el punto crítico de la mezcla (PCM) no es único, como en el caso de la Figura 1, sino que depende de la composición de la mezcla. La Figura 7 muestra esquemáticamente una isoterma del diagrama Presión vs. Composición para una mezcla binaria de CO<sub>2</sub> + disolvente, señalando el PCM de la mezcla. Como puede verse en la figura 7, para una determinada temperatura (isoterma), el PCM se corresponde con la presión y fracción molar de CO<sub>2</sub> en el que las fases líquidas + vapor convergen en una única fase homogénea supercrítica. Por debajo de esta presión crítica existen una fase homogénea subcrítica a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y una región de dos fases (líquido + vapor) en un amplio rango de concentraciones de CO<sub>2</sub>.



**Figura 7.** Esquema del diagrama Presión vs. Composición para una mezcla binaria de CO<sub>2</sub> + disolvente. PCM: punto crítico de la mezcla.

Para el proceso SAS, se esperan condiciones de trabajo en la región supercrítica (zona A de la Figura 7), región donde las partículas precipitadas son más pequeñas y más homogéneas. Si las condiciones de trabajo se encuentran en la región subcrítica (zona B), en general, las partículas obtenidas son más irregulares, con aglomerados e incluso con formaciones huecas (Reverchon *et al.*, 2010). Obviamente, es necesario evitar la región de dos fases (zona C), puesto que en este caso podría resultar la precipitación de disolvente líquido en la celda de precipitación.

La Figura 8 muestra el diagrama Presión vs. Composición de la mezcla binaria CO<sub>2</sub> + etanol a distintas temperaturas, según datos experimentales (Chang *et al.*, 1997; Nam Joung *et al.*, 2001; Knez *et al.*, 2008). Claramente, las condiciones de trabajo en la precipitación SAS, para asegurar condiciones de operación en fase supercrítica homogénea, demanda fracciones molares muy altas de CO<sub>2</sub> en la fase supercrítica CO<sub>2</sub> + etanol, así como presiones de trabajo mayores a temperaturas mayores. En resumen, la presión crítica del PCM aumenta con la temperatura mientras que la concentración crítica de CO<sub>2</sub> en la mezcla binaria disminuye con la temperatura.



**Figura 8.** Diagrama Presión vs. Composición para la mezcla binaria de CO<sub>2</sub> + etanol a distintas temperaturas. (●) PCM: punto crítico de la mezcla.

En el caso de la precipitación SAS de un componente muy insoluble en la fase supercrítica CO<sub>2</sub> + disolvente, los PCM de la mezcla binaria CO<sub>2</sub> + disolvente pueden utilizarse como una referencia para determinar las condiciones favorables de precipitación. Así, por ejemplo, en el caso de una disolución etanólica de un componente bioactivo prácticamente insoluble en SCCO<sub>2</sub> + etanol, los PCM que muestra la Figura 8 pueden tenerse en cuenta para diseñar el proceso SAS.

No obstante, cuando se precipita el extracto etanólico de un material vegetal, existe un número elevado de componentes en la disolución, y puede ocurrir que algunos de ellos sean parcialmente o muy solubles en SCCO<sub>2</sub> + etanol, por lo que el PCM puede variar significativamente respecto de los valores correspondientes al sistema binario SCCO<sub>2</sub> + etanol. En general, siendo los componentes del extracto sustancia de mayor peso molecular y volatilidad mucho menor que la del CO<sub>2</sub> o etanol, se espera que a una determinada temperatura el PCM aumente con la presión y, además, con la concentración de las sustancias solubles en la fase supercrítica.

Son numerosos los extractos vegetales precipitados con la técnica SAS y utilizando etanol como disolvente líquido. Como ejemplos, se citan los extractos de romero (Visentin *et al.*, 2012), extractos de hojas de mango (Guamán-Balcázar *et al.*, 2019), de hojas de naranja (Montes *et al.*, 2019) y de milenrama (Villanueva-Bermejo *et al.*, 2017). No existe en la actualidad ningún estudio de la precipitación SAS de raíz de *Glycyrrhiza glabra*, comúnmente llamada regaliz. Esta planta presenta ciertos componentes muy atractivos por sus propiedades bioactivas, tal y como se explicará a continuación, y por esto constituye el material de estudio del presente trabajo.

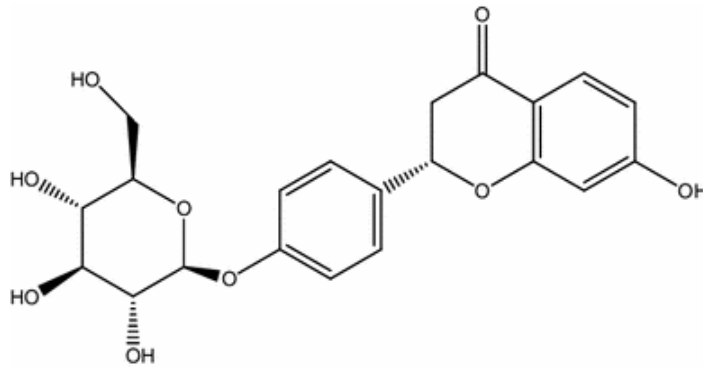
## **1.2 Raíz de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*)**

La *Glycyrrhiza glabra* o el regaliz es una planta medicinal que se puede encontrar en el Mediterráneo, Asia y en otras partes del sureste de Europa. Su uso más extendido es el de aditivo edulcorante a partir del extracto de raíz de regaliz (E958), que contiene glicirricina, compuesto que le confiere su característico sabor dulce. En Estados Unidos su presentación como saborizante es en glicirrinato de amonio. Su sabor dulce, unido a ciertas propiedades bioactivas, ha provocado su uso como planta medicinal. Tradicionalmente, la raíz de regaliz se ha usado para curar problemas del aparato respiratorio superior, desórdenes digestivos, antiestrés o incluso como agente antiviral.



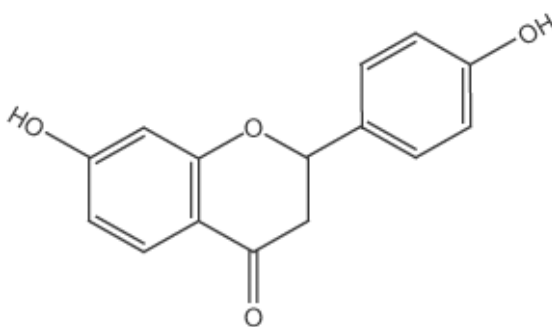
En estudios recientes se han demostrado diferentes propiedades bioactivas, como antitusivo, inhibidor de la trombina, antiulcerativo, antimicrobiano y antiviral, antiinflamatorio y antioxidante, antidiabético, hepatoprotector y anticancerígeno. Los dos grandes grupos de compuestos que se consideran responsables de estas propiedades son los triterpenoides y los derivados fenólicos (Saxena, 2005; Chin *et al.*, 2007; Kaur, 2013). De estos componentes, destacan:

- **Liquiritin:** es una flavanona glicosilada derivada de la liquiritigenina. Su estructura química se puede ver en la figura 9. Se forma como metabolito de la planta cuando un residuo de beta-D-glucopiranosil ataca la posición 4' de la liquiritigenina por un enlace glicosídico. Se le atribuyen funciones protectoras contra la isquemia cerebral y espasmolítico. Otros estudios recientes concluyen que el liquiritin podría aumentar la actividad de la superóxido dismutasa o inhibir la peroxidación lipídica (Zhang *et al.*, 2013; Kaur, 2013).



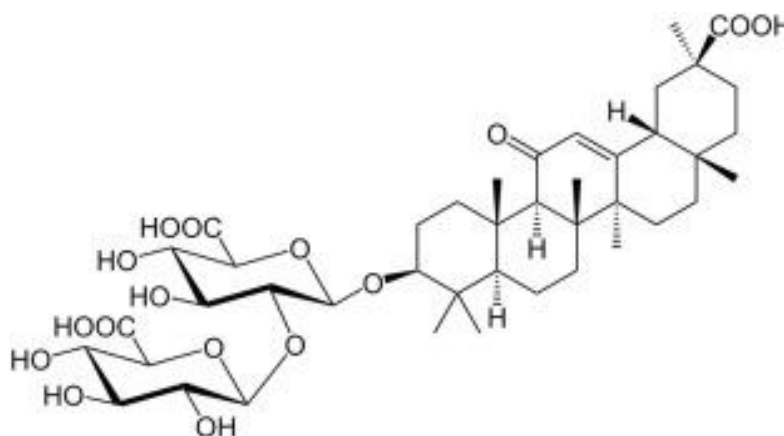
**Figura 9.** Estructura química del liquiritin

- **Liquiritigenina:** la liquiritigenina es una dihidroxiflavanona con dos grupos hidroxilo en la posición 4' y 7'. En la figura 10 se puede ver su estructura. Es un agonista de los estrógenos de los receptores  $\beta$ . Se le atribuyen funciones como la actividad antialérgica o su actividad estrogénica (Kim *et al.*, 2008; Kaur, 2013)



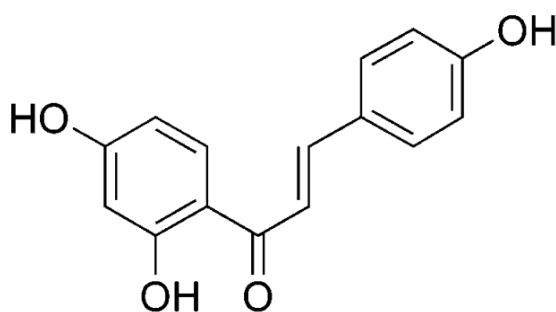
**Figura 10.** Estructura química de la liquiritigenina.

- **Ácido glicirrónico:** el ácido glicirrónico o glicirricina es un triterpeno glicosilado con dos ácidos glucurónicos en el C-3. La estructura química puede observarse en la figura 11. Presenta una parte hidrofóbica, correspondiente al triterpeno denominado ácido glicirrético, y la parte hidrofílica, los ácidos glucurónicos. Se trata del compuesto bioactivo principal del regaliz dentro de la medicina china y japonesa, y actualmente es uno de los triterpenos más estudiados. Entre sus propiedades bioactivas se encuentran la actividad antiviral, antihiperlipidémica, contra carcinoma hepatocelular, actividad antitusiva y antitrombótica, antiVIH, previene hepatitis C crónica, actividad antimicrobiana e inhibidor de la tirosinasa. En estudios recientes se valora como liberador de medicamentos, formando complejos solubles en agua con medicamentos lipofílicos debido a su carácter anfipático. A parte de este hecho, algunos estudios ponen de manifiesto que puede aumentar la actividad de otros medicamentos (Saxena, 2005; Kaur, 2013; Selyutina y Polyakov, 2019; Li *et al.*, 2019).



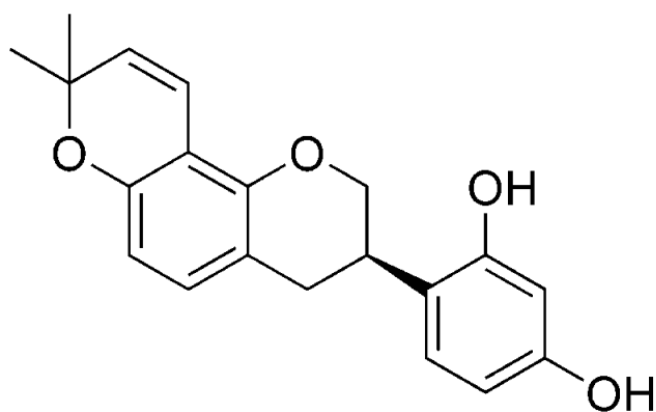
**Figura 11.** Estructura química del ácido glicirrónico.

- **Isoliquiritigenina:** la isoliquiritigenina es un flavonoide con una chalcona que se encuentra en la raíz de regaliz, ampliamente usado en medicina. La estructura química se puede ver en la figura 12. Posee propiedades biológicas como antiinflamatorio, antioxidante, neuroprotector, analgésico y relajante uterino, actividad antitrombótica, fitoestrógeno, inhibidor de la tirosinasa y anticancerígeno en cánceres actuando contra la proliferación celular, inducción, apoptosis y prevención de la metástasis (Saxena, 2005; Kaur, 2013; Sameiyan *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).



**Figura 12.** Estructura química de la isoliquiritigenina.

- **Glabridina:** la glabridina es un isoflavonoide que se encuentra en la raíz de regaliz. En la figura 13 se puede ver la estructura química de la glabridina. Se caracterizó por primera vez en 1976. Las actividades biológicas que se le atribuye son antioxidante, antiinflamatorio, neuroprotector, antiaterogénico, regulación del metabolismo energético, antitumoral, antinefrítico, antibacteriano, antiulceroso, potenciador de la memoria y fitoestrógeno (Saxena, 2005; Simmler *et al.*, 2013; Kaur, 2013).



**Figura 13.** Estructura química de la glabridina.

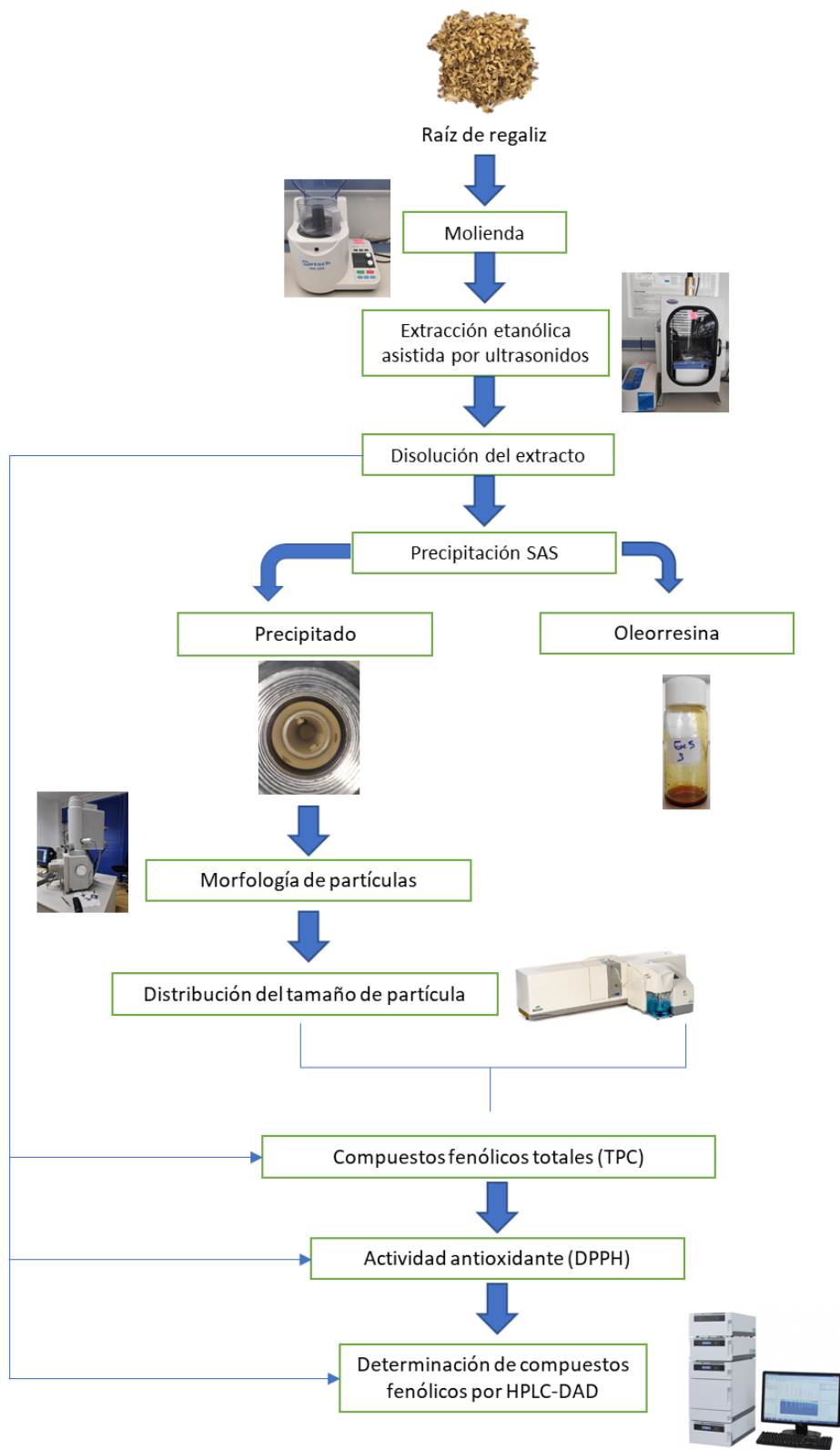
## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal del trabajo fue la optimización y puesta a punto de la precipitación de partículas de un extracto de raíz de regaliz usando CO<sub>2</sub> supercrítico, mediante la técnica de precipitación supercrítica anti-solvente (SAS), como potencial ingrediente bioactivo para la industria alimentaria.

Para lograr la consecución del objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- **Precipitación y fraccionamiento del extracto de raíz de regaliz:** Se evaluaron diferentes condiciones de operación en la precipitación SAS como técnica para lograr el fraccionamiento del extracto vegetal, de composición compleja, y la precipitación selectiva de sus compuestos fenólicos. Se determinaron los rendimientos de los precipitados, así como del material no precipitado.
- **Caracterización de los precipitados:** Se determinó el contenido de compuestos fenólicos en las diversas fracciones precipitadas, recogidas a las distintas condiciones estudiadas, además de la relación de estos compuestos con la capacidad antioxidante de las muestras. Se identificaron y cuantificaron los principales compuestos fenólicos mediante HPLC. Además, se evaluó la morfología y la distribución del tamaño de partícula de los precipitados, con el fin de establecer la influencia de las condiciones del proceso en estas dos características físicas importantes de los productos.

En la figura 14 se puede ver el plan de trabajo que se ha llevado a cabo.



**Figura 14.** Plan de trabajo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

Para llevar a cabo el estudio, se utilizó raíz de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) adquirida en Murciana de Herboristería S.A.L., con un contenido en agua de 9,90% en peso. Esta raíz se sometió a un pretratamiento que consistió en una reducción del tamaño de muestra en un molino de cuchillas Grindomix GM 200 (Verder International B.V. Vleuten, Holanda). La muestra se almacenó en bolsas de polietileno en una cámara fría a 4°C.

*Disolventes y reactivos:* el disolvente de extracción etanol absoluto (99,8%), carbonato de sodio anhidro (99,5%) y reactivo de Folin-Ciocalteu fueron adquiridos de Panreac (Barcelona, España). El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo y 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Las fases móviles usadas en el análisis cromatográfico por HPLC fueron: ácido ortofosfórico (85% de pureza) adquirido de Scharlab S.L. (Sentmenat, España). Acetonitrilo grado HPLC (99,8%) adquirido de Macron (Polonia).

*Patrones:* liquiritin grado HPLC (pureza  $\geq 98\%$ ), isoliquiritigenin grado HPLC (pureza  $\geq 98\%$ ), ácido glicirricico (pureza 97%), liquiritigenin grado HPLC (pureza  $\geq 97\%$ ), glabridin grado HPLC (pureza  $\geq 97\%$ ) obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).

#### 3.2. Métodos y equipamientos utilizados

##### 3.2.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

Se llevó a cabo una extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos, siendo el etanol el disolvente. Las condiciones de extracción fueron determinadas con anterioridad por el grupo de investigación, y optimizadas para la obtención de extractos con alto contenido en antioxidantes. El rendimiento de esta extracción fue de 3,18%. La extracción UAE se repitió las veces necesarias con el fin de obtener el volumen de extracto suficiente para realizar todos los ensayos de precipitación SAS.

La UAE se llevó a cabo con una sonda de ultrasonidos Branson Digital Sonifier, modelo 550 (Danbury, Estados Unidos), cuya frecuencia es 20 kHz, con un diámetro de ½ pulgada y una potencia máxima de 550 W. Se procedió a las extracciones con una relación de

muestra:disolvente 1:10, mezclando 50 g de muestra con 500 ml de etanol y con unos parámetros de extracción de 15 minutos y 50°C.

### **3.2.2. Preparación de las disoluciones de extracto de raíz de regaliz para la precipitación SAS**

Antes de la precipitación SAS, cada extracto se filtró a vacío mediante un matraz Kitasato y se concentró hasta alcanzar una concentración en el rango de 14-17 mg/ml. La eliminación de etanol de las disoluciones se llevó a cabo por evaporación a vacío en un rotavapor Buchi Vacuum Pump V-700 (Flawil, Suiza). Todos los extractos se mezclaron y se determinó la concentración final de la disolución etanólica, resultando en 14,2 mg/ml.

Posteriormente a la precipitación SAS de los experimentos llevados a cabo con la disolución preparada a 14,2 mg/ml, 704,2 ml de esta disolución se diluyeron con 295,8 ml de etanol para un volumen final de 1000 ml y obteniendo una nueva disolución de extracto con concentración final de 9,6 mg/ml.

### **3.2.3. Proceso SAS con CO<sub>2</sub> supercrítico**

El proceso de precipitación supercrítica anti-solvente (SAS) se llevó a cabo en un equipo de tecnología supercrítica (Thar modelo SF2000. Thar Technology, PA, Estados Unidos) con control independiente de temperatura y presión, que consta de una celda de precipitación de volumen interno de 273 ml y dos separadores de 500 ml de capacidad. Para introducir el CO<sub>2</sub> y la disolución de extracto en la celda de precipitación, el equipo cuenta con una bomba de alta presión (Thar modelo P-50) y una bomba de HPLC (Thar, modelo P-504), respectivamente. La celda de precipitación utilizada para los experimentos está fabricada de acero inoxidable y está configurada de forma que se produce la entrada en co-corriente del flujo CO<sub>2</sub> y del extracto por la parte superior de la misma. En el interior de la celda se sitúa un filtro de acero inoxidable (fritado) con un diámetro de poro de 5 µm, para recoger las partículas formadas durante el proceso. La planta de precipitación SAS se muestra en la figura 15.

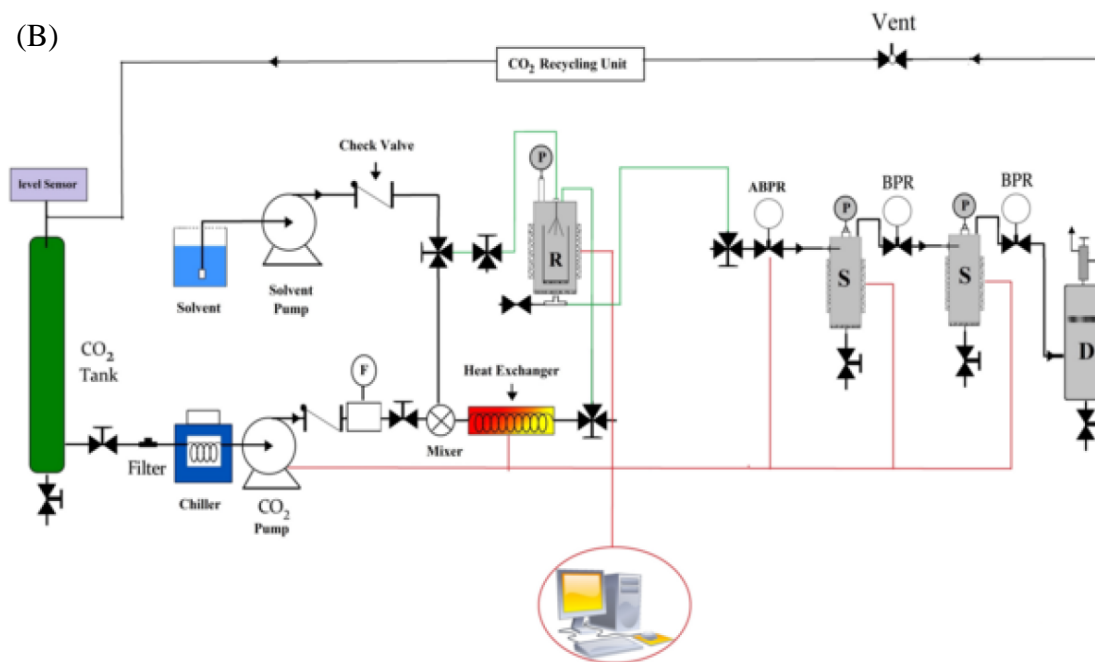
Todos los experimentos se llevaron a cabo en modo semi-continuo, bombeando en primer lugar el CO<sub>2</sub> hasta alcanzar las condiciones de presión y temperatura determinadas. Seguidamente, se inicia el bombeo de un volumen determinado de la disolución de extracto, introduciéndola en la celda de precipitación a través de una boquilla de 100 µm de diámetro

interno (Figura 16). En la celda de precipitación se ponen en contacto la corriente de CO<sub>2</sub> con la disolución de extracto, el etanol se disuelve en la fase supercrítica, y se produce la precipitación de los compuestos no solubles en la fase CO<sub>2</sub>-disolvente orgánico. Los compuestos precipitados quedan retenidos en el fritado de la celda (figura 17), mientras que los compuestos solubles en la fase supercrítica CO<sub>2</sub>-etanol se recuperan en los separadores junto con el etanol, por efecto de la expansión de la fase supercrítica hasta la presión atmosférica.

(A)



(B)



**Figura 15.** (A) Imagen de la planta piloto de precipitación SAS; (B) Diagrama de planta piloto de precipitación SAS. (Troconis, 2016)

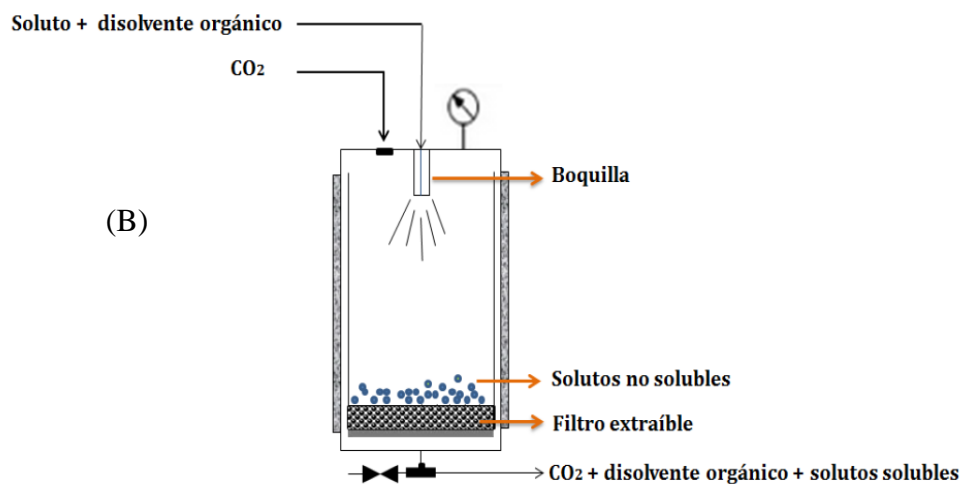


Una vez finalizado el tiempo de precipitación (45 min), se detuvo el bombeo de la disolución de extracto, y se continuó el flujo de CO<sub>2</sub> durante 15 minutos con la finalidad de eliminar el etanol residual que pudiera haber permanecido en la celda de precipitación. Finalmente, se despresuriza el equipo y se recoge el precipitado y los compuestos del separador con el etanol. Estos últimos fueron llevados al rotavapor para eliminar el etanol, obteniéndose un producto viscoso (oleorresina).

(A)



(B)



**Figura 16.** (A) Imagen de la celda de precipitación de planta piloto con precipitado; (B) Esquema de la celda de precipitación de planta piloto. (Troconis, 2016).

Los experimentos se realizaron a distintas presiones, temperaturas y concentraciones del extracto UAE (ver tabla 3). Las condiciones de temperatura y presión se seleccionaron teniendo en cuenta los datos de equilibrio líquido + vapor y punto crítico de mezclas CO<sub>2</sub> + etanol, con el objetivo de acertar condiciones de operación en la región homogénea supercrítica (zona A de la **Figura 7**).

En los experimentos a 35°C y concentración de 14,2 mg/ml se realizaron réplicas con el fin de determinar la reproducibilidad del método. Los flujos de CO<sub>2</sub> y disolución de extracto fueron de 50 g/min y 2 g/min, respectivamente. El precipitado se almacenó en cámara fría a 4°C y la fracción obtenida en los separadores (oleorresina) se almacenó en congelador hasta los análisis posteriores.



**Figura 17.** Interior de celda de precipitación con precipitado.

**Tabla 3.** Condiciones experimentales del proceso SAS. Tiempo de precipitación: 45 min.

<i>No.</i>	<i>Presión (bar)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Concentración de la disolución de extracto (mg/ml)</i>
<i>1</i>	150	40	14,2
<i>2</i>	200	40	14,2
<i>3</i>	125	35	14,2
<i>4</i>	150	35	14,2
<i>5</i>	175	35	14,2
<i>6</i>	200	35	14,2
<i>7</i>	150	35	9,6
<i>8</i>	200	35	9,6
<i>9</i>	150	40	9,6
<i>10</i>	200	40	9,6

### 3.2.4. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales (TPC)

El contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos de raíz de regaliz y en los productos de los ensayos SAS (precipitados y oleorresinas) fue determinado usando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). 50 µl de extracto se mezclaron con 3 µl de agua

miliQ y 250 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu. El contenido fue mezclado en vortex y después de 3 minutos se añadió 750 µl de solución de carbonato de sodio (20% de masa) y 950 µl de agua miliQ. Después de 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad, se midió la absorbancia de las muestras a 760 nm usando un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Fischer Scientific Inc., MA, USA). Los resultados fueron expresados como GAE (mg de ácido equivalente/g de extracto).

### **3.2.5. Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo DPPH**

La capacidad de los extractos de reducir los radicales libres de DPPH fue determinada siguiendo el método descrito por Brand-Williams (Brand-Williams *et al.*, 1995). Al extracto de raíz de regaliz se le añadió 975 µl de radical DPPH en etanol ( $6,1 \cdot 10^{-5}$ ), diariamente preparado. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en oscuridad durante 2 horas. Luego, la absorbancia fue medida a 515 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Fischer Scientific Inc., MA, USA). Se usó una curva de calibrado (regresión lineal) para determinar la concentración de DPPH en el medio de reacción. Una muestra control (p.e. una muestra con el mismo volumen de disolvente en lugar del extracto) fue usado para medir el máximo de absorbancia del DPPH. El trolox fue usado como standard de referencia, y los resultados expresados tanto como TEAC (µmol trolox/g extracto) como IC<sub>50</sub> (µg/ml). Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

### **3.2.6. Análisis de las muestras por HPLC-DAD**

El análisis por HPLC se llevó a cabo según describen (Wei *et al.*, 2015). Para ello se usó un equipo LC-2030C 3D Plus (Shimadzu) equipado con una bomba cuaternaria, un autoinyector y un detector DAD. La columna empleada fue una RP-C18 (250 x 4,6 mm; 3 µm) a una temperatura de 25°C. La fase móvil consistió en acetonitrilo (A) y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> acuoso al 0,026% (v/v), aplicando el siguiente gradiente de elución: un 20-25% de A a los 0-20 minutos, un 25-34% de A a 20-30 minutos, un 34-50% de A a los 30-50 minutos, un 50-60% de A a 50-60 minutos y un 60% de A a 60-80 minutos. Las condiciones iniciales se alcanzaron en 5 minutos. El caudal fue de 0,7 ml/min y fue mantenido constante durante todo el análisis. El volumen de inyección fue de 20 µl y la detección fue a 230, 254, 280 y 370 nm. Se usaron curvas de calibrado con patrones para determinar el contenido de los compuestos bioactivos en los diferentes extractos.

### **3.2.7. Análisis de la distribución del tamaño de partícula**

La distribución del tamaño de partículas se llevó a cabo en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid. Para ello se usó un Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltda, Malvern, -Reino Unido), equipado con una unidad de dispersión de muestra de vía húmeda. La humidificación y separación de las partículas de forma individual se realizó usando agua como dispersante. La distribución del tamaño de partículas se determinó a partir de las medidas de intensidad angular de la luz dispersada por la muestra.

### **3.2.8. Análisis de la morfología**

El análisis de la morfología de las partículas se llevó a cabo en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid. Para ello se usó la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) a partir de un equipo Hitachi S-3000N (Hitachi High-Technologies, Estados Unidos) con voltaje comprendido ente 0,3 y 30 kV. Las muestras se adhirieron a soportes circulares mediante una cinta de carbono de doble cara. Para la observación de la muestra fue necesaria una metalización previa con cromo por el Quorum Q150T S (Quorum Technologies Ltd, Reino Unido). A continuación, se incidió un haz de electrones a 5kV en la muestra y se tomaron fotografías a distintos aumentos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Rendimientos

Para la discusión de las condiciones óptimas en este caso se tuvo en cuenta el rendimiento obtenido en el precipitado y en el separador según tres variables de operación: presión, temperatura y concentración de la disolución de extracto. El rendimiento se define como el porcentaje de precipitado u oleorresina obtenidos en relación a la cantidad total de extracto bombeado a través de la boquilla. Todos los datos se pueden ver en la tabla 4.

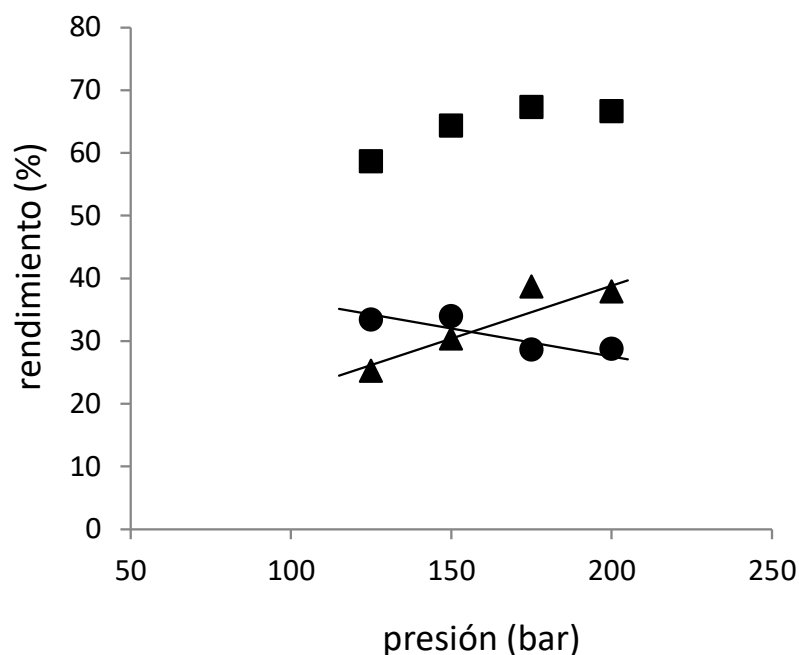
**Tabla 4.** Rendimientos obtenidos en la precipitación SAS a 50 g/min de flujo de CO<sub>2</sub> y 45 minutos de precipitación. Conc.: concentración de la disolución de extracto, %P: Rendimiento precipitado, %S: rendimiento en el separador (oleorresina).

<i>Experimento</i>	<i>Presión (bar)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Conc. (mg/ml)</i>	<i>%P</i>	<i>%S</i>
<i>1</i>	150	40	14,2	13,28	41,35
<i>2</i>	200	40	14,2	23,48	34,75
<i>3</i>	125	35	14,2	33,42	25,23
<i>4</i>	150	35	14,2	33,93	30,40
<i>5</i>	175	35	14,2	28,64	38,66
<i>6</i>	200	35	14,2	28,77	37,89
<i>7</i>	150	35	9,6	52,70	38,25
<i>8</i>	200	35	9,6	30,35	37,62
<i>9</i>	150	40	9,6	44,20	36,63
<i>10</i>	200	40	9,6	33,95	56,63

Como se comentó con anterioridad, se realizaron réplicas de varios experimentos (3 a 6 en la tabla 4) con el fin de valorar la reproducibilidad de la técnica. En la tabla 4 pueden verse los rendimientos medios obtenidos para estos ensayos (125-200 bar, 35°C y 14,2 mg/ml) y en la tabla A1 del Anexo se muestran todos los valores obtenidos y las desviaciones correspondientes. En todo caso la desviación media entre duplicados fue siempre menor a 9.37% y la desviación media promedio de 3.03%. En este análisis de los rendimientos del proceso de precipitación, así como en los resultados posteriores vinculados al análisis químico

y actividad antioxidante de los productos del proceso, se indicarán los valores medios obtenidos en los experimentos 3 a 6. No obstante, en el Anexo 1 se encuentran las tablas con los valores correspondientes a los duplicados y las desviaciones medias, demostrando las bajas desviaciones obtenidas la reproducibilidad de los métodos utilizados.

En relación al efecto de la presión, teniendo en cuenta los experimentos del 3 al 6 (35°C y 14,2 mg/ml), se puede observar que a presiones más bajas se obtienen rendimientos mayores en el precipitado que en el separador (oleorresina). En cambio, a presiones de 175 y 200 bar ocurre el efecto contrario, siendo mayores los rendimientos en el separador que en el precipitado. La figura 18 muestra esta tendencia, así como la recuperación total de extracto (precipitado + oleorresina) que alcanza valores 60-70% en estos experimentos. Esta tendencia a obtener mayores rendimientos de precipitados a presiones más bajas se observa también al comparar los experimentos 7 y 8 (35°C y 9,6 mg/ml) y los experimentos 9 y 10 (40°C y 9,6 mg/ml) en los que se alcanzan recuperaciones totales de hasta 90%. No obstante, en los experimentos 1 y 2 (40°C y 14,2 mg/ml) se observa el efecto contrario, con una significativa disminución del rendimiento de precipitación en ambos casos y en comparación con el resto de los experimentos.



**Figura 18.** Rendimiento en función de la presión de los experimentos 3 a 6 (35°C y 14,2 mg/ml): (●) precipitado, (▲) oleorresina, (■) precipitado + oleorresina, (—) línea de tendencia.

A 35°C y presiones entre 125 y 200 bar se obtuvieron precipitados sólidos, completamente libres de etanol, a las dos concentraciones de disolución de extracto analizadas, lo que sugiere que estas condiciones de trabajo están por encima del PCM. Así, conforme aumenta la presión a temperatura constante de 35°C, la densidad del SCCO<sub>2</sub> aumenta y así también aumenta la solubilidad de los componentes del extracto solubles en la fase supercrítica, resultando en una disminución del rendimiento de precipitación con el aumento de presión. En cambio, a 40°C este efecto se produce únicamente para la disolución de extracto de 9,6 mg/ml, mientras que a concentraciones de 14,2 mg/ml el rendimiento de precipitación disminuye significativamente a 150 bar. Este hecho puede vincularse a un aumento del PCM, que dificulta la precipitación, posiblemente producida en condiciones de fase homogénea subcrítica. De hecho, a 40°C y 14,2 mg/ml, los precipitados fueron viscosos, con aglomerados adheridos a las paredes de la celda, y difícil de recuperar y cuantificar su peso.

Respecto del efecto de la temperatura, se observa que a presiones más bajas una disminución de temperatura favorece el rendimiento de precipitado, como indican los resultados de la tabla 4 al comparar los experimentos 1 con 4 y 7 con 9, todos a 150 bar. Consecuentemente, el aumento de temperatura produce en general un aumento de rendimiento en los separadores. No obstante, a presiones mayores (200 bar) el efecto de la temperatura parece ser menos importante.

En cuanto al efecto de la concentración de la disolución de extracto, en general se obtienen rendimientos mayores a 9,6 mg/ml tanto en el precipitado como en el separador. Es decir, el rendimiento total del proceso (precipitado + oleorresina) es mayor a menores concentraciones de disolución de extracto utilizada, resultando menores pérdidas de extracto UAE en el proceso. Se destaca el experimento 7, donde el rendimiento de precipitado aumenta en comparación con su homólogo a 14,2 mg/ml (experimento 4) más de 1,5 veces, con un rendimiento total mayor al 90%. Como vemos, a 40°C y 14,2 mg/ml se obtienen rendimientos mucho más bajos que con la disolución de extracto a 9,6 mg/ml, a la misma temperatura y presión. Como se explicó anteriormente, este efecto puede deberse a un aumento del PCM como consecuencia de la mayor concentración de la disolución de extracto, aumento que perjudica la precipitación SAS. Prosapio *et al.* (2018) señalan que altas concentraciones pueden resultar en una mayor viscosidad de la disolución y perjudicar la atomización. Este hecho, sumado al aumento de la temperatura, conduce a un fenómeno de coalescencia, formándose aglomerados, y disminuyendo los rendimientos de precipitación.

Sui *et al.* (2012) llevó a cabo la precipitación SAS de un compuesto puro de la raíz de regaliz, el ácido glicirrónico, analizando el efecto de las mismas tres variables de operación que se estudiaron en este trabajo: presión, temperatura y concentración del ácido en la disolución. En relación al efecto de la temperatura y de la concentración de la disolución de extracto, el artículo presenta una tendencia contraria a la de este trabajo. En cambio, en función de la presión, las observaciones de Sui *et al.* (2012) sigue la tendencia descritas en este trabajo. Queda claro que pueden existir grandes diferencias en el comportamiento de la precipitación SAS de un extracto multicomponente en comparación con la precipitación de uno de sus componentes.

Por otro lado, Martín y Cocero (2004) desarrollaron un modelo de simulación de precipitación SAS, donde un aumento de la temperatura resulta en mayores tamaños de partícula, pero también aumenta la solubilidad de los solutos en la mezcla SCCO<sub>2</sub> + cosolvente, resultando en mayores rendimientos en el separador. Estas conclusiones se asemejan a los resultados obtenidos en este trabajo. Marqués *et al.* (2013) analizaron la influencia de la presión en la precipitación SAS de un extracto de semillas de uvas, llegando a la conclusión de que, a mayores presiones, menores rendimientos. Es decir, el efecto de las condiciones de operación en la precipitación SAS puede variar significativamente según las características (composición y concentración) de la disolución utilizada, debido a la gran variedad de compuestos presentes en la misma, con diferentes polaridades, volatilidades y solubilidades en SCCO<sub>2</sub> y cosolvente utilizado.

Teniendo en cuenta las tres variables estudiadas en la precipitación SAS de un extracto UAE de raíz de regaliz, podríamos concluir que, dentro del rango de condiciones de operación analizadas, las condiciones óptimas para obtener un mayor rendimiento son 150 bar, 35°C y una concentración inicial de la disolución de extracto de partida de 9,6 mg/ml, debido a que se obtienen las menores pérdidas de extracto, es decir los rendimientos más altos tanto en el precipitado como en la oleorresina.

#### 4.2. Compuestos fenólicos totales (TPC)

Para los compuestos fenólicos totales se analizaron tres respuestas:

- **Concentración de compuestos fenólicos totales:** se define como los mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de precipitado u oleorresina (TPC).
- **Recuperación de compuestos fenólicos totales:** definido como la relación entre el contenido de compuestos fenólicos en el precipitado y el total de compuestos fenólicos



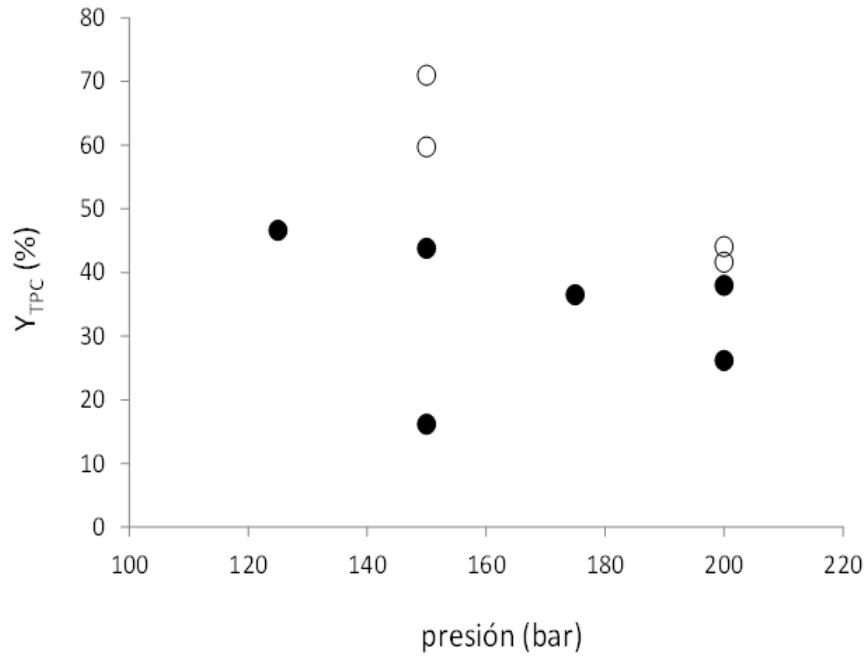
introducidos en la celda de precipitación a través de la disolución de extracto bombeada.

- **Factor de enriquecimiento:** Definido como la relación entre TPC del precipitado y TPC del extracto UAE.

Los resultados se presentan en la tabla 5. En el caso de los experimentos 3 a 6, la tabla 5 presenta el valor medio de los ensayos SAS llevados a cabo por duplicado (ver tabla A2 del anexo). Así, la desviación estándar se corresponde con seis determinaciones, tres por cada muestra analizada. En general, en estos experimentos las desviaciones son más altas porque incluyen tanto los errores de las réplicas como los errores de las determinaciones de TPC, llevadas a cabo por triplicado. Aun así, el error en la determinación de TPC es menor a 7% en el caso de los precipitados y 15% para las oleorresinas, indicando la reproducibilidad de las técnicas empleadas. Al igual que en el análisis de los rendimientos del proceso, se analizará la variación del contenido de los compuestos fenólicos en precipitados y oleorresinas según las tres variables del proceso de precipitación anti-solvente estudiadas: presión, temperatura y concentración de la disolución de extracto. En general, puede observarse de la tabla 5 que los compuestos fenólicos se distribuyen entre el precipitado y la oleorresina, puesto que se obtienen concentraciones de mg GAE/g similares en ambos productos.

La figura 19 muestra la recuperación de compuestos fenólicos totales obtenido en la celda de precipitación en función de la presión y de la concentración de la disolución de extracto utilizada. Cuando se utiliza la disolución con menor concentración (9.6 mg/ml) la recuperación de compuestos fenólicos es mayor. También puede observarse en la figura una tendencia general a obtener mayores recuperaciones de TPC a presiones más bajas. Por otro lado, observando la tabla 5, puede concluirse que a 35°C (menor temperatura empleada) la recuperación de TPC son en general mayores a los correspondientes a 40°C.

Así, dentro del rango de operación estudiado, las mejores condiciones para recuperar en el precipitado los compuestos fenólicos del extracto de raíz de regaliz serían 150 bar, 35°C y una concentración de disolución de extracto de 9,6 mg/ml, debido a que en estas condiciones se obtienen una alta concentración y rendimiento de TPC y también un rendimiento de precipitación adecuado (52.7%). En cuanto al enriquecimiento, se observa un aumento de concentración de compuestos fenólicos totales en los precipitados, con valores de entre 1,1 y 1,4.



**Figura 19.** Recuperación de compuestos fenólicos ( $Y_{TPC}$ ) en función de la presión.  
 (●) Disolución de extracto a 14,2 mg/ml; (○) disolución de extracto a 9,6 mg/ml.

**Tabla 5.** Compuestos fenólicos totales (mg GAE/g) obtenidos en precipitado y oleorresina.  $Y_{TPC}$ : recuperación en precipitado; E: factor de enriquecimiento en precipitado. Compuestos fenólicos totales del extracto UAE de raíz de regaliz:  $119,512 \pm 4,092$  mg GAE/g.

<i>Experimento</i>	<i>Compuestos fenólicos totales (mg GAE/g)</i>		$Y_{TPC}$ (%)	<i>E</i>
	<i>Precipitado</i>	<i>Oleorresina</i>		
<i>1</i>	145,2 ± 3,4	166,9 ± 3,2	16,1	1,2
<i>2</i>	133,1 ± 1,8	161,0 ± 5,1	26,1	1,1
<i>3</i>	167,1 ± 9,4	160,0 ± 10,6	46,6	1,4
<i>4</i>	154,4 ± 11,4	167,8 ± 5,1	43,7	1,3
<i>5</i>	152,3 ± 11,1	164,9 ± 3,9	36,4	1,3
<i>6</i>	157,7 ± 3,1	160,3 ± 23,9	37,9	1,3
<i>7</i>	160,8 ± 3,2	168,9 ± 5,6	70,9	1,3
<i>8</i>	163,8 ± 4,8	150,2 ± 4,4	41,6	1,4
<i>9</i>	161,4 ± 3,5	177,8 ± 6,2	59,7	1,3
<i>10</i>	148,8 ± 7,3	168,3 ± 8,0	42,3	1,2

### 4.3. Capacidad antioxidante (ensayo del radical DPPH)

Para analizar la capacidad antioxidante de los experimentos, se tuvieron en cuenta dos respuestas:

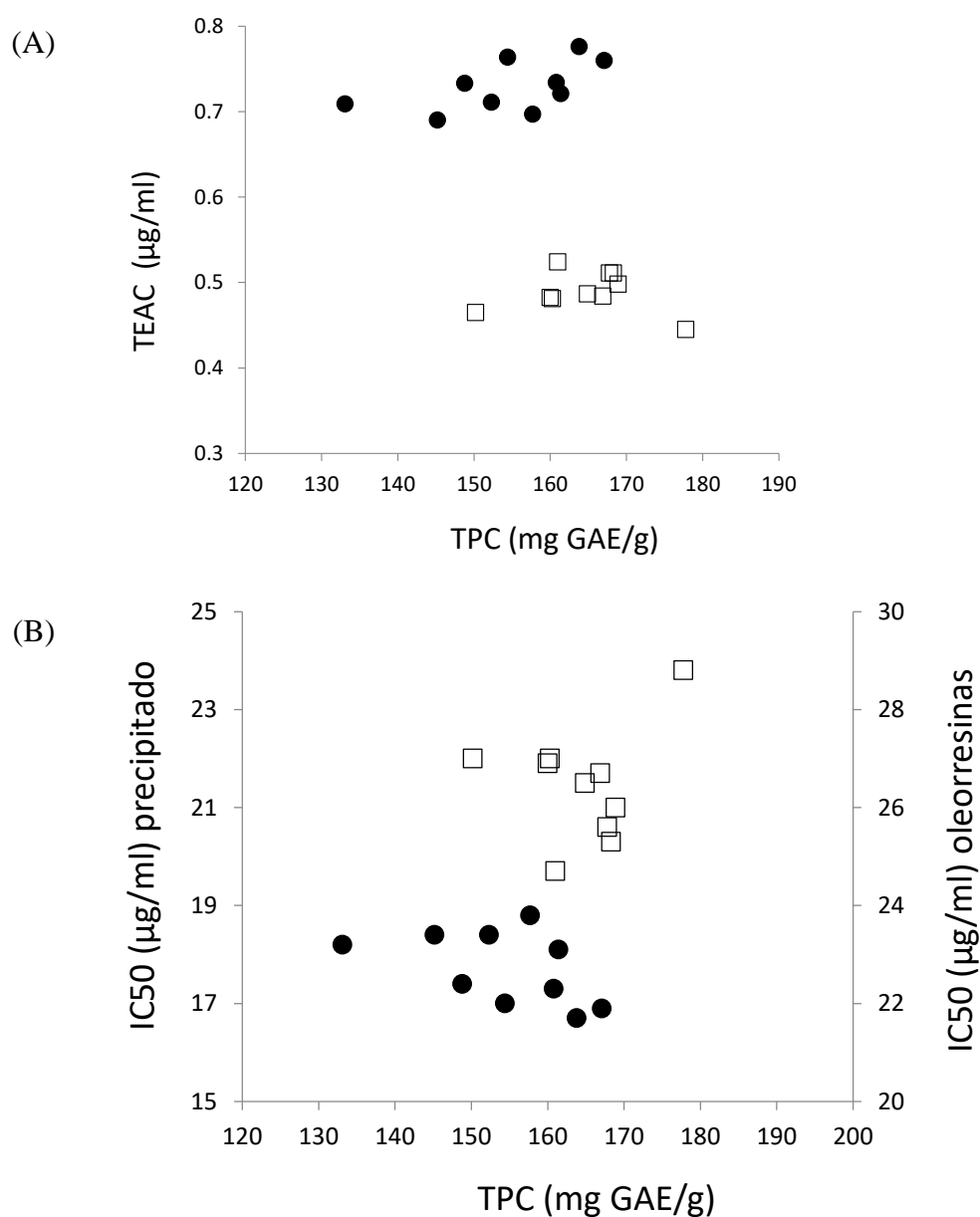
- **IC<sub>50</sub>**: definido como la concentración inhibitoria al 50%, es decir, la concentración de la muestra a la que se inhibe el radical DPPH al 50%. A valores más bajos, mayor capacidad antioxidante debido a que se necesita una menor concentración de muestra para inhibir el 50%.
- **TEAC**: se define como la capacidad antioxidante equivalente al trolox, calculada por el IC<sub>50</sub> del trolox en un ensayo de DPPH y por el IC<sub>50</sub> de la muestra del precipitado u oleorresina.

Los resultados de la capacidad antioxidante de precipitados y oleorresinas se pueden observar en la tabla 6. Nuevamente, en el caso de los experimentos 3 a 6 se presentan los valores medios y las desviaciones de las réplicas. Las desviaciones en el IC<sub>50</sub> se encuentran entre 0,09 y 1,15 para el precipitado y entre 0,01 y 0,04 para las oleorresinas, destacando la reproducibilidad de los métodos utilizados. En la tabla A3 del anexo se encuentran los datos correspondientes a los duplicados de los experimentos 3 a 6.

**Tabla 6.** Capacidad antioxidante por el ensayo del DPPH obtenido en la precipitación SAS. IC<sub>50</sub>: concentración inhibitoria al 50%; TEAC: capacidad antioxidante equivalente al trolox. IC<sub>50</sub> extracto UAE: 20,402 ± 0,990; TEAC extracto UAE: 0,636 ± 0,044

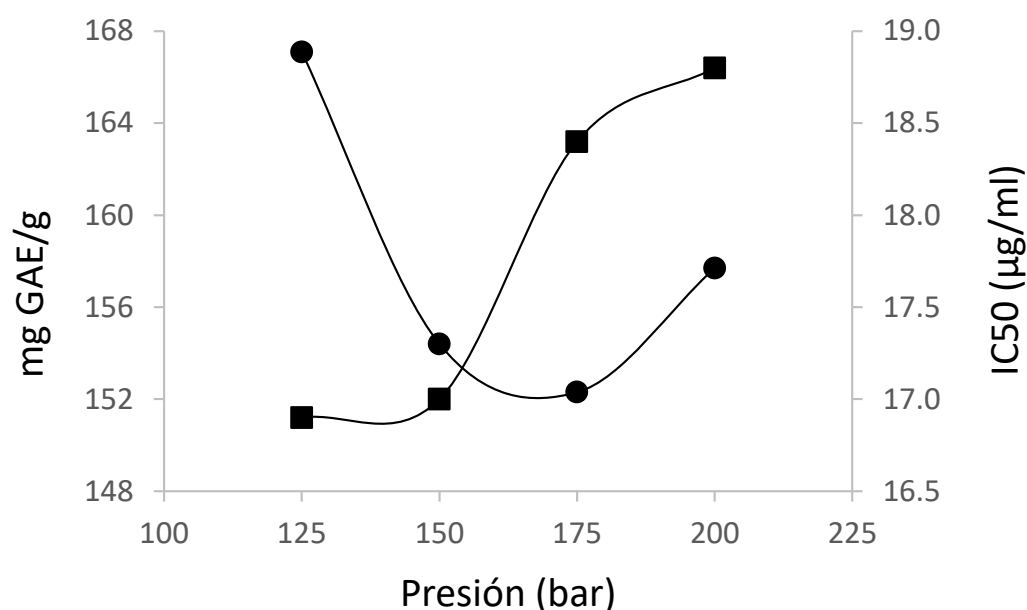
<i>Experimento</i>	<i>Precipitado</i>		<i>Separador</i>	
	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	TEAC (mmol/ml)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	TEAC (mmol/ml)
<i>1</i>	18,37 ± 0,73	0,69 ± 0,01	26,67 ± 0,16	0,48 ± 0,01
<i>2</i>	18,19 ± 0,40	0,71 ± 0,02	24,70 ± 0,55	0,52 ± 0,02
<i>3</i>	16,88 ± 0,25	0,76 ± 0,02	26,94 ± 2,06	0,48 ± 0,03
<i>4</i>	16,98 ± 0,09	0,76 ± 0,01	25,56 ± 1,33	0,51 ± 0,02
<i>5</i>	18,37 ± 1,13	0,71 ± 0,03	26,48 ± 1,32	0,49 ± 0,03
<i>6</i>	18,75 ± 1,15	0,70 ± 0,04	27,15 ± 1,09	0,48 ± 0,02
<i>7</i>	17,29 ± 0,59	0,73 ± 0,01	26,00 ± 0,11	0,50 ± 0,01
<i>8</i>	16,67 ± 0,08	0,78 ± 0,01	27,89 ± 0,84	0,46 ± 0,01
<i>9</i>	18,11 ± 0,31	0,72 ± 0,01	28,81 ± 0,49	0,44 ± 0,01
<i>10</i>	17,36 ± 0,54	0,73 ± 0,01	25,28 ± 0,55	0,51 ± 0,02

La figura 20 representa los valores TEAC e IC50 obtenidos en precipitados y oleorresinas en función de TPC (mg GAE/g). En general, no existe una relación definida entre los valores TEAC y TPC (figura 20 (A)), y claramente los precipitados presentan valores TEAC más altos que las oleorresinas para igual concentración de TPC. Esto significa que los compuestos fenólicos en precipitado y oleorresina son diferentes, siendo de mayor capacidad antioxidante aquellos que se obtienen en el precipitado. Así, los valores IC50 de los precipitados son menores que los correspondientes a las oleorresinas, como puede verse en la figura 20 (B).



**Figura 20.** Valores (A) TEAC y (B) IC50 obtenidos en (●) precipitados y (□) oleorresinas en función de TPC (mg GAE/g).

No obstante, el análisis de los experimentos 3 a 6, todos a 35°C y 14,2 mg/ml, permite establecer ciertas conclusiones en cuanto al efecto de la presión en la actividad antioxidante de los precipitados. La figura 21 muestra los valores de TPC (mg GAE/g) y los IC50 (µg/ml) en función de la presión de precipitación. Puede destacarse una tendencia a la disminución del contenido de compuestos fenólicos con el aumento de la presión, al menos hasta 175 bar, que se corresponde con una disminución de la actividad antioxidante y consecuente aumento de los valores de IC50.



**Figura 21.** Valores de TPC (●) IC50 (■) en función de la presión a 35°C y 14,2 mg/ml

Quintana *et al.* (2019 a) estudiaron la extracción supercrítica de la raíz de regaliz utilizando SCCO<sub>2</sub> y etanol como cosolvente. En dicho trabajo muestran el análisis de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos. De manera general, los resultados de IC<sub>50</sub> obtenidos presentan valores por encima de 30 µg/ml, aproximadamente el doble de los valores obtenidos en este trabajo. Así, los precipitados obtenidos utilizando la técnica SAS como método de fraccionamiento de un extracto etanólico de raíz de regaliz, resulta en productos con mayor capacidad antioxidante que los extractos supercríticos. Esta característica, sumada a la presentación en forma de micro- y nano-partículas en polvo, destaca a los precipitados obtenidos en este trabajo como productos interesantes para uso en alimentación funcional.

#### 4.4. Análisis HPLC-DAD de los compuestos analizados

De manera general, se observa en la tabla 7 que los compuestos liquiritigenina, glabridina e isoliquiritigenina se concentran en el separador, mientras que los demás compuestos se concentran en el precipitado. A pesar de que la glabridina se concentre en el separador, también se encuentra en una alta concentración en el precipitado. Para los experimentos 3 a 6 se presenta el valor medio de las réplicas y las desviaciones estándar de todas las determinaciones (ver tabla A4 del anexo).

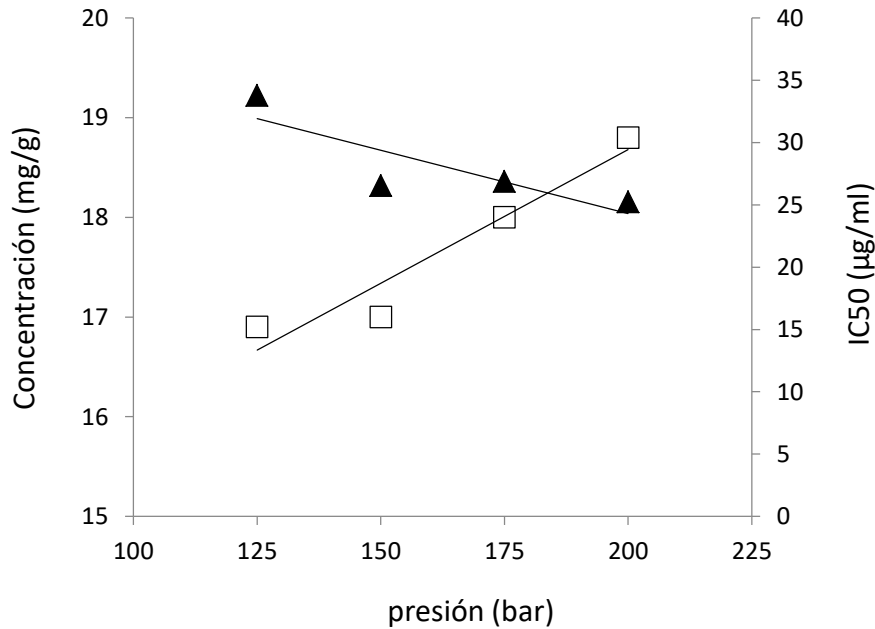
La tendencia observada puede ser debida a la polaridad de estos compuestos, vinculada a su estructura química. Tanto la liquiritigenina como la glabridina son los compuestos más apolares identificados, con sólo dos grupos hidroxilo en su estructura. La isoliquiritigenina presenta una estructura parecida a la liquiritigenina, con la diferencia de que este último es una flavanona y la isoliquiritigenina es una chalcona, compuestos precursor de las flavanonas. Las chalconas tienen el anillo central abierto, por lo que presentan un grupo hidroxilo libre que le confiere mayor polaridad comparado con la flavona liquiritigenin. El ácido glicirricico es un terpenoide glicosilado, y a pesar de ser un terpenoide, el azúcar glicosilado le confiere cierta polaridad, provocando su concentración en el precipitado. Por último, el liquiritin, es el compuesto más polar de los estudiados (presenta 5 grupos hidroxilo en su estructura) y se observa que es el mayoritario en el precipitado.

La figura 22 muestra para los experimentos 3 a 6 (35°C y 14,2 mg/ml de concentración de disolución de extracto) la variación con la presión del IC<sub>50</sub> de los precipitados y la suma de las concentraciones de los compuestos identificados por HPLC (tabla 7). En general, se observa una tendencia a la disminución de los valores de IC<sub>50</sub> (mejor actividad antioxidante) conforme aumenta la suma de la concentración de estos compuestos en los precipitados. Esta tendencia se verifica para la suma total de las concentraciones de los compuestos identificados, así como para la concentración de liquiritin y glabridina (compuestos más abundantes dentro de los identificados). Por lo tanto, podría concluirse que los compuestos de la raíz de regaliz identificados por HPLC tienen un efecto significativo en la actividad antioxidante de los precipitados. Kaur (2013) señala a la licochalcona, licocumarina, glabridina e isoliquiritigenina como los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante de la raíz de regaliz. En este trabajo, de estos cuatro han sido identificados y cuantificados la glabridina e isoliquiritigenina, ya que no se poseían los patrones de licochalcona y licocumarina.

**Tabla 7.** Concentración (mg/g) de los compuestos de raíz de regaliz analizados por HPLC: (a) precipitados; (b) oleorresinas.

	<i>liquiritin</i> (12,465 s)	<i>liquiritigenina</i> (34,458 s)	<i>ácido glicirrónico</i> (47,861 s)	<i>isoliquiritigenina</i> (49,381 s)	<i>glabridina</i> (69,203 s)
<b>Extracto UAE</b>	5,23 ± 0,01	0,73 ± 0,00	0,60 ± 0,28	0,60 ± 0,01	29,10 ± 2,12
<b>(a) Precipitados</b>					
<b>1</b>	8,34 ± 0,06	0,58 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,60 ± 0,01	12,80 ± 0,28
<b>2</b>	8,11 ± 0,07	0,40 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,40 ± 0,01	10,90 ± 0,14
<b>3</b>	9,13 ± 0,77	0,26	0,50 ± 0,14	0,60 ± 0,01	23,30 ± 6,65
<b>4</b>	8,60 ± 0,35	0,60	0,40 ± 0,01	0,60 ± 0,01	16,35 ± 0,78
<b>5</b>	8,92 ± 0,24	0,57 ± 0,18	0,50 ± 0,14	0,60 ± 0,01	16,30 ± 1,41
<b>6</b>	8,73 ± 0,25	0,60 ± 0,01	0,45 ± 0,07	0,60 ± 0,01	14,85 ± 1,77
<b>7</b>	8,84 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,40 ± 0,01	12,70 ± 0,14
<b>8</b>	9,37 ± 0,01	0,50 ± 0,14	0,70 ± 0,14	0,40 ± 0,01	11,00 ± 1,70
<b>9</b>	8,04 ± 0,02	0,60 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,60 ± 0,01	12,60 ± 3,96
<b>10</b>	9,61 ± 0,10	0,56 ± 0,06	0,60 ± 0,01	0,50 ± 0,14	15,20 ± 5,37
<b>(b) Oleorresinas</b>					
<b>1</b>	0,89 ± 0,01	0,98 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	56,30 ± 1,56
<b>2</b>	0,72 ± 0,01	1,05 ± 0,01	0,30 ± 0,14	0,80 ± 0,01	51,90 ± 0,99
<b>3</b>	n.i.	0,97 ± 0,05	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	57,15 ± 0,92
<b>4</b>	0,70 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	54,75 ± 1,20
<b>5</b>	n.i.	1,10 ± 0,14	0,25 ± 0,07	0,85 ± 0,07	61,70 ± 8,06
<b>6</b>	n.i.	0,97 ± 0,10	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	54,65 ± 2,33
<b>7</b>	n.i.	1,00 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	53,90 ± 0,14
<b>8</b>	0,72 ± 0,01	1,18 ± 0,29	0,30 ± 0,14	0,90 ± 0,14	57,70 ± 13,15
<b>9</b>	n.i.	0,82 ± 0,05	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	55,20 ± 4,53
<b>10</b>	n.i.	1,27 ± 0,18	0,20 ± 0,01	0,90 ± 0,14	62,60 ± 5,37

n.i.: no identificado.



**Figura 22.** Variación de los valores de IC<sub>50</sub> y de la suma de concentraciones de los compuestos identificados por HPLC en función de la presión, a 35°C y 14,2 mg/ml de concentración de disolución de extracto: (□) IC<sub>50</sub> (µg/ml); (▲) concentración (mg/g).

#### 4.5. Distribución del tamaño de partícula

En relación a las partículas obtenidas en las muestras de los distintos experimentos, se analizó el tamaño de la partícula (en µm) y el porcentaje en volumen de partículas de dicho tamaño contenidas en la muestra. Los datos obtenidos según los percentiles y tamaño medio de partícula se pueden ver en la tabla 8. Para el caso de los experimentos 3 a 6 se presentan en la tabla 8 los valores medios de los ensayos duplicados, y en la tabla A5 del anexo se muestran los datos correspondientes a todos los experimentos. Las desviaciones en los tamaños medios se encuentran entre 1,1 y 3,4 µm (errores del orden del 10%). En la tabla 8 se puede observar que el tamaño medio de partícula a 35°C, 14,2 mg/g de concentración de disolución de extracto y presiones de 125, 150, 175 y 200 bar, claramente disminuye con la presión, desde 36,7 µm a 125 bar hasta 11,7 µm a 250 bar.

Esta tendencia de disminución del tamaño de partícula según aumenta la presión de precipitación también puede observarse en la figura 22 donde se muestra la distribución de tamaño de partículas en estos experimentos y sus duplicados. Además, se podría inferir de la

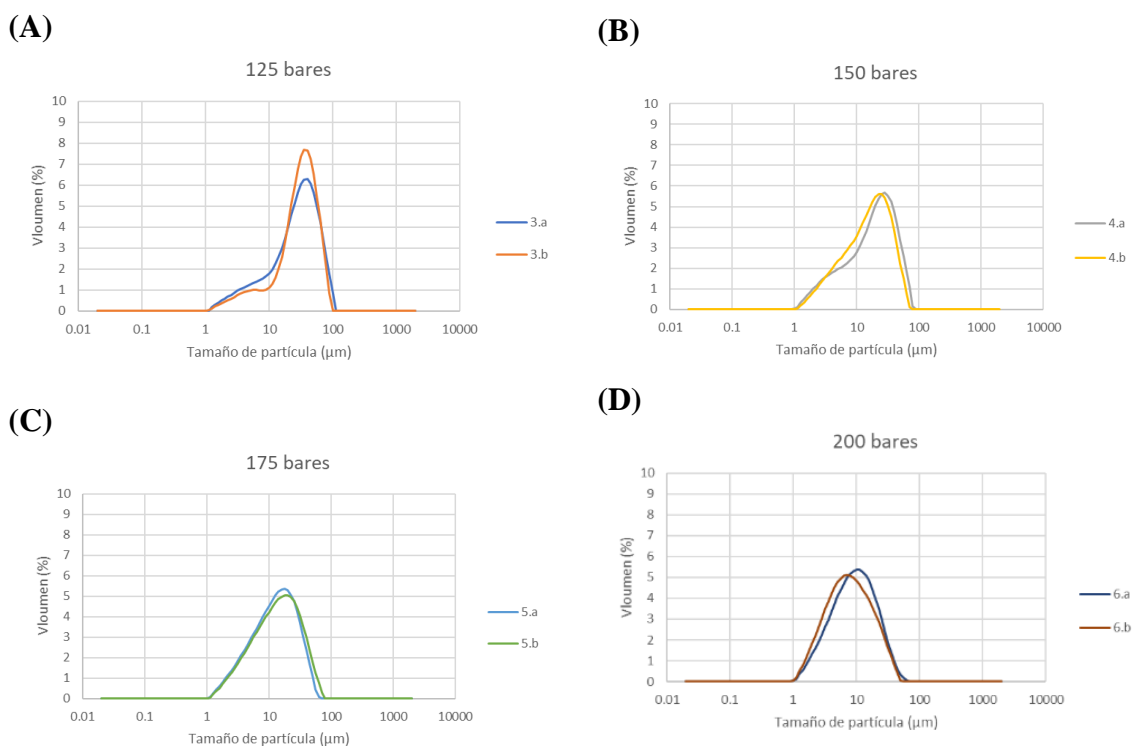


figura 22 que a mayores presiones los tamaños son más heterogéneos, ya que las curvas campana de las gráficas son más anchas.

Esta tendencia de disminución de tamaño de partícula con el aumento de la presión de precipitación concuerda con el análisis publicados por Werling y Debenedetti (1999) y Martín y Cocero (2004) en sus modelos de simulación de la precipitación SAS. También, según Kröber y Teipel (2002) en su estudio de la precipitación SAS de ácido tartárico, el aumento de la presión resultó en un menor tamaño de partícula.

**Tabla 8.** Resultados estadísticos de la distribución del tamaño de las partículas en el precipitado. d (0,1): percentil 10; d (0,5): percentil 50; d (0,9): percentil 90.

<i>Experimento</i>	<b>d (0,1) (µm)</b>	<b>d (0,5) (µm)</b>	<b>d (0,9) (µm)</b>	<b>diámetro medio (µm)</b>
<b>1</b>	7,04	35,19	71,78	37,90
<b>2</b>	10,65	34,16	61,87	35,82
<b>3</b>	5,66	30,57	68,05	34,27
<b>4</b>	7,35	36,94	71,54	39,09
<b>5</b>	3,82	20,20	48,82	23,58
<b>6</b>	4,12	17,15	41,52	20,32
<b>7</b>	3,69	13,43	34,07	16,51
<b>8</b>	3,91	14,58	39,25	18,55
<b>9</b>	3,15	9,74	25,85	12,54
<b>10</b>	2,73	8,01	23,72	10,94



**Figura 22.** Distribución del tamaño de partícula en función de la presión a 35°C y disolución de extracto a 14,2 mg/g. (A) a (D): Duplicados de los experimentos 3 a 6.

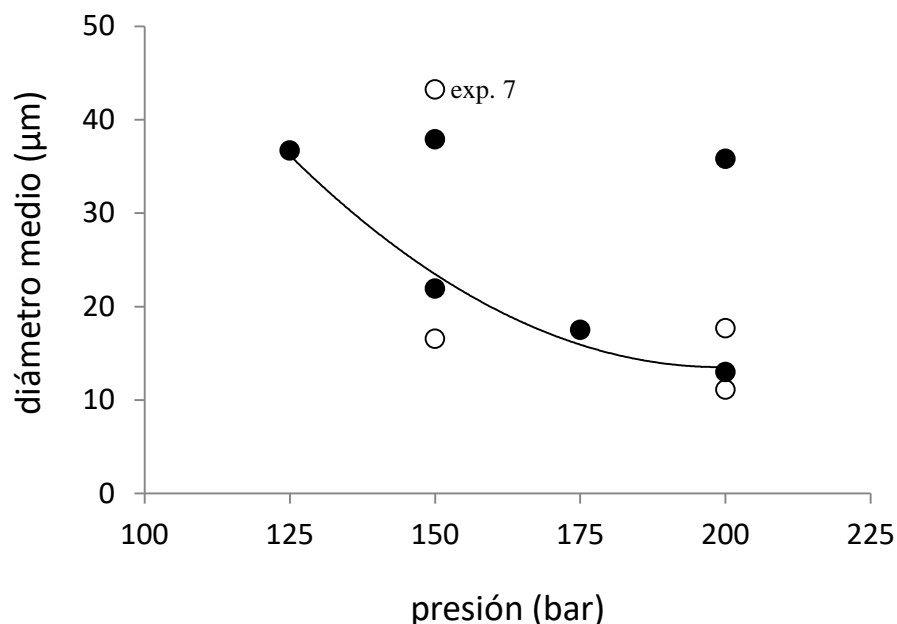
Reverchon *et al.* (2010) y Reverchon y de marco (2011) explican que en el proceso SAS el colapso de las micro-gotas (formadas por el paso de la disolución de extracto a través de la boquilla) se puede producir de dos maneras: por la evaporación del disolvente (etanol) en el anti-solvente (CO<sub>2</sub>) y/o por la difusión del anti-solvente (CO<sub>2</sub>) en las micro-gotas de disolvente (etanol) formadas. En función de las características químicas del disolvente y del PCM puede predominar un efecto u otro, y esto afecta significativamente el tamaño y forma de las partículas sólidas precipitadas. En el caso de los disolventes alcohólicos, como el etanol, predomina la difusión del anti-solvente, la cual aumenta con la presión de precipitación. Cuando la difusión del CO<sub>2</sub> en la disolución etanólica es muy rápida, el chorro de micro-gotas tiene un pequeño recorrido dentro de la celda de precipitación, las micro-gotas colapsan en forma instantánea, formando así partículas más pequeñas y más esféricas. Este es el caso de condiciones de operación en la región homogénea supercrítica (zona A de la figura 7).

En relación al efecto de la temperatura se puede observar de la tabla 8 una tendencia obtener partículas de menor tamaño medio a 35°C, en comparación con la operación a 40°C e igual

presión y concentración de disolución de extracto. No obstante, las diferencias en cuanto al tamaño de las partículas son más marcadas en relación a la concentración de disolución de extracto utilizada (ver figura 23).

A excepción del experimento 7 (señalado en la figura) puede concluirse que a 9,6 mg/ml se obtienen precipitados con tamaños de partículas menores. El diámetro medio de partícula obtenido en el experimento 7 (35°C, 150 bar y 9,6 mg/ml) no se corresponde con lo esperado, puesto que en el experimento 9 (40°C, 150 bar y 9,6 mg/ml) a una temperatura mayor se lograron diámetros medios de 16,53  $\mu\text{m}$ , indicando que las condiciones de operación deberían estar dentro de la región supercrítica, alejadas del PCM. Lamentablemente, no se llevó a cabo la repetición (o duplicado) de este experimento.

Por otro lado, puede observarse en la figura 23 que el aumento de presión de operación puede resultar también en diámetros pequeños con concentraciones de disolución de extracto de 14,2 mg/ml, tal como destaca la línea de tendencia que corresponde a los experimentos llevados a cabo a 35°C.

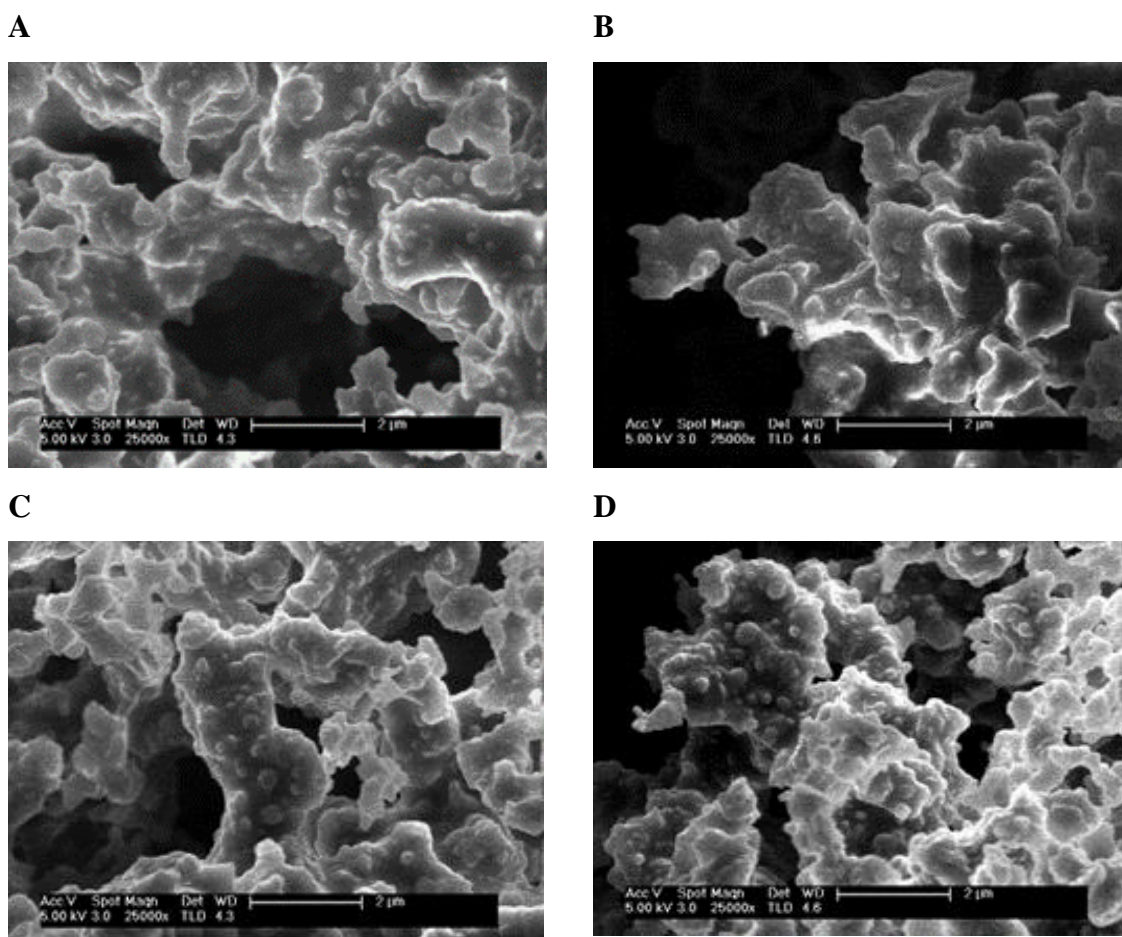


**Figura 23.** Diámetro medio de partículas en función de la presión de precipitación SAS. (●) Disolución de extracto a 14,2 mg/ml; (○) disolución de extracto a 9,6 mg/ml; (—) línea de tendencia a 35°C y 14,2 mg/ml.

Teniendo en cuenta las figuras 5 y 7, donde los símbolos vacíos corresponden a 9,6 mg/ml, se puede concluir que con la menor concentración de extracto estudiada se obtienen los mayores rendimientos de precipitación y tamaños de partículas menores.

#### 4.6. Evaluación de la morfología

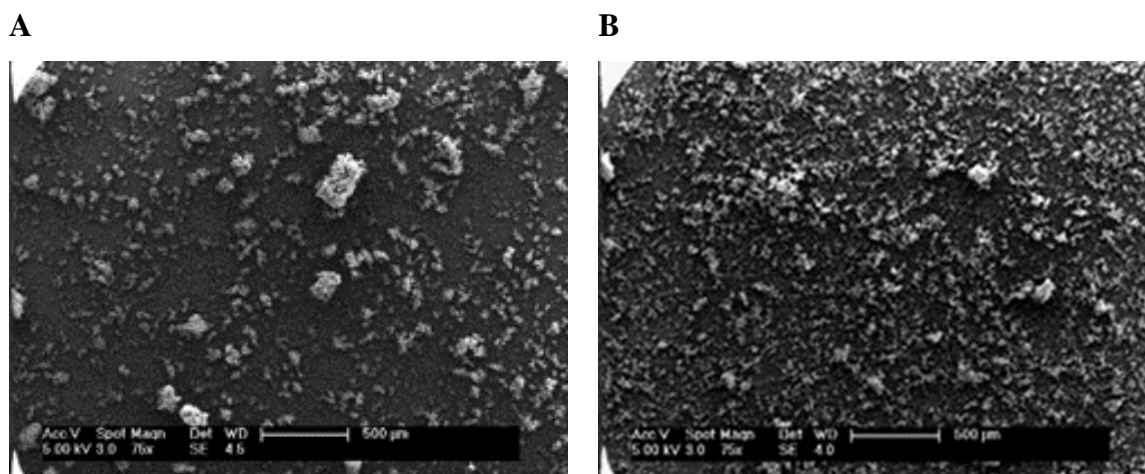
Para la evaluación de la morfología se realizaron distintas fotografías tomadas por un microscopio electrónico de barrido a distintos aumentos. Se eligieron las fotos tomadas a 25000x debido a que los detalles se podían apreciar de manera óptima, sin perder resolución en la imagen. En algunos casos se eligieron fotos con aumento 75x para ver las diferencias entre los precipitados de manera más superficial. En la figura 24 se muestran las imágenes de los precipitados en función de la presión a 35°C y 14,2 mg/ml de concentración de disolución de extracto (experimentos 3 a 6).



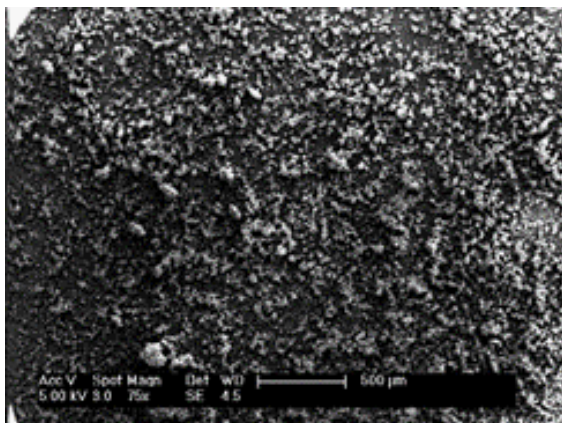
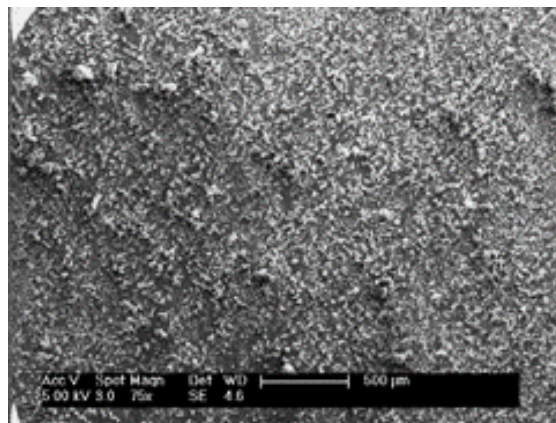
**Figura 24.** Imágenes SEM (25000x) de los precipitados en función de la presión a 35°C y 14,2 mg/ml de concentración de disolución de extracto. A: 125 bar; B: 150 bar; C: 175 bar; D: 200 bar.

Se observa la aparición de partículas más pequeñas, redondas y más regulares, según aumenta la presión. A 125 y 150 bar no se aprecian grandes diferencias, siendo en su mayoría agregados irregulares. A partir de 175 bar comienza a observarse la formación de partículas redondas y más pequeñas, especialmente a 200 bar. A pesar de ello, el tamaño de las partículas a la máxima presión no llega a ser esféricas y regulares, como es el caso de otros precipitados obtenidos en el grupo de investigación (Troconis, 2016; Quintana *et al.*, 2019 b)

En la figura 25 se encuentran las imágenes SEM (75x) en función de la concentración de disolución de extracto a 150 bar y 35°C. Se observa que a 9,6 mg/ml las partículas son de tamaños heterogéneos, pero formando agregados más pequeños. Esta tendencia coincide con el análisis de la distribución del tamaño de partículas en función de la concentración de la disolución de extracto, presentada en la sección anterior. A 14,2 mg/ml se forman algunas partículas pequeñas, pero también se forman algunos agregados de gran tamaño. Este comportamiento se corrobora con las imágenes (75x) de los experimentos de 200 bar y 35°C que se muestran en la figura 26. Por lo tanto, se podría concluir que se obtiene una morfología más regular y con menos aglomerados a una concentración de disolución de extracto de 9,6 mg/ml.



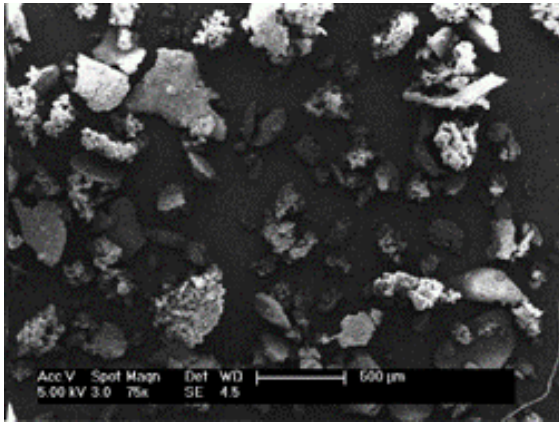
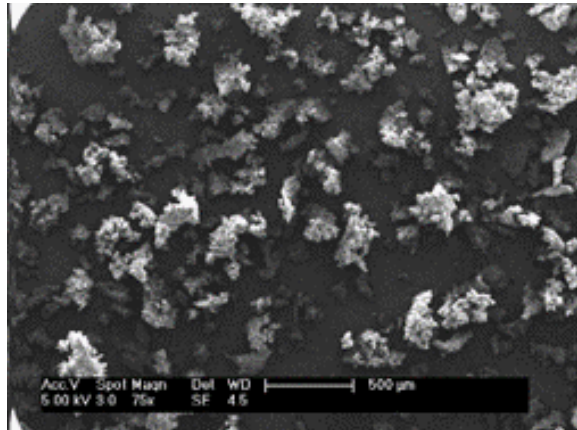
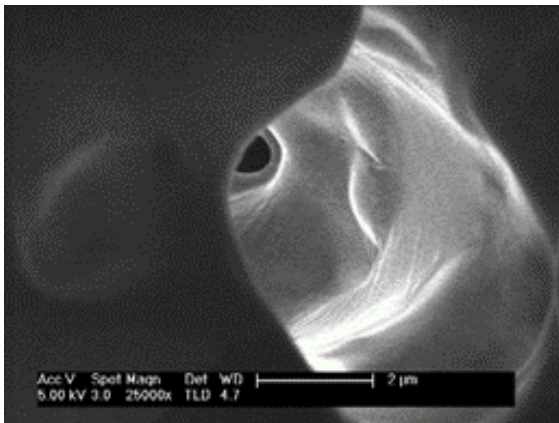
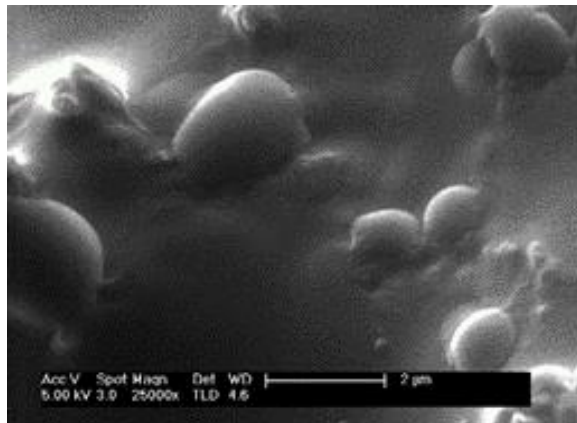
**Figura 25.** Imágenes SEM (75x) a diferentes aumentos de los precipitados en función de la concentración de la disolución de extracto a 150 bar y 35 °C. A: 14,2 mg/ml y B: 9,6 mg/ml.

**A****B**

**Figura 26.** Imágenes SEM (75x) de los precipitados a 200 bar y 35 °C. A: 14,2 mg/ml;  
B: 9,6 mg/ml.

La figura 27 muestra las imágenes SEM obtenidas en el caso de los experimentos 1 y 2. En el análisis de los rendimientos de precipitación se observó una significativa disminución del rendimiento de precipitación en ambos casos y en comparación con el resto de los experimentos. Este hecho se vinculó a un posible aumento del PCM, que pudo provocar la operación en condiciones de fase homogénea subcrítica (zona B de la figura 7) o incluso en la región de dos fases (zona C de la figura 7). Los precipitados de los experimentos 1 y 2 fueron viscosos, con aglomerados adheridos a las paredes de la celda, y difícil de recuperar y cuantificar su peso. En las imágenes de la figura 27 a 25000x (A y B) se aprecia un material con partículas unidas, que han experimentado el fenómeno de la coalescencia, resultando en tamaños considerables, especialmente a 150 bar (experimento 1). A 75x se observa un material continuo, más parecido a una gomorresina, incluso con cavidades dentro de los agregados. Estas imágenes corroboran unas condiciones de operación SAS por debajo del PCM, como consecuencia de la mayor temperatura y concentración de disolución de extracto.

Las propiedades fisicoquímicas (tamaño molecular, punto de fusión, solubilidad en SCCO<sub>2</sub>) del gran número de componentes presentes en el extracto vegetal, contenido en la disolución, así como el tipo de cosolvente empleado, determinan el PCM el que a su vez condiciona la operación SAS para obtener productos sólidos micronizados.

**A****B****C****D**

**Figura 27.** Imágenes SEM a diferentes aumentos de precipitados a 40°C y 14,2 mg/ml. A: experimento 1 y B: experimento 2 (25000x). C: experimento 1 y D: experimento 2 (75x).

## 5. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo de manera satisfactoria la precipitación de micro- y nano-partículas de raíz de regaliz mediante la técnica SAS, con las siguientes conclusiones:

- A presiones más bajas y menores temperaturas se obtienen rendimientos de precipitación mayores. También, el rendimiento aumenta al disminuir la concentración de la disolución de extracto de 14,2 a 9,6 mg/ml, siendo 52,70 % el mayor rendimiento obtenido a 150 bar, 35 °C y 9,6 mg/ml.
- La recuperación de compuestos fenólicos en el precipitado aumenta al disminuir la presión, temperatura y concentración de la disolución de extracto. Dentro del rango de operación estudiado, y teniendo en cuenta también el rendimiento de precipitación, el óptimo corresponde a 150 bar, 35°C y 9,6 mg/ml, con un factor de enriquecimiento respecto del extracto etanólico de raíz de regaliz de 1.3.
- Los precipitados presentan mayor actividad antioxidante que las oleorresinas para igual concentración de compuestos fenólicos totales, probablemente por el fraccionamiento provocado por la técnica SAS (diferente tipo de compuestos fenólicos en precipitados y oleorresinas). Entre los compuestos estudiados, liquiritin y glabridina son los mayoritarios en los precipitados, y se observa una tendencia a la disminución de los valores de IC<sub>50</sub> (mejor actividad antioxidante) conforme aumenta su concentración en los precipitados.
- Se obtienen partículas de menor tamaño a mayores presiones, menores temperaturas y menor concentración de la disolución de extracto, siendo las partículas más regulares y menos aglomeradas a 9,6 mg/ml, 35 °C y presiones de hasta 175 bar. Se pone de manifiesto la importancia de una operación en condiciones por encima del punto crítico de la mezcla para obtener una morfología adecuada, ya que se han obtenido menores rendimientos y capacidad antioxidante, así como partículas más grandes, viscosas y aglomeradas, en condiciones de operación posiblemente subcríticas.

En resumen, el fraccionamiento del extracto etanólico de raíz de regaliz utilizando la técnica SAS resulta en precipitados con mejor actividad antioxidante que el extracto etanólico, incluso que extractos supercríticos obtenidos con etanol como cosolvente. Esta característica, sumada a la presentación en forma de micro- y nano-partículas en polvo, destaca a los precipitados obtenidos en este trabajo como productos interesantes para uso como ingredientes bioactivos.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

Adami, R., Liparoti, S. y Reverchon, E. (2011). A new supercritical assisted atomization configuration, for the micronization of thermolabile compounds. *Chemical Engineering Journal*, 173(1): 55-61.

Alvídrez-Morales, A., González-Martínez, B.A. y Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública Y Nutrición*, 3(3).

Bagheri, H., Hashemipour, H. y Ghader, S. (2019). Population balance modeling: application in nanoparticle formation through rapid expansion of supercritical solution. *Computational Particle Mechanics*

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.

Chang, C.J., Day, C., Ko, C. y Chiu, K. (1997). Densities and P-x-y diagrams for carbon dioxide dissolution in methanol, ethanol, and acetone mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 131(1): 243-258.

Chin, Y., Jung, H., Liu, Y., Su, B., Castoro, J.A., Keller, W.J., Pereira, M.A. y Kinghorn, A.D. (2007). Anti-oxidant Constituents of the Roots and Stolons of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12): 4691-4697.

Guamán-Balcázar, M.C., Montes, A., Pereyra, C. y Martínez de la Ossa, E. (2019). Production of submicron particles of the antioxidants of mango leaves/PVP by supercritical antisolvent extraction process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 143: 294-304.

Kaur, H. (2013). *Glycyrrhiza glabra*: A phytopharmacological review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(7): 2470-1477.

Kim, Y.W., Zhao, R.J., Park, S.J., Lee, J.R., Cho, I.J., Yang, C.H., Kim, S.G. y Kim, S.C. (2008). Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *British Journal of Pharmacology*, 154(1): 165-173.

Knez, Ž, Škerget, M., Ilič, L. y Lütge, C. (2008). Vapor-liquid equilibrium of binary CO<sub>2</sub>-organic solvent systems (ethanol, tetrahydrofuran, ortho-xylene, meta-xylene, para-xylene), 43: 383-389.

Kröber, H. y Teipel, U. (2002). Materials processing with supercritical antisolvent precipitation: process parameters and morphology of tartaric acid. *The Journal of Supercritical Fluids*, 22(3): 229-235.

Langa, E., Pardo, J.I., Giménez-Rota, C., González-Coloma, A., Hernáiz, M.J. y Mainar, A.M. (2019). Supercritical anti-solvent fractionation of *Artemisia absinthium* L. conventional extracts: tracking artemetin and casticin. *The Journal of Supercritical Fluids*, 151: 15-23.

- Li, X., Sun, R. y Liu, R. (2019). Natural products in licorice for the therapy of liver diseases: Progress and future opportunities. *Pharmacological Research*, 144: 210-226.
- Marqués, J.L., Porta, G.D., Reverchon, E., Renuncio, J.A.R. y Mainar, A.M. (2013). Supercritical antisolvent extraction of antioxidants from grape seeds after vinification. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82: 238-243.
- Martín, A. y Cocero, M.J. (2008). Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(3): 339-350.
- Martín, A. y Cocero, M.J. (2004). Numerical modeling of jet hydrodynamics, mass transfer, and crystallization kinetics in the supercritical antisolvent (SAS) process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 32(1): 203-219.
- Mendiola, J. (2013). Supercritical Fluid Extraction. En: Rostagno, M. y Prado, J. (Eds.), *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. 1ª ed. Royal Society Of Chemistry, GB, Oct 1, pp. 196-230.
- Montes, A., Hanke, F., Williamson, D., Guamán-Balcázar, M.C., Valor, D., Pereyra, C., Teipel, U. y Martínez de la Ossa, E. (2019). Precipitation of powerful antioxidant nanoparticles from orange leaves by means of supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 31: 235-243.
- Nam Joung, S., Woo Yoo, C., Shin, H.Y., Kim, S., Yoo, K., Soo Lee, C. y Soo Huh, W. (2001). Measurements and correlation of high-pressure VLE of binary CO<sub>2</sub>-alcohol systems (methanol, ethanol, 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol), 185: 219-230.
- Prosapio, V., De Marco, I. y Reverchon, E. (2018). Supercritical antisolvent coprecipitation mechanisms. *The Journal of Supercritical Fluids*, 138: 247-258.
- Quintana, S., Cueva, C., Villanueva-Bermejo, D., Moreno-Arribas, M.V., Fornari, T. y García-Risco, M.R. (2019 a). Antioxidant and antimicrobial assessment of licorice supercritical extracts. *Industrial Crops and Products*, 139: 111496.
- Quintana, S., R. García-Risco, M., Reglero, G., Villanueva Bermejo, D. y Fornari, T. (2019 b) b. Supercritical antisolvent particle precipitation and fractionation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*.
- Rasenack, N. y Müller, Dr (hon) Bernd W. (2004). Micron-Size Drug Particles: Common and Novel Micronization Techniques. *Pharmaceutical Development and Technology*, 9(1): 1-13.
- Reverchon, E., Torino, E., Dowy, S., Braeuer, A. y Leipertz, A. (2010). Interactions of phase equilibria, jet fluid dynamics and mass transfer during supercritical antisolvent micronization, 156: 446-458.
- Reverchon, E. y de marco, I. (2011). Mechanisms controlling supercritical antisolvent precipitate morphology, 169: 358-370.

- Sameiyan, E., Hayes, A.W. y Karimi, G. (2019). The effect of medicinal plants on multiple drug resistance through autophagy: A review of in vitro studies. *European Journal of Pharmacology*, 852: 244-253.
- Saxena, S. (2005). Glycyrrhiza glabra: Medicine over the millennium. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 4(5): 358-367.
- Selyutina, O.Y. y Polyakov, N.E. (2019). Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier – From physicochemical properties to biomedical applications: A modern insight on the ancient drug. *International Journal of Pharmaceutics*, 559: 271-279.
- Silva, J.M., Akkache, S., Araújo, A.C., Masmoudi, Y., Reis, R.L., Badens, E. y Duarte, A.R.C. (2019). Development of innovative medical devices by dispersing fatty acid eutectic blend on gauzes using supercritical particle generation processes. *Materials Science and Engineering: C*, 99: 599-610.
- Simmler, C., Pauli, G.F. y Chen, S. (2013). Phytochemistry and biological properties of glabridin. *Fitoterapia*, 90: 160-184.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R.M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Sodeifian, G., Saadati Ardestani, N., Sajadian, S.A. y Soltani Panah, H. (2019). Experimental measurements and thermodynamic modeling of Coumarin-7 solid solubility in supercritical carbon dioxide: Production of nanoparticles via RESS method. *Fluid Phase Equilibria*, 483: 122-143.
- Sui, X., Wei, W., Yang, L., Zu, Y., Zhao, C., Zhang, L., Yang, F. y Zhang, Z. (2012). Preparation, characterization and in vivo assessment of the bioavailability of glycyrrhizic acid microparticles by supercritical anti-solvent process. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2): 471-479.
- Troconis, D. (2016). *Implementación en Novalindus de la tecnología supercrítica de formación de partículas. Trabajo Fin de Máster*. Universidad Autónoma de Madrid, (Junio,2016).
- Vázquez de Frutos, L. (2008). *Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales. Tesis Doctoral inédita*. Universidad Autónoma de Madrid, .
- Villanueva-Bermejo, D., Zahran, F., Troconis, D., Villalva, M., Reglero, G. y Fornari, T. (2017). Selective precipitation of phenolic compounds from Achillea millefolium L. extracts by supercritical anti-solvent technique. *The Journal of Supercritical Fluids*, 120: 52-58.
- Visentin, A., Rodríguez-Rojo, S., Navarrete, A., Maestri, D. y Cocero, M.J. (2012). Precipitation and encapsulation of rosemary antioxidants by supercritical antisolvent process. *Journal of Food Engineering*, 109(1): 9-15.

Wei, S., Yang, M., Chen, X., Wang, Q. y Cui, Y. (2015). Simultaneous determination and assignment of 13 major flavonoids and glycyrrhizic acid in licorices by HPLC-DAD and Orbitrap mass spectrometry analyses. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(3): 232-240.

Werling, J.O. y DeBenedetti, P.G. (1999). Numerical modeling of mass transfer in the supercritical antisolvent process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 16(2): 167-181.

Ye, X. y Wai, C.M. (2003). Making Nanomaterials in Supercritical Fluids: A Review. *Journal of Chemical Education*, 80(2): 198.

Zhang, X., Song, Y., Han, X., Feng, L., Wang, R., Zhang, M., Zhu, M., Jia, X. y Hu, S. (2013). Liquiritin attenuates advanced glycation end products-induced endothelial dysfunction via RAGE/NF- $\kappa$ B pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 374(1): 191-201.

## ANEXO

Duplicados de los experimentos 3 a 6 de precipitación SAS de una disolución de extracto de raíz de regaliz.

**Tabla A1.** Rendimientos. Conc.: concentración de la disolución de extracto, %P: Rendimiento precipitado, %S: rendimiento en el separador (oleorresina).

<i>Experimento</i>	<i>Presión (bar)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Conc. (mg/ml)</i>	<i>%P</i>	<i>%S</i>
<i>3.a</i>	125	35	14,2	35,78	27,45
<i>3.b</i>	125	35	14,2	31,05	23,01
<i>4.a</i>	150	35	14,2	34,92	29,48
<i>4.b</i>	150	35	14,2	32,93	31,31
<i>5.a</i>	175	35	14,2	27,77	35,81
<i>5.b</i>	175	35	14,2	29,50	41,51
<i>6.a</i>	200	35	14,2	28,45	44,53
<i>6.b</i>	200	35	14,2	29,08	31,24

**Tabla A2.** Compuestos fenólicos totales (mg GAE/g) obtenidos en precipitado y oleorresina. YTPC: recuperación en precipitado; E: factor de enriquecimiento en precipitado. Compuestos fenólicos totales del extracto UAE de raíz de regaliz:  $119,512 \pm 4,092$  mg GAE/g.

<i>Experimento</i>	<i>mg GAE/g</i>		<i>Precipitado</i>	
	<b>Precipitado</b>	<b>Separador</b>	<b>Y<sub>TPC</sub> (%)</b>	<b>E</b>
<i>3.a</i>	160,5 ± 9,8	167,4 ± 3,5	48,0	1,3
<i>3.b</i>	173,8 ± 4,8	152,5 ± 3,4	45,6	1,4
<i>4.a</i>	146,4 ± 4,8	164,2 ± 7,9	42,7	1,2
<i>4.b</i>	162,4 ± 4,9	171,3 ± 9,2	44,7	1,3
<i>5.a</i>	160,2 ± 9,6	167,7 ± 3,2	37,2	1,3
<i>5.b</i>	144,5 ± 7,6	162,2 ± 1,8	35,7	1,2
<i>6.a</i>	159,9 ± 8,6	177,7 ± 6,1	38,0	1,3
<i>6.b</i>	155,5 ± 7,8	143,4 ± 9,3	37,8	1,3

**Tabla A3.** Capacidad antioxidante por el ensayo del DPPH obtenido en la precipitación SAS. IC<sub>50</sub>: concentración inhibitoria al 50%; TEAC: capacidad antioxidante equivalente al trolox. IC<sub>50</sub> extracto UAE: 20,402 ± 0,990; TEAC extracto UAE: 0,636 ± 0,044.

<i>Experimento</i>	<i>Precipitado</i>		<i>Separador</i>	
	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	TEAC (mmol/ml)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	TEAC (mmol/ml)
<i>3.a</i>	17,06 ± 0,65	0,74 ± 0,01	28,39 ± 0,27	0,46 ± 0,01
<i>3.b</i>	16,70 ± 0,14	0,78 ± 0,01	25,49 ± 0,28	0,51 ± 0,01
<i>4.a</i>	17,05 ± 0,25	0,75 ± 0,01	24,62 ± 0,99	0,53 ± 0,03
<i>4.b</i>	16,92 ± 0,37	0,77 ± 0,01	26,50 ± 0,63	0,49 ± 0,01
<i>5.a</i>	17,58 ± 0,85	0,73 ± 0,05	27,41 ± 0,54	0,47 ± 0,01
<i>5.b</i>	19,17 ± 0,91	0,69 ± 0,02	25,54 ± 0,45	0,51 ± 0,01
<i>6.a</i>	17,94 ± 0,18	0,72 ± 0,01	26,38 ± 1,15	0,50 ± 0,03
<i>6.b</i>	19,56 ± 0,56	0,67 ± 0,01	27,92 ± 0,39	0,47 ± 0,01

**Tabla A4.** Concentración (mg/g) de los compuestos de raíz de regaliz analizados por HPLC: (a) precipitados; (b) oleorresinas.

<i>Experimentos</i>	liquiritin	liquiritigenina	ácido glicirrónico	isoliquiritigenina	glabridina
	(12,465 s)	(34,458 s)	(47,861 s)	(49,381 s)	(69,203 s)
<b>a) Precipitados</b>					
<b>3.a</b>	8,58	0,26	0,40	0,60	28,00
<b>3.b</b>	9,67	n.i.	0,60	0,60	18,60
<b>4.a</b>	8,35 ± 0,01	0,60 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,60 ± 0,01	15,80 ± 0,00
<b>4.b</b>	8,84 ± 0,07	n.i.	0,40 ± 0,01	0,60 ± 0,01	16,90 ± 0,14
<b>5.a</b>	8,75 ± 0,01	0,44 ± 0,29	0,40 ± 0,01	0,60 ± 0,01	15,30 ± 2,97
<b>5.b</b>	9,09 ± 0,27	0,70 ± 0,14	0,60 ± 0,28	0,60 ± 0,01	17,30 ± 0,99
<b>6.a</b>	8,90 ± 0,07	0,60 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,60 ± 0,01	13,60 ± 0,28
<b>6.b</b>	8,55 ± 0,09	0,60 ± 0,00	0,50 ± 0,14	0,60 ± 0,01	16,10 ± 0,14
<b>b) Oleorresinas</b>					
<b>3.a</b>	n.i.	0,93	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	57,80 ± 0,28
<b>3.b</b>	n.i.	1,00 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	56,50 ± 0,42
<b>4.a</b>	0,70 ± 0,01	0,90 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	55,60 ± 0,28
<b>4.b</b>	n.i.	0,90 ± 0,08	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	53,90 ± 4,10
<b>5.a</b>	n.i.	1,00 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	56,00 ± 1,41
<b>5.b</b>	n.i.	1,20 ± 0,28	0,30 ± 0,08	0,90 ± 0,08	67,40 ± 10,75
<b>6.a</b>	n.i.	1,04 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	56,30 ± 0,14
<b>6.b</b>	n.i.	0,91 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,80 ± 0,01	53,00 ± 0,57

n.i.: no identificado.

**Tabla A5.** Resultados estadísticos de la distribución del tamaño de las partículas en el precipitado. d (0,1): percentil 10; d (0,5): percentil 50; d (0,9): percentil 90.

<i>Experimento</i>	<b>d (0,1) (μm)</b>	<b>d (0,5) (μm)</b>	<b>d (0,9) (μm)</b>	<b>Tamaño medio d (4,3) (μm)</b>
<b>3.a</b>	5,66	30,57	68,05	34,27
<b>3.b</b>	7,35	36,94	71,54	39,09
<b>4.a</b>	3,82	20,20	48,82	23,58
<b>4.b</b>	4,12	17,15	41,52	20,32
<b>5.a</b>	3,69	13,43	34,07	16,51
<b>5.b</b>	3,91	14,58	39,25	18,55
<b>6.a</b>	3,15	9,74	25,85	12,54
<b>6.b</b>	2,73	8,01	23,72	10,94



**ANEXO AL CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID PARA EL DESARROLLO DE PROGRAMAS DE MÁSTER UNIVERSITARIO**

**SOLICITUD DE PRÁCTICAS / TRABAJOS FIN DE MÁSTER**

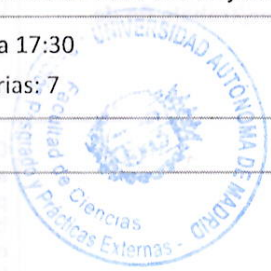
**Curso: 2018-19**

La Universidad Autónoma de Madrid conforme a lo establecido en la cláusula segunda. 2) del citado convenio, solicita al CSIC la realización de prácticas y/o trabajos de fin de Máster por parte del alumnado abajo consignado, según los contenidos del convenio de colaboración citado, firmado el 11 de noviembre de 2014, del que el presente documento es anexo inseparable, y en los siguientes términos:

<b>1. Denominación del programa de Máster:</b>	Máster en Nuevos Alimentos
<b>2. Instituto del CSIC donde se desarrollarán las actividades:</b>	CSIC - CIAL Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación
<b>3. Coordinador/a del Máster de la Universidad:</b>	
<b>4. Tutor/académico de la Universidad:</b>	Tiziana Fornari Reale Departamento de Química Física Aplicada 914972380 tiziana.fornari@uam.es
<b>5. Organizador/a del Máster del CSIC:</b>	
<b>6. Responsable de prácticas/trabajo fin de Máster del CSIC:</b>	Tiziana Fornari Reali / Elena Somaris Quintana Dpto de Química Física Aplicada 910017902 / 910017972 tiziana.fornari@uam.es / somaris.quintana@predoc.uam.es
<b>7. Finalidad de las actividades:</b>	Desarrollo Trabajo Fin de Máster. La precipitación supercrítica anti-solvente (SAS) es una tecnología novedosa que es aplicada principalmente para la formulación de sustancias puras bioactivas (fármacos), para obtener micro o nano partículas y encapsularlas en diferentes medios. Cuando se intenta aplicar la técnica a extractos de origen vegetal, el procedimiento es más complejo por la gran cantidad de sustancias diferentes que componen un extracto natural. En este trabajo el estudiante conocerá los fundamentos de la precipitación SAS adaptada a la aplicación de la técnicas para producir, en un solo paso, el fraccionamiento del extracto, la concentración de sus ingredientes bioactivos y la formación de micro y nanopartículas. Se llevarán a cabo ensayos SAS experimentales en planta piloto y se determinará la calidad de los productos obtenido mediante el estudio de su composición química, el análisis de la estabilidad y la distribución y morfología de las partículas.
	Desarrollo Trabajo Fin de Máster. CG2 Saber aplicar los conceptos, principios, teorías y modelos adquiridos en el Máster en el campo académico, de la



<p><b>8. Objetivos programáticos y actividades previstas:</b></p>	<p>investigación y de la innovación tecnológica respecto a la formulación de nuevos alimentos.</p> <p>CG3 Capacidad de razonamiento, análisis crítico y síntesis de ideas nuevas para la elaboración de nuevos alimentos, abarcando niveles más integradores, como los vinculados a la biodiversidad y al medio ambiente.</p> <p>CG4 Capacidad para buscar, analizar y gestionar información para planificar un trabajo experimental, un desarrollo científico o un plan de investigación.</p> <p>CG5 Elaborar adecuadamente y con cierta originalidad composiciones escritas o argumentos motivados, redactar planes, proyectos de trabajo o artículos científicos.</p> <p>CB6 Poseer y comprender conocimientos que aporten una base u oportunidad de ser originales en el desarrollo y/o aplicación de ideas, a menudo en un contexto de investigación</p> <p>CB7 Que los estudiantes sepan aplicar los conocimientos adquiridos y su capacidad de resolución de problemas en entornos nuevos o poco conocidos</p> <p>CB8 Que los estudiantes sean capaces de integrar conocimientos y enfrentarse a la complejidad de formular juicios a partir de una información que, siendo incompleta o limitada, incluya reflexiones sobre las responsabilidades sociales y éticas vinculadas a la aplicación de sus conocimientos y juicios</p> <p>CE2 Aplicar métodos avanzados para la caracterización química de ingredientes bioactivos.</p> <p>CE3 Conocer el efecto en el organismos de las distintas clases de ingredientes bioactivos, así como saber evaluar su funcionalidad, biodisponibilidad y bioaccesibilidad.</p> <p>CE4 Diseñar la incorporación de ingredientes funcionales a un alimento base, teniendo en cuenta sus propiedades tecnofuncionales así como el proceso tecnológico implicado en su elaboración.</p> <p>CE8 Adquirir las estrategias apropiadas para la resolución de problemas concretos de investigación, desarrollo e innovación en el campo de los nuevos alimentos.</p>
<p><b>9. Sistemas de evaluación y control:</b></p>	<p>Regulado en la guía docente de la asignatura</p>
<p><b>10. Duración de las actividades:</b></p>	<p>Del 4 de marzo de 2019 al 6 de julio de 2019</p>
<p><b>11. Horario de las actividades:</b></p>	<p>De 09:00 a 17:30, Horas diarias: 7</p>
<p><b>12. Nº total de horas</b></p>	<p>500</p>
<p><b>13. Cuantificación de la previsión del gasto en el que incurrirá eventualmente el instituto del CSIC</b></p>	<p>0</p>



<p>Nombre y apellidos del estudiante: Diego Martin Hernandez</p>	<p>DNI/NIE: 51538360Y</p>	<p>Curso: 1</p>	<p>Teléfono: 917338877</p>	<p>Fecha de nacimiento: 24/02/1996</p>	<p>Máster: Máster en Nuevos Alimentos</p>
--	-------------------------------	---------------------	--------------------------------	--	---

Lo que se firma, por duplicado ejemplar, en Madrid a 4 de marzo de 2019

Por la Universidad Autónoma de Madrid

Marín Martín, Francisco  
Vicedecano de Prácticas Externas



Autorizado por el/la director/a del  
Instituto del CSIC



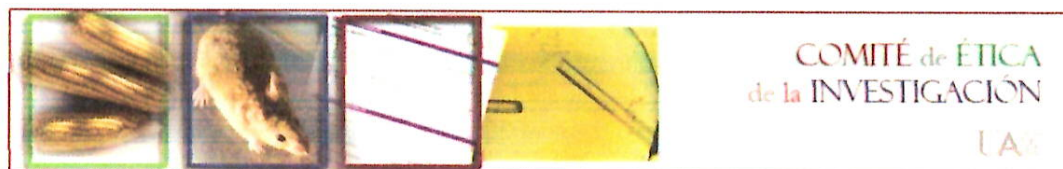
**ANEXO II AL CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID PARA EL DESARROLLO DE PROGRAMAS DE MÁSTER UNIVERSITARIO.**

El presente anexo se incorpora al convenio suscrito entre las citadas entidades con fecha 19 de diciembre de 2014. El alumnado abajo firmante y que se recoge en el anexo I firmado el 4 de marzo de 2019 , del citado convenio, ha leído y acepta las condiciones y compromisos establecidos en dicho convenio y declara su conformidad para realizar las prácticas y/o trabajos de fin de Máster en el CSIC, según los términos recogidos en el anexo I del mismo

Firma del/de la alumno/a



Fdo.: Diego Martin Hernandez  
DNI: 51538360Y



## Solicitud de evaluación por el Comité de Ética de la Investigación (CEI-UAM) para trabajos de investigación en el ámbito docente

De acuerdo con el Reglamento del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, los trabajos de investigación que se realicen en el ámbito docente (lo que incluye Trabajos Fin de Grado y Trabajos Fin de Master, entre otros posibles) deben solicitar la evaluación de dicho Comité cuando la investigación implique a seres humanos o la utilización de muestras de origen humano, la obtención y el tratamiento de datos de carácter personal, la experimentación animal y la utilización de agentes biológicos de riesgo u organismos modificados genéticamente, de conformidad con lo establecido en la legislación vigente. Dichos trabajos, en el momento de ser solicitados o adjudicados (según especifique cada titulación), deberán presentar (junto con la documentación solicitada en cada caso) el presente documento debidamente cumplimentado.

CURSO: 1º

TÍTULO DEL TRABAJO:

Precipitación supercrítica anti-solvente de extractos bioactivos naturales

TIPO DE TRABAJO (especificar TFG, TFM u otro) Y TITULACIÓN:

TFM

Indicar si la propuesta contempla alguno/s de los siguientes aspectos:

- A: Investigación con seres humanos o uso de datos personales..... SI  NO
- B: Utilización de muestras biológicas humanas o información genética.. SI  NO
- C: Experimentación animal..... SI  NO
- D: Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana,  
animal o para las plantas .. SI  NO
- E: Uso de organismos modificados genéticamente (OMGs)..... SI  NO

En caso de haber contestado afirmativamente a uno o más ítems, indicar si el trabajo se hace dentro de un Proyecto de Investigación más amplio que cuenta con la aprobación del CEI y, si es así, especificar título del proyecto, Investigador Principal y fecha de aprobación por el CEI-UAM:

Si el trabajo de investigación no se enmarca en un Proyecto ya aprobado, se ha de adjuntar una breve memoria que incluya las actividades a realizar, incluyendo la metodología y el material -en su caso- que se va a utilizar. Además, se adjuntará la siguiente **documentación**:

- En el supuesto **A**, si la investigación es prospectiva, se deberá aportar el documento de consentimiento informado que se utilizará, donde conste la información detallada que recibirá el participante en el estudio. Si la investigación es retrospectiva se deberá establecer un compromiso de confidencialidad sobre los posibles datos identificativos de los participantes. En cualquier caso, se detallará si los datos o el material obtenido serán anonimizados o codificados y cómo se custodiarán. También deberá indicarse el modo de reclutamiento de los participantes. Si se trata de experimentación clínica se debe adjuntar el informe del Comité de Ética del Centro en el que se llevará a cabo la experimentación, señalando la extensión de esta autorización (usos restringidos al proyecto, o para otros usos relacionados).
- En el supuesto **B** si la investigación es prospectiva, se deberá aportar el documento de consentimiento informado a utilizar donde conste la información detallada que recibirá el participante en el estudio. Si la investigación es retrospectiva deberá presentarse la autorización del uso de las muestras, que deberán tratarse de forma anónima, a menos que se justifique adecuadamente la necesidad del tratamiento de forma no anónima, en cuyo caso se necesitará consentimiento informado y documento de confidencialidad.
- En el supuesto **C** se deberá adjuntar el Informe del Órgano Encargado del Bienestar de los Animales (OEBA) y, en su caso, del Órgano Habilitado.
- En el supuesto **D** se debe adjuntar el informe del Comité de Bioseguridad o del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales del Centro en el que se llevará a cabo la experimentación. Asimismo, se deberán enumerar los agentes biológicos a utilizar y describir las medidas de contención del laboratorio donde se van a realizar los trabajos.
- En el supuesto **E** se debe adjuntar el informe del Comité de Bioseguridad o del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales del Centro en el que se llevará a cabo la experimentación. Se debe declarar la categoría de riesgo de los **OMGs** empleados y su procedencia, así como los organismos receptores y donantes empleados y los vectores utilizados.

Nombre y Apellidos del estudiante:	Diego Martin Hernández
Nombre y Apellidos del Director:	Tiziana Fornari y Elena Somaris
Nombre y Apellidos del Tutor (si el Director es externo):	
Departamento:	Química Física Aplicada
Centro:	CIAL (UAM-CSIC)
Teléfono:	910017902
Correo electrónico:	tiziana.fornari@uam.es

Firma del estudiante



Firma(s) del Director y del Tutor (en su caso)

Fecha: 15 de febrero de 2019

**FORNARI  
REALI  
TIZIANA -  
55113166Z**

Firmado digitalmente por  
FORNARI REALI TIZIANA -  
55113166Z  
Nombre de reconocimiento  
(DN): c=ES,  
serialNumber=IDCES-5511316  
6Z, givenName=ILIZIANA,  
sn=FORNARI REALI,  
cn=FORNARI REALI TIZIANA -  
55113166Z  
Fecha: 2019.02.15 18:56:53  
+01'00'



## INFORME DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

### MÁSTER EN NUEVOS ALIMENTOS

CURSO ACADÉMICO: 2018-2019

CONVOCATORIA:  Ordinaria  Extraordinaria

### ESTUDIANTE:

Apellidos: MARTÍN HERNÁNDEZ      Nombre: DIEGO

**TÍTULO DEL TFM:** *Precipitación supercrítica anti-solvente de extractos de Regaliz (Glycyrrhiza glabra L.)*

**TÍTULO EN INGLÉS:** *Supercritical antisolvent precipitation of Licorice (Glycyrrhiza glabra L.) extracts*

### DIRECTOR

Apellidos: FORNARI REALI      Nombre: TIZIANA

### Codirector:

Apellidos: QUINTANA MARTÍNEZ      Nombre: SOMARIS ELENA

### TUTOR (si aplica)

Apellidos \_\_\_\_\_ Nombre \_\_\_\_\_

### INFORME PARA EL TRIBUNAL

La firma del presente documento avala que la dedicación del estudiante ha sido adecuada a los ECTS del TFM, y que los resultados presentados en la memoria del TFM han sido generados por el autor de la misma.

Cantoblanco a \_\_28\_\_ de \_\_junio\_\_ de 2019\_\_

EL DIRECTOR

Fdo.:

EL CODIRECTOR

Fdo.:

EL TUTOR

Fdo.:

EL ESTUDIANTE

Fdo.: