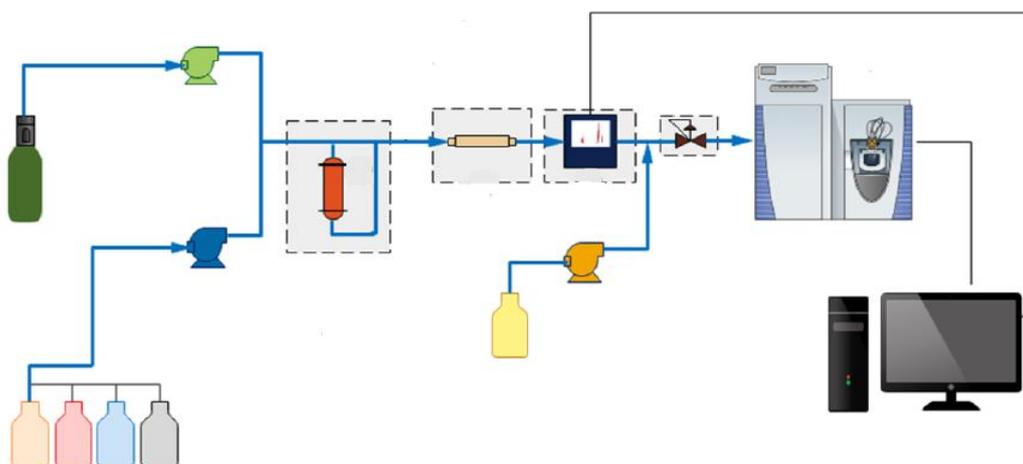




EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS: APLICACIONES DE INTERÉS FARMACÉUTICO



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
JOSÉ REYES VARGAS



Trabajo Fin de Grado:

Extracción con Fluidos Supercríticos: Aplicaciones de Interés Farmacéutico

Revisión Bibliográfica

Grado en Farmacia

Departamento de Química Analítica

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

José Reyes Vargas

Tutoras:

M^a Teresa Morales Millán

M^a Ángeles Herrador Morillo

Sevilla Diciembre del 2018

ÍNDICE

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
1.1. Técnicas de Separación	3
1.2. Extracción Líquido-Líquido	4
1.3. Extracción en Fase Sólida	4
1.4. Extracción Sólido-Líquido: Soxhlet	5
1.5. Microextracción en Fase Sólida	6
2. OBJETIVOS	7
3. METODOLOGÍA	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1. Extracción con Fluidos Supercríticos (EFS)	8
4.1.1. Generalidades	8
4.1.2. Características	10
4.1.3. Instrumentación	12
4.1.4. Proceso de Extracción Supercrítica	13
4.1.5. Ventajas y Desventajas	14
4.1.6. Tipos de EFS	15
4.1.7. Optimización de las Condiciones de Extracción	15
4.2. Aplicaciones de Interés farmacéutico	19
4.2.1. Aplicaciones en la industria agroalimentaria	19
4.2.2. Aplicaciones en la industria farmacéutica	22
4.2.3. Aplicaciones de interés toxicológico	24
4.3. Desarrollo de la EFS a lo Largo del Tiempo	
4.4. Otras Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos	25
4.4.1. Cromatografía de Fluidos Supercríticos	25
4.4.2. Cristalización Supercrítica	26
4.4.3. Otras Aplicaciones	28
5. CONCLUSIONES	29
6. BIBLIOGRAFIA	29

RESUMEN

Dentro del proceso de análisis de muestras, existen muchas técnicas y procedimientos por las que se hacen pasar la muestra antes de realizar la determinación del analito. Las técnicas de separación son necesarias debido a que las muestras son demasiado complejas y es fundamental la eliminación de interferencias para facilitar la determinación del analito de interés.

Las técnicas utilizadas para la extracción son: extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, extracción sólido-líquido, microextracción en fase sólida y la extracción con fluidos supercríticos (EFS).

Esta última técnica, al ser el objeto del trabajo, se explica más detalladamente, incluyendo sus generalidades, características, tipos, procedimiento, ventajas y desventajas e instrumentación.

Además, se indican las numerosas aplicaciones de interés farmacéutico, clasificándose en diferentes industrias como la agroindustria, la industria farmacéutica y las aplicaciones de interés toxicológico.

También se comenta el desarrollo de la EFS desde sus inicios mostrando el número de artículos en los que usa la EFS.

Aparte se mencionan otras aplicaciones que pueden tener los fluidos supercríticos en el ámbito farmacéutico como la cromatografía de fluidos supercríticos, la cristalización supercrítica, la preparación de polvos farmacéuticos y la aplicación de fluidos supercríticos en la solubilización de fármacos.

Finalmente se destacan las conclusiones a las que se han llegado sobre la extracción con fluidos supercríticos tras finalizar esta revisión bibliográfica.

Palabras claves: técnicas de separación, extracción, extracción con fluidos supercríticos, EFS.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los procedimientos de preparación de muestras, utilizados generalmente por los químicos analíticos consumen, tanto tiempo como disolventes. Según una encuesta reciente, dos tercios del tiempo de análisis está dedicado a la preparación de muestras, y este paso representa al menos un tercio del error generado durante la ejecución de un método de análisis. La mejora y la automatización de la etapa de preparación de muestras, por lo tanto, darán lugar a una reducción en el tiempo de análisis y una mayor fiabilidad de los resultados.

1.1. Técnicas de separación

Las técnicas de separación, y dentro de ellas las técnicas extractivas, son procesos mediante los cuales el analito se separa de la matriz (Fernández et al., 2004) eliminando así las posibles interferencias e incrementando la concentración del analito.

La importancia de las técnicas de separación en el proceso analítico se debe a que:

-Logran mejorar la exactitud mediante el aumento directo de la sensibilidad a través del proceso de preconcentración.

-Logran un aumento directo de la selectividad a través de la eliminación de interferencias.

En la Figura 1 se muestra un esquema de algunas de las técnicas de extracción más usadas, que a continuación serán explicadas.

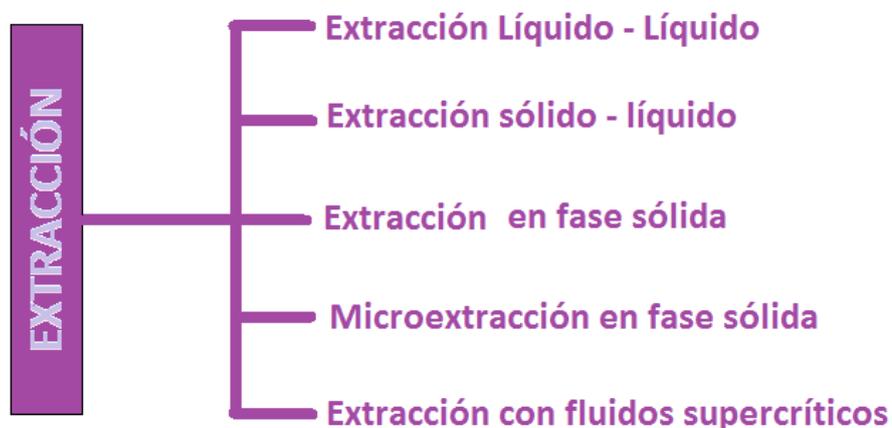


Figura 1. Esquema de las técnicas de extracción más empleadas

1.2. Extracción líquido – líquido.

Es un proceso de reparto en el que el analito se va a transferir desde una “fase líquida A” a otra “fase líquida B”, inmiscible con la anterior, concentrándose el soluto en el disolvente con mayor solubilidad.

Es una técnica útil para purificar, separar, aumentar selectividad y preconcentrar.

La separación de uno o más analitos se suele realizar entre una disolución acuosa (fase acuosa) y otro disolvente inmiscible con el agua (fase orgánica) con la ayuda de un embudo de decantación, como se muestra en la Figura 2.

La posición relativa de ambas fases (arriba o abajo) depende de la relación de densidades (Valcárcel, 1999).



Figura 2. Embudo de decantación usado en la extracción líquido-líquido

1.3. Extracción sólido-líquido: Soxhlet

Es un proceso cíclico de extracción continua empleado para la extracción de compuestos orgánicos intensamente retenidos en muestras sólidas. Para ello es necesario el uso de tres piezas de vidrio: matraz, cuerpo intermedio con sifón y refrigerante como se muestra en la Figura 3.

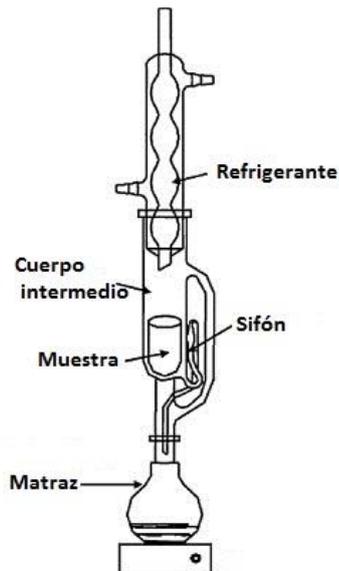


Figura 3. Esquema del material necesario para la extracción Soxhlet

Esta técnica presenta ventajas como la independencia del tipo de matriz y que la muestra entra en contacto con el disolvente limpio varias veces favoreciendo la transferencia. Pero también tiene inconvenientes como la necesidad de de gran cantidad de disolvente, la evaporación del analito y el largo tiempo de ejecución (Valcárcel, 1999).

La preocupación reciente sobre los peligros asociados con la mayoría de los disolventes usados, los costos y peligros ambientales de la eliminación de disolventes de desecho, han llevado al desarrollo de métodos de extracción alternativas como la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción con fluido supercrítico (EFS), ya que estas técnicas si cumplen los principios de la química verde.

1.4. Extracción en fase sólida

Proceso físico en el que intervienen una fase sólida y un líquido. Esta separación está basada en la afinidad del analito por una fase sólida, en la que queda retenido, como se muestra en la Figura 4.

Los compuestos retenidos se eluyen posteriormente con un pequeño volumen de un disolvente adecuado (Fernández et al., 2004).

Esta técnica presenta ventajas como el uso de poco disolvente, la fácil aplicación y la posibilidad de ser automatizada y desventajas como las bajas recuperaciones, la obturación de los cartuchos y la limitación de compuestos para usarlos.

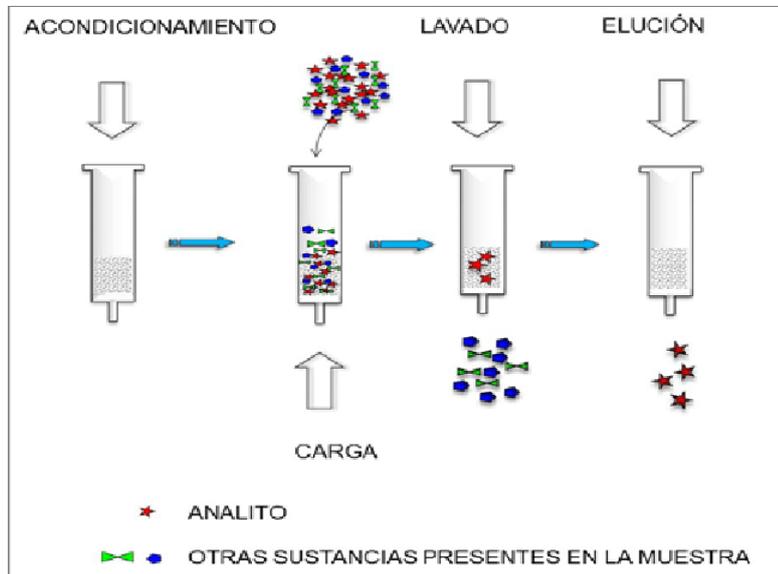


Figura 4. Esquema del proceso de extracción en fase sólida

1.5. Microextracción en fase sólida

Es una técnica de extracción para compuestos orgánicos que se basa en la adsorción de los analitos de la matriz por una fase sólida inmovilizada sobre una fibra de sílice fundida, como se muestra en la Figura 5.

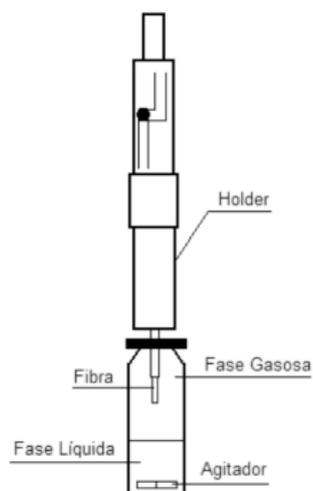


Figura 5. Esquema del proceso de microextracción en fase sólida

Es una técnica de extracción en la que no se usa disolventes, rápida, casi sin pérdidas y que se puede acoplar a cromatografía de gases y HPLC. Las desventajas son el alto costo, la fragilidad de la fibra y la limitación a muestras líquidas o compuestos volátiles (Fernández et al., 2004).

2. OBJETIVOS

- Poner de manifiesto la necesidad de los procesos de separación de los analitos, destacando los procesos de extracción más usados.
- Describir detalladamente la extracción con fluidos supercríticos: fundamento, instrumentación, procedimientos, ventajas e inconvenientes y aplicaciones.
- Hacer una revisión crítica de las aplicaciones de esta técnica en los últimos años centrada principalmente en las de interés farmacéutico, ambiental y alimentario.

3. METODOLOGÍA

La realización de este trabajo se ha llevado a cabo mediante una búsqueda de bibliografía en diferentes fuentes de información como libros, bases de datos, artículos científicos y tesis doctorales.

En la primera parte se hace una breve introducción de las técnicas de separación para la que se ha usado principalmente los libros “Toma y tratamiento de muestras” de Fernández et al. (2004) y “Principios de Química Analítica” de Valcárcel (1999).

La segunda parte se centra en la técnica de extracción con fluidos supercríticos, para la que se ha usado el libro “Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico” de Luque de Castro et al. (1993).

Además, se complementó con numerosos artículos sacados de distintas bases de datos, destacando *Pubmed*. Para la primera parte de generalidades y características del proceso se hizo un cribado buscando palabras clave como el

nombre de la técnica tanto en español como en inglés, siendo este idioma el que más resultados ofreció. Para la segunda parte en la que se trata objetivo del trabajo, se realizó un cribado mediante palabras claves como aplicaciones farmacéuticas de la EFS, también en ambos idiomas. Para esta parte han sido fundamentales los artículos “Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria” de Velasco et al. (2007) y “Supercritical fluid extraction: recent advances and applications” de Herrero et al. (2010) entre otros.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Extracción con fluidos supercríticos

4.1.1 Generalidades

Un fluido supercrítico es un estado de la materia en la que se encuentra bajo condiciones de presión y temperatura superior a su punto crítico, en el que no se pueden distinguir el estado gaseoso del estado líquido. En este punto el compuesto es compresible, comportándose como un gas y tiene la densidad de un líquido y por lo tanto su poder disolvente (Luque de Castro et al., 1993).

En un diagrama de fases, como el de la Figura 6, las curvas de fusión, sublimación y vaporización muestran las zonas de coexistencia de dos fases. Tan solo hay un punto de coexistencia de tres estados, el llamado punto triple (PT). El punto crítico (PC) se encuentra marcado al final de la curva del equilibrio líquido-gas, y el área sombreada indica la región de fluido supercrítico. El punto crítico de un compuesto se encuentra en la intersección de la temperatura y la presión crítica (Bhimanagouda et al., 2009).

-Temperatura crítica: Por encima de esta temperatura el componente gaseoso del compuesto puro no puede ser licuado sin importar la presión aplicada.

-Presión crítica: Por encima de esta presión, el componente líquido del compuesto puro no puede ser evaporado sin importar la temperatura aplicada.

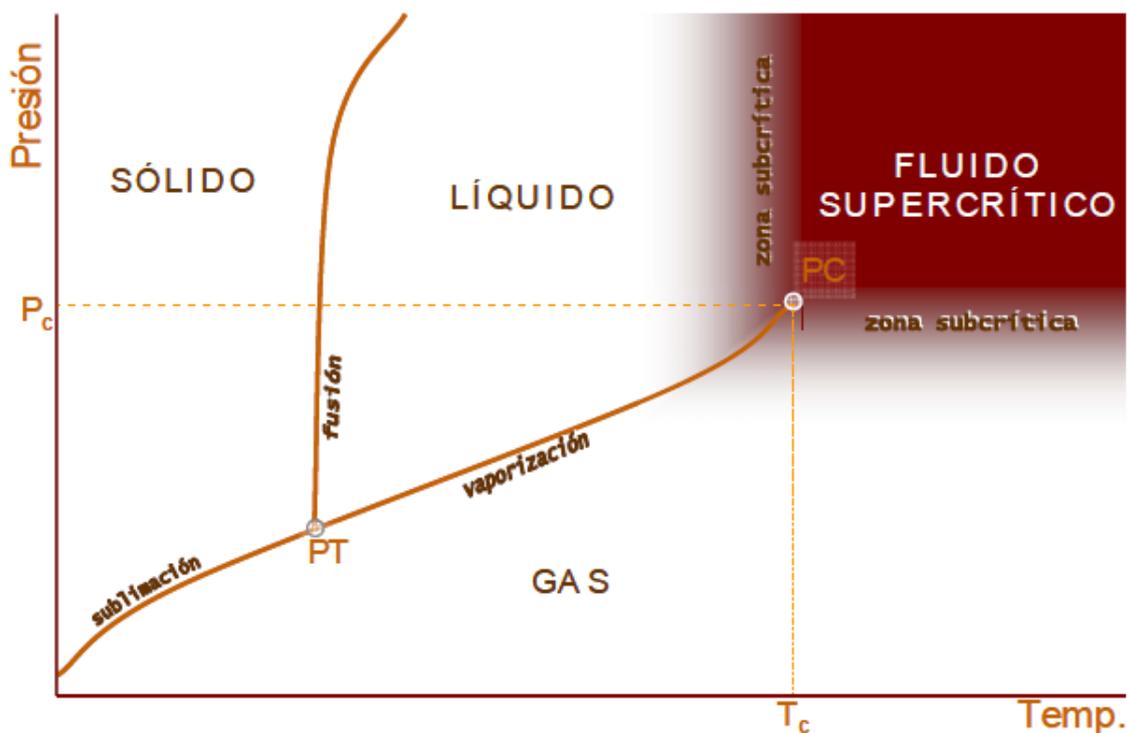


Figura 6. Diagrama de fases sólido/líquido/gas. PT: punto triple, PC: punto crítico, P_c : presión crítica, T_c : temperatura crítica (Mendiola, 2008)

Tanto el punto triple como el punto crítico son característicos de cada sustancia. En la Tabla 1 se pueden ver las condiciones de presión y temperatura que definen el punto crítico de las sustancias más estudiadas.

Tabla 1. Propiedades críticas de las sustancias más comúnmente empleadas en condiciones supercríticas (Mendiola, 2008)

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Presión crítica (bar)	Temperatura crítica (°C)	Densidad crítica (g/ml)
Dióxido de carbono	44,01	72,0	31,1	0,47
Agua	18,02	214,8	374,2	0,32
Amoniaco	17,03	109,8	132,5	0,23
Argón	39,95	48,6	-122,4	0,73
Acetona	58,08	47,0	235,0	0,28
Etanol	46,07	72,0	243,4	0,28
Metanol	32,04	78,9	239,0	0,27
Metano	16,04	46,0	-82,6	0,17
Etano	30,07	47,6	32,3	0,20
n-Propano	44,10	42,4	96,7	0,22
n-Butano	58,12	70,6	152,0	0,23
n-Pentano	72,15	32,9	196,0	0,23
n-Hexano	86,16	30,1	234,2	0,23
Dimetiléter	46,07	52,6	126,2	0,26
Dietiléter	74,12	63,8	193,6	0,27
Piridina	79,10	56,3	347,0	0,31

El fluido supercrítico más usado es el dióxido de carbono. Hay varias razones que lo explican.

En primer lugar, el CO₂ es barato y está disponible comercialmente incluso con una alta pureza. No es inflamable ni tóxico, a diferencia de muchos disolventes orgánicos. La temperatura y presión crítica son moderadas (31.1 °C y 72.84 atm). Estas condiciones lo convierten en un disolvente adecuado para la extracción de compuestos termosensibles. Desde el punto de vista del proceso, al ser un gas a temperatura ambiente es seguro de manejar y no deja residuos de disolvente en los productos finales.

Pero también tiene desventajas, debido a que no es polar, la extracción de analitos polares puede ser un desafío. Esto se puede mejorar mediante la adición de una pequeña cantidad de disolvente modificador polar o un agente tensioactivo (Mendiola, 2008).

4.1.2. Características

Los fluidos supercríticos poseen unas propiedades fisicoquímicas únicas que los hacen atractivos como disolventes de extracción (Tabla 2). Con respecto a la cinética, su viscosidad es 5-20 veces menor que la de los líquidos ordinarios: los coeficientes de difusión de solutos son, en consecuencia, mayores. Esto proporciona claramente un medio para extracciones más rápidas y eficientes en comparación con fases líquidas clásicas, debido a una penetración más rápida y más completa en las matrices sólidas.

Tabla 2. Valores de densidad, viscosidad y coeficiente de difusión para gases, fluidos supercríticos y líquidos (Leyendecker et al., 1987).

Fluid	Density (g cm ⁻³)	Viscosity (Pa s)	Diffusion coefficient (cm ² s ⁻¹)
Gas	(0.6-2) · 10 ⁻³	(1-3) · 10 ⁻⁵	0.1-1.0
Supercritical fluid	0.2-0.9	(1-3) · 10 ⁻⁴	(0.1-5) · 10 ⁻⁴
Liquid	0.6-1.6	(0.2-3) · 10 ⁻³	(0.2-3) · 10 ⁻⁵

Desde un punto de vista termodinámico, los fluidos supercríticos tienen densidades 100-1000 veces mayores que los gases, lo que les da un poder de solvatación más cercano a la de los líquidos. Además, su densidad está estrechamente relacionada con la presión y, en menor extensión, la temperatura (Figura 7).

Como la fuerza de extracción de un fluido supercrítico está directamente relacionada con su densidad (puede ser descrito por la correlación empírica $\delta = 1.25P_c^{1/2} (\rho_g / \rho_l)$, donde δ es el parámetro de solubilidad de Hildebrand, P_c es la presión crítica del fluido, ρ_g es la densidad del fluido supercrítico, y ρ_l es la densidad del fluido en su estado líquido, la capacidad de solvatación de un fluido supercrítico hacia una especie puede ser fácilmente modificada cambiando la presión y/o la temperatura de extracción (Leyendecker et al., 1987).

Eso permite el ajuste de una gran escala de valores de densidad y la extracción selectiva de compuestos variando la presión de extracción.

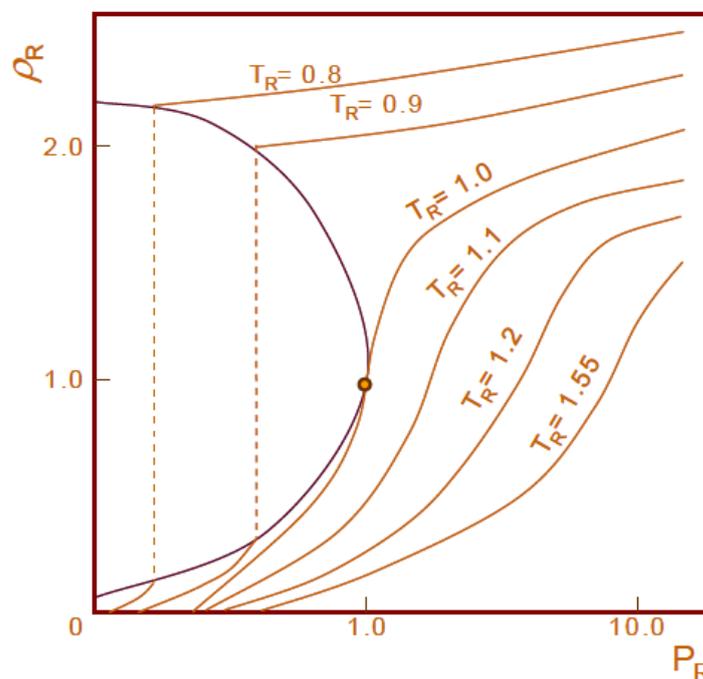


Figura 7. Variación de la densidad en función de la presión y temperatura en las cercanías del punto crítico. P_R , T_R y ρ_R son las variables reducidas ($P_R = P/P_C$, $T_R = T/T_C$ y $\rho_R = \rho/\rho_C$) (Mendiola, 2008).

4.1.3. Instrumentación

La instrumentación requerida (Figura 8) para realizar una EFS exitosa está disponible comercialmente. El proceso comienza con una fuente limpia de fluido, que en la mayoría de los casos es una botella de alta presión de CO₂. Una bomba se usa para aumentar la presión del fluido por encima de su presión crítica. La presión de extracción de trabajo está determinada por la densidad requerida para disolver los analitos de interés de la muestra. La muestra está contenida en la cámara de extracción, que se calienta a la temperatura de extracción deseada por encima del punto crítico. El fluido presurizado es llevado a la temperatura adecuada por la cámara y se permite que fluya a través de la matriz de muestra para extraer los analitos. Después de la muestra, el fluido cargado de analito fluye a un restrictor, que controla la velocidad de flujo del fluido. El restrictor mantiene la alta presión del fluido en el cámara. En el restrictor, el fluido supercrítico pierde su fuerza de solvatación cuando su presión cae a la presión atmosférica. Después del restrictor, los analitos se pueden recoger para el análisis posterior (Valverde, 1995).

El poder de solvatación del CO₂ se puede mejorar mediante la adición de una pequeña cantidad de disolvente modificador cuya pureza debe estar garantizada.

En el pasado, se han usado botellas de mezcla de CO₂ que contenían un disolvente modificador pero había ciertas dudas respecto a la consistencia de la mezcla a lo largo de la vida útil de la botella. Actualmente se usan equipos con bombas modificadoras especiales que dosifican y mezclan el disolvente modificador con el CO₂.

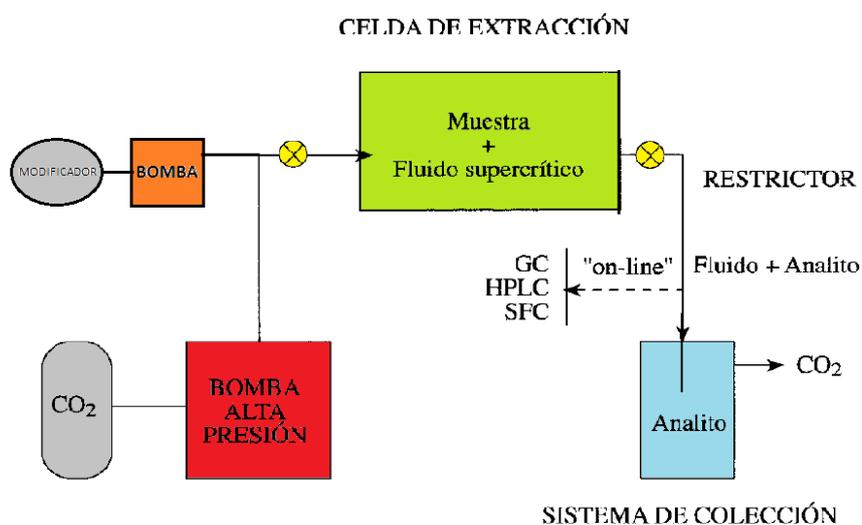


Figura 8. Esquema de la instrumentación necesaria para la extracción con fluidos supercríticos

4.1.4. Proceso de extracción supercrítica

Un proceso de extracción supercrítica consta de 4 etapas (Gallego y Castañeda, 2004):

- Etapa de presurización
- Etapa de ajuste de temperatura
- Etapa de extracción
- Etapa de separación

La forma en la que opera el sistema se resume a continuación. El material a extraer se carga dentro de la cámara de extracción. Una vez que este listo se hace pasar el fluido supercrítico dentro de la cámara de extracción mediante una bomba, presurizándose hasta alcanzar la presión y la temperatura por encima del punto crítico. Aquí el disolvente entra en contacto con los componentes de la matriz, solubilizando y arrastrando los componentes afines. El fluido, cargado de analito, fluye a el restrictor, donde se produce la descompresión del fluido cambiando éste de fase y separándose de los componentes disueltos para poder ser recuperados (Valverde, 1995).

Para que las extracciones sean efectivas hay que tener en cuenta un factor muy importante como es el diseño del sistema usado para la recogida de los analitos. La extracción *off-line* consiste en un tubo de ensayo o vial, el cual contiene un pequeño volumen de disolvente orgánico, en el que el fluido, al salir del restrictor, burbujea. Con este tipo de extracción no es necesario realizar etapas de preconcentración, ya que los extractos obtenidos se pueden analizar en el correspondiente sistema cromatográfico.

En la extracción *on-line* los analitos extraídos son trasladados y pueden ser recogidos en diferentes sistemas como “bucle” de inyección, trampa de termodesorción o la fase estacionaria en la cabeza de columna. En este tipo el sistema cromatográfico se acopla directamente al equipo de extracción. Los sistemas usados pueden ser la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de fluidos supercríticos (CFS). Gracias a este acoplamiento la automatización del proceso es más fácil y más sensible, ya que todo el analito que se ha extraído pasa al sistema cromatográfico (Valverde, 1995).

4.1.5. Ventajas y desventajas

Algunas de las ventajas y desventajas de la extracción con disolventes supercríticos en comparación con los métodos convencionales se resumen en la Tabla 3 (Lang et al., 2001).

Tabla 3. Principales ventajas y desventajas de la EFS

Ventajas	Desventajas
Debido a su baja viscosidad y alta difusividad, el fluido supercrítico puede penetrar dentro de un sólido poroso con mayor facilidad, lo que resulta en una extracción más rápida.	Debido a la naturaleza del proceso se requieren presiones elevadas para llevar a cabo la extracción.
La disolución del fluido supercrítico es controlado en función de la presión y/o temperatura.	Alto costo debido a la inversión para el equipo y mantenimiento.
En la extracción supercrítica se hace pasar fluido fresco a través de la muestra continuamente.	La compresión del solvente requiere medidas elaboradas de recirculación para reducir los costos energéticos.
Los fluidos supercríticos son fácilmente recuperados del extracto mediante despresurización.	Disuelven pocos compuestos no polares.
Los compuestos termolábiles pueden ser extraídos sin daño alguno debido a las bajas temperaturas empleadas.	El uso de modificadores puede alterar la polaridad del CO ₂ , pero pueden quedar en el extracto necesitando un proceso de separación posterior.
La extracción supercrítica utiliza disolventes no hostiles con el medio ambiente.	
El fluido supercrítico puede ser reciclado o reusado, minimizando la generación de desperdicios.	

Debido a la preocupación por el medio ambiente, la extracción con fluidos supercríticos muestra excelentes oportunidades para lograr los objetivos claves de la “química verde”. Este término se refiere al diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso o producción de sustancias peligrosas para el medio ambiente. Esta metodología cumple varios objetivos como la disminución del uso de disolventes y que éstos sean lo más inocuos posible.

4.1.6. Tipos de EFS

La extracción con fluidos supercríticos, al igual que las extracciones con disolventes líquidos, puede llevarse a cabo de forma estática o de forma dinámica. En la forma estática, la celda de extracción es presurizada con el fluido manteniendo cerrada la válvula de salida del extractor, una vez finalizada la extracción, dicha válvula se abre, pasando el fluido, con los analitos extraídos, al sistema de colección. En el modelo dinámico, el fluido supercrítico se deja fluir en forma continua a través de la celda de extracción, manteniendo las válvulas de entrada y de salida del extractor abiertas durante todo el periodo de extracción. En este caso el flujo del fluido a través del sistema de extracción viene fijado, fundamentalmente, por la presión de trabajo y por las características del restrictor (longitud y diámetro interno en el caso de los restrictores fijos) (Chafer et al., 2005).

En principio, cabe pensar que la extracción dinámica dé mejores y más rápidas recuperaciones, ya que con esta forma de operación, durante todo el proceso de extracción, se produce la renovación continua del fluido que entra en contacto con la muestra, lo que hace que sea difícil que el fluido puede llegar a saturarse. No obstante, el modelo estático permite una mayor penetración del fluido en los poros de la matriz de la muestra, así como que se pueda alcanzar el equilibrio de reparto del analito entre la matriz y el fluido. Esta es la razón de que, en la práctica, las extracciones suelen llevarse a cabo realizando una extracción estática, a la que sigue un periodo de extracción dinámica.

4.1.7. Optimización de las condiciones de extracción

Los dos parámetros básicos en EFS son la recuperación de extracción (la proporción de la cantidad de soluto extraído con respecto a su cantidad inicial, generalmente expresado como un porcentaje masivo) y la tasa de extracción (recuperación de extracción por unidad de tiempo a una determinada velocidad del fluido supercrítico a través de la célula).

La realización de la extracción de un determinado soluto de una matriz necesita la optimización de varios parámetros, de los que destacan la presión, la temperatura, la posible adición de un modificador orgánico para el fluido, la velocidad de flujo y el tipo de matriz

● ***Influencia de la temperatura***

A una presión constante, la densidad del CO₂ disminuye cuando la temperatura aumenta. Este efecto es más pronunciado a medida que aumenta la compresibilidad, como se muestra en la Figura 9. La temperatura también afecta a la volatilidad del soluto.

Para un soluto no volátil, una temperatura más alta daría como resultado una menor recuperación de extracción debido a una disminución en la solubilidad.

Por otro lado, para un soluto volátil, hay una competencia entre su solubilidad en CO₂ (que disminuye a medida que la temperatura aumenta) y su volatilidad (que aumenta al aumentar temperatura) (Camel et al., 1993).

● ***Influencia de la velocidad del fluido***

La velocidad del fluido supercrítico que fluye a través de la célula tiene una gran influencia en la eficiencia de la extracción. Cuanto más lenta es la velocidad del fluido, más profundamente penetra en la matriz. La velocidad del fluido puede ser expresado por la velocidad lineal, que depende fuertemente de la velocidad de flujo y la geometría de la celda.

Para una célula de extracción dada, la velocidad de flujo se puede cambiar fácilmente mediante el uso un nuevo restrictor con un diámetro interior diferente. La disminución de la tasa de flujo da como resultado una menor velocidad lineal y generalmente mayores recuperaciones de extracción (como resultado de un contacto prolongado entre el fluido supercrítico y la muestra) (Camel et al., 1993).

● ***Adición de un modificador***

La baja polaridad del CO₂ limita su uso a la extracción de solutos relativamente apolar, o moderadamente polares. Por lo tanto, se agrega una pequeña cantidad de un disolvente orgánico polar (metanol, acetonitrilo, agua, etc.), llamado "Modificador", al fluido supercrítico para la extracción de solutos más polares.

La naturaleza del modificador depende de la naturaleza del soluto a extraer. Un punto de partida razonable consiste en seleccionar un modificador que sea un buen disolvente en su estado líquido para el analito de interés.

Cabe señalar que la adición de grandes cantidades de modificador puede cambiar considerablemente los parámetros críticos de la mezcla. Como resultado, mezclas binarias de dióxido de carbono y un disolvente orgánico a menudo se utilizan en un estado subcrítico, donde los coeficientes de difusión son más pequeños que en un estado supercrítico.

La Figura 10 muestra el efecto del agregado de un modificador sobre la solubilidad de aceite de palma en CO₂ supercrítico. A presiones cercanas a 20 MPa, la solubilidad del aceite en CO₂ aumenta casi nueve veces cuando se utiliza 10% de etanol como modificador. Para lograr el mismo grado de extracción que con CO₂ puro, el agregado de etanol permite reducir las presiones requeridas entre un 30 y un 40% (Bharath et al., 1992).

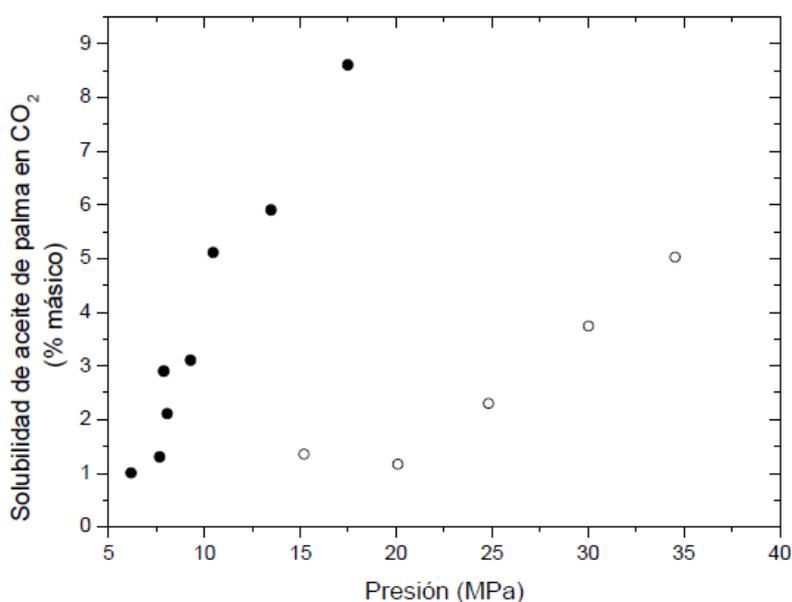


Figura 10. Solubilidad de aceite de palma en CO₂ en función de la presión. (●) sin modificador y (○) con 10% de etanol (Bharath et al., 1992)

● **Influencia de la naturaleza de la matriz**

Factores como el tamaño de partícula, forma, área superficial, porosidad, humedad, nivel de solutos extraíbles y la naturaleza de la matriz afectarán a los resultados analíticos. De la misma manera, las interacciones entre solutos y sitios activos de la matriz pueden necesitar condiciones de extracción estrictas.

4.2. Aplicaciones de interés farmacéutico

La EFS es una técnica muy usada en los procesos industriales de extracción desde hace varias décadas, especialmente en la industria agroalimentaria (49%), como se puede observar en la Figura 11. También es ampliamente usada en el sector químico (27%) y el farmacéutico (20%). Estas aplicaciones se comentaran seguidamente exponiendo varios ejemplos dentro de cada sector.

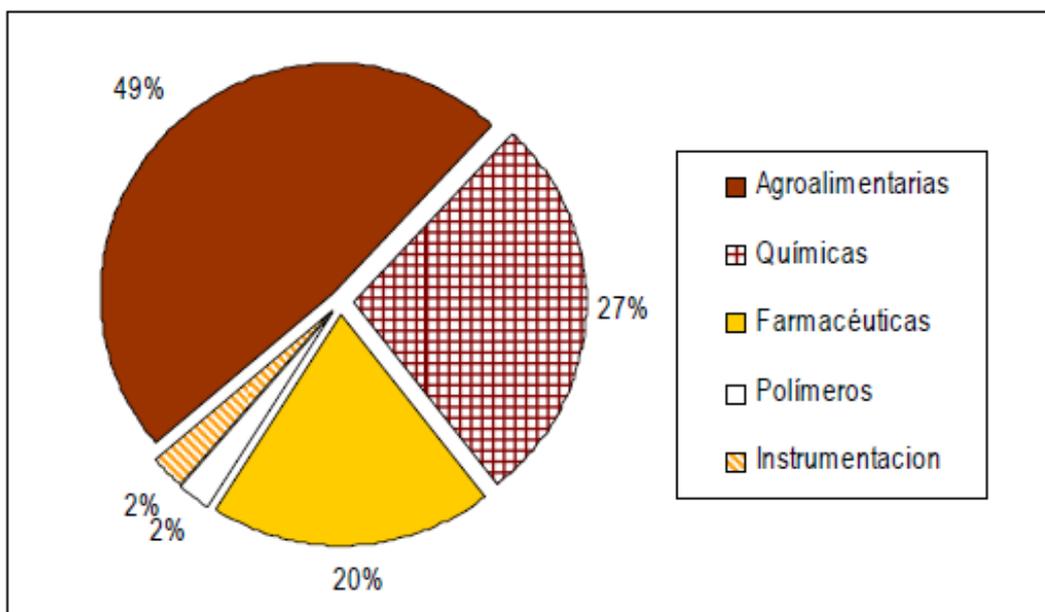


Figura 11. Porcentajes del uso de la EFS en los distintos sectores industriales (Mendiola, 2008)

4.2.1. Aplicaciones en la industria agroalimentaria

La EFS tiene diversas aplicaciones en la industria agroalimentaria como son: el fraccionamiento y la extracción de aceites y grasas, la extracción de antioxidantes naturales, la extracción de alcaloides, aromas y especias

-Extracción y fraccionamiento de lípidos

La EFS es una buena alternativa respecto a los disolventes orgánicos para la extracción y fraccionamiento de aceites vegetales por sus ventajas como no ser toxico ni dejar residuos, así como su capacidad de extraer selectivamente determinadas sustancias al modificar la presión y temperatura. Pero la principal ventaja es la obtención de aceites de calidad libres de fosfolípidos y glicolípidos, menor contenido en hierro, claros y

desodorizados (Tilly et al., 1990). En la Tabla 4 se pueden observar algunos ejemplos de extracción con fluidos supercríticos de aceites y lípidos.

Tabla 4. Aceites y lípidos extraídos con CO₂ supercrítico (Velasco et al., 2007)

Materia Prima	Principio Activo	Condiciones de Extracción	
		T (°C)	P (bar)
Lúpulo (<i>Humulus lupulus L.</i>)	Ácidos- alfa	40 - 60	120 - 280
Nuez Moscada (<i>Myristica fragans H.</i>)	Aceite	23	90
Hinojo (<i>Foeniculum vulgare M.</i>)	Aceite Triglicéridos	40 - 50	200 - 900
Avellana	Aceite	40-60	300-600
Nuez Moscada	Aceite	50-70	150-300
Hinojo	Triglicéridos	40	300
Salvado de Arroz	Ácidos grasos libres	50-60	100-400
Pimienta	Triglicéridos	35-65	220-500
Cacao	Triglicéridos	70	200-400
Pimienta	Triglicéridos	40	120-200

-Extracción de antioxidantes naturales

Se ha aumentado el uso de antioxidantes naturales debido a las restricciones legales y el rechazo de consumidores a los antioxidantes sintéticos, así como los ácidos fenólicos, flavonoides y tocoferoles (Ibañez et al., 2000). En la Tabla 5 se pueden observar algunos ejemplos de antioxidantes naturales extraídos con fluidos supercríticos a partir de diferentes materias primas.

-Extracción de alcaloides, aromas y especias

Uno de los campos más desarrollados a nivel industrial es la obtención de ingredientes como alcaloides, aromas y especias para la agroindustria, perfumes y cosmética. En la Tabla 6 se pueden observar algunos ejemplos de aceites esenciales, especialmente, pero también de alcaloides, colorantes y especias extraídos con fluidos supercríticos.

Tabla 5. Antioxidantes naturales extraídos con CO₂ supercrítico (Velasco et al., 2007)

Materia Prima	Principio Activo	Condiciones de Extracción	
		T (°C)	P (bar)
Cascara de pistacho (<i>Pistachia vera</i>)	Antioxidante	35 - 60	101 - 355
Rizomas de Ginger (<i>Zingiber officinale R.</i>)	Gingerol	20 - 40	150 - 200
Rizomas de Ginger (<i>Zingiber officinale R.</i>)	Gingerol	20 - 40	100 - 300
Rizomas de Ginger (<i>Zingiber officinale R.</i>)	Gingerol	20 - 35	200 - 250
Romero (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>)	Antioxidante	40 - 60	100 - 400
Semillas de Cilantro (<i>Coriander sativum</i>)	Antioxidante	58 - 85	116 - 280
Yerba Buena (<i>Hierochloe odorata</i>)	Antioxidante	40	250 - 350

Tabla 6. Alcaloides, aromas y especias extraídos con CO₂ supercrítico (Velasco et al., 2007)

Materia Prima	Principio Activo	Condiciones de Extracción	
		T (°C)	P (bar)
Anís (<i>Pimpinella anisum L.</i>)	Aceite esencial	30	80 - 180
Bulbo de Clavo (<i>Eugenia caryophyllus</i>)	Aceite esencial	50	90 - 120
Bulbo de Clavo (<i>Eugenia caryophyllus</i>)	Aceite esencial	10 - 35	66 - 100
Eucalipto (<i>Eucalyptus tereticornis</i>)	Aceite esencial	10 - 25	66.7-78.5
Manzanilla (<i>Chamomilla recutita L.</i>)	Aceite esencial	30 - 40	100 - 200
Pimienta (<i>Lippia sidoides C.</i>)	Aceite esencial	10 - 25	66.7 - 88.5
Pimienta Negra (<i>Piper nigrum L.</i>)	Aceite esencial	30 - 50	150 - 300
Romero (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>)	Aceite esencial	38 - 48	100 - 160
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	Aceite esencial	40	200
Semillas de Guaraná (<i>Paullinia cupana M.</i>)	Alcaloide	40 - 70	100-400
Palma (<i>Lat. palum</i>)	Alcaloide	40 - 80	207- 483
Pimienta (<i>Capsicum annum L.</i>)	Capsaicinoides	40	120 - 320
Cúrcuma (<i>Curcuma longa L.</i>)	Colorante	45	250 - 300
Stevia (<i>Stevia rebaudiana B.</i>)	Glúcidos	30	200 - 250

4.2.2. Aplicaciones en la industria farmacéutica

Los principales usos de los fluidos supercríticos en la industria farmacéutica incluyen procesos como la ingeniería de partículas y cristales (Byrappa et al., 2008), formación de complejos con ciclodextrinas (CD), revestimiento, espumación e ingeniería de tejidos, reacciones enzimáticas en medios supercríticos, producción de liposomas, purificación de excipientes farmacéuticos, esterilización, eliminación de disolventes (Pasquali y Bettini, 2008), separaciones enantioselectivas (Izake, 2007) y, por supuesto, extracción y purificación de principios activos a partir de materias primas y de medios de reacción sintéticos.

En términos generales, el uso principal de fluidos supercríticos en productos farmacéuticos trata de la extracción de compuestos bioactivos de una mezcla (purificación de reacciones, cuantificación de enantiómero activo, extracción de matrices naturales...) o con la extracción de la matriz (Tabla 7).

Tabla 7. *Compuestos bioactivos y de interés extraídos con CO₂ supercrítico (Herrero et al., 2010)*

Materia prima	Componente de interés	Actividad	Condiciones de extracción	
			T(°C)	P(Bar)
Cynanchum paniculatum	Paeonol	Antiinflamatorio antidiabético	55	150
Cucscuta reflexa	Cumarina	Antifúngico	55	248
Zingiber corallinum	Aceite esencial	Antipirético	30	100
Matricaria chamomilla	Aceite esencial	Antiinflamario Antiespasmódico	40	250
Nigella sativa	Aceite esencial	Antimicrobiano	40	400
Viscum album	Cito tóxico	Anticanceroso	35	350
Hippophae rhamnoides	Componentes relacionados con la coagulación	Antitrombótico	60	450
Valeriana officinalis	Acido valerénico	Tranquilizante	37	360
Spirulina platensis	Vitamina E	Antioxidante	83.3	220
	Acido γ -linolénico	Antimicrobiano	40	400

La separación quiral es un tema muy importante para la industria farmacéutica. La aplicabilidad de SFE como una técnica efectiva y verde para las enantioseparaciones se conoce desde finales de los años 90.

En estos procesos, se forman sales diastereoméricas o complejos de compuestos racémicos y agentes de resolución antes de la etapa de extracción. El agente de resolución seleccionado se agrega en una relación estequiométrica menor que al compuesto racémico. Los enantiómeros que no han reaccionado se extraen con el disolvente supercrítico y se recogen como un polvo después de la despresurización de la solución (Molnár et al., 2008). Por ejemplo, Molnár et al. (2008) informaron una resolución nueva y simple para los enantiómeros de trans-1,2ciclohexanodiol por formación de complejo diastereomérico con ácido tartárico y posterior extracción con fluido supercrítico.

4.2.3. Aplicaciones de interés toxicológico

Existen varios compuestos con serias implicaciones para la salud, cuya determinación puede hacerse usando la EFS, las principales áreas de aplicación incluyen toxicología y ecotoxicología de los alimentos. Además, la Environmental Protection Agency (EPA) ha adoptado la EFS como método de referencia para extraer Hidrocarburos del Petróleo PAH (hidrocarburo aromático policíclico) y PCB (policloruro de bifenilo) a partir de matrices ambientales sólidas.

La EFS se ha utilizado recientemente para extraer organofosforados de diferentes materiales vegetales (Fidalgo-Used et al., 2007), y también se han publicado varias aplicaciones analíticas relacionadas con la extracción de organofosforados de diferentes tejidos animales. Como se muestra en la Tabla 8, la EFS se usa para medir contaminantes en sedimentos. Es importante cuantificar el impacto de las actividades humanas en el medio ambiente, y los suelos y sedimentos son buenos marcadores de este impacto.

Tabla 8. Componentes tóxicos extraídos con CO2 supercrítico (Herrero et al., 2010)

Matriz	Componente de interés	Condiciones de extracción	
		T(°C)	P(Bar)
Melón	Insecticidas	50	300
Sedimentos	PCB	40-100	365
Leche y plasma	Orbifloxacino	60-150	250-320
Aceite de pescado	Dioxinas y PCB	70	300
Suelos	Artemisina	50	300
Suelos industriales envejecidos	PAH	50	300
Tejidos de cerdo	Fluoroquinolonas	80	300

4.3. Desarrollo de la EFS a lo largo del tiempo

La EFS es una técnica que se ha desarrollado ampliamente en los últimos años debido a la posibilidad de analizar distintos tipos de muestras y su respeto por el medioambiente. La Figura 12 muestra de manera grafica el número de artículos publicados por año que ha tenido esta técnica. Se puede observar, en la misma, un aumento progresivo hasta la actualidad del número de artículos publicados.



Figura 12. Numero de articulos por año sobre EFS en Pubmed

Años 1972 a 1987

El primer artículo publicado sobre la extracción con fluidos supercríticos fue en el año 1972. En estos años solo se encuentran el 0.65% de los artículos (19) sobre EFS ya que la técnica no estaba desarrollada aún.

Años 1988 a 1999

En esta década se produce un aumento respecto a los años anteriores del uso de esta técnica debido a su desarrollo. En estos años se concentran el 14,15% de los artículos (410).

Años 2000 a 2010

En esta década es sin duda donde se produce el auge del EFS ya que se perfecciona la técnica y se encuentran multitud de aplicaciones. Esta década contiene el 43.13% de los artículos (1250).

Años 2011 a 2018

Durante estos años se sigue la misma tendencia de aumento, solo que con aun más velocidad, ya que en tan solo 7 años hay casi los mismos artículos que la década pasada (1219), conteniendo el 42%.

4.4. Otras aplicaciones de los fluidos supercríticos

La principal aplicación de los fluidos supercríticos es la extracción supercrítica (EFS) pero, además de ésta, el empleo de diversos fluidos en condiciones sub y supercríticas está muy extendido a diversos ámbitos, tanto industriales como experimentales. Se comentarán seguidamente de forma breve.

4.4.1. Cromatografía de fluidos supercríticos

La cromatografía supercrítica (CFS) es una técnica que ha despertado gran interés en el ámbito de la purificación. En la Figura 13 se muestra la instrumentación necesaria para la CFS. Como se ha comentado anteriormente, los fluidos supercríticos combinan las propiedades de los líquidos y de los gases, por lo que, la cromatografía de fluidos

supercríticos podría situarse a medio camino entre la cromatografía de gases y la de líquida de alta resolución. Esta técnica presenta ventajas como la mayor rapidez de las separaciones, respecto al HPLC, debido a los mayores coeficientes de difusión de los analitos en el fluido supercrítico y la disolución selectiva de los analitos al variar las condiciones de presión y/o temperatura del fluido empleado (Roth, 2004).

Es en el campo de las separaciones farmacéuticas donde la CFS ha alcanzado mayor desarrollo, debido a su uso no sólo a escala analítica sino también a escala preparativa.



Figura 13. Instrumentación para la CFS

En los últimos años se han realizado diversas revisiones sobre muy diversas aplicaciones de la CFS: sobre el análisis de vitaminas liposolubles (Turner et al., 2001), de ácidos grasos (Senorans e Ibanez, 2002), o bien sobre sus aplicaciones en ciencia forense (McAvoy et al., 1999) e incluso sobre su empleo en la determinación de propiedades termodinámicas (Roth, 2004).

4.4.2. Cristalización supercrítica

Un proceso que despierta un gran interés en la actualidad es la cristalización supercrítica, fundamentalmente en la industria farmacéutica y dirigida a la obtención de partículas apropiadas para una administración por vía inhalatoria o parenteral. Existen diversas metodologías para llevar a cabo la precipitación supercrítica (Pasquali et al., 2006) algunos de ellos se comentan a continuación:

- **RESS (rápida expansión de la solución supercrítica):** representa uno de los métodos simples para producir partículas encapsuladas con principio activo. Este método consiste en una saturación del fluido supercrítico con un sustrato sólido seguido de la despresurización rápida y luego expansión de una solución supercrítica a través de un capilar calentado. En este caso, el tamaño y forma de las partículas depende tanto de las condiciones de expansión como de la concentración inicial de solutos. Un ejemplo del uso de este método es en la obtención de analgésicos (Thakur y Gupta, 2006) o bien en la micronización de manteca de cacao (Letourneau et al., 2005).

- **SAS (el disolvente-antisolvente):** fue desarrollado con el fin de lograr una reducción en tamaño de partícula de los materiales hidrofóbicos que no son aptos para el procesamiento con la técnica RESS debido a su escasa solubilidad en fluido supercrítico. La técnica SAS utiliza un fluido supercrítico como antidisolvente. Implica la precipitación del soluto presente en un disolvente orgánico introduciendo un fluido supercrítico como antisolvente. El tamaño y forma de la nucleación es función de la difusión del antisolvente (fluido supercrítico) en la fase orgánica y la velocidad de “evaporación” de fase orgánica. Esta técnica está especialmente indicada para la obtención de micro o nanocristales de proteínas, péptidos o incluso fragmentos de ADN (Ozge Guney, 2002).

- **Atomización supercrítica:** es una combinación las dos técnicas anteriores con la atomización clásica, lo que permite la cristalización de productos termolábiles, sin necesidad de emplear recipientes de alta presión (Reverchon y Antonacci, 2007).

- **Encapsulación supercrítica:** La solución orgánica cargada con una concentración apropiada de fármaco y polímero se rocía a través de una boquilla en el recipiente que contiene el fluido supercrítico. Cuando el fluido supercrítico extraiga el disolvente, el fármaco cristalizará junto con el polímero de forma que quedará encapsulado. De este modo se han obtenido tanto nuevos sistemas de administración de fármacos como catalizadores inmovilizados (Wang et al., 2006).

En la Figura 14 se representa un esquema de las técnicas anteriormente citadas.

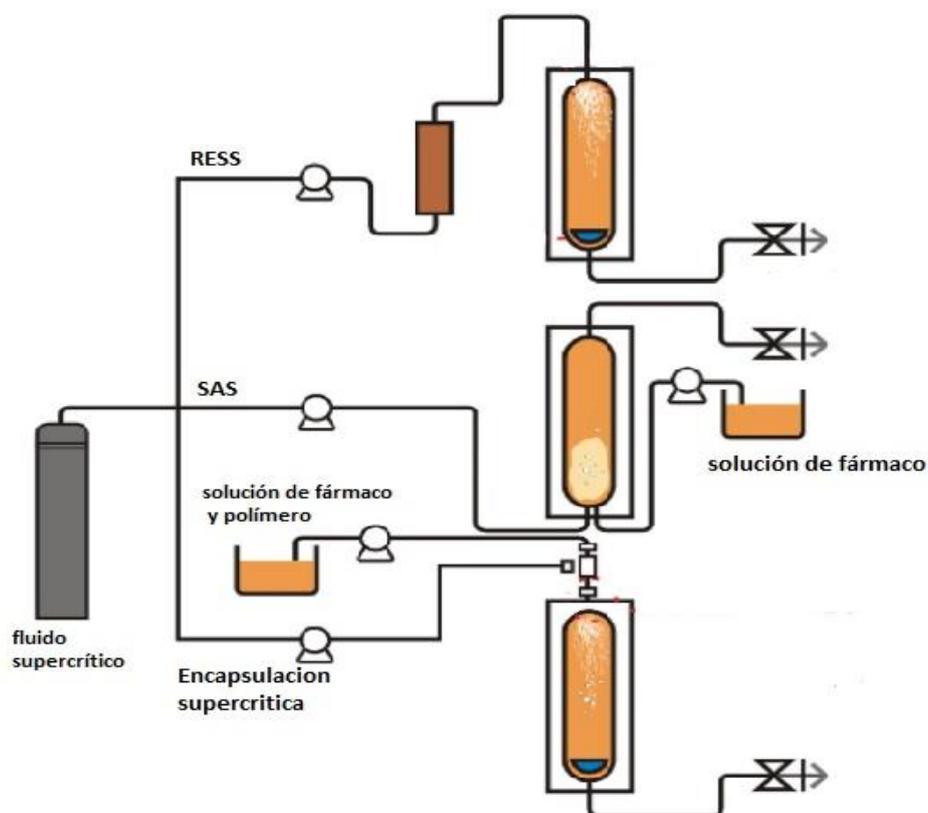


Figura 14. Esquema de las técnicas de cristalización

4.4.3. Otras aplicaciones

Preparación de polvos farmacéuticos

Las propiedades inherentes de los fluidos supercríticos se pueden usar para el procesamiento de macromoléculas tales como proteínas, péptidos y ácidos nucleicos. El método tiene ventajas sobre los métodos de liofilización convencionales.

Las ventajas incluyen la incorporación de productos biológicos delicados sin pérdida de actividad biológica y control sobre la morfología de las partículas de polvo. Varios estudios han demostrado que diversos tipos de partículas pueden obtenerse al procesar soluciones acuosas de proteínas en polvos mediante el uso de fluidos supercríticos (Tservistas et al., 2000).

Aplicaciones de solubilización de fármacos

La solubilidad de los principios activos es uno de los parámetros dominantes del diseño de entrega de medicamentos. Una multitud de productos farmacéuticos a menudo son sustancias insolubles en medios acuosos, y las aplicaciones de estos principios activos a menudo están limitadas por su baja biodisponibilidad. Un método prometedor para mejorar la solubilidad y por lo tanto la biodisponibilidad de los agentes farmacéuticos se puede lograr mediante la tecnología de fluidos supercríticos.

5. CONCLUSIONES

- La extracción con fluidos supercríticos es una técnica muy útil como método de separación y preconcentración de analitos en muestras complejas.
- En el ámbito farmacéutico, es una técnica muy usada por sus ventajas frente a otras técnicas de extracción.
- Presenta condiciones muy favorables desde el punto de vista medioambiental, satisfaciendo la postura de la “química verde”.
- La facilidad con la que pueden modificarse estos fluidos posibilita la optimización de las condiciones para que el proceso de separación cumpla las especificaciones deseadas.
- La extracción con fluidos supercríticos es una técnica cada vez más usada, tanto en aplicaciones farmacéuticas como en aplicaciones agroalimentarias o en toxicología.
- El uso de los fluidos supercríticos en la industria farmacéutica no se limita a su uso en la extracción, sino también en procesos de cromatografía o cristalización.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bharath R, Inomata H, Adschiri T, Arai K. Phase Equilibrium Study for the Separation and Fractination of Fatty Oil Components using Supercritical Carbon Dioxide. *Fluid Phase Equilibria*. 1992; 81: 307-320.
- Bhimanagouda P, Brodbelt J, Miller E, Turner N. Potential Health Benefits of Citrus: An Overview. *American Chemical Society*. 2009; 936: 1-16.
- Byrappa K, Ohara S, Adschiri T. Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology towards biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2008; 60 (3): 299-327.
- Camel V, Tambuté A, Caude M. Analytical-scale supercritical fluid extraction: a promising technique for the determination of pollutants in environmental matrices. *Journal of Chromatography*. 1993; 642 (1): 263-281.
- Chafer A, Pascual-Martí M.C, Salvador A, Berna A. Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin. *Journal of Separation Science*. 2005; 28 (16): 2050-2056.
- Fernández Hernando P, Martín-Esteban A, Pérez-Conde C, Vidal M, Cámara C. Toma y tratamiento de muestras. 1ª ed. Madrid: Síntesis; 2004.
- Fidalgo-Used N, Blanco-Gonzalez E, Sanz-Medel A. Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Analytica Chimica Acta*. 2007; 590 (1): 1-16.
- Gallego I, Castañeda D. Diseño conceptual de un sistema de extracción supercrítica, a escala blanco, utilizando dióxido de carbono como disolvente. Universidad EAFIT. Resumen de los trabajos de grado desarrollados en ingeniería de procesos durante el 2003. Medellín. 2004; 46-53
- Herrero M, Mendiola J, Cifuentes A, Ibañez E. Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217(16): 2495-2511.
- Ibañez E, Palacios J, Señorans F, Santa-Maria G, Tabera J, Reglero G. Isolation and separation of tocopherols from olive by products with supercritical fluids. *Journal of the America oil chemists society*. 2000; 77 (2): 187-190.

- Izake E. Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: an overview. *Journal Pharmaceutical Sciences*. 2007; 96 (7):1659-1676.
- Lang Q, Wai C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies a practical review. *Talanta*. 2001; 53 (4): 771-782.
- Letourneau J.J, Vigneau S, Gonus P, Fages J. Micronized cocoa butter particles produced by a supercritical process. *Chemical Engineering and Processing*. 2005; 44 (2): 201-207.
- Leyendecker D, Leyendecker D, Schmitz F, Lorenschat B, Klesper E. Supercritical Fluid Chromatography using mixtures of carbon dioxide or ethane with 1,4-dioxane as eluents. *Journal of Chromatography A*. 1987; 398: 105-123.
- Luque de Castro M.D, Valcárcel M, Tena M.T. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. España: Reverté; 1993.
- McAvoy Y, Backstrom B, Janhunen K, Stewart A, Cole M.D. Supercritical fluid chromatography in forensic science: a critical appraisal. *Forensic Science International*. 1999; 99(2): 107-122.
- Mendiola J.A. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. (Tesis doctoral). Universidad autónoma de Madrid. 2008.
- Molnar P, Thorey P, Bansaghi G, Szekely E, Poppe L, Tomin A, Kemeny S, Fogassy E, Simandi B. Resolution of racemic trans-1, 2 cyclohexanediol with tartaric acid. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2008; 19 (13):1587-1592
- Ozge Guney A.A. Synthesis of controlled-release products in supercritical medium. *AIChE Journal*. 2002; 48 (4): 856-866.
- Pasquali I, Bettini R, Giordano F. Solid-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006; 27 (4): 299-310.
- Pasquali I, Bettini R. Are pharmaceuticals really going supercritical?. *International journal of pharmaceuticals*. 2008; 364(2):176-187
- Reverchon E, Antonacci A. Polymer microparticles production by supercritical assisted atomization. *Journal of Supercritical Fluids*. 2007; 39(3): 444-452.

- Roth M. Determination of thermodynamic properties by supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1037(1): 369-391.
- Señorans F.J, Ibáñez E. Analysis of fatty acids in foods by supercritical fluid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2002; 465(1): 131-144.
- Thakur R, Gupta R.B. Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC). *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 308(1): 190-199.
- Tilly K, Chaplin R, Foster N. Supercritical fluid extraction of the triglycerides present in vegetable oils. *Separation Science and Technology*. 1990; 25 (4): 357-367.
- Tservistas M, Levy M. S, Lo-Yim M. Y, O'Kennedy R. D, York P, Humphrey G. O, Hoare M. The formation of plasmid DNA loaded pharmaceutical powders using supercritical fluid technology. *Biotechnol. Bioeng.* 2000; 72 (1), 12–18.
- Turner C, King J.W, Mathiasson L. Supercritical fluid extraction and chromatography for fatsoluble vitamin analysis (Review). *Journal of Chromatography A*. 2001; 936: 215-237.
- Valcárcel M. principios de química analítica.1ª ed. Barcelona: Springer-Verlag Iberica S.A. 1999.
- Valverde A. Extracción con fluidos supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas. En: Valverde A y Fernandez-Alba A.R. Residuos de plaguicidas'94. Almeria: IEA/UAL/COEXPHAL; 1995. p.141-154
- Velasco R, Villada H, Carrera J. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*. 2007; 18(1): 53-65.
- Wang Y, Yang J, Pfeffer R, Dave R, Michniak B. The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery. *Powder Technology*. 2006; 164(2): 94-102.