

Capitolo 2

Estrazione con fluidi supercritici (SFE)

Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte

2.1 Introduzione

L'estrazione con fluidi supercritici, o *supercritical fluid extraction* (SFE), rappresenta una valida alternativa ai sistemi classici di estrazione con solvente e ad altre tecniche, come distillazione frazionata, estrazione in corrente di vapore e desorbimento termico.

Per comprendere al meglio le potenzialità e i vantaggi dei fluidi supercritici, è importante esaminare le caratteristiche dello stato supercritico e le proprietà dei fluidi supercritici.

2.1.1 Lo stato supercritico

Il diagramma di fase di una sostanza evidenzia aree nelle quali questa esiste sotto forma di solido, di liquido o di gas, nonché un punto triplo in cui le tre fasi coesistono (Fig. 2.1). Le curve del grafico rappresentano la coesistenza di diverse fasi. Spostandosi da sinistra a destra lungo la curva di coesistenza gas-liquido (che rappresenta le variazioni della pressione di vapore in funzione della temperatura), aumentano sia la temperatura sia la pressione, e di conseguenza il liquido diviene via via meno denso a causa dell'espansione termica, mentre il gas diviene via via più denso a causa dell'aumento di pressione. Continuando a spostarsi verso destra lungo la curva, si arriva a un punto nel quale le densità delle due fasi coincidono e non vi è più distinzione tra fase gassosa e fase liquida (punto critico). In tale punto la sostanza viene descritta come un fluido supercritico: sul diagramma di fase il punto critico è individuato dalle coordinate di pressione critica (P_c) e temperatura critica (T_c), che assumono valori diversi a seconda della sostanza in esame.

L'esistenza di uno stato supercritico fu proposta per la prima volta nel 1822 da Charles Cagniard de la Tour. Riscaldando una sostanza liquida al di sopra del suo punto di ebollizione, all'interno di un recipiente sigillato mantenuto in rotazione e contenente una sfera di selce, lo studioso scoprì che oltre una certa temperatura non si udiva più il rumore determinato dalla sfera che entrava nella fase liquida. Grazie a questo esperimento, Cagniard de la Tour dedusse che per ogni sostanza esiste una temperatura al di sopra della quale la fase liquida scompare (vaporizza), anche se viene aumentata la pressione. Qualche tempo dopo, costruì un tubo in vetro sigillato che gli consentì di osservare il fenomeno, ossia la scomparsa del menisco di separazione tra fase liquida e fase gassosa all'aumentare della temperatura, e di misurare i valori di temperatura critica di diverse sostanze (acqua, alcol, etere ecc.) (Berche et al, 2009).

La scomparsa della differenza tra gas e liquido può essere illustrata graficamente mediante una moderna versione dell'esperimento di Cagniard de la Tour nel quale il menisco tra fase

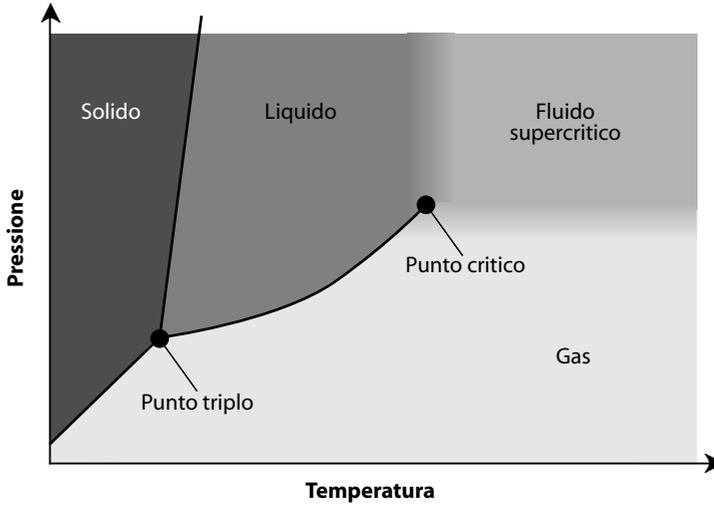


Fig. 2.1 Rappresentazione schematica di un diagramma di fase

liquida e fase gassosa scompare alla temperatura critica. La Fig. 2.2 mostra schematicamente una cella nella quale si svolge l'esperimento alle coordinate di realizzazione (temperatura/pressione). In (A) la cella si trova alla temperatura più bassa e mostra le fasi liquida e gassosa separate da un menisco; al crescere della temperatura e della pressione, la differenza di densità tra le due fasi diminuisce e la separazione diviene via via meno distinta (B); al raggiungimento del punto critico, il menisco scompare (C). La Fig. 2.3 mostra le immagini fotografiche dell'esperimento.

L'esistenza dei fluidi supercritici può essere spiegata anche a livello molecolare. Quando due molecole di un fluido si avvicinano, a una temperatura alla quale la loro velocità relati-

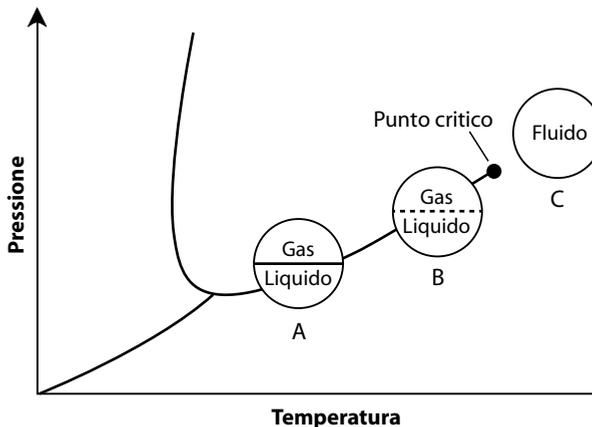


Fig. 2.2 Rappresentazione schematica della sparizione del menisco al punto critico

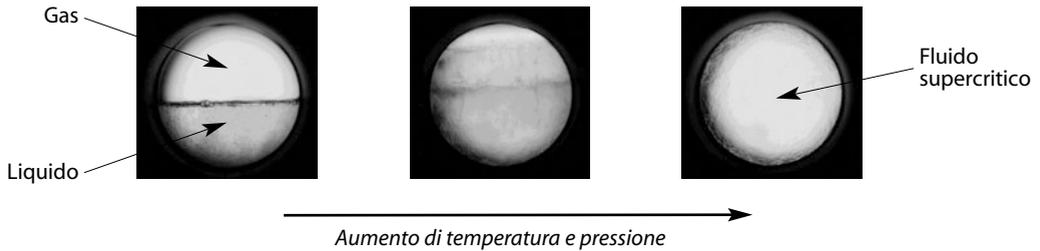


Fig. 2.3 Immagini fotografiche che illustrano le variazioni di stato dell'anidride carbonica, e in particolare la graduale sparizione del menisco di separazione tra la fase liquida e la fase gassosa, all'aumentare di temperatura e pressione

va è molto bassa, le forze di mutua attrazione determinano una temporanea associazione tra le due molecole. Se vi è una sufficiente densità di molecole (cioè una sufficiente pressione), è possibile che si verifichi la condensazione alla forma liquida. Se la temperatura e, quindi, la velocità cinetica sono elevate, la condensazione non può avere luogo. Sulla base del comportamento molecolare, è ragionevole attendersi che per ogni sostanza esista una temperatura al di sotto della quale la condensazione in forma liquida è possibile, ma al di sopra della quale il processo non può avere luogo.

2.1.2 Proprietà dei fluidi supercritici

Quando viene portata a valori di temperatura e pressione superiori, rispettivamente, a T_c e P_c , una sostanza assume caratteristiche fisiche particolari intermedie tra quelle di un liquido e quelle di un gas: scompare la differenza tra stato liquido e stato gassoso e la sostanza può essere descritta solo come un “fluido” di densità uniforme che, all'aumentare della pressione, si avvicina a quella di un solvente liquido. Nel contempo, i fluidi supercritici hanno viscosità simile a quella di un gas (molto bassa). Semplificando, un fluido in queste condizioni potrebbe essere definito come un gas “molto denso”.

Il fluido supercritico esiste quindi come singola fase (né liquida, né gassosa) e non può essere liquefatto o vaporizzato aumentando la temperatura o la pressione (Cavalcanti, Meireles, 2012). Aggiustando opportunamente la temperatura o la pressione (o entrambe), si possono variare la densità e le altre proprietà del fluido per adattarle alla solubilità dei diversi componenti di specifico interesse, rendendo l'estrazione altamente selettiva.

2.2 Principi e vantaggi della tecnica

La SFE non utilizza un solvente organico bensì un fluido supercritico, che, come si è visto, rende più rapido ed efficiente il processo di estrazione. Secondo la definizione IUPAC, un fluido supercritico è qualsiasi elemento, sostanza o miscela riscaldato sopra la temperatura critica (T_c) e pressurizzato sopra la pressione critica (P_c); nella pratica per la maggior parte delle applicazioni si utilizza CO_2 supercritica. L'estrazione è condotta in celle d'acciaio che vengono caricate con il campione macinato. Una pompa invia la CO_2 alla cella termostata dove avviene l'estrazione in condizioni di temperatura e pressione supercritiche. All'uscita della cella la pressione si abbassa e la CO_2 evapora completamente, rilasciando i soluti estratti.

Come già discusso, i fluidi supercritici hanno proprietà intermedie tra quelle di un liquido e quelle di un gas; in particolare hanno densità simile a quella di un liquido e viscosità simile a quella di un gas.

Poiché il potere solvente di un fluido è correlato direttamente alla densità, ne consegue che, rispetto a una classica estrazione con solvente, l'estrazione con un fluido supercritico di comparabile potere solvatante (densità) richiede meno tempo. Grazie alla minore viscosità, il fluido supercritico è inoltre in grado di penetrare in profondità nella matrice del campione; pertanto il trasferimento di massa (diffusione) dell'analita dalla matrice risulterà più rapido rispetto a quello dell'estrazione classica con solvente. Tutto ciò può significare minor consumo di solvente e, di conseguenza, costi ridotti rispetto alle tradizionali estrazioni liquido-liquido o mediante Soxhlet (considerando anche gli oneri correlati allo smaltimento dei solventi).

Scegliendo opportunamente il fluido supercritico, le condizioni di temperatura e pressione e la modalità di raccolta del campione, l'estrazione può essere resa altamente selettiva nei confronti dell'analita di interesse. Ciò significa che gli estratti ottenuti saranno più puliti (conterranno meno interferenti), rispetto a quelli ottenuti con solventi organici, e non necessiteranno di ulteriore purificazione prima della determinazione analitica finale.

Altri vantaggi offerti da questa tecnica sono la possibilità di automazione e l'applicabilità ai settori più svariati (polimeri, alimentare, farmaceutico, ambientale).

In definitiva la SFE rappresenta una valida alternativa alla tradizionale estrazione con solvente, in quanto limita il consumo di solventi organici, riduce i tempi di analisi e può essere facilmente automatizzata.

2.3 Scelta del fluido supercritico

Per essere convenientemente utilizzata come fluido supercritico, una sostanza deve avere un basso peso molecolare, una temperatura critica prossima a quella ambiente ($T_c \sim 10\div 40^\circ\text{C}$) e una pressione critica non troppo elevata ($P_c \sim 40\div 60$ atm).

Gli idrocarburi leggeri possiedono queste caratteristiche, ma presentano problemi a causa dell'infiammabilità e della tossicità. Alcuni clorofluorocarburi hanno buone proprietà solvente nei confronti di determinati analiti; per esempio, l'esafluoruro di zolfo (SF_6) supercritico mostra una selettività particolare per l'estrazione degli idrocarburi alifatici fino a C24 da miscele di idrocarburi alifatici e aromatici. Pur avendo valori di pressione e temperatura critica convenienti, questi idrocarburi sono relativamente costosi, se ottenuti a elevato grado di purezza, e sono tra l'altro banditi in quanto inaccettabili dal punto di vista ambientale. Negli anni Novanta del secolo scorso sono state sviluppate alcune applicazioni che utilizzano come fluido supercritico il protossido di azoto (N_2O), più adatto della CO_2 per l'estrazione di composti polari. L'elevato potere ossidante del N_2O ne preclude l'impiego con analiti ossidabili e modificanti organici e il suo utilizzo è stato limitato in quanto può causare violente esplosioni. L'ammoniaca può essere facilmente convertita in fluido supercritico, ma presenta lo svantaggio di essere troppo aggressiva (discioglie i materiali a base di silice) e tossica. Anche l'acqua è stata testata come fluido supercritico; tuttavia la necessità di elevate temperature ($T > 374^\circ\text{C}$) e pressioni ($P > 221$ atm), unitamente alla sua natura corrosiva in tali condizioni, ne hanno limitato le possibilità pratiche di applicazione.

Oltre il 90% delle applicazioni SFE utilizza CO_2 supercritica. L'anidride carbonica, pur avendo una pressione critica più elevata ($P_c = 72,9$ atm), offre maggiori vantaggi rispetto alle altre sostanze utilizzabili: è priva di tossicità, è inerte, non è infiammabile, è riciclabile (e quindi priva di impatto ambientale) e a temperatura e pressione ambiente è un gas, ciò che

Tabella 2.1 Punti critici di diversi solventi

Solvente	T_c (°C)	P_c (atm)	Densità critica (g/mL)
Anidride carbonica	31,3	72,9	0,448
Protossido di azoto	36,5	71,7	0,450
Etano	32,3	48,1	0,200
Propano	96,7	41,9	0,217
n-Pentano	196,6	33,3	0,232
Metanolo	240,5	78,9	0,272
Etanolo	243,0	63,0	0,276
Clorotrifluorometano	28,0	38,7	0,579
Isopropanolo	235,3	47,0	0,273
Ammoniaca	132,4	112,5	0,235
Acqua	374,2	214,8	0,320

la rende facilmente separabile dal soluto, una volta terminato il processo estrattivo; inoltre è reperibile a elevata purezza e basso costo. Lo svantaggio principale della CO₂ è rappresentato dalla sua natura non polare (ha una polarità simile a quella dell'etano); per tale motivo, in alcuni casi deve essere addizionata di piccole percentuali di modificanti polari, quali metanolo e acetonitrile, per aumentarne il potere solubilizzante nei confronti di analiti più polari. In Tabella 2.1 sono riportati i valori critici di alcuni composti.

2.4 Strumentazione

Lo schema riportato nella Fig. 2.4 illustra gli elementi fondamentali di un estrattore per SFE. Il cuore del sistema è rappresentato da una pompa ad alta pressione (si possono utilizzare pompe a siringa, a pistone, termiche o per cromatografia in fase supercritica), in grado di raggiungere pressioni operative di circa 680 atm. Il fluido viene pompato a flusso costante attraverso la cella. Per le applicazioni analitiche l'estrazione è condotta in celle d'acciaio di dimensioni simili a quelle utilizzate per la tecnica PLE (vedi cap. 3), munite di filtri d'acciaio (*fritts*) rimovibili e guarnizioni a tenuta a entrambe le estremità. Alcuni sistemi dispongono di una seconda pompa opzionale per aggiungere un eventuale modificante polare.

La camera termostata contenente la cella di estrazione può essere dotata di valvole multi-va per gestire più celle contemporaneamente. La successiva unità di depressurizzazione è costituita da un capillare di restrizione (in silice fusa, acciaio o materiale polimerico) con diametro interno fisso o regolabile (attraverso una valvola a spillo). Il restrittore ha la funzione di mantenere la pressione all'interno della cella al di sopra della P_c e controllare la velocità di flusso del fluido supercritico attraverso il campione. Il capillare può essere termostato per evitare ostruzioni al suo interno, causate da depositi di soluto o di ghiaccio (nel caso di campioni molto umidi).

Una valvola posta tra cella e capillare permette di effettuare estrazioni sia in modalità statica, mantenendo cioè il campione a contatto per un certo tempo con il fluido senza scaricare quest'ultimo attraverso il restrittore, sia in modalità dinamica, facendo fluire in continuo il fluido supercritico attraverso il campione e il sistema di depressurizzazione.

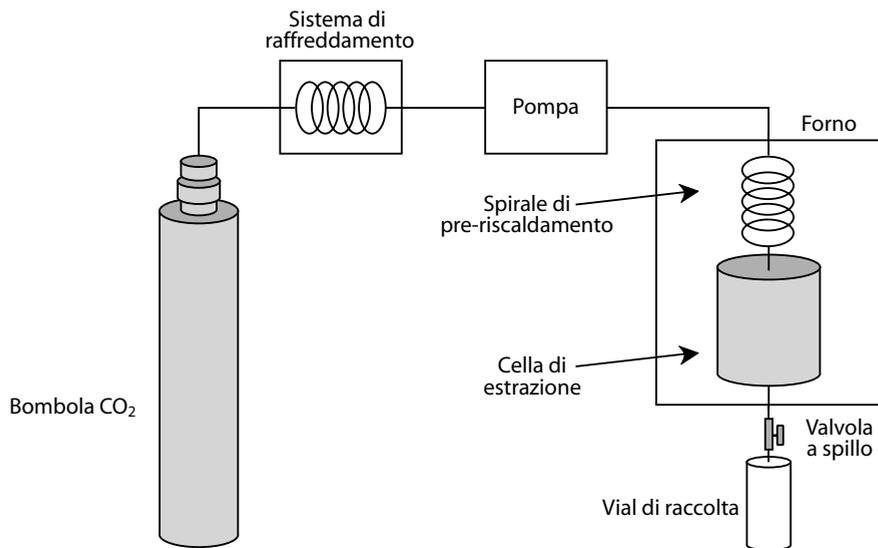


Fig. 2.4 Schema di un estrattore per SFE

2.5 Modalità operativa

I campioni vengono pesati nella cella di estrazione, la camera di estrazione viene riscaldata e pressurizzata ai valori desiderati e il fluido supercritico viene pompato attraverso la cella di estrazione per estrarre l'analita di interesse dalla matrice. L'estratto fluisce attraverso un restrittore, all'uscita del quale la pressione viene ridotta a quella ambiente. Il fluido supercritico si espande rapidamente in fase gassosa (se il fluido supercritico è un gas a pressione e temperatura ambiente) e gli analiti vengono raccolti nell'apposito dispositivo.

L'estrazione è generalmente realizzata in due fasi: una statica e una dinamica. Nella fase statica fluido supercritico e campione rimangono in contatto statico per un certo tempo, mentre durante la fase dinamica il fluido supercritico fluisce attraverso il campione. La fase di estrazione statica serve per ottimizzare il contatto tra fluido e campione, migliorando così l'efficienza della successiva estrazione dinamica.

2.6 Pre-trattamento della matrice

La matrice ideale per la SFE è rappresentata da una polvere solida di elevata area superficiale e buona permeabilità (per esempio tessuti vegetali essiccati e macinati). Quanto più piccole sono le particelle, tanto maggiore è l'area superficiale esposta dal campione al fluido supercritico e tanto minore il percorso che l'analita deve compiere per diffondere in superficie. Tuttavia, particelle troppo fini possono favorire il ri-adsorbimento degli analiti sulla superficie delle particelle (ciò potrebbe essere evitato aumentando la velocità di flusso del fluido) e dare problemi di non omogenea estrazione a causa della formazione di "percorsi preferenziali" nel letto impaccato (Pourmortazavi, Hajimirsadeghi, 2007). La Fig. 2.5 illustra l'effetto del diverso diametro delle particelle sulla resa di estrazione di olio da semi di sesamo (Döker et al, 2010).

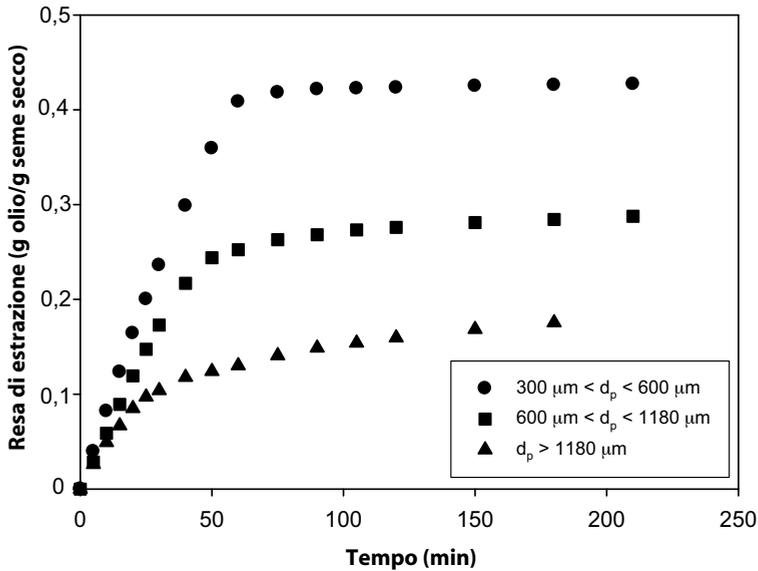


Fig. 2.5 Effetto della granulometria del campione sulla resa dell'estrazione di olio da semi di sesamo. d_p , diametro delle particelle. (Da Döker et al, 2010. Riproduzione autorizzata)

Quando si carica la cella di estrazione è bene riempire con una sostanza inerte tutto lo spazio rimasto libero, in modo da evitare volumi morti che influiscono negativamente sull'efficienza di estrazione. È consigliato l'uso di un agente disperdente che, oltre a minimizzare i volumi morti, può migliorare l'estrazione aumentando l'area del campione esposta al fluido supercritico.

Le matrici liquide non sono generalmente adatte alla SFE, a meno che non possano essere adsorbite su un solido poroso.

I campioni con contenuto elevato di acqua devono essere liofilizzati o essiccati prima dell'estrazione. Se il contenuto di acqua è modesto, può essere sufficiente mescolare il campione con un agente disidratante/disperdente (allumina basica, solfato di magnesio, Hydromatrix).

La presenza di acqua nella matrice può avere due effetti diversi: in piccole percentuali può agire come modificante polare migliorando l'estrazione di composti polari (per esempio, per l'estrazione di pesticidi da campioni di terreno è vantaggioso aggiungere piccole percentuali di acqua nella CO_2 o nel campione), ma a concentrazioni superiori a determinati livelli può impedire il contatto dell'analita con il fluido supercritico, influenzando negativamente il processo di estrazione. L'effetto dell'acqua dipende anche dalla natura dell'analita: se nella cella rimane una quantità eccessiva di acqua, gli analiti idrofilici vi restano disciolti e danno basse rese di estrazione nel fluido supercritico; gli analiti semipolari si disciolgono nell'acqua, ma vengono rapidamente estratti nel fluido supercritico; infine, gli analiti idrofobici precipitano sulla superficie della matrice e l'acqua presente agisce da barriera al loro trasferimento nel fluido supercritico, anche quando sono altamente solubili in esso (Pourmortazavi, Hajimirsadeghi, 2007). Nel caso di raccolta del campione su fase solida (vedi par. 2.7.4.2), la ricondensazione dell'acqua a livello della trappola può determinare perdite di analiti: in presenza di acqua, gli analiti trattenuti dalla trappola possono essere trascinati fuori da essa determinando bassi recuperi. Un altro

problema che può manifestarsi quando si estraggono campioni umidi è legato al fatto che la piccola quantità di acqua che si solubilizza nella CO₂ può causare, in seguito al raffreddamento determinato dal processo di evaporazione, la formazione di ghiaccio nel restrittore, ostruendolo.

2.7 Ottimizzazione del processo di estrazione

Per la messa a punto di un metodo SFE occorre eseguire prove pratiche in diverse condizioni, poiché le variabili in gioco nel processo estrattivo possono essere numerose.

Pressione, temperatura, composizione del fluido, tempo di estrazione, tecnica di raccolta dell'estratto, preparazione della cella e velocità di flusso del fluido rappresentano i principali parametri da ottimizzare. Le pressioni applicate sono generalmente comprese nell'intervallo 200-400 atm, le temperature vanno da 40 a 150 °C, mentre la velocità di flusso varia da 1 a 3 mL/min. Il fluido più utilizzato è la CO₂ supercritica ($T_c = 31$ °C, $P_c = 72,9$ atm). Il metanolo è il modificante più utilizzato. In qualche caso, si può inserire nella cella assieme al campione un materiale adsorbente in grado di ritenere gli interferenti (per esempio grassi, quando si estraggono analiti da matrici lipidiche) (Hartonen, 2010).

2.7.1 Pressione e temperatura

La pressione e la temperatura costituiscono i parametri più importanti nell'ottimizzazione del processo di estrazione. Il fattore di forza dei fluidi supercritici è rappresentato dalla possibilità di modularne la densità (e quindi la capacità estraente e la selettività) mediante modeste variazioni di temperatura e pressione nell'intorno del punto critico.

Il comportamento di un soluto (analita) in un fluido supercritico al variare della pressione può essere descritto da tre parametri: (i) *pressione di miscibilità*, che corrisponde alla pressione alla quale il soluto inizia a ripartirsi nel fluido supercritico; (ii) *pressione di massima solubilità*; (iii) *pressione di frazionamento*, cioè l'intervallo di pressione tra i due punti precedenti nel quale è possibile estrarre selettivamente il soluto scegliendo opportunamente la pressione. Anche le proprietà fisiche del soluto, in particolare il suo punto di fusione, sono importanti: la maggior parte degli analiti si discioglie meglio quando si trova allo stato liquido (Pourmortazavi, Hajimirsadeghi, 2007).

In Fig. 2.6 è riportata la curva solubilità-pressione per il naftalene (con CO₂ a 45 °C): a 75 atm (pressione di miscibilità) l'analita è poco solubile nel fluido supercritico; all'aumentare della pressione la sua solubilità aumenta rapidamente (specialmente attorno ai 90 atm), fino a raggiungere il valore massimo in corrispondenza della pressione di massima solubilità. Da ciò si deduce che tra i parametri che influenzano l'efficienza dell'estrazione la pressione è il più importante (Pourmortazavi, Hajimirsadeghi, 2007; Andersen et al, 1989).

Un aumento della pressione (a temperatura costante) influenza positivamente la solubilità dell'analita, e quindi l'efficienza dell'estrazione, in quanto aumenta la densità del fluido, cioè la forza del solvente. Di conseguenza, quanto più alta è la pressione, tanto minore sarà il volume di fluido necessario per ottenere una data resa di estrazione. Tuttavia, quando si trattano matrici complesse non conviene aumentare la pressione, e quindi la densità, oltre il necessario, in quanto densità troppo elevate portano generalmente a selettività più basse (co-estrazione di altri componenti presenti nella matrice). È stato dimostrato, per esempio, che pressioni troppo elevate determinano una perdita di selettività nell'estrazione di tocoferoli e carotenoidi dall'olio di palma, dovuta a un incremento della solubilità dei trigliceridi. In teoria, la solubilità dell'analita è massima quando la densità del fluido supercritico uguaglia quella dell'analita.

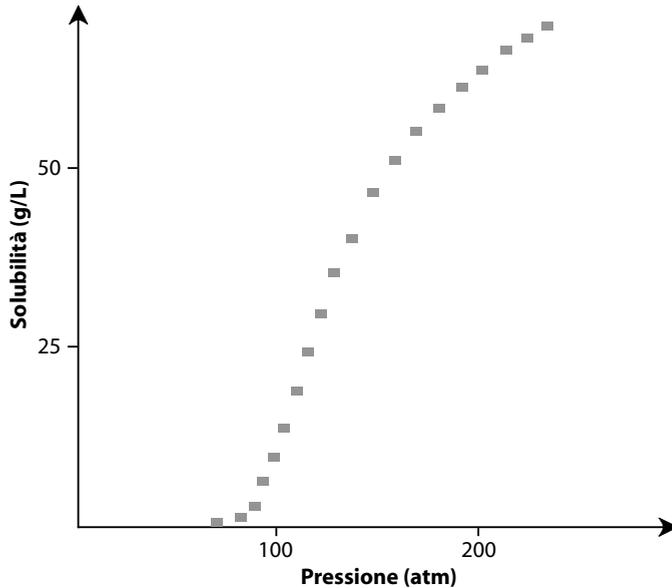


Fig. 2.6 Andamento della solubilità del naftalene al variare della pressione (con CO₂ a 45 °C)

A pressione costante, la densità della CO₂ diminuisce all'aumentare della temperatura; tale effetto diventa più evidente all'aumentare della compressibilità del fluido. Prevedere l'effetto della temperatura sull'estrazione dell'analita non è tuttavia così semplice. La solubilità dell'analita nel fluido è influenzata, oltre che dalla densità di quest'ultimo, anche dalla natura del campione e dalla volatilità dell'analita. Nel caso di un analita non volatile l'aumento di temperatura determina una riduzione della resa di estrazione dovuta alla diminuzione della densità del fluido; nel caso di un analita volatile, invece, l'aumento di temperatura determina due effetti contrapposti: (i) la diminuzione della densità, che comporta una diminuzione della solubilità dell'analita, e (ii) l'aumento della tensione di vapore dell'analita, che ne facilita il passaggio nel fluido supercritico (Pourmortazavi, Hajimirsadeghi, 2007). In pratica, l'effetto della temperatura sulla forza solvente del fluido (a pressione costante) dipende dalla pressione. Se la pressione è inferiore al cosiddetto *crossover point*, un aumento della temperatura riduce l'efficienza di estrazione, in quanto diminuisce la densità del fluido (e quindi la sua forza solvente). Se la pressione è superiore al *crossover point*, un aumento della temperatura può migliorare l'efficienza di estrazione nonostante la diminuzione della densità del fluido, in quanto aumenta la tensione di vapore dell'analita. I valori di *crossover point* dipendono dalle interazioni analita-fluido supercritico (in letteratura sono riportati i valori per diversi soluti) (Turner et al, 2001).

2.7.2 Aggiunta di modificanti, co-additivi e modificanti reattivi

Oltre alle interazioni analita-fluido supercritico, occorre tener conto anche delle interazioni analita-matrice. Essendo apolare, la CO₂ non riesce a estrarre adeguatamente analiti in grado di dare interazioni polari con la matrice; per la SFE ciò rappresenta un limite che può essere superato utilizzando modificanti polari.

Nel caso di matrici solide, le interazioni analita-matrice possono essere dovute a forze dipolo-dipolo o a legami idrogeno; in questo caso l'estrazione può essere efficace solo se vengono aggiunti modificanti (per esempio metanolo) che aumentano la polarità in fase di estrazione. I modificanti possono essere aggiunti direttamente nella cella di estrazione, essere già presenti in quantità prestabilita nella bombola contenente il fluido estraente oppure venire progressivamente dosati mediante apposite pompe. È importante osservare che i valori critici del fluido così modificato sono diversi da quelli del fluido puro. Nel caso del sistema $\text{CO}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, la temperatura critica aumenta di diversi gradi, a seconda della percentuale di metanolo aggiunto. Alcuni studi hanno messo in evidenza anche l'effetto modificante dell'elio utilizzato per la pressurizzazione delle bombole di CO_2 : l'elio si ripartisce tra la CO_2 e lo spazio di testa interno, abbassando la densità del fluido e di conseguenza il suo potere solvente. È quindi consigliabile utilizzare sempre bombole di CO_2 non pressurizzata con elio.

Tra i modificanti più utilizzati vi sono il metanolo e l'acetone, puri o miscelati con acqua. Un punto di partenza ragionevole per la scelta del modificante è orientarsi verso un composto che allo stato liquido mostri di essere un buon solvente per l'analita di interesse. Anche l'acqua può modificare la polarità della CO_2 . In presenza di acqua è buona norma operare a temperature vicine alla sua temperatura di ebollizione, in modo da aumentare la sua solubilità (e di conseguenza quella di eventuali analiti polari) nella CO_2 .

L'effetto dei modificanti può anche essere correlato a un rigonfiamento della matrice (come se fossero dei veri e propri agenti imbibenti), che favorisce il successivo distacco dell'analita grazie alla maggiore penetrazione del solvente. A tale proposito, usando come modificanti combinazioni acqua/metanolo, si ottiene un effetto sinergico: mentre l'acqua contribuisce a rigonfiare la matrice, il metanolo solubilizza le molecole di analita.

Un'altra strategia è rappresentata dall'impiego di co-additivi. Secondo questo approccio, per diminuire le interazioni analita-matrice si aggiungono sostanze in grado di competere fortemente con l'analita nel processo di interazione con la matrice. Per esempio, per migliorare l'estrazione delle ammine aromatiche primarie dal suolo (interazione di sostanze polari con gruppi silanologici del suolo), si può aggiungere un'ammina con pKa maggiore rispetto a quello degli analiti (come 1,6-esandiammina), che competendo con gli analiti di interesse per l'interazione con la matrice (suolo) favorisce di fatto l'estrazione.

Un ulteriore approccio consiste nell'utilizzo dei cosiddetti modificanti reattivi. In questo caso il modificante reattivo interagisce con la matrice o l'analita, generando in uno dei due compartimenti delle modificazioni chimiche. L'analita può per esempio reagire con il modificante in modo da venire convertito in una specie maggiormente solubile in CO_2 . In altri casi il modificante reagisce solo con la matrice, inducendo il desorbimento degli analiti. Mediante l'uso di chelanti particolari è possibile estrarre anche alcuni metalli.

Gli svantaggi associati all'impiego di un modificante sono: (i) diminuzione della selettività, con conseguente aumento di soluti co-estratti che possono complicare la successiva analisi, e (ii) possibile condensazione del modificante quando si utilizza come trappola un adsorbente solido (si può ovviare a tale problema riscaldando la trappola).

2.7.3 Flusso e tempo di estrazione

La velocità lineare del fluido dipende dalla geometria della cella e dal diametro del restrittore posto all'uscita della cella. La velocità di flusso, che può essere agevolmente modificata agendo sul diametro del restrittore, influenza fortemente l'efficienza di estrazione: più bassa è la velocità di flusso, più il fluido penetra in profondità nella matrice, migliorando in alcuni casi l'efficienza di estrazione. Velocità di flusso troppo elevate provocano inoltre una

notevole caduta di pressione all'uscita della cella (durante la decompressione del fluido), con possibili perdite di analita. D'altra parte, in alcuni casi (per esempio nell'estrazione di olio da semi) si osserva un aumento della resa di estrazione all'aumentare della velocità di flusso (Pourmortazavi, Hajimirsadeghi, 2007). Per una migliore comprensione di questi effetti, il processo di estrazione può essere suddiviso in quattro fasi:

1. penetrazione del fluido supercritico nella matrice del campione;
2. rilascio reversibile dell'analita (desorbimento);
3. diffusione dell'analita verso la superficie della particella di matrice;
4. solubilizzazione dell'analita nel fluido supercritico.

La velocità di estrazione dipende in sostanza, da un lato, dal processo di desorbimento/diffusione e, dall'altro, da quello di solubilizzazione dell'analita nel fluido. Per ottimizzare la procedura di estrazione, è quindi necessario studiare l'effetto della velocità del fluido su una particolare matrice, per determinare se l'estrazione è controllata dal desorbimento/diffusione o dalla solubilizzazione dell'analita nel fluido. In genere, quando le interazioni analita-matrice sono molto forti la velocità di estrazione è controllata dal desorbimento. In questo caso l'efficienza di estrazione non migliora significativamente aumentando la velocità di flusso del fluido di estrazione, ma può essere migliorata inserendo o allungando la fase di estrazione statica (in questo modo si riduce anche il consumo di solvente). È inoltre buona norma operare ad alta temperatura, utilizzando modificanti in grado di rompere le interazioni analita-matrice in modo da favorire un rapido trasferimento di massa. Quando le interazioni analita-matrice sono deboli, l'estrazione è invece controllata dalla solubilizzazione dell'analita nel fluido supercritico. In questo caso la velocità di estrazione dipende principalmente dalla ripartizione degli analiti tra matrice e fluido supercritico e aumenta al crescere della velocità di flusso.

2.7.4 Modalità di raccolta del campione

Il metodo di raccolta del campione può condizionare fortemente le rese di estrazione e va quindi ottimizzato. I due metodi più utilizzati (Fig. 2.7) prevedono la raccolta del campione

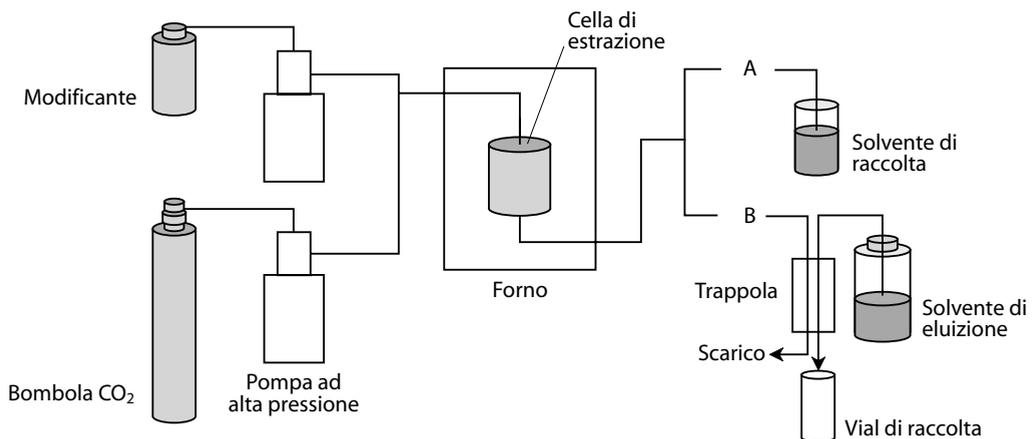


Fig. 2.7 Schema di un estrattore supercritico e modalità di raccolta

in fase liquida (solitamente si immerge l'uscita del restrittore in una provetta contenente del solvente) o in fase solida, ossia su una trappola riempita con materiale inerte (raffreddata criogenicamente) o con materiale adsorbente (Turner et al, 2001).

2.7.4.1 Raccolta in fase liquida

Questo metodo è il più comunemente utilizzato e si realizza immergendo l'uscita del restrittore in una piccola quantità di solvente organico (metanolo, esano o acetone) contenuto in una provetta (Turner et al, 2002). Talvolta, prima di venire a contatto con il solvente, l'effluente CO₂-analita viene depressurizzato in un tubo di trasferimento in vetro (Fig. 2.8) (Pourmortazavi, Hajimirsadeghi, 2007).

In questo caso i parametri che possono influenzare il recupero sono: tipo e volume di solvente, temperatura del solvente, velocità di flusso nel restrittore, temperatura del restrittore e pressurizzazione del recipiente di raccolta (Turner et al, 2002). In Fig. 2.9 sono schematizzate le differenti fasi della raccolta dell'analita impiegando un restrittore lineare immerso nel recipiente contenente il solvente:

1. uscita dal restrittore;
2. diffusione attraverso la fase gassosa (nelle bollicine di gas) all'interfaccia gas-liquido;
3. solvatazione nel solvente;
4. mantenimento della stabilità (stato di solvatazione) nel solvente.

Ovviamente la solubilizzazione dell'analita nel solvente contenuto nella provetta di raccolta deve avvenire prima che le bollicine di CO₂ raggiungano la superficie del solvente, altrimenti parte dell'analita potrebbe essere trascinato e disperso in fase gassosa assieme alla CO₂.

La prima fase implica che l'analita non venga adsorbito sulle pareti del restrittore. Idealmente l'intera caduta di pressione si verifica all'uscita del restrittore, e fino a quel punto gli analiti sono completamente solubili. Un riscaldamento uniforme del restrittore minimizza i problemi di intasamento da parte dei componenti estratti o dovuti alla formazione di ghiaccio. Il riscaldamento del restrittore può d'altra parte determinare perdite degli analiti più volatili e degradazione di componenti termolabili.

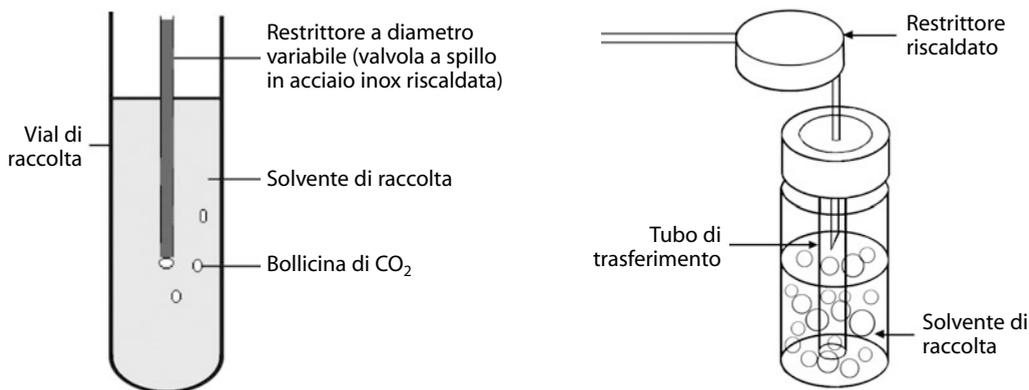


Fig. 2.8 Due diversi sistemi di raccolta in solvente. (Da Pourmortazavi, Hajimirsadeghi, 2007. Riproduzione autorizzata)

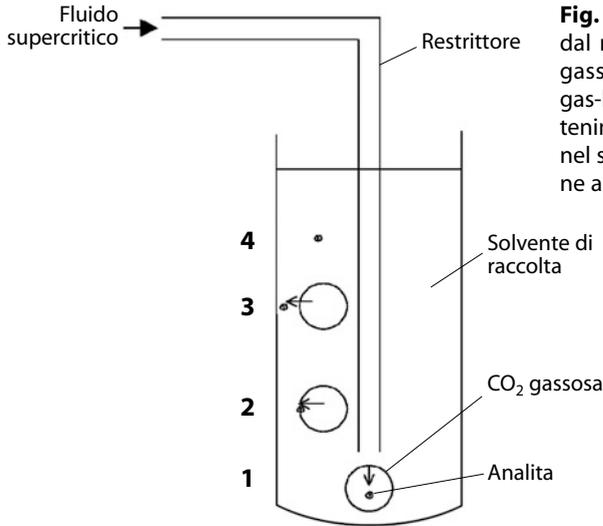


Fig. 2.9 Fasi della raccolta in solvente. **1** uscita dal restringitore; **2** diffusione attraverso la fase gassosa (nelle bollicine di gas) all'interfaccia gas-liquido; **3** solvatazione nel solvente; **4** mantenimento della stabilità (stato di solvatazione) nel solvente. (Da Turner et al, 2002. Riproduzione autorizzata)

La seconda fase è controllata dal coefficiente di diffusione degli analiti in fase gassosa. Bollicine di CO₂ di piccole dimensioni riducono la distanza che l'analita deve percorrere per raggiungere l'interfaccia gas-liquido. Per ottenere bollicine di gas di dimensioni più piccole, è sufficiente agire sul diametro del restringitore per modificare opportunamente la velocità di flusso, o utilizzare un solvente di viscosità più elevata. Aumentando la viscosità del solvente, aumenta anche il tempo necessario affinché le bollicine raggiungano l'interfaccia liquido-gas. Lo stesso effetto può essere ottenuto utilizzando una colonna di solvente più alta nel recipiente di raccolta. In questo modo, per esempio, è stato possibile aumentare i recuperi di sedici idrocarburi policiclici aromatici (IPA) dal 48 al 75% semplicemente utilizzando 10 mL di solvente anziché 4 mL (Bøwadt et al, 1993).

Per quanto riguarda la terza fase, la solvatazione dell'analita dipende principalmente dalla forza del solvente, che dovrebbe sciogliere bene sia l'analita sia il materiale co-estratto, in modo da evitare perdite in forma di aerosol. Un leggero aumento della temperatura del solvente può favorire la solubilità degli analiti, ma generalmente si preferisce utilizzare temperature più basse per diminuire la pressione di vapore dell'analita (soprattutto nel caso di analiti volatili). Una leggera pressurizzazione del recipiente di raccolta migliora il recupero dei componenti volatili e minimizza l'evaporazione del solvente e la formazione di aerosol. Un'altra soluzione, a questo proposito, è utilizzare un condensatore posto sopra il recipiente di raccolta. Per evitare la formazione di ghiaccio nel restringitore, è sufficiente immergere la provetta di raccolta in acqua tiepida (Turner et al, 2002).

2.7.4.2 Raccolta in fase solida

Il fluido di estrazione decompresso attraversa una trappola contenente materiale adsorbente (octadecilsilano, diolo, silice, Florisil) o inerte (letto in acciaio, biglie di vetro). Una volta completata l'estrazione, gli analiti vengono eluiti con un opportuno solvente. In Fig. 2.10 è riportato lo schema di una trappola in fase solida.

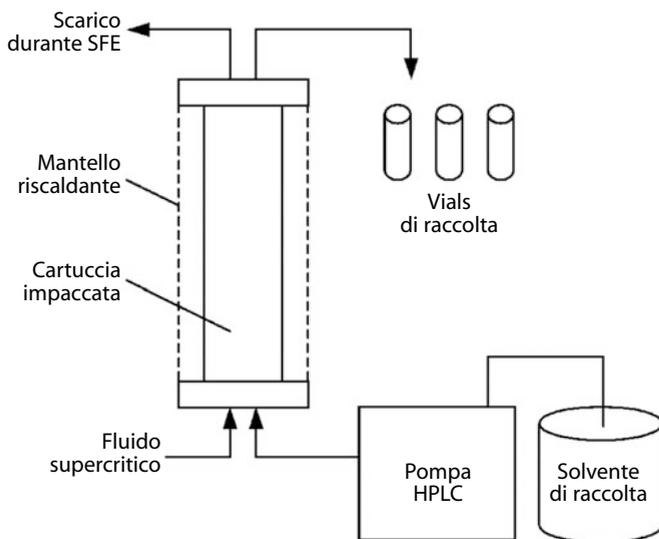


Fig. 2.10 Schema di una trappola in fase solida. (Da Turner et al, 2002. Riproduzione autorizzata)

Per valutare l'efficienza di una trappola in fase solida durante lo sviluppo di un metodo, è sufficiente estrarre una quantità nota di analita da un materiale inerte posto nella cella di estrazione, oppure applicare l'analita direttamente all'entrata della trappola ed effettuare un'estrazione con successiva eluizione. La trappola può inoltre essere connessa a un sistema di cromatografia liquida (LC) per studiare il profilo di eluizione.

Di notevole importanza è la scelta del materiale di adsorbimento e del solvente di eluizione. In alcuni casi è vantaggioso utilizzare combinazioni di differenti materiali adsorbenti, poiché scegliendo opportunamente il solvente di eluizione si può introdurre selettività nella fase di raccolta. Per esempio, riempiendo la cella di allumina è possibile trattenere i trigliceridi che altrimenti co-eluirebbero con gli analiti di interesse.

La capacità del materiale di impaccamento (intesa come quantità massima di analita che può trattenere) può rappresentare un problema, poiché il suo superamento può causare perdita di analiti. Anche se gli analiti non eccedono il limite di capacità dell'adsorbente, può esservi un sovraccarico dovuto al materiale co-estratto (per esempio, grassi). Il materiale co-estratto può inoltre deattivare l'adsorbente. Una tecnica per ovviare ai problemi di capacità è realizzare una procedura frazionata di estrazione/eluizione, che consiste nel lavare la trappola a determinati intervalli di tempo durante l'estrazione. È anche importante scegliere opportunamente il solvente per eluire gli analiti dalla trappola, poiché esso deve garantire recuperi possibilmente quantitativi con volumi limitati di eluente. La scelta del solvente deve inoltre tener conto della compatibilità con la successiva determinazione analitica.

Uno svantaggio associato all'uso di trappole adsorbenti è rappresentato dal fatto che, quando si utilizzano campioni contenenti acqua o fluidi di estrazione con elevate concentrazioni di modificante, la condensazione dell'acqua o del modificante nella trappola può determinare perdita di analiti. La soluzione consiste nel mantenere la temperatura della trappola al di sopra del punto di ebollizione del modificante (tenendo però conto dei problemi relativi a perdite di analiti volatili e termodegradazione). Quando possibile si utilizzano modificanti con elevata pressione di vapore, in modo da poter mantenere la trappola a temperature relativa-

mente basse anche con concentrazioni di modificante relativamente alte. Rispetto alla raccolta in fase liquida, le tecniche di adsorbimento su trappola consentono recuperi migliori dei componenti con elevata pressione di vapore (la temperatura della trappola può essere facilmente abbassata anche a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$); inoltre si ottengono estratti più puliti (Turner et al, 2002).

2.7.4.3 Altri sistemi di raccolta

In alcuni casi può essere vantaggioso intrappolare gli analiti in una provetta vuota, eliminando così il passaggio di concentrazione del solvente. Per aumentare la superficie di raccolta, la provetta può essere riempita con materiale inerte (lana di vetro). Lo svantaggio di tale tecnica è che può portare a bassi recuperi, se confrontata con la raccolta in fase liquida. La temperatura di estrazione condiziona la temperatura di raccolta, a meno che la provetta non venga raffreddata. Tempi di raccolta troppo lunghi possono determinare perdita degli analiti più volatili. In presenza di analiti sensibili alla degradazione ossidativa, può essere vantaggioso effettuare la raccolta in un solvente contenente un protettivo antiossidante.

La Fig. 2.11 mostra un sistema combinato di raccolta in fase solida-solvente, nel quale le perdite di analiti dalla fase solida dovute a superamento della capacità vengono neutralizzate dalla presenza del solvente (Hüsers, Kleiböhmer, 1995). Questo sistema è particolarmente utile per valutare l'efficienza di intrappolamento di diversi materiali adsorbenti in fase di messa a punto di un metodo (Turner et al, 2002).

La scelta del metodo ottimale per la raccolta degli analiti dipende dalle proprietà del campione e dell'analita, nonché dai parametri di estrazione e dalla tecnica analitica finale.

La raccolta in fase liquida rappresenta il sistema più semplice e facile da ottimizzare, ma non è indicata nel caso di flussi elevati (a causa della dispersione del solvente per formazione di aerosol) e di analiti volatili.

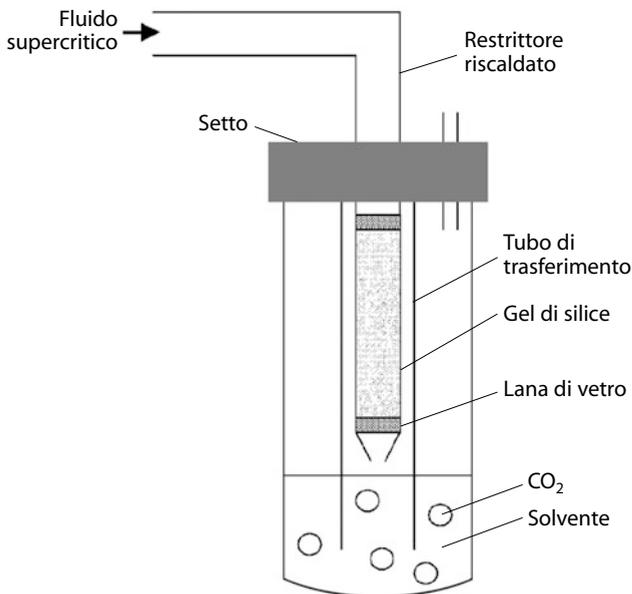


Fig. 2.11 Sistema combinato di raccolta in fase solida-solvente. (Da Hüsers, Kleiböhmer, 1995. Riproduzione autorizzata)

Se gli analiti sono volatili, si tende a preferire l'intrappolamento in fase solida, che permette anche di migliorare la selettività del sistema e ottenere estratti più concentrati e puliti. L'adsorbimento in fase solida consente di lavorare bene anche a flussi elevati, ma se la capacità e il potere di ritenzione della fase solida o la forza dell'eluente non sono adeguati i recuperi vengono compromessi.

Rispetto alla raccolta in fase solida, la raccolta in fase liquida è meno soggetta a perdite dovute a sovraccarico del campione quando questo contiene grandi quantità di grassi, acqua o percentuali elevate di modificante. In generale, se il campione contiene grandi quantità di grassi si tende a preferire la raccolta in fase liquida o in provetta vuota.

2.8 Sistemi on-line

La SFE può essere accoppiata on-line alla gascromatografia (GC), alla cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e alla cromatografia con fluidi supercritici (SFC). Quest'ultimo accoppiamento risulta il più compatibile e necessita quindi di interfacce più semplici.

L'interfaccia a un sistema cromatografico deve soddisfare due requisiti principali: trattenere quantitativamente gli analiti e trasferirli quantitativamente in banda stretta al sistema cromatografico. Ciò può essere ottenuto intrappolando gli analiti su una superficie adsorbente o inerte, raffreddata criogenicamente, e successivamente desorbendo (termicamente o con solvente) gli analiti dalla trappola per trasferirli alla colonna cromatografica. L'interfaccia può essere un piccolo pezzo di capillare in silice fusa (rivestito o meno di fase stazionaria) o una piccola colonna riempita con materiale inerte o adsorbente. In alternativa, la focalizzazione dell'analita può essere realizzata direttamente in testa alla colonna analitica (in SFC o HPLC) o nell'iniettore GC. Nell'accoppiamento con una colonna capillare per SFC, l'interfaccia più comune per intrappolare gli analiti durante l'estrazione è rappresentata da un capillare non rivestito in silice fusa (circa 10 cm × 0,2 mm) raffreddato criogenicamente, direttamente connesso all'uscita del restrittore (Xie et al, 1989). In Fig. 2.12 è mostrato uno schema dell'interfaccia SFE-SFC.

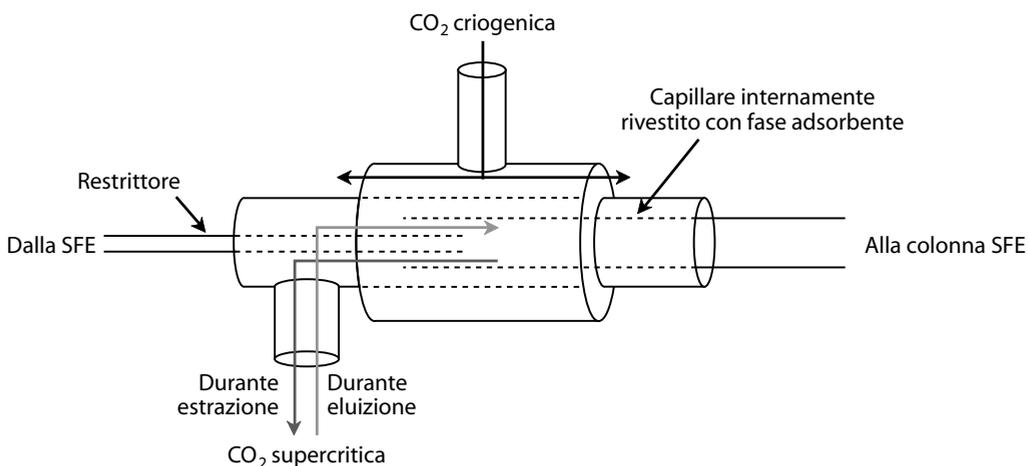


Fig. 2.12 Schema di un'interfaccia SFE-SFC

Per ottenere recuperi quantitativi degli analiti più volatili, occorre raffreddare il capillare a temperature comprese tra -40 e -50 °C. Un'alternativa al capillare non rivestito è rappresentata da un capillare rivestito con fase stazionaria chimicamente legata, che permette di trattenere più efficacemente alcuni analiti. In questo caso l'effetto di auto-raffreddamento determinato dall'espansione della CO_2 supercritica è sufficiente per ottenere recuperi quantitativi di analiti non volatili. Nell'accoppiamento SFE-SFC con colonne impaccate l'intrapolamento degli analiti può essere realizzato in una piccola colonna separata o direttamente in testa alla colonna analitica. Il desorbimento dell'analita viene normalmente raggiunto aumentando la temperatura della trappola (200 °C) o la percentuale di modificante nella fase mobile.

Nell'accoppiamento SFE-GC, per la raccolta dell'analita si utilizzano generalmente trappole riempite con materiale inerte (vetro). È importante raffreddare opportunamente la trappola e ottimizzare le condizioni di ritenzione dell'analita. Velocità di flusso eccessive o percentuali elevate di modificante nel fluido di estrazione possono causare perdite di analita. Un'alternativa per l'accoppiamento SFE-GC è rappresentata dall'impiego di iniettori con *liner* impaccato con fase adsorbente legata.

Rispetto alle tecniche off-line, le tecniche on-line migliorano la sensibilità, poiché viene trasferita alla colonna cromatografica l'intera frazione estratta dal campione. Inoltre, è richiesta una minore manipolazione del campione (che si traduce in coefficienti di variazione più bassi) e si riducono i tempi di analisi. Lo svantaggio maggiore è rappresentato dal rischio di sovraccaricare la trappola nel caso di elevati contenuti di materiale co-estratto (grassi), di acqua o di elevate percentuali di modificante.

2.9 Applicazioni

La SFE viene impiegata in diversi settori delle industrie alimentare (estrazione di aromi, estrazione di sostanze grasse, decaffeinizzazione del caffè ecc.), farmaceutica, tessile e del colore, nell'estrazione di additivi da polimeri e nel trattamento di biopolimeri.

La SFE è particolarmente adatta all'estrazione di sostanze termolabili. La possibilità di modificare la densità del fluido supercritico (e quindi la sua forza solvente e la sua selettività), agendo semplicemente sulle condizioni di pressione e temperatura, permette di utilizzare un solo fluido per diverse applicazioni.

Sulla base di tali premesse, la SFE si è progressivamente imposta a livello industriale come una delle tecnologie elettive per trattare materie prime di interesse alimentare. Tuttavia, gli alti costi di investimento necessari hanno contribuito a limitarne la diffusione al trattamento di sostanze alimentari o biologiche a elevato valore aggiunto, tali da sopportare il maggior costo derivante dall'impiego del nuovo processo.

È importante sottolineare che, dopo l'estrazione, l'alimento trattato non incorpora alcun residuo di solvente: a differenza dei solventi tradizionali, infatti, una volta riportata a temperatura e pressione ambientali la CO_2 evapora senza lasciare tracce. Per tale motivo, la Food and Drug Administration (FDA) ha riconosciuto il processo SFE come sicuro (GRAS, *generally recognized as safe*).

Oltre che a livello industriale, la SFE si è imposta come tecnica di preparazione del campione in molti laboratori.

Nel settore analitico l'impiego della SFE come tecnica di estrazione si è diffuso a partire dalla fine degli anni Ottanta, quando si sono rese disponibili le prime pompe adatte allo scopo (in seguito allo sviluppo della cromatografia con fluidi supercritici).

Numerosi studi comparativi hanno dimostrato che l'affidabilità del metodo SFE è paragonabile a quella dei metodi "classici", mentre sono sicuramente superiori le caratteristiche relative alla manualità e all'organizzazione del lavoro di laboratorio. In particolare, risulta importante la riduzione dei tempi di estrazione, soprattutto se si tiene conto che con i metodi classici ai tempi di estrazione devono essere sommati quelli per l'eliminazione del solvente, presente in quantità più elevate rispetto a quanto avviene impiegando fluidi supercritici (il solvente in questo caso funge solo da trappola finale o viene utilizzato per eluire gli analiti da una trappola adsorbente).

2.9.1 Estrazione del grasso

L'applicazione più importante nel settore dell'analisi chimica degli alimenti riguarda l'estrazione del grasso. La SFE rappresenta un'importante alternativa per l'estrazione e il frazionamento del grasso su scala sia industriale sia analitica. Aggiustando opportunamente le condizioni di temperatura e pressione (in modo da regolare la densità del fluido supercritico), è possibile rendere l'estrazione selettiva nei confronti del grasso o di una determinata frazione lipidica (per esempio acidi grassi). L'estrazione condotta in assenza di modificanti polari permette di ottenere rese quantitative dei lipidi neutri, mentre i lipidi polari (come i fosfolipidi) vengono estratti solo parzialmente a causa della loro scarsa solubilità nella CO₂ supercritica. In questi casi le rese di estrazione possono essere migliorate impiegando diversi modificanti, quali metanolo, etanolo o anche acqua in piccola quantità. Quest'ultima si è dimostrata particolarmente efficace per l'estrazione del grasso da prodotti lattiero-caseari. Va comunque ricordato che un contenuto eccessivo di acqua agisce da barriera, poiché impedisce da un lato l'efficace penetrazione del fluido supercritico nel campione e dall'altro la diffusione del grasso dal campione verso l'esterno. L'efficienza di estrazione dipende anche dalla granulometria del campione: una granulometria fine favorisce il contatto campione-fluido supercritico, facilitando l'estrazione del grasso.

Numerosi lavori hanno dimostrato che la SFE consente di ottenere, in tempi notevolmente ridotti, rese in grasso paragonabili a quelle dei metodi classici di riferimento. Se la quantità di grasso da estrarre è elevata, la raccolta può essere effettuata in provetta vuota. Il metodo ufficiale AOAC per la determinazione dell'olio nei semi oleosi raccomanda la raccolta del campione in provetta vuota riempita con lana di vetro (AOAC International, 2002).

La possibilità di estrarre analiti di interesse da differenti substrati in tempi ridotti può consentire di analizzare un numero di campioni più elevato, aspetto di non secondaria importanza sia per un laboratorio di routine di tipo commerciale, sia per l'ottenimento di banche dati sempre più corpose, utilissime per fissare gli intervalli di oscillazione di determinati parametri analitici. La Tabella 2.2 riporta le rese di estrazione e i coefficienti di variazione ottenuti con metodi SFE e Soxhlet per quattro diversi prodotti alimentari (i dati sono la media di sei repliche)

Tabella 2.2 Confronto tra le rese di estrazione di grasso con metodi SFE e Soxhlet

Prodotto	SFE (n=6)		Soxhlet (n=6)	
	% grasso	CV%	% grasso	CV%
Salsiccia di maiale	29,8	1,6	29,8	1,3
Burro di arachidi	49,3	0,6	49,5	0,4
Formaggio Cheddar	33,9	3,5	33,3	1,1
Snack al mais	31,8	0,8	31,5	0,5

Tabella 2.3 Rese di estrazione di grasso con metodi SFE e idrolisi basica seguita da estrazione con solvente

Prodotto	SFE		Soxhlet	
	% grasso	CV%	% grasso	% grasso in etichetta
Latte liquido	3,51		3,50	
Latte concentrato 1	4,99	1,8	5,20	5,21
Latte concentrato 2	6,66		6,65	
Latte concentrato 3	6,65	1,8	6,40	6,73
Latte concentrato 4	6,49	1,8	6,80	6,73
Latte in polvere	26,71		26,47	
Latte di soia (polvere)	6,80	1,7	6,70	6,73

(Hopper et al, 1995). La Tabella 2.3 riporta un confronto tra le rese percentuali in grasso ottenute da formule per lattanti; in questo caso il metodo di riferimento prevedeva un'idrolisi basica seguita da estrazione con solvente (Ashraf-Khorassani et al, 2002).

2.9.2 Estrazione di componenti bioattivi

In letteratura sono riportate numerose applicazioni relative all'estrazione da diversi vegetali di sostanze ad azione antiossidante, quali carotenoidi, pigmenti, tocoferoli e polifenoli (Turner et al, 2002; Mendiola et al, 2007). Si tratta di componenti sensibili alle alte temperature di estrazione e all'ossigeno, che con la SFE vengono estratti vantaggiosamente e in condizioni blande. Alcuni metodi, ottimizzati per l'estrazione di caroteni e luteina da carote o di licopene da pomodori, prevedono l'impiego di oli vegetali come co-solventi per aumentare le rese di estrazione (Sun et al, 2006; Vasapollo et al, 2004). In questo modo si ottengono, per α - e β -carotene, rese di estrazione comparabili con quelle ottenibili mediante estrazione con solvente e si evita la perdita di carotenoidi ossigenati (luteina). Se la presenza di grasso nell'estratto è indesiderata, si può ricorrere all'impiego di etanolo (15%) come modificante (López et al, 2004). La polarità e la temperatura della trappola vanno in questo caso attentamente ottimizzate per evitare la condensazione del modificante nella trappola, con conseguente perdita di analita. Le prestazioni migliori sono state ottenute impiegando una trappola C18 termostata a 80 °C ed eluendo successivamente gli analiti con acetone a 30 °C.

La SFE risulta particolarmente adatta alla determinazione delle vitamine liposolubili (Turner et al, 2002), analiti soggetti a processi di ossidazione e degradazione accelerati da luce, calore e presenza di ossigeno. I metodi convenzionali per la determinazione delle vitamine liposolubili prevedono una saponificazione (che può causare parziale isomerizzazione della vitamina D e totale degradazione della vitamina K), l'impiego di solventi organici (che devono essere degasati per evitare problemi di ossidazione) e il riscaldamento del campione. La SFE rappresenta una valida alternativa all'impiego dei solventi organici e permette di ridurre il riscaldamento del campione (e quindi la degradazione termica degli analiti). Per ovviare almeno in parte ai problemi di degradazione ossidativa, si può aggiungere un antiossidante al solvente di lavaggio o di raccolta. Per esempio, per estrarre i carotenoidi da un campione di carota liofilizzato si è utilizzata una miscela esano-acetone (9/1) contenente lo 0,005% di butilidrossitoluene (Barth et al, 1995). In funzione del contenuto di grasso del campione, si possono utilizzare diverse tecniche di raccolta dell'analita.

Per l'estrazione di polifenoli da matrici vegetali, trattandosi di componenti piuttosto polari, occorre aggiungere modificanti polari alla CO₂. Diversi studi riportano le condizioni ottimizzate per l'estrazione di polifenoli da uva e residui della vinificazione (Chafer et al, 2005; Palenzuela et al, 2002) o da altri frutti, come il melograno (Cavalcanti et al, 2012). Palenzuela et al (2002) hanno sviluppato un metodo on-line accoppiato direttamente a un rivelatore amperometrico (utilizzando una trappola liquida come interfaccia). Le condizioni di estrazione e rivelazione sono state ottimizzate prendendo come composto di riferimento l'epicatechina. L'estrazione è stata condotta a 50 °C impiegando come modificante acqua (10%), mentre la raccolta del campione è stata effettuata in un tampone salino compatibile con la rivelazione amperometrica.

2.9.3 Estrazione di oli essenziali e sostanze volatili

Altri settori analitici dove la SFE trova largo impiego sono l'estrazione di oli essenziali da diversi vegetali per la successiva caratterizzazione chimica e l'estrazione di componenti della frazione volatile da diverse matrici alimentari (Pourmortazavi, Hajimirsadeghi, 2007; Xu et al, 2011; Turner et al, 2002). Rispetto al metodo classico di estrazione (idrodistribuzione), la SFE permette di estrarre un maggior numero di sostanze volatili (anche se possono esservi perdite di componenti volatili in fase di depressurizzazione) in tempi ridotti e preservando l'integrità del prodotto.

Nell'estrazione di sostanze volatili dagli alimenti, la raccolta degli analiti avviene solitamente in trappole impaccate di materiale adsorbente raffreddate criogenicamente (Turner et al, 2002). Per esempio, per l'analisi della frazione aromatica di un olio d'oliva è stata utilizzata una trappola in Tenax (dopo l'estrazione la trappola veniva desorbita termicamente a 220 °C in un iniettore GC) (Morales et al, 1998), mentre per la frazione volatile di un formaggio è stata utilizzata una trappola impaccata con fase C18 (eluata con una miscela esano/acetone, 2/1) (Larrayoz et al, 1999).

2.9.4 Analisi di contaminanti

La SFE è ampiamente utilizzata anche per l'estrazione e il dosaggio di diversi contaminanti presenti in tracce negli alimenti. In questo caso uno dei problemi maggiori è rappresentato dalle impurezze sempre presenti (seppure in tracce) nei solventi di estrazione; ciò risulta particolarmente evidente quando sono coinvolti grossi volumi di solvente, che vengono poi concentrati prima della determinazione analitica finale. Una delle applicazioni più importanti è l'analisi dei pesticidi in diverse matrici alimentari. Alcuni studi hanno dimostrato la possibilità di estrarre pesticidi da campioni di frutta e vegetali con CO₂ non modificata. Utilizzando condizioni di pressione meno drastiche si riduce significativamente la co-estrazione di β -carotene, mentre l'interferenza dovuta alla co-estrazione della clorofilla può essere eliminata per adsorbimento su una trappola di allumina (Lehotay, Ibrahim, 1995). Per la raccolta del campione si possono impiegare, a seconda dei casi, sia la tecnica in fase liquida sia quella su trappola adsorbente. Generalmente si utilizzano come solventi di raccolta, metanolo, diclorometano o acetone, e come trappole adsorbenti fasi di C18, Tenax, diolo o Florisil (Turner et al, 2002). Studi comparativi effettuati su campioni di vegetali fortificati con 56 diversi pesticidi hanno dimostrato che l'acetone permette di eluire i pesticidi dalla trappola con un minor volume rispetto a etilacetato, acetonitrile e metanolo (Lehotay, Valverde-García, 1997).

I metodi convenzionali per l'estrazione dei pesticidi apolari prevedono una fase di estrazione con solventi organici (esano o diclorometano) seguita da una fase di purificazione

(SPE, vedi cap. 6) per eliminare i lipidi interferenti. La CO₂ supercritica è molto adatta all'estrazione dei pesticidi apolari da matrici lipidiche. Per purificare l'estratto, separando i lipidi, si possono adottare due strategie: effettuare la raccolta del campione con una trappola adsorbente in grado di trattenere selettivamente il grasso (*fat retainer*) o aggiungere la stessa fase adsorbente direttamente nella cella di estrazione. Nel primo caso è importante valutare l'effetto della concentrazione del modificante sulla capacità dell'adsorbente di trattenere il grasso (in genere è bene non superare l'1-2%).

In anni recenti l'attenzione si è spostata sulla messa a punto di metodi multiresiduali in grado di estrarre un'ampia varietà di pesticidi (organoclorurati, organofosforici, organoazotati e piretroidi) da diverse matrici alimentari (prodotti vegetali, ittici, dietetici e per l'infanzia). Per estrarre i pesticidi più polari, si utilizza CO₂ modificata con il 10% di acetonitrile (Mendiola et al, 2007). Per migliorare la sensibilità dell'analisi dei carbammati, King et al (2002) hanno sviluppato un metodo che prevede la derivatizzazione direttamente nel fluido supercritico. In questo caso l'agente derivatizzante (acido eptafluorobutirrico) agisce anche da modificante polare. I derivati vengono analizzati mediante gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni (GC-ECD) o con spettrometro di massa (GC-MS) raggiungendo sensibilità molto elevate.

La CO₂ supercritica si presta molto bene all'estrazione di contaminanti apolari, come gli IPA. In letteratura sono riportati diversi metodi per l'estrazione/purificazione degli IPA con fluidi supercritici. Le condizioni ottimali sono simili e prevedono l'impiego di temperature intorno a 100 °C e pressioni intorno a 300 atm. Per limitare la co-estrazione del grasso in campioni che ne contengono quantità elevate, come i tessuti ittici, è possibile effettuare una purificazione in cella con adsorbente C18 (Ali, Cole, 2001, 2002) o con gel di silice (Lage Yusty, Cortizo Daviña, 2005). L'estratto così ottenuto è pronto per l'analisi GC-MS o HPLC con rivelazione spettrofluorimetrica. Altre applicazioni riguardano l'estrazione di diossine e policlorobifenili (PCB) (Anyanwu et al, 2003; Boatto et al, 2003; Björklund et al, 2002), seguita da analisi GC-MS. Anche in questo caso, considerato che si tratta di composti essenzialmente apolari, si impiegano CO₂ pura (senza modificante), condizioni di estrazione blande e un *fat retainer* nella cella di estrazione, per limitare la co-estrazione del grasso. Come illustrato in una review di García-Rodríguez et al (2008), diverse fasi o combinazioni di fasi sono state valutate come *fat retainer* (Florisil, allumina, gel di silice acidificato ecc.). Björklund et al (2000) hanno proposto un metodo che prevede la raccolta del campione su trappola solida di Florisil che viene eluita con eptano. È anche possibile una determinazione quantitativa del grasso eluendolo in presenza di metanolo dopo l'eluizione dei PCB.

La SFE è stata applicata con successo anche nella determinazione di diversi residui di farmaci veterinari, somministrati illecitamente a scopo auxinico (Combs et al, 1997). La tecnica si applica sia ai composti apolari sia a quelli polari, come i sulfamidici somministrati a polli, bovini e maiali attraverso il mangime. Arancibia et al (2003) hanno sviluppato un metodo rapido per evitare la fase di purificazione prima dell'analisi HPLC. Il campione, mescolato con celite per adsorbire l'acqua, viene sottoposto a estrazione ad alta temperatura (120-160 °C), utilizzando metanolo come modificante polare. Altre applicazioni riguardano l'estrazione di residui di ormoni steroidei (Stolker et al, 1998) e β -agonisti (O'Keeffe et al, 1999) da tessuti animali, l'estrazione di micotossine da campioni di cereali (Taylor et al, 1993) e di aflatossina M1 da tessuto animale (Taylor et al, 1997), l'estrazione di nitrosammine da prodotti carnei affumicati (Fiddler, Pensabene, 1996) e la determinazione di idrocarburi originati dalla decomposizione dei grassi in carni di pollo e maiale irradiate (trattamento consentito negli Stati Uniti ma vietato in Europa) (Horvatovich et al, 2000).

La SFE è stata anche adottata come metodo ufficiale per la determinazione di idrocarburi di origine petrolifera e IPA in matrici ambientali (EPA, 1996a, 1996b).

Bibliografia

- Ali MY, Cole RB (2001) SFE-plus-C18 Lipid Cleanup and Selective Extraction Method for GC/MS Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoked Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9): 4192-4198
- Ali MY, Cole RB (2002) One-step SFE-plus-C(18) selective extraction of low-polarity compounds, with lipid removal, from smoked fish and bovine milk. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 374(5): 923-931
- Andersen MR, King JW, Hawtorne SB (1990) Environmental matrices extracted by SPE. In: Lee ML, Markides KE (eds) *Analytical supercritical fluid chromatography and extraction*. Chromatographic Conferences, Provo, UT
- Andersen MR, Swanson JT, Porter NL, Richter BE (1989) Supercritical fluid extraction as a sample introductory method for chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 27(7): 371-377
- Anyanwu EC, El-Saeid MH, Akpan AI, Saled MA (2003) Evaluation of the most current and effective methods in the analysis of chlorinated dioxins in ground beef. *The Scientific World Journal*, 3: 913-921
- AOAC International (2002) Official Method of Analysis 41.1.69
- Arancibia V, Valderrama M, Rodriguez P et al (2003) Quantitative extraction of sulfonamides in meats by supercritical methanol-modified carbon dioxide: A foray into real-world sampling. *Journal of Separation Science*, 26(18): 1710-1716
- Ashraf-Khorassani M, Ude M, Doane-Wedeman T et al (2002) Comparison of gravimetry and hydrolysis/derivatization/gas chromatography-mass spectrometry for quantitative analysis of fat from standard reference infant formula powder using supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7): 1822-1826
- Barth MM, Zhou C, Kute KM, Rosenthal GA (1995) Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11): 2876-2878
- Berche B, Henkel M, Kenna R (2009) Critical phenomena: 150 years since Cagniard de la Tour. *Journal of Physical Studies*, 13(3): 3001-3004
- Björklund E, Järemo M, Mathiasson L (2000) Simultaneous determination of PCBs and triglycerides in a model fat sample using selective supercritical fluid extraction. *Journal of Liquid Chromatography and Related Techniques*, 23(15): 2337-2344
- Björklund E, von Holst C, Anklam E (2002) Fast extraction, clean-up and detection methods for the rapid analysis and screening of seven indicator PCBs in food matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 21(1) 40-53
- Boatto G, Nieddu M, Carta A et al (2003) Supercritical fluid extraction and GC detection of p,p1-DDE and PCB congeners in some samples of dying species from Sardinia. *Fresenius Environmental Bulletin* 12(5): 435-441
- Bøwadt S, Pelusio F, Montanarella L, Larsen B (1993) Trapping techniques in supercritical fluid extraction. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 11(1-3): 117-131
- Cavalcanti RN, Meireles MAA (2012) Fundamentals of supercritical fluid extraction. In: Pawliszyn J (ed) *Comprehensive sampling and sample preparation*. Elsevier, Amsterdam
- Cavalcanti RN, Navarro-Díaz HJ, Santos DT et al (2012) Supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves: chemical composition, economic evaluation and chemometric approach. *Journal of Food Research*, 1(3): 282-294
- Chafer A, Pascual-Martí MC, Salvador A, Berna A (2005) Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin. *Journal of Separation Science*, 28(16): 2050-2056
- Combs MT, Boyd S, Ashraf-Hhorassani M, Taylor LT (1997) Quantitative recovery of sulfonamides from chicken liver, beef liver, and egg yolk via modified supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5): 1779-1783

- Döker O, Salgin U, Yildiz N et al (2010) Extraction of sesame seed oil using supercritical CO₂ and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 97(3): 360-366
- EPA - Environmental protection Agency (1996) *Supercritical fluid extraction of polynuclear aromatic hydrocarbons, EPA method 3561* <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3561.pdf>
- EPA - Environmental protection Agency (1996) *Supercritical fluid extraction of total hydrocarbons, EPA method 3560* <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3560.pdf>
- Fiddler W, Pensabene JW (1996) Supercritical fluid extraction of volatile N-nitrosamines in fried bacon and its drippings: method comparison. *Journal of AOAC International*, 79(4): 895-901
- García-Rodríguez D, Carro-Díaz AM, Lorenzo-Ferreira RA (2008) Supercritical fluid extraction of poly-halogenated pollutants from aquaculture and marine environmental samples: A review. *Journal of Separation Science*, 31(8): 1333-1345
- Hartonen K (2010) Novel accelerated extraction techniques. In: Jestoi M, Järvenpää E, Peltonen K (eds) *First dice your dill – new methods and techniques in sample handling*. University of Turku, Turku
- Hopper ML, King JW, Johnson JH et al (1995) Multivessel supercritical fluid extraction of food items in Total Diet Study. *Journal of AOAC International*, 78(4): 1072-1079
- Horvatovich P, Miesch M, Hasselmann C, Marchioni E (2000) Supercritical fluid extraction of hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones for the detection of irradiated foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 897(1-2): 259-268
- Hüsers N, Kleiböhmer W (1995) Studies on trapping efficiencies of various collection devices for off-line supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 697(1-2): 107-114
- King JW, Zhang Z (2002) Derivatization reactions of carbamate pesticides in supercritical carbon dioxide. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 374(1): 88-92
- Lage Yusty MA, Cortizo Daviña JL (2005) Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. *Food Control*, 16(1): 59-64
- Larráyoiz P, Carbonell M, Ibáñez F et al (1999) Optimization of indirect parameters which affect the extractability of volatile aroma compounds from Idiazábal cheese using analytical supercritical fluid extractions (SFE). *Food Chemistry*, 64(1): 123-127
- Lehotay SJ, Ibrahim MA (1995) Supercritical-fluid extraction and gas-chromatography ion-trap mass-spectrometry of pentachloronitrobenzene pesticides in vegetables. *Journal of AOAC International*, 78(2): 445-452
- Lehotay SJ, Valverde-García A (1997) Evaluation of different solid-phase traps for automated collection and clean-up in the analysis of multiple pesticides in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 765(1): 69-84
- López M, Arce L, Garrido J et al (2004) Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. *Talanta*, 64(3): 726-731
- Mendiola JA, Herrero M, Cifuentes A, Ibáñez E (2007) Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2): 234-246
- Morales MT, Berry AJ, McIntyre PS, Aparicio R (1998) Tentative analysis of virgin olive oil aroma by supercritical fluid extraction-high resolution gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 819(1-2) 267-275
- O’Keeffe MJ, O’Keeffe MO, Glennon JD (1999) Supercritical fluid extraction (SFE) as a multi-residue extraction procedure for beta-agonists in bovine liver tissue. *Analyst*, 124(9): 1355-1360
- Palenzuela B, Rodríguez-Amaro R, Rios A, Valcárcel M (2002) Screening of polyphenols in grape marc by on-line supercritical fluid extraction – Amperometric detection with a PVC-graphite composite electrode. *Electroanalysis*, 14 (19-20): 1427-1432
- Pourmortazavi SM, Hajmirsadeghi SS (2007) Supercritical fluid extraction in plant essentials and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1163(1-2): 2-24
- Stolker AA, Zoontjes PW, van Ginkel LA (1998) The use of supercritical fluid extraction for the determination of steroids in animal tissues. *Analyst*, 123(12): 2671-2676

- Sun M, Temelli F (2006) Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 37: 397-408
- Taylor SL, King JW, Richard JL, Greer JI (1993) Analytical-scale supercritical fluid extraction of aflatoxin B1 from field-inoculated corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(6): 910-913
- Taylor SL, King JW, Richard JL, Greer JI (1997) Supercritical fluid extraction of aflatoxin M1 from beef liver. *Journal of Food Protection*, 60(6): 698-700
- Turner C, King JW, Mathiasson L (2001) Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *Journal of Chromatography A*, 936: 215-237
- Turner C, Sparr Eskilsson C, Björklund E (2002) Collection in analytical-scale supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 947: 1-22
- Vasapollo G, Longo L, Rescio L, Ciurlia L (2004) Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as cosolvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 29: 87-96
- Xie QL, Markides KE, Lee ML (1989) Supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography with fraction collection for sensitive analytes. *Journal of Chromatographic Science*, 27(7): 365-370
- Xu L, Zhan X, Chen R et al (2011) Recent advances on supercritical fluid extraction of essential oils. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(9): 1196-1211