



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA



**Extracción supercrítica de componentes
bioactivos de la hoja de chaya
(*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M.
Johnst)**

TESIS

para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Ingeniería

Presenta:

Ing. Jonathan Maldonado Jiménez

Director:

Dr. Juan Barajas Fernández



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”



**División
Académica
de Ingeniería
y Arquitectura**

DIRECCIÓN

OFICIO DAIA/2314/2017
FECHA: 11 de Octubre 2017
ASUNTO: Autorización de impresión definitiva

C. ING. JONATHAN MALDONADO JIMÉNEZ
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
PRESENTE.

En virtud de haber elaborado su trabajo de Tesis, para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería en el cual ha sido el Dr. Juan Barajas Fernández Director de Tesis denominado:

“EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE COMPONENTES BIOACTIVOS DE LA HOJA DE CHAYA (*Cnidocolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst)”

Tengo a bien autorizarle la **IMPRESIÓN DEFINITIVA** de dicho trabajo, continuando con los trámites correspondientes para su examen de obtención de grado.

Sin otro particular, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
**UNIVERSIDAD JUAREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**
DIVISIÓN ACADÉMICA DE
DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
DR. CANDELARIO BOLAINA TORRES
DIRECTOR



DIRECCIÓN

C.c.p. Archivo

DR'CBT/Dr.JBF/apl***



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”



**División
Académica
de Ingeniería
y Arquitectura**

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Cunduacán, Tabasco, a 9 de Octubre de 2017

MEM/MCI/018/2017

PARA: DR. CANDELARIO BOLAINA TORRES
DIRECTOR DE LA DAIA
DE: COMISIÓN SINODAL
ASUNTO: APROBACIÓN DE IMPRESIÓN TESIS DE MAESTRIA

Una vez hecha la revisión detallada del Trabajo de Tesis denominado:

**“EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE COMPONENTES BIOACTIVOS DE LA
HOJA DE CHAYA (*Cnidocolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst)”**

Desarrollado por el C. **ING. JONATHAN MALDONADO JIMÉNEZ** de la **Maestría en Ciencias en Ingeniería**, le comunicamos que aceptamos la impresión del trabajo, ya que el mismo ha cumplido con los requisitos necesarios.

COMISIÓN SINODAL


DR. JOSÉ GUADALUPE FABIÁN
RIVERA TREJO
PRESIDENTE


DR. JUAN BARAJAS FERNÁNDEZ
VOCAL 1


DR. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ
RIVERA
VOCAL 3


DR. JUAN GABRIEL ÁLVAREZ
RAMÍREZ
SECRETARIO


DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES
OLÁN ACOSTA
VOCAL 2

c.c.p. Archivo

CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente documento a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada "Extracción supercrítica de componentes bioactivos de la hoja de chaya (*Cnidocolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst)", de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro, autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la Ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 15 días del mes de Octubre del año 2017.

AUTORIZO



Jonathan Maldonado Jiménez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) por confiar en mí al permitirme cursar la Maestría en Ciencias en Ingeniería en esta honorable institución y por el apoyo del Programa Institucional de Superación Académica.

Al CONACYT por otorgarme la beca #413640 para estudiar este grado académico.

Al CONACYT por el Proyecto INFR-2014-01-226114, y al proyecto UJAT-IB-2015-30.

Al Dr. Juan Barajas Fernández por permitirme colaborar con él, guiarme durante mi investigación y de quien aprendí mucho, pero sobre todo por su valiosa amistad.

Al Dr. José de los Santos, Dr. Juan Gabriel y a la Mtra. Anabel quienes siempre me orientaron académicamente y por sus atenciones.

Al Dr. Pedro García Alamilla, quien me recibió, enseñó y ayudó durante toda mi investigación en DACA, así como los apoyos proporcionados en su laboratorio y más allá de lo académico por la amistad entablada. Así también a la Dra. Laura Mercedes, quien colaboró en la presente investigación y por sus atenciones.

A la Dra. Nelly del Carmen Jiménez Pérez (DACBIOL) por su valiosa atención y su colaboración a la realización de este trabajo.

A los doctores que forman parte del posgrado en Ciencias en Ingeniería quienes me dieron sus enseñanzas en el aula y su amistad.

A mis compañeros del posgrado, Candelario, Judith y Juan Carlos y también a las practicantes Gaby, Gloria, Diana y Zuleyma. A los compañeros de DACA, Fanny y Jhonatan porque aprendí mucho de ellos, por su apoyo y sobre todo por su valiosa amistad. Y en especial a Verónica, aprendí mucho sobre otros temas gracias a ti.

A mi familia, en especial a mis padres (Orlando y Yolanda) por ayudarme infinitamente a lograr una meta más y por su apoyo incondicional, los amo. A mis hermanos (Orlando y Lupita) por su apoyo.

A Dios, sin él nada es posible.

DEDICATORIA

*A mis queridos padres Orlando y Yolanda
que son mi ejemplo a seguir,
y también por su amor y apoyo,
y a mis hermanos Orlando y Lupita
por su apoyo y cariño.*

Contenido

Índice de Figuras.....	4
Índice de Tablas.....	6
Resumen.....	8
Abstract	9
INTRODUCCIÓN.....	10
CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO	12
1.1. Fundamentos teóricos	12
1.1.1. Métodos de extracción de componentes.....	12
1.1.2. Hoja de chaya (<i>Cnidocolus aconitifolius</i> (Mill.) I.M. Johnst)	17
1.1.3. Compuestos fenólicos	22
CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
2.1. Matriz vegetal.....	26
2.1.1. Recolección de muestras.....	26
2.1.2. Validación del material vegetal	27
2.2. Determinación de humedad.....	27
2.2.1. En base húmeda	27
2.2.2. En base seca	29
2.3. Preparación de la curva de calibración de ácido gálico, para la determinación de fenoles totales, con etanol al 70% y agua destilada.....	30
2.4. Cuantificación de compuestos fenólicos totales mediante el uso de la espectrofotometría Uv-vis a través del método de Folin-Ciocalteu.....	31
2.5. Extracción ultrasónica.....	32
2.5.1. Cinética de extracción ultrasónica utilizando los solventes 1 y 2	32
2.5.2. Diseño de experimentos para la extracción ultrasónica.....	32
2.5.3. Extracción ultrasónica en base seca en solventes 1 y 2.....	34
2.5.4. Extracción ultrasónica en base húmeda en solventes 1 y 2.....	34
2.6. Extracción supercrítica	35
2.6.1. Equipo de extracción supercrítica SFT-150.....	35
2.6.1. Diseño de experimentos para la extracción con fluido supercrítico	36
2.6.2. Extracción supercrítica en base seca	37
2.7. Análisis por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) .	40

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1. Determinación de humedad.....	41
3.1.1. Base húmeda.....	41
3.1.2. Base seca.....	41
3.2. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales.	43
3.3. Extracción ultrasónica.....	45
3.3.1. Cinética de extracción ultrasónica.....	45
3.3.2. En base seca utilizando con el solvente 1	46
3.3.3. En base seca utilizando el solvente 2.....	48
3.3.4. En base húmeda utilizando el solvente 1	51
3.3.5. En base húmeda utilizando el solvente 2.....	53
3.3.6. Análisis de resultados de extracción ultrasónica.....	54
3.4. Extracción supercrítica	56
3.4.1. En base seca utilizando el solvente 1	56
3.4.2. En base seca utilizando el solvente 2.....	58
3.5. Determinación por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT- IR)	61
3.6. Optimización.....	70
3.6.1. Extracción por ultrasonido	71
3.6.2. Extracción supercrítica	73
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
4.1. Conclusiones.....	75
4.2. Recomendaciones.....	75
5. Referencias	76
ANEXOS	85
A. Guía rápida de operación del extractor supercrítico SFT-150	85
B. Guía rápida de operación del baño ultrasónico Elmasonic S 40 H	88
C. Evidencias fotográficas	90

Índice de Figuras

Figura 1. Sistemas de baños ultrasónicos, a) emisión de onda vertical, b) emisión de onda horizontal (Tiwari, 2015).	15
Figura 2. Diagrama de fases de las sustancias puras como el CO ₂ , Pc y Tc corresponden a la presión y temperatura crítica, respectivamente (Herrero et al., 2006).....	17
Figura 3. Hoja de chaya (<i>Cnidioscolus aconitifolius</i> (Mill.) I.M. Johnst).....	18
Figura 4. Distribución geográfica de la hoja de chaya (Ross-Ibarra and Molina-Cruz, 2002).....	19
Figura 5. Compuestos fenólicos más representativos, adaptado de (Ratnam <i>et al.</i> , 2006).	22
Figura 6. Estructura química de los flavonoides.	23
Figura 7. Estructura de la quercetina (a) y el kaempferol (b).	24
Figura 8. Hoja de chaya con flor recolectada para validación de muestra.	26
Figura 9. Ubicación de Teapa y Tacotalpa en el Estado de Tabasco, fuente Google Maps® 2017.....	27
Figura 10. Cama de secado al sol con hoja de chaya.	28
Figura 11. Hoja de chaya molida para determinar humedad en base seca.	29
Figura 12. Muestras en reposo (método de Folín-Ciocalteu).	31
Figura 13. Equipo de ultrasonido con muestras de la cinética de extracción.	32
Figura 14. Equipo de extracción supercrítica SFT-150.	35
Figura 15. Diagrama del equipo de extracción supercrítica: (T1) Tanque de CO ₂ , (C) compresor de aire, (B) bomba de diafragma, (E) enfriador, (CE) cámara de extracción, (T2) recipiente separador y recolector de extracto.....	38
Figura 16. Espectrómetro FT-IR Shimadzu Modelo IRAffinity-1.	40
Figura 17. Curva de calibración de ácido gálico con el solvente 1.....	44
Figura 18. Curva de calibración de ácido gálico con el solvente 2.....	44
Figura 19. Superficie de respuesta de la extracción en base seca en solvente 1.	48
Figura 20. Superficie de respuesta de la extracción en base seca en solvente 2.	50
Figura 21. Superficie de respuesta de la extracción en base húmeda en solvente 1... ..	52
Figura 22. Superficie de respuesta de la extracción en base húmeda con el solvente 2.	55
Figura 23. Superficie de respuesta de la extracción supercrítica en base seca con el solvente 1.....	58

Figura 24. Superficie de respuesta de la extracción supercrítica en base seca en con el solvente 2.....	60
Figura 25. Espectro de FT-IR de la hoja chaya seca.	61
Figura 26. Espectro de FT-IR del extracto de la hoja de chaya con el solvente 1 (negro) y 2 (rojo).....	64
Figura 27. Espectro de FT-IR del extracto supercrítico con el solvente 1 y la hoja de chaya.	67
Figura 28. Equipo de extracción supercrítica SFT-150.	85
Figura 29. Equipo de baño ultrasónico Elmasonic S 40 H.	88
Figura 30. Molienda de muestras.	90
Figura 31. Tamizado con malla #50 (0.297mm).	90
Figura 32. Extracto supercrítico de la hoja de chaya.	91

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición proximal de la chaya (Shittu et al., 2014).....	20
Tabla 2. Principales minerales contenidos en la hoja de chaya (Jiménez-Aguilar and Grusak, 2015).	20
Tabla 3. Componentes fitoquímicos presentes en la hoja de chaya (Fagbohun et al., 2012).....	21
Tabla 4. Contenido de componentes bioactivos de la hoja de <i>Cnidioscolus</i> (<i>aconitifolius</i> y <i>chayamansa</i>).....	21
Tabla 5. Clasificación de flavonoides adaptado de (Naczk and Shahidi, 2004).	24
Tabla 6. Ácidos Fenólicos, adaptado de (Naczk and Shahidi, 2004).	25
Tabla 7. Concentraciones diluidas de las soluciones madres.....	30
Tabla 8. Variables del proceso de extracción ultrasónica.	33
Tabla 9. Diseño central compuesto para la extracción ultrasónica.	34
Tabla 10. Variables del proceso de extracción supercrítica.	37
Tabla 11. Diseño central compuesto para la extracción supercrítica.	37
Tabla 12. Tabla de humedad en base húmeda.	41
Tabla 13. Determinación de humedad en base seca mediante técnica gravimétrica a la hoja de <i>C. aconitifolius</i>	42
Tabla 14. Tabla de absorbancias de la curva de calibración con el solvente 1.	43
Tabla 15. Tabla de absorbancia de la curva de calibración con el solvente 2.....	43
Tabla 16. Concentraciones obtenidas mediante cinética de extracción (solvente 1)....	45
Tabla 17. Concentraciones obtenidas mediante cinética de extracción (solvente 2)....	45
Tabla 18. Concentración de fenoles totales en el solvente 1 (mg EAG g ⁻¹).	46
Tabla 19. Tabla de ANOVA para base seca en medio etanólico.	47
Tabla 20. Concentración de fenoles totales en medio acuoso (mg EAG g ⁻¹).	49
Tabla 21. Tabla de ANOVA para base seca en medio acuoso.	49
Tabla 22. Concentración de fenoles totales con el solvente 1 (mg EAG g ⁻¹).....	51
Tabla 23. Tabla de ANOVA para base húmeda en medio etanólico.	52
Tabla 24. Concentración de fenoles totales en solvente 2 (mg EAG g ⁻¹).	53
Tabla 25. ANOVA de la extracción en medio acuoso en base húmeda.	54
Tabla 26. Concentración de fenoles totales en el solvente 1 (mg EAG g ⁻¹).	56
Tabla 27. Tabla de ANOVA para extracción supercrítica en base seca con el solvente 1.	57

Tabla 28. Concentración de fenoles totales en el solvente 2 (mg EAG g ⁻¹).	59
Tabla 29. Tabla de ANOVA para extracción supercrítica en base seca con el solvente 2.	59
Tabla 30. Tabla de modos vibracionales del espectro de la Figura 25 que corresponde a la hoja de chaya seca sin tratamiento.....	62
Tabla 31. Tabla de modos vibracionales del espectro de la Figura 26 que corresponde al extracto los solventes 1 y 2 de la hoja de chaya.....	65
Tabla 32. Tabla de modos vibracionales del espectro de la Figura 27 que corresponde al extracto con el solvente 1 y la hoja de chaya que se obtuvo con fluido supercrítico.	68
Tabla 33. Tabla de optimización para base seca con el solvente 1.	71
Tabla 34. Tabla de optimización para base seca con el solvente 2.	72
Tabla 35. Tabla de optimización para base seca con el solvente 1.	72
Tabla 36. Tabla de optimización para base húmeda con el solvente 2.	73
Tabla 37. Tabla de optimización para base seca con el solvente 1 para la extracción supercrítica.....	74
Tabla 38. Tabla de optimización para base seca con con el solvente 2 para la extracción supercrítica.....	74

Resumen

Los compuestos bioactivos son parte fundamental en la dieta de las personas por lo cual su uso se recomienda ampliamente. La literatura muestra que las matrices vegetales presentan gran cantidad de estos compuestos. Como ejemplo de ello se tiene a la hoja de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst), que posee gran cantidad de estos. Las técnicas tradicionales de extracción, como la maceración, soxhlet y prensado, son las más utilizadas para la obtención de esos componentes. Sin embargo, todas ellas presentan las mismas características, el largo tiempo de extracción y el uso excesivo de solventes tóxicos. Que hace que no sean muy redituables para la industria de procesos.

En la última década, surgió el uso de tecnologías de extracción verdes, como ejemplo están, la extracción con ultrasonido y la supercrítica. Presentan características idóneas, como menor tiempo de extracción, uso de solventes no tóxicos, eficiencia de extracción, entre otras. El objetivo de esta investigación fue estudiar la extracción de compuestos fenólicos totales (CFT) procedentes de la hoja de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst), mediante la extracción ultrasónica y supercrítica. Dado que estos compuestos son antioxidantes naturales y son utilizados como base de fármacos.

Se empleó la metodología de Folín-Ciocalteu, para la cuantificación de los CFT. Se obtuvo 53.333 mg EAG (equivalentes de ácido gálico) g⁻¹ con la extracción supercrítica en medio etanólico, que corresponde a la mayor concentración de CFT contra 30.72 mg EAG g⁻¹, que se obtuvo con ultrasonido, también en medio etanólico. Estos valores son más altos que lo reportado por García-Rodríguez (2014), 35.70 ± 24.60 mg EAG g⁻¹ y por Jiménez-Aguilar and Grusak (2015), 5.66 ± 0.59 mg EAG g⁻¹ con técnicas de extracción tradicionales.

Abstract

Bioactive compounds are a fundamental part in the diet of people for which its use is highly recommended. The literature shows that vegetable matrices present a large amount of these compounds. As example of this is when the leaf of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst), which has a large number of these. Traditional extraction, soxhlet, the maceration and pressing techniques, are the most used for the obtaining of such components. However, all of them have the same characteristics, the long time of toxic extraction and the excessive use of solvents. Making not be very profitable for the process industry.

In the last decade, did the use of extraction of green technologies, as example, the extraction with ultrasound and the supercritical. They are ideally suited, as less time extraction, use of solvents not toxic, efficiency of extraction, among others. The objective of this research was to study the extraction of total phenolic compounds (CFT) from leaf of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst), using ultrasonic and supercritical extraction. Since these compounds are antioxidants and are used as the basis of drugs.

Used the methodology of Folin-ciocalteu reagent, for the quantification of the CFT. Was obtained 53.333 mg EAG (Gallic acid equivalents) g^{-1} with supercritical extraction in ethanolic medium, which corresponds to the highest concentration of CFT against 30.72 mg EAG g^{-1} , which was obtained with Ultrasound, also in ethanolic medium. These values are higher than what was reported by cerqueiro (2014), 35.70 24.60 \pm mg EAG g^{-1} and Jimenez-Aguilar and Grusak (2015), 5.66 \pm 0.59 mg EAG g^{-1} with extraction techniques traditional.

INTRODUCCIÓN

En los procesos industriales es común el uso de compuestos derivados de matrices vegetales. Las industrias textil, cosmética, de pinturas, farmacéutica y de alimentos, son las principales consumidores de insumos naturales. Por lo que en los últimos años, la búsqueda y obtención de compuestos de origen vegetal, y en particular de bioactivos, se encuentra en crecimiento constante.

Dichos compuestos de interés industrial suelen presentarse como una mezcla multicomponente, ya sea en fase gaseosa, líquida o sólida, o también como mezcla de estas. Y para extraer un componente de interés a partir de una mezcla, se hace necesaria la aplicación de los procesos de separación.

Diversas técnicas de extracción pueden ser utilizadas para obtener los compuestos de interés, tales como la destilación, adsorción, cristalización, extracción líquido-líquido, sólido-líquido y prensado mecánico (Salazar, 2010). De las técnicas mencionadas, la extracción sólido-líquido es una de las más empleadas en la industria de procesos para la obtención de compuestos de origen vegetal.

La extracción sólido-líquido se aplica de diferentes maneras: la extracción con solventes orgánicos, la extracción mecánica a alta presión con prensa de tornillo (Baryeh, 2001), extracción mecánica asistida de extracción con solventes orgánicos (Morillo *et al.*, 2010), destilación con arrastre de vapor, la extracción con solventes mediante la percolación, la maceración o técnicas de soxhlet (Casas *et al.*, 2008) y la extracción con fluidos supercríticos (SFE por sus siglas en inglés) (de Melo *et al.*, 2014).

La extracción con fluidos supercríticos es considerada un proceso verde, debido a que utiliza solventes con bajo impacto ambiental (Sharif *et al.*, 2014). Además, provee extractos más limpios y puros por lo cual es conveniente y efectiva para aplicaciones en procesos químicos, farmacéuticos, alimentarios, de eliminación de residuos y en la industria del petróleo (Velasco *et al.*, 2007).

Por otra parte, esta técnica de extracción ofrece características atractivas para la obtención de componentes bioactivos en comparación con otras técnicas

de extracción (da Silva *et al.*, 2016). Más de 300 especies vegetales y sus partes se han estudiado usando la técnica de extracción con fluido supercrítico siendo las frutas, hojas, semillas, cáscaras y raíces, las de mayor interés científico por los componentes que pueden aportar a la industria (de Melo *et al.*, 2014).

Los compuestos bioactivos de origen vegetal pueden tener aplicaciones o ser útiles en la salud, debido a que muchas especies son atractivas por tener propiedades medicinales (Wojdylo *et al.*, 2007), y los compuestos fenólicos son en la mayoría de los casos responsables de estas propiedades, ya que influyen en diversos procesos metabólicos diferentes (Porrás-Loaiza and López-Malo, 2009). La hoja de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst), es una matriz vegetal con una gran diversidad de componentes bioactivos y dentro de ellos van incluidos los flavonoides, que son un tipo de compuestos fenólicos.

En el presente trabajo, se realizó la obtención de extractos de la hoja de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I. M. Johnst) mediante la extracción con CO₂ supercrítico a diferentes condiciones de presión y temperatura. Los compuestos que se analizaron fueron los compuestos fenólicos. También se realizó la obtención de extractos utilizando la extracción asistida por ultrasonido.

Esta tesis se integra por cuatro capítulos. En el primero de ellos, se presenta una revisión de la literatura del proceso de extracción supercrítica, de la extracción asistida por ultrasonido, así como de la hoja de chaya y sus componentes ya detectados. En el capítulo dos, se presenta la metodología seguida para la obtención de los extractos y su caracterización mediante la espectroscopia Uv-vis y también por la espectrofotometría de infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR). En el capítulo tres, se muestran los resultados obtenidos y se realiza la discusión de los mismos. Por último, el capítulo cuatro se establecen las conclusiones y las recomendaciones para trabajos futuros. En los anexos se hace una descripción de algunas de las técnicas de extracción utilizadas y se muestra evidencia fotográfica.

CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1. Fundamentos teóricos

1.1.1. Métodos de extracción de componentes

Existen varios métodos o técnicas de extracción para separar componentes de materias sólidas, principalmente de origen vegetal. Estas técnicas son utilizadas en diferentes industrias para la obtención de componentes que utilizan en sus procesos. Los métodos de extracción pueden ser mecánicos o involucrar el uso de solventes, esto dependiendo el componente que se desea extraer. A continuación se describen algunas de estas técnicas.

1.1.1.1. Lixiviación

Diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos se pueden encontrar contenidos en la materia sólida. Para separar el soluto de interés o eliminar un soluto indeseado de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida. Ambas fases entran en contacto y el soluto o los solutos se difunden desde el sólido hacia la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes a partir del sólido que los contiene. Este proceso de separación se llama lixiviación o extracción sólido-líquido, al igual que muchas otras operaciones unitarias, puede ser realizada por lotes o en continuo. Y es muy frecuente utilizarlo con material vegetal seco (hojas, raíces y tallos de plantas) (Harborne, 1980).

En la obtención de aceites vegetales mediante la lixiviación tradicional, se utilizan disolventes orgánicos como hexano, acetona y éter. Dentro de los aceites que se extraen por esta técnica están: el de girasol, de cacahuate, de soya, de ricino, de palma africana, entre otros. Entre los inconvenientes que presenta esta técnica se encuentran, extracción incompleta, es decir limitada, tiempos de extracción grandes, extractos con trazas de solventes y gran cantidad de solvente requerido (Harborne, 1980; Kimbaris *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016).

1.1.1.2. Destilación por arrastre de vapor de agua

Los líquidos con alto punto de ebullición no se pueden purificar por destilación a presión atmosférica, porque los componentes de la mezcla líquida podrían descomponerse a las temperaturas elevadas que se requieren. En la mayoría de los casos, las sustancias con alto punto de ebullición son casi insolubles en agua; entonces, se logra una separación a una temperatura más baja por medio de una destilación simple con arrastre de vapor, éste método se usa con bastante frecuencia para separar un componente de alto punto de ebullición de cantidades pequeñas de impurezas no volátiles.

En la destilación por arrastre de vapor, mientras haya agua líquida presente, el componente de alto punto de ebullición se vaporizará a una temperatura inferior a su punto de ebullición normal sin usar vacío. Los vapores de agua (A) y del componente (B) de alto punto de ebullición se recuperan en un condensador y las dos fases líquidas inmiscibles resultantes se separan (Geankoplis, 1999).

La relación entre moles de B destilado y moles de A destilado se presenta en la Ecuación 1:

$$\frac{n_B}{n_A} = \frac{P_B}{P_A} \quad (1)$$

Donde n_A , n_B , P_A y P_B son el número de moles de A, el número de moles de B, la presión parcial de A y la presión parcial de B, respectivamente.

1.1.1.3. Extracción asistida por ultrasonido

Las ondas de ultrasonido son aquellas que se encuentran por encima de la frecuencia de sonido del oído humano, es decir aquellas ondas mayores a 20 kHz (Cruz-Cansino *et al.*, 2016). Las ondas de sonido generan vibraciones mecánicas en la superficie que las recibe. Debido a que estas ondas viajan a

través de la materia, a diferencia de las ondas (de radio, rayos x, infrarrojo, entre otras) que viajan en el vacío (Peralta-Jiménez and Cañizares-Macías, 2013), generan vibraciones que pueden dañar a las partículas por el efecto que causa la cavitación acústica, la cual genera el crecimiento y la implosión de microburbujas existentes en la materia a tratar (Tiwari, 2015).

En el caso que la materia de estudio sea una matriz vegetal, las implosiones afectan directamente la estructura celular ocasionando la fractura del tejido vegetal y permitiendo la extracción de varios compuestos desde las vacuolas (Cruz-Cansino *et al.*, 2016; Kimbaris *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016). Aunque de igual manera en esta parte de la célula vegetal se encuentran los alcaloides, que posiblemente son extraídos también (Afoakwa, 2010).

Es importante mencionar que al existir la turbulencia provocada por las implosiones, el líquido se va enriqueciendo con el soluto de interés debido a la transferencia de masa que se genera (Zhang *et al.*, 2016). Con la extracción ultrasónica se reduce el daño térmico a la matriz de estudio, así como el tiempo de extracción, además de que se consume poca energía y menor cantidad de solventes, además tiene una alta eficiencia y reproducibilidad (Chemat *et al.*, 2017; Kimbaris *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016).

La extracción ultrasónica es considerada una técnica amigable con el ambiente y se puede considerar como una tecnología verde. Principalmente, se utiliza para la extracción de compuestos bioactivos (Chemat *et al.*, 2017; Tiwari, 2015). Y es muy frecuente encontrar los equipos de esta tecnología como baños ultrasónicos, tal y como se muestra en la Figura 1.

Otro uso que tiene el baño ultrasónico es para la limpieza de superficies (materiales de laboratorio) dado que las ondas permiten el desprendimiento de contaminantes de las superficies, y es una técnica de limpieza muy barata (Peralta-Jiménez and Cañizares-Macías, 2013).

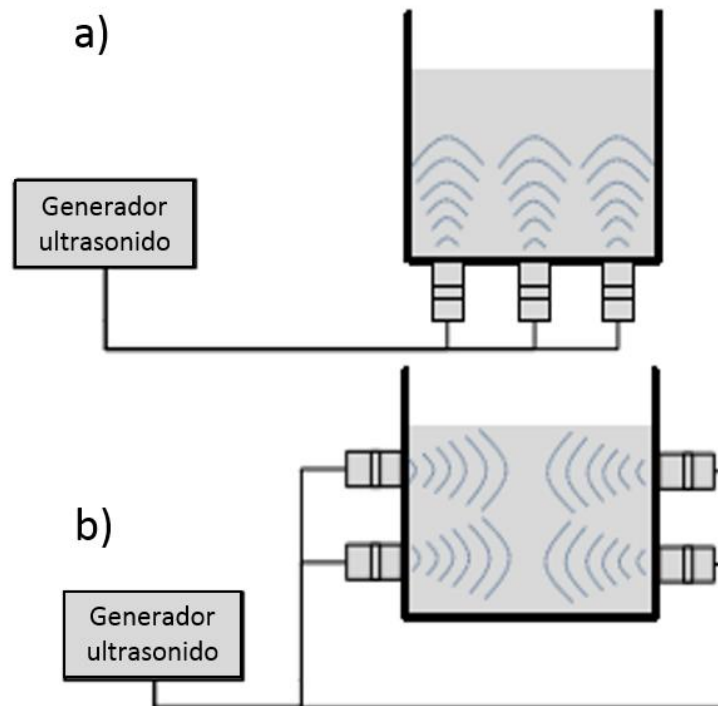


Figura 1. Sistemas de baños ultrasónicos, a) emisión de onda vertical, b) emisión de onda horizontal (Tiwari, 2015).

1.1.1.4. Extracción con fluidos supercríticos

La extracción supercrítica es una operación unitaria de transferencia de masa que se efectúa por encima del punto crítico del solvente (Velasco *et al.*, 2007). Este tipo de extracción ofrece un sinnúmero de ventajas sobre otras técnicas de extracción debido a las diferentes propiedades fisicoquímicas que ofrece el fluido supercrítico, tales como, la baja viscosidad, así como una difusividad alta. Una de las principales características de la extracción supercrítica, es el control sobre la densidad del solvente al variar su presión o temperatura (da Silva *et al.*, 2016). La extracción supercrítica es utilizada en la extracción de componentes de matrices vegetales donde se obtuvieron rendimientos altos (Casas *et al.*, 2008).

Los fluidos supercríticos penetran con mayor facilidad en los sólidos porosos y los solutos pueden ser recuperados con sólo variar la temperatura o la

presión del solvente. Esta técnica también ofrece un tiempo de extracción menor y extractos con mayor pureza (Herzi *et al.*, 2013). Se considera una técnica de extracción con bajo impacto ambiental (Sharif *et al.*, 2014).

Por otra parte, el CO₂ es el solvente supercrítico más utilizado porque es no tóxico, ambientalmente aceptable, químicamente estable y de fácil remoción por descompresión (Costa *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2016). Además el CO₂ tiene afinidad sobre extractos no polares y para poder disolver compuestos polares se requiere de pequeñas cantidades de cosolventes (solventes polares: metanol, etanol, agua, etc.) (de Melo *et al.*, 2014). Las condiciones de operación para llevar a efecto la separación depende del extracto que se requiera obtener (Reverchon and De Marco, 2006).

Para el caso de la extracción de aceites esenciales provenientes de matrices vegetales, la extracción supercrítica es el referente principal, ya que es un proceso de extracción con el cuál se obtienen componentes con una gran pureza y libre de solventes, lo que otorga una mayor calidad del producto obtenido (Palafox *et al.*, 2012; Rocha-Uribe *et al.*, 2011).

1.1.1.4.1. Comportamiento físico del CO₂

El solvente más utilizado para realizar la extracción supercrítica, y en especial cuando las materias primas son alimentos, es el dióxido de carbono (Casas *et al.*, 2008). Tiene un punto crítico de 31.06 °C y 73.8 bar (1070 lb_f/in²). En la Figura 2, se muestra el diagrama de fases del CO₂ puro y se indica la región supercrítica (Casas *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2016).

Se puede observar que en la región supercrítica no hay distinción entre el líquido y el gas, ni tampoco existe fase de transición de uno a otro; los fluidos supercríticos actúan como un gas muy denso o un líquido móvil y ligero. La solubilidad y selectividad en un fluido supercrítico son funciones dependientes de la temperatura y la presión, principalmente (da Silva *et al.*, 2016; Herzi *et al.*, 2013). Y esto se debe a que las solubilidades son más altas por encima del punto crítico (de Melo *et al.*, 2014).

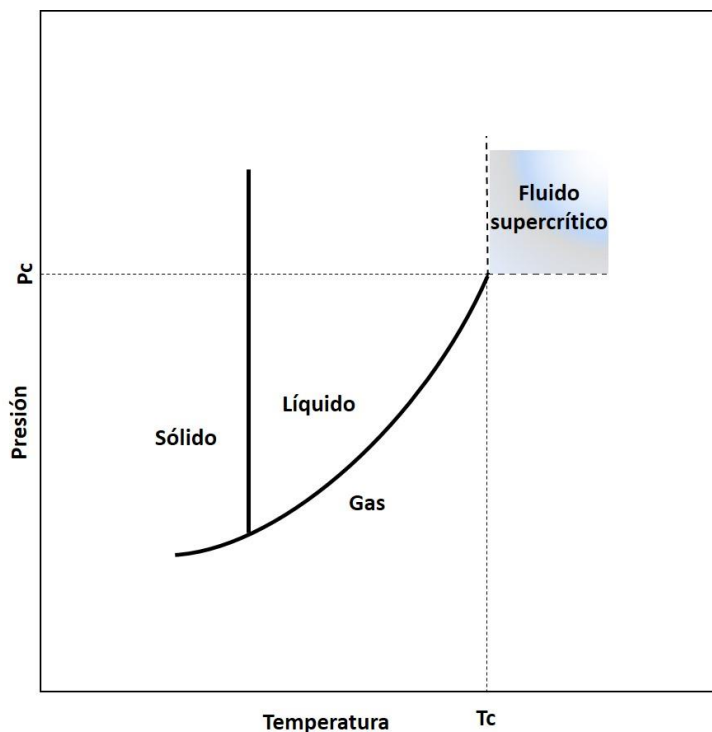


Figura 2. Diagrama de fases de las sustancias puras como el CO_2 , P_c y T_c corresponden a la presión y temperatura crítica, respectivamente (Herrero *et al.*, 2006).

El proceso de solubilización de la matriz vegetal consiste en que la muestra absorbe el CO_2 supercrítico, lo que genera un aumento de volumen de la célula vegetal, provocando una dilatación de los canales intracelulares, por lo que los solutos se difunden en el fluido supercrítico y salen del interior de la célula solubilizados en el fluido y después mediante la descompresión se obtienen los extractos con los compuestos bioactivos de interés (da Silva *et al.*, 2016; Zhao and Zhang, 2013).

1.1.2. Hoja de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst)

La chaya es un arbusto que pertenece al género *Cnidoscolus* de la subfamilia de *Euphorbiaceae*, la variedad *aconitifolius* (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst) se muestra en la Figura 3, es la más domesticada y conocida

en la región de Chiapas, Tabasco y Veracruz, como se muestra en la Figura 4, al igual que en países de Centroamérica como Belice y Guatemala. Los nombres comunes, con los que se le conocen en varios lugares, son hoja estrella, chayapica y chaya (Ross-Ibarra and Molina-Cruz, 2002).



Figura 3. Hoja de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst).

En el estado de Tabasco, ubicado en la región sureste de México, se favorece el crecimiento de la chaya debido a la alta humedad que prevalece. Además, en esta región se consume en una amplia gama de platillos típicos, y también se utiliza para curar diversas enfermedades de manera empírica tales como la gripe, hipertensión, dolores renales, diabetes entre otras.

Estas aplicaciones se deben a que posee propiedades medicinales derivado de los componentes bioactivos que se encuentran como parte de su estructura (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2014). Se considera que la salud de las personas requiere de antioxidantes y minerales para su buen funcionamiento, se

recomienda el consumo de vegetales de hojas verdes (Jiménez-Aguilar and Grusak, 2015).



Figura 4. Distribución geográfica de la hoja de chaya (Ross-Ibarra and Molina-Cruz, 2002).

Las técnicas de extracción soxhlet y concentrado metanólico son utilizadas ampliamente para obtener extractos a partir de la hoja de chaya, obteniendo un sinnúmero de componentes bioactivos, tales como minerales (Shittu *et al.*, 2014), fenoles (García-Rodríguez *et al.*, 2014) y proteínas (Ross-Ibarra and Molina-Cruz, 2002), por mencionar algunos.

1.1.2.1. Taxonomía y nomenclatura

De acuerdo a la base de datos de Integrated Taxonomic Information System (ITIS, 2017), la taxonomía de la chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Jhonst) se menciona a continuación.

Nombre científico: *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Jhonst

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridiplantae

Infrareino: Streptophyta (Plantas terrestres)
 Superdivisión: Embryophyta
 División: Tracheophyta (Plantas vasculares)
 Subdivisión: Spermatophytina (Plantas con semillas)
 Clase: Magnoliopsida
 Super orden: Rosanae
 Orden: Malpighiales
 Familia: Euphorbiaceae
 Género: *Cnidoscolus*
 Especie: *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst
 Nombre común: Chaya

1.1.2.2. Composición de la hoja de chaya

Las Tablas 1, 2 y 3 muestran la composición proximal, el análisis mineral y el análisis fitoquímico, respectivamente, que se ha realizado a la hoja de chaya en diferentes estudios.

Tabla 1. Composición proximal de la chaya (Shittu *et al.*, 2014).

Componente	%
Humedad	2.86 ± 0.02
Cenizas	14.22 ± 0.02
Fibra cruda	16.37 ± 0.16
Grasa cruda	7.39 ± 0.19
Proteínas cruda	14.7 ± 0.03
Carbohidratos	44.31 ± 0.16

Tabla 2. Principales minerales contenidos en la hoja de chaya (Jiménez-Aguilar and Grusak, 2015).

Minerales	µg g ⁻¹ de hoja fresca
Boro	4.56 ± 1.32 mg g ⁻¹
Hierro	23.66 ± 12.79
Manganeso	12.37 ± 2.64
Sodio	24.64 ± 14.65
Zinc	4.91 ± 0.61

Tabla 3. Componentes fitoquímicos presentes en la hoja de chaya (Fagbohun *et al.*, 2012).

Componentes	Resultados
Alcaloides	+
Taninos	+
Saponinas	+
Esteroides	-
Flobataninos	-
Flavonoides	+

+ = indica presencia del componente

- = indica ausencia del componente

En la Tabla 4, se muestran otros compuestos que se obtuvieron utilizando técnicas convencionales como soxhlet o remojo simple.

Tabla 4. Contenido de componentes bioactivos de la hoja de *Cnidoscolus (aconitifolius y chayamansa)*.

Componentes extraídos a la hoja de chaya
<ul style="list-style-type: none"> • Taninos, saponinas, alcaloides y flavonoides (Oyagbemi <i>et al.</i>, 2011). • Fitatos, fobataninas y esteroides (Shittu <i>et al.</i>, 2014). • Fibra, proteínas, ácido ascórbico y β-caroteno (Kuti and Kuti, 1999; Quezada, 2007). • Sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, hierro y cobre (Fagbohun <i>et al.</i>, 2012). • Boro, Cobalto, Manganeso, Niquel (Jiménez-Aguilar and Grusak, 2015).
<ul style="list-style-type: none"> • Tiamina, niacina, riboflavina, vitamina A y C, minerales (calcio, fierro, fósforo, potasio, magnesio, sodio, manganeso, zinc y cobre); además, flavonoides como amentoflavona (diapigenina), astragalina (kaempferol-3-O-glucósido), kaempferol-3-O-rutinósido, dihidromirecetina y glucósidos cianogénicos (Jiménez-Arellanes <i>et al.</i>, 2014). • Fenoles totales y flavonoides expresados en equivalentes de ácido gálico y catequina (Loarca-Piña <i>et al.</i>, 2010). • Proteína, de grasa, de fibra cruda y HCN (Spell and Bressani, 2011). • Esteroles, cumarina, flavonoides (García-Rodríguez <i>et al.</i>, 2014).

Las tablas presentadas muestran la gran cantidad de componentes bioactivos que posee la hoja de chaya, por lo que se hace una planta completamente atractiva para explorar con las mencionadas técnicas verdes.

1.1.3. Compuestos fenólicos

Las plantas poseen un sinnúmero de compuestos químicos que forman parte de su estructura, y entre estos compuestos se puede encontrar a los fenoles, los cuales existen en infinidad de estructuras y todas coinciden en algo, un grupo fenol con por lo menos un grupo hidroxilo dentro de su estructura (Robbins, 2003). Además de que estos tipos de compuestos ayudan a las plantas a protegerse de los rayos UV y son muy buenos como antioxidantes (Soobrattee *et al.*, 2005).

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en 2 grupos principales: flavonoides y ácidos fenólicos (Porrás-Loaiza and López-Malo, 2009), tal como se muestra en la Figura 5.

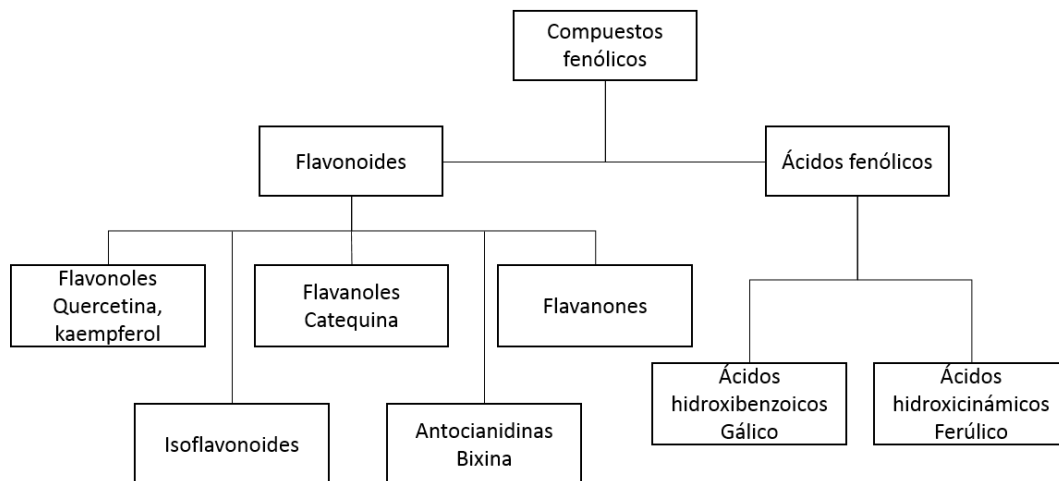


Figura 5. Compuestos fenólicos más representativos, adaptado de (Ratnam *et al.*, 2006).

1.1.3.1. Flavonoides

Los flavonoides son componentes bioactivos que se encuentran en matrices vegetales, también son conocidos como fitonutrientes y son una clase de polifenoles de bajo peso molecular (Perea, 2013). De manera característica poseen estructuras $C_6-C_3-C_6$, es decir 2 o más anillos aromáticos y además presentan un grupo hidroxilo aromático y se unen mediante un puente de carbono (Porrás-Loaiza and López-Malo, 2009). En la Figura 6, se muestra la estructura general de los flavonoides.

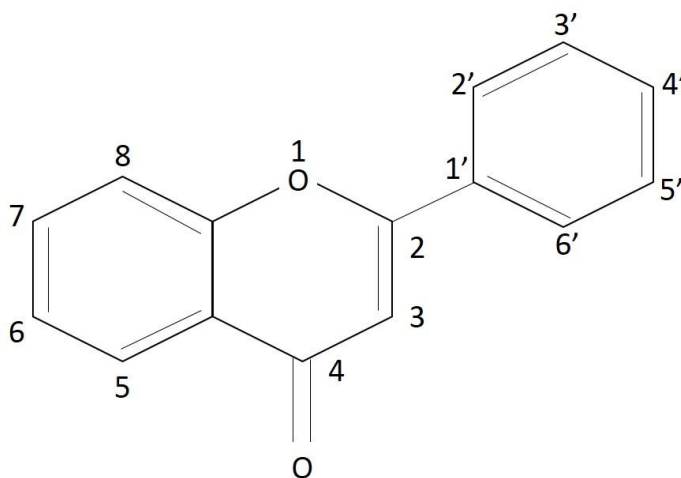


Figura 6. Estructura química de los flavonoides.

Mientras que en la Figura 7 se muestran unos de los flavonoides más conocidos, y que se pueden encontrar en diversas matrices vegetales, la quercetina (a) y el kaempferol (b). En la mayoría de los casos los flavonoides son extraídos con metanol, etanol o agua y en ocasiones deben utilizarse soluciones ácidas (Naczki and Shahidi, 2004).

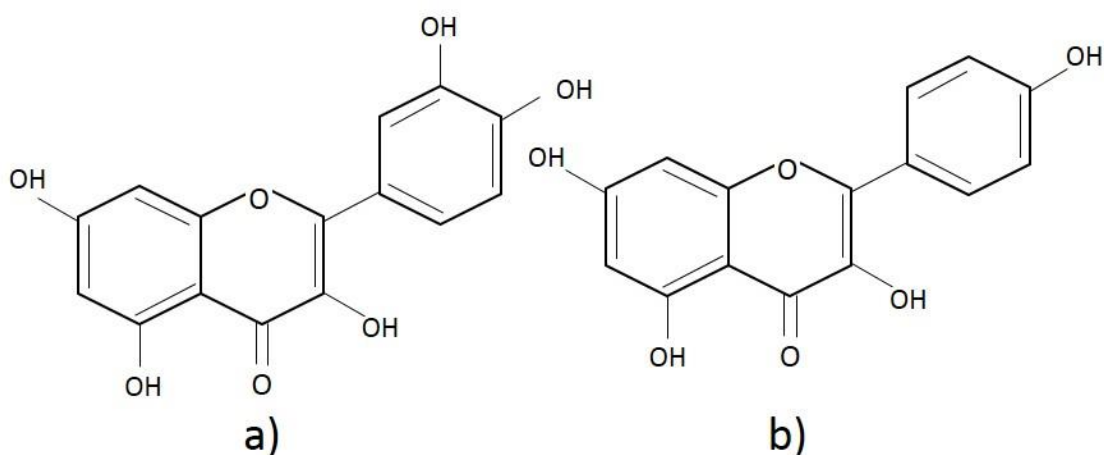


Figura 7. Estructura de la quercetina (a) y el kaempferol (b).

Debido a que existe una gran variedad de flavonoides, estos se clasifican de acuerdo a la sustitución del radical que se les realiza. En Tabla 5, se muestra una clasificación de ellos.

Tabla 5. Clasificación de flavonoides adaptado de (Naczka and Shahidi, 2004).

Tipo de flavonoide	Ejemplo	Radical sustituido
Flavona	Apigenina	5, 7, 4' -OH
Flavonona	Taxilofina	3, 5, 7, 3', 4' -OH
Flavonol	Kaempferol	3, 5, 7, 4' -OH
	Quercetina	3, 5, 7, 3', 4' -OH
Flavononol	Genistina	5, 4'-OH; 7-Glucosa
Isoflavona	Genisteína	5, 7, 4' -OH
Flavanol	Catequina	3, 5, 7, 3', 4' -OH
Antocianidina	Epigenidina	5, 7, 4' -OH

Es importante mencionar que los flavonoides son agentes con actividad antioxidante, además de que se les atribuye efectos terapéuticos, tales como, actividades antiinflamatorias, hepatoprotectores y antimicrobial (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Estas cualidades son presentadas por *C. chayamansa*, que es una planta de la misma familia de *C. aconitifolius*, y que es ampliamente utilizada en nuestro país (García-Rodríguez *et al.*, 2014), además también se reporta el efecto de reducción de la glucosa, colesterol y triacilglicéridos evaluados en ratas wistar (Figuroa-Valverde *et al.*, 2009), en esta misma especie.

1.1.3.2. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, entre los principales se encuentran el ácido gálico, vanílico y p-hidroxibenzoico (Porrás-Loaiza and López-Malo, 2009). En la Tabla 6, se muestran los radicales que deben sustituirse para llegar a algunos de estos ácidos.

Tabla 6. Ácidos Fenólicos, adaptado de (Naczki and Shahidi, 2004).

Nombre del ácido	Nombre químico	R ₁	R ₂	R ₃	Estructura base del ácido
p-Hidroxibenzoico	4-Hidroxibenzoico	H	OH	H	
Protocatequico	3,4-Dihidroxibenzoico	OH	OH	H	
Vanílico	4-Hidroxi-3-metoxibenzoico	OCH ₃	OH	H	
Gálico	3,4,5-Trihidroxibenzoico	OH	OH	OH	
p-cumárico	4-Hidroxicinámico	H	OH	H	
Cafeíco	3,4-Hidroxicinámico	OH	OH	H	
Ferúlico	4-Hidroxi-3-metoxicinámico	OCH ₃	OH	H	

La tabla anterior ayuda a identificar de manera adecuada el tipo de ácido fenólico que se este utilizando al presentarse en ella los radicales y la posición que se sustituyen en la molécula del ácido. Mostrando de mejor manera su clasificación, así como el nombre químico que corresponde a cada caso.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. Matriz vegetal

2.1.1. Recolección de muestras

Las hojas de chaya se recolectaron en campo de cultivo sin control en los municipios de Teapa y Tacotalpa, Tabasco, al Sureste de México, siguiendo el procedimiento descrito por (Lot and Chiang-Cabrera, 1986). El cual consiste en localizar plantas que se encuentren floreciendo para realizar el corte de una rama que incluya hojas y flor como se muestra en la Figura 8. La muestra utilizada se colocó en papel periódico a manera de libro y se prensó con cartón para llevarla al herbario, tres muestras fueron recolectadas de la misma forma para su correspondiente validación. El mapa de los municipios en donde se realizó la recolección se puede ver en la Figura 9.



Figura 8. Hoja de chaya con flor recolectada para validación de muestra.



Figura 9. Ubicación de Teapa y Tacotalpa en el Estado de Tabasco, fuente Google Maps® 2017.

2.1.2. Validación del material vegetal

La validación se realizó en el Herbario de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, obteniendo como especie validada hojas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst), las cuales fueron ingresadas a la base de datos del Herbario con números de folio 35137 y 35138. La validación se realizó porque ayuda a asignar de manera adecuada las propiedades estudiadas a una especie determinada, en este caso a la *Cnidoscolus aconitifolius*.

2.2. Determinación de humedad

2.2.1. En base húmeda

Las hojas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst) fueron lavadas con abundante agua, escurridas y secadas con ayuda de papel absorbente para alimentos, después de esto se colocaron en una cama de secado de acero inoxidable grado alimenticio, como se muestra en la Figura 10,

midiendo el peso de la muestra antes y después del tiempo de secado (8 h en total), el secado se realizó a una temperatura ambiental promedio de 33 °C.



Figura 10. Cama de secado al sol con hoja de chaya.

Los resultados son expresados en porcentaje de humedad (%H) contenida en las muestras y se determinaron utilizando la Ecuación 2:

$$H = \frac{PM - PMDS}{PM} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

H = % Humedad

PM = Peso de la muestra antes del secado en g

$PMDS$ = Peso de la muestra después del secado en g

2.2.2. En base seca

Se utilizaron las muestras obtenidas del secado en base húmeda, las cuales se molieron con ayuda de un molino comercial marca KRUPS® hasta obtener un tamaño de partícula de 0.297 mm para obtener un polvo como el que se muestra en la Figura 11.

Se pesaron muestras uniformes de 2 g de polvo y se colocaron en taras de aluminio grado alimenticio, las cuales se encontraban a peso constante para luego ser ingresadas a una estufa de laboratorio a una temperatura de 105 °C durante 24 h. Se midió el peso de la tara sin muestra, después con muestra antes y después del tiempo de secado, se utilizó la ayuda de un desecador en el manejo de las taras, con el fin de evitar ganancia de humedad en las muestras. La técnica usada para la determinación de la humedad fue la de gravimetría a 24 h.



Figura 11. Hoja de chaya molida para determinar humedad en base seca.

Los resultados son expresados en porcentaje de humedad (%H) contenida en las muestras y se determinaron utilizando Ecuación 3:

$$H = \frac{(PTM - PTMDS)}{PTM - PT} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

H = % Humedad

PTM = Peso de la tara con muestra antes del secado en g

$PTMDS$ = Peso de la tara con muestra después del secado en g

PT = Peso de la tara (a peso constante) sin muestra en g

2.3. Preparación de la curva de calibración de ácido gálico, para la determinación de fenoles totales, con etanol al 70% y agua destilada

Se preparó una solución de ácido gálico ($C_6H_2(OH)_3COOH$) en etanol (C_2H_5OH) al 70%, de ahora en adelante denominado solvente 1 y otra en agua (solvente 2) con una concentración cada una de 1 mg ml^{-1} . Estas soluciones se consideraron como solución madre, respectivamente. A partir de la solución madre se prepararon soluciones diluidas como se indica en Tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones diluidas de las soluciones madres.

Matraz (muestra)	Concentración de ácido gálico (mg ml^{-1})
1 (B)	0
2	0.04
3	0.08
4	0.12
5	0.16
6	0.2

Posteriormente las muestras diluidas se sometieron al método de Folín-Ciocalteu para obtener la cuantificación de compuestos fenólicos totales presentes en ellas.

2.4. Cuantificación de compuestos fenólicos totales mediante el uso de la espectrofotometría Uv-vis a través del método de Folín-Ciocalteu

Todas las muestras después de su respectivo proceso de extracción fueron filtradas utilizando papel filtro Whatman #4. Posteriormente, con los extractos se prepararon diluciones a una concentración de 2.5 mg ml^{-1} , de las soluciones diluidas se tomaron alícuotas de $200 \mu\text{l}$ y a cada muestra se le añadió 1.5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu y se dejaron reposar por 5 min . Pasado el tiempo de reposo, se le añadió a cada muestra 1.5 ml de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 10% (m/v) y se dejaron reposar por 90 min , como se muestra en la Figura 12.

De inmediato las muestras fueron centrifugadas a $10\,000 \text{ rpm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min (Centrífuga Marca HERMLE Labortechnik GmbH Z326K). Por último, se leyó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 725 nm (Othman *et al.*, 2007) en un espectrofotómetro UV-vis (Marca Thermo SCIENTIFIC Modelo GENESYS IOS). De acuerdo a Othman (2007) en ese rango del espectro medio, son detectables los compuestos fenólicos totales.

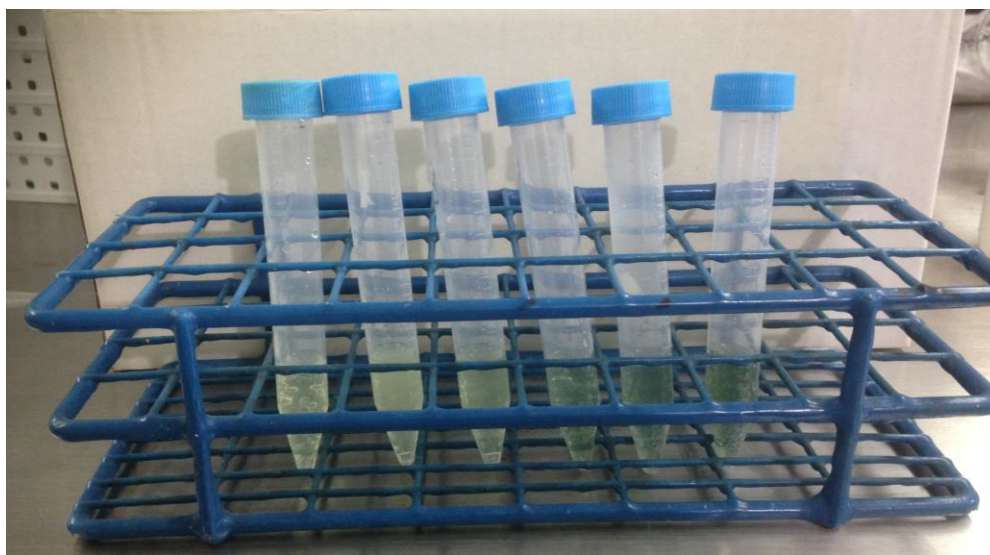


Figura 12. Muestras en reposo (método de Folín-Ciocalteu).

2.5. Extracción ultrasónica

2.5.1. Cinética de extracción ultrasónica utilizando los solventes 1 y 2

Se pesaron muestras de 1 g de hoja seca de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst) y se colocaron en tubos de ensayo a los cuales se les añadió 40 ml del solvente 1 o 2, obteniendo así una concentración de 25 mg ml⁻¹, los tubos fueron etiquetados con leyendas (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h y 6 h) que corresponde a los tiempos de extracción y fueron insertados a un equipo de baño ultrasónico Elma S40H Elmasonic (Figura 13, en el anexo B se muestra una guía rápida de operación) a una temperatura de 65 °C y a una frecuencia constante de 40-50 Hz. Al cumplirse el tiempo de extracción los tubos con las muestras se sacaron del baño ultrasónico. Se cuantificaron los compuestos fenólicos totales, mediante espectrofotometría Uv-vis.



Figura 13. Equipo de ultrasonido con muestras de la cinética de extracción.

2.5.2. Diseño de experimentos para la extracción ultrasónica

El modelo del diseño se encuentra representado por el modelo de segundo orden, que se presenta en la Ecuación 4:

$$Y_i^u = \beta_0 + \sum_{i=1}^K \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (4)$$

Donde Y_i^u es la variable de respuesta, concentración de fenoles totales (CFT) mg EAG g⁻¹, β_0 es el coeficiente constante, β_i es el coeficiente lineal, β_{ij} es el coeficiente de interacción y β_{ii} es el coeficiente cuadrático y ε es el error aleatorio (Del Ángel *et al.*, 2015; Montgomery, 2004).

En la propuesta de experimentación se tuvieron 2 factores con 2 niveles cada uno, 5 puntos centrales y 4 puntos axiales, con lo cual se generó un diseño con 13 corridas experimentales. El diseño propuesto se aplicó al medio de extracción con los solventes 1 y 2, respectivamente.

La Tabla 8 indica las variables que se contemplaron para realizar la extracción ultrasónica, así como los niveles en sus valores altos y bajos y sus puntos centrales y la codificación de ellas.

Tabla 8. Variables del proceso de extracción ultrasónica.

Variables independientes	Símbolo		Código		
	Sin codificar	Codificado	-1	0	1
Temperatura de extracción (K)	T	X ₁	303	318	333
Tiempo de extracción (min)	t	X ₂	30	60	90

La Tabla 9 muestra el diseño central compuesto que se obtuvo, con el cual se trabajaron las variables en la extracción ultrasónica, en donde la variable de respuesta medida fue la concentración de compuestos fenólicos totales. Además en esta misma tabla se presentan los arreglos de las variables para realizar las extracciones.

Tabla 9. Diseño central compuesto para la extracción ultrasónica.

Código		X ₁ : Temperatura (K)	X ₂ : Tiempo (min)
-1	-1	303	30
-1	1	303	90
1	-1	333	30
1	1	333	90
-1.414	0	297	60
1.414	0	339	60
0	-1.414	318	18
0	1.414	318	102
0	0	318	60
0	0	318	60
0	0	318	60
0	0	318	60
0	0	318	60
0	0	318	60

2.5.3. Extracción ultrasónica en base seca en solventes 1 y 2

Se pesaron muestras de 1 g de hoja de chaya seca y molida (tamaño de partícula de 0.297 mm) y se colocaron en tubos de ensayo de plástico de 50 ml, a los cuales se les añadió 40 ml de solvente 1 o 2, obteniendo así una concentración de 25 mg ml⁻¹, los tubos fueron insertados a un equipo de baño ultrasónico (Elma S40H Elmasonic). Las variables a controlar fueron temperatura y tiempo de extracción, la frecuencia se mantuvo constante en un rango de 40-50 Hz, al cumplirse el tiempo de extracción las muestras fueron sacadas. El procedimiento de Folín-Ciocalteu fue realizado, para la cuantificación de los compuestos fenólicos.

2.5.4. Extracción ultrasónica en base húmeda en solventes 1 y 2

Muestras de 1 g de hoja de chaya fresca (tamaño de 0.5 cm aprox.) fueron colocadas en tubos de ensayo de plástico de 50 ml, a los cuales se les añadió 40 ml del solvente requerido (solvente 1 o 2), obteniendo así una concentración de 25 mg ml⁻¹. Seguidamente las muestras se introdujeron al baño ultrasónico, y se

manipularon la temperatura y el tiempo de extracción, manteniendo la frecuencia constante.

Una vez concluida la extracción, las muestras fueron retiradas del baño ultrasónico y se realizó el procedimiento de cuantificación de los compuestos fenólicos totales, a través de la espectrofotometría Uv-vis.

2.6. Extracción supercrítica

2.6.1. Equipo de extracción supercrítica SFT-150

Para realizar la extracción supercrítica se utilizó el equipo SFT-150 (System of Supercritical Fluid Technologies, Inc.), que se muestra en la Figura 14, con las características que se mencionan a continuación:



Figura 14. Equipo de extracción supercrítica SFT-150.

- Rango de temperatura: ambiente hasta 200 °C
- Presión máxima de operación: 68.9 MPa

- Flujo de CO₂: 330 ml/min
- Tanques para muestras: 100 y 1000 ml
- Aire seco: regulado a 760 kPa
- Suministro de gas: cilindro de CO₂ líquido con tubo dip
- Módulo de adicional: módulo de co-solvente

El aire seco es alimentado, al equipo de extracción supercrítica a través de un compresor equipado con sistema de calentamiento de aire, con lo cual se asegura que el aire suministrado se encuentre seco. En el anexo A se encuentra una guía de uso rápido del equipo.

2.6.1. Diseño de experimentos para la extracción con fluido supercrítico

Para realizar la extracción supercrítica se utilizó un diseño factorial central compuesto del tipo 2², con 2 factores y 2 niveles cada uno, 5 puntos centrales y 4 puntos axiales, con lo cual se generó un diseño con 13 corridas experimentales (Kuehl, 2001).

El modelo del diseño se encuentra representado de manera adecuadas por el modelo de segundo orden, en la Ecuación 5:

$$Y_i^s = \beta_0 + \sum_{i=1}^K \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (5)$$

Donde Y_i^s corresponde a la variable de respuesta, CFT en mg EAG g⁻¹, y β_0 , β_i , β_{ij} y β_{ii} son los coeficientes constantes, lineales, de interacción y cuadráticos, respectivamente, y ε_i es el error aleatorio (Del Ángel *et al.*, 2015).

Las variables que fueron contempladas durante la extracción supercrítica se muestran en la Tabla 10, en donde además se muestran las condiciones de operación manipuladas durante el proceso de extracción y los rangos de dichas variables, además de que se presenta la codificación empleada. Mientras que el

diseño utilizado es mostrado en la Tabla 11, que se obtuvo con el software STATGRAPHICS Centurion XV.I®, y en el cual se analizó el diseño propuesto y en donde las variables de respuesta serán el rendimiento de extracción y la concentración de compuestos fenólicos.

Tabla 10. Variables del proceso de extracción supercrítica.

Variables independientes	Símbolo		Código		
	Sin codificar	Codificado	-1	0	1
Temperatura de extracción (K)	T	X ₁	303	318	333
Presión (psi)	P	X ₂	2000	4000	6000

Tabla 11. Diseño central compuesto para la extracción supercrítica.

Código		Temperatura (K)	Presión (psi)
1	1	333.00	6000.00
-1.414	0	296.79	4000.00
1	-1	333.00	2000.00
0	0	318.00	4000.00
0	0	318.00	4000.00
0	1.414	318.00	6828.43
0	-1.414	318.00	1171.57
0	0	318.00	4000.00
-1	-1	303.00	2000.00
-1	1	303.00	6000.00
0	0	318.00	4000.00
0	0	318.00	4000.00
1.414	0	339.21	4000.00

2.6.2. Extracción supercrítica en base seca

Se pesaron muestras de 10 g de hoja de chaya seca y se introdujeron en el cartucho porta-muestras, previo a esto el equipo de extracción supercrítica (SFT-150 System of Supercritical Fluid Technologies, Inc.) se encendió 30 min antes de introducir la muestra con el objetivo de lograr la estabilización interna

del equipo y con esto asegurar que el CO₂ que ingresa al equipo se encuentra en estado líquido.

Una vez estabilizado el equipo la muestra se colocó en el recipiente de acero inoxidable con una capacidad de 100 ml, el cual funge como cámara de extracción y todas las conexiones fueron cerradas debidamente. En este punto el frasco recolector de extracto con tapa septa se pesó y colocó en el lugar de recolección de extracto del equipo realizando las conexiones pertinentes para disipar el CO₂ a la atmósfera, no sin antes medir el flujo del solvente de extracción (CO₂) con un rotámetro. El diagrama del equipo de extracción supercrítica se muestran en la Figura 15.

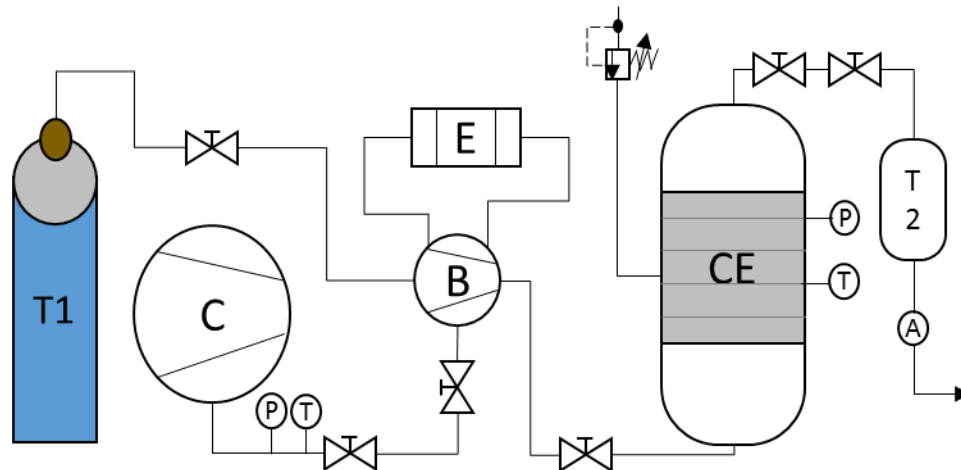


Figura 15. Diagrama del equipo de extracción supercrítica: (T1) Tanque de CO₂, (C) compresor de aire, (B) bomba de diafragma, (E) enfriador, (CE) cámara de extracción, (T2) recipiente separador y recolector de extracto.

Pasados los 30 min de espera para que el equipo opere adecuadamente (recomendación del fabricante), se inició la apertura de las válvulas de CO₂ y de aire seco (proveniente de un compresor equipado con secador) y se inició la apertura de las válvulas respectivas del equipo de extracción, programando la temperatura en el panel de control y controlando la presión de forma manual, hasta llegar a las condiciones de operación establecidas por el diseño de experimentos.

Una vez establecidas las condiciones de operación se llevó a efecto un tiempo de remojo, que consiste en extracción de 20 min de la materia prima en modo estático, que permite que la extracción inicie desde ese momento y por tanto el CO₂ que se encuentre en la cámara de extracción se vaya enriqueciendo con el extracto.

Pasado este tiempo se inicia la extracción dinámica durante un tiempo de 20 min, posterior a este tiempo se cierran las válvulas de alimentación tanto de CO₂ como del aire seco y se dejan abiertas las válvulas de salida del extracto para realizar el despresurizado del sistema y tener una recuperación completa del extracto. Para finalizar, una vez despresurizado el equipo se procede a pesar el frasco con el extracto y determinar el rendimiento de extracción mediante la Ecuación 6:

$$y = \frac{\textit{extracto}}{\textit{muestra}} \times 100 \quad (6)$$

En donde:

y = rendimiento de extracción en %

extracto = cantidad de extracto obtenido en mg

muestra = cantidad muestra inicial en mg

El extracto se retiró del frasco recolector con la ayuda de un baño con agua a temperatura aproximada de 50 °C y uso del solvente 1 o 2, según correspondiera (25 mg ml⁻¹), la muestra se guardó en tubos de ensayo protegidos de la luz y en refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

Para realizar la cuantificación por espectrofotometría Uv-vis, a las muestras se les realizó el procedimiento descrito anteriormente en la sección de cuantificación de compuestos fenólicos totales.

2.7. Análisis por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Las muestras de los extractos con los solventes 1 y 2, que se obtuvieron tanto en extracción ultrasónica como supercrítica, se caracterizaron estructuralmente mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), con el objetivo de determinar los grupos funcionales presentes en las muestras y observar si existe la presencia del flavonoide quercetina.

Cada muestra se mezcló con bromuro de potasio (KBr) (Sigma Aldrich grado FT-IR) para la preparación de una pastilla. Posteriormente, se analizaron en un espectrómetro FT-IR de la marca Shimadzu, modelo IRAffinity-1 (Figura 16), en un rango de número de onda de 400-4000 cm^{-1} , a una resolución de 2 cm^{-1} y 40 escaneos. Los datos fueron procesados en el Software IRsolution™.



Figura 16. Espectrómetro FT-IR Shimadzu Modelo IRAffinity-1.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación de humedad

3.1.1. Base húmeda

La determinación de humedad de los alimentos, en este caso la hoja de chaya, de acuerdo a la (Secretaría de Salud, 1995), es importante realizarlo para conocer la cantidad de humedad presente en la matriz de estudio y la información obtenida se utiliza como referente para evitar el crecimiento de microorganismos que deterioren la muestra y por tanto no posea la calidad sanitaria debida. La hoja de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst) en base húmeda presentó una humedad promedio del 74.47 % tal y como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Tabla de humedad en base húmeda.

Muestra	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	% Peso seco	% Humedad	% Promedio de Humedad
1	79.15	18.01	22.75	77.25	
2	89.4	21.53	24.08	75.92	74.47
3	96.5	28.7	29.74	70.26	

Las humedades obtenidas son similares a los obtenidos por Spell and Bressani (2011), quien obtuvo 76.36 % en promedio, y Jiménez-Aguilar and Grusak (2015) reportaron 89.60 % de humedad al aplicar la técnica de gravimetría secando a 70 °C durante 3 días, para la misma especie.

3.1.2. Base seca

La Tabla 13 muestra los datos obtenidos sobre el porcentaje de humedad de la chaya, los cuales son similares a los obtenidos por Fagbohun (2012), quien obtuvo 5.35%, y Shittu (2014), quien reportó humedades de 2.86 ± 0.02 % al aplicar la técnica de gravimetría a peso constante, para la misma especie *C. aconitifolius*.

Tabla 13. Determinación de humedad en base seca mediante técnica gravimétrica a la hoja de *C. aconitifolius*.

Muestra	Código de tara	Peso de la tara antes del secado (g)	Peso de la tara con muestra (g)	Peso de la tara después del secado (g)	% Humedad en cada muestra	% Promedio de Humedad
1	MU	3.5364	5.5364	5.4607	3.785	
2	MF	3.4843	5.4843	5.4155	3.44	3.61
3	SG	3.4561	5.4561	5.384	3.605	

Al comparar los resultados obtenidos de humedad de nuestra matriz vegetal de estudio con otras hojas estudiadas, como por ejemplo la hoja de aguacate (*Persea americana*), la humedad obtenida fue el equivalente a 5.33 % obtenido por Arukwe (2012) valor que observamos está ligeramente encima del obtenido en nuestra matriz vegetal en base seca.

En tanto Khan (2013) determinó la humedad de la hoja de repollo (*Brassica oleraceae var. Capitata*) en 88.48%, para la hoja de espinaca (*Spinacia oleraceae*) obtuvo 90.21 % y para la hoja de cilantro (*Coriandrum sativum*) obtuvo 83.58%, valores que obtuvo en base húmeda, lo que nos indica que la hoja de chaya tiene un contenido de humedad menor que estas especies reportadas. Cuando Khan (2013) hizo el análisis en base seca obtuvo 24 %, 14.51 % y 10.49 % respectivamente, observando que al compararlo con el 3.61% que se obtuvo de la hoja de chaya indica que la muestra contiene menor cantidad de agua en forma de humedad en las muestras.

Por otra parte Ooi (2012) reporta otra planta de uso medicinal, la hoja de corazón de hombre (*Peperomia pellucida*) con una humedad en base fresca de 93.14 % y en base seca del 8.33 %, en base fresca casi un 20 % mayor a la obtenida en la hoja de chaya y en base seca más del doble.

Después de comparar los resultados obtenidos con datos de la misma especie y con datos de otros tipos de hojas vegetales, la humedad presente en la hoja de chaya es más baja comparada con las demás. De acuerdo a Kavitha (2013), mientras menor sea la humedad en la matriz de estudio se disminuye la

acción bacteriana que puede surgir y destruir la hoja. Además de permitir realizar la extracción posteriormente con mayor eficiencia, debido a que el agua presente en forma de humedad, no interfiere en los resultados.

3.2. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales.

En las Tablas 14 y 15 se muestran los resultados de las absorbancias obtenidas a 725 nm y el promedio de ellas, utilizando el solvente 1 y 2, respectivamente, con las cuales se construyen las curvas de calibración por cada solvente utilizado, solvente 1 (Figura 17) y solvente 2 (Figura 18).

Tabla 14. Tabla de absorbancias de la curva de calibración con el solvente 1.

Muestra	Concentración (mg ml ⁻¹)	Absorbancia (1)	Absorbancia (2)	Absorbancia (3)	Promedio
1 (B)	0	0	0	0	0.000
2	0.04	0.002	0.094	0.083	0.060
3	0.08	0.004	0.28	0.25	0.178
4	0.12	0.007	0.538	0.528	0.358
5	0.16	0.009	0.754	0.869	0.544
6	0.2	0.016	1.073	1.134	0.741

Tabla 15. Tabla de absorbancia de la curva de calibración con el solvente 2.

Muestra	Concentración (mg ml ⁻¹)	Absorbancia (1)	Absorbancia (2)	Absorbancia (3)	Absorbancia (4)	Absorbancia Promedio
1 (B)	0	0	0	0	0	0.0000
2	0.04	0.07	0.183	0.096	0.107	0.1140
3	0.08	0.202	0.44	0.331	0.357	0.3325
4	0.12	-	0.768	0.643	0.595	0.6687
5	0.16	0.733	0.969	1.052	0.818	0.8930
6	0.2	0.942	1.553	1.216	1.047	1.1895

Nota: la absorbancia fue medida a 725 nm y los valores obtenidos se utilizan como unidades arbitrarias (u.a.).

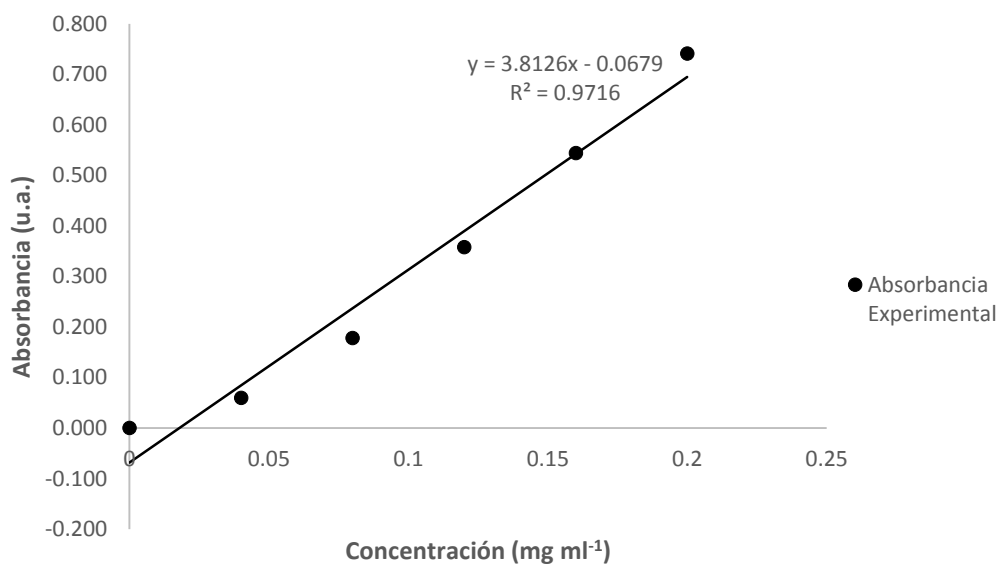


Figura 17. Curva de calibración de ácido gálico con el solvente 1.

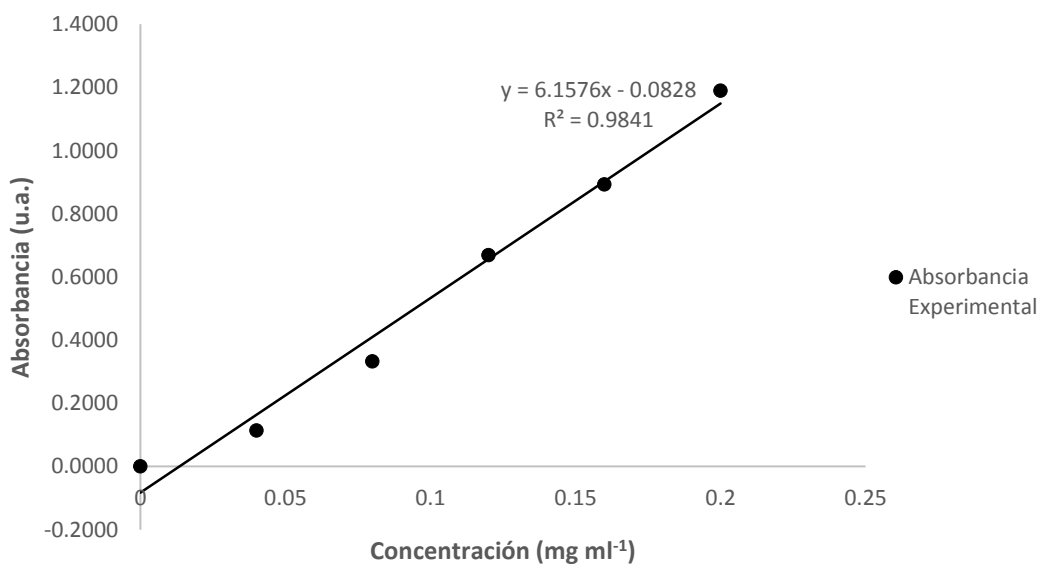


Figura 18. Curva de calibración de ácido gálico con el solvente 2.

Los experimentos para construir la curva de calibración se repitieron por triplicado y en ambas curvas de calibración se obtuvo una R^2 mayor al 90 %, lo que indica que las curvas de calibración se pueden utilizar de manera satisfactoria (Gutiérrez and De la Vara, 2008; Montgomery, 2004), por lo cual, se

utilizaron para cuantificar los compuestos fenólicos contenidos en los extractos de chaya obtenidos por las técnicas de extracción asistida por ultrasonido y por extracción supercrítica.

3.3. Extracción ultrasónica

3.3.1. Cinética de extracción ultrasónica

En las Tablas 16 y 17, se muestran las concentraciones totales de fenoles obtenidos al aplicar la técnica para determinar la cinética de extracción por ultrasonido con la aplicación de los solventes 1 y 2, respectivamente.

Tabla 16. Concentraciones obtenidas mediante cinética de extracción (solvente 1).

Muestra	Tiempo (h)	Absorbancia: Blanco	Absorbancia: dilución (2.5 mg ml ⁻¹)	CFT (mg EAG g ⁻¹)
1	1	0	0.126	22.454
2	2	0	0.105	19.892
3	3	0	0.106	20.014
4	4	0	0.114	20.990
5	5	0	0.113	20.868
6	6	0	0.117	21.356

Tabla 17. Concentraciones obtenidas mediante cinética de extracción (solvente 2).

Muestra	Tiempo (h)	Absorbancia: Blanco	Absorbancia: dilución (2.5 mg ml ⁻¹)	CFT (mg EAG g ⁻¹)
1	1	0	0.219	21.320
2	2	0	0.215	21.060
3	3	0	0.178	18.618
4	4	0	0.199	20.002
5	5	0	0.214	20.988
6	6	0	0.212	20.844

Los experimentos se efectuaron bajo las mismas condiciones, únicamente realizando el cambio de solvente. Se observó que los resultados con mayor rendimiento de concentración total de fenoles fue a 1 h con 22.454 y 21.320 mg EAG g⁻¹, para el solvente 1 y 2, respectivamente, a la temperatura de 65 °C y frecuencia de 40-50, este dato se utilizó como referencia sobre el tiempo de extracción y aplicado al diseño de experimentos y la experimentación con ultrasonido.

3.3.2. En base seca utilizando con el solvente 1

En la Tabla 18 se muestran los resultados de compuestos fenoles, que se obtuvieron después de realizar la cuantificación por espectrofotometría Uv-vis, en los extractos de la hoja de chaya en base seca con el solvente 1.

Tabla 18. Concentración de fenoles totales en el solvente 1 (mg EAG g⁻¹).

Código		X ₁ : Temperatura (K)	X ₂ : Tiempo (min)	Y _{S1} ^U : CFT (mg EAG g ⁻¹)
-1	-1	303	30	21.096
-1	1	303	90	30.720
1	-1	333	30	21.240
1	1	333	90	22.104
-1.414	0	297	60	23.436
1.414	0	339	60	23.544
0	-1.414	318	18	24.156
0	1.414	318	102	28.440
0	0	318	60	21.356
0	0	318	60	21.112
0	0	318	60	20.989
0	0	318	60	21.234
0	0	318	60	22.716

Estos datos se analizaron estadísticamente con ayuda del software STATGRAPHICS Centurion XV.I® y se realizó el análisis de varianza (ANOVA), teniendo como variable de respuesta los compuestos fenólicos totales, que

presentaron cambios significativos ($p < 0.05$) como efecto tanto de la temperatura como del tiempo de extracción. Como se puede observar en la Tabla 19. Así también, el ANOVA indicó que hay efectos de interacción y cuadráticos entre los factores y el polinomio de respuesta obtenido por regresión está dado por la Ecuación 7:

$$Y_{s1}^u = 21.41 - 2.07982X_1 + 4.13663X_2 - 4.38X_1X_2 + 1.4564X_1^2 + 4.26441X_2^2 \quad (7)$$

Tabla 19. Tabla de ANOVA para base seca en medio etanólico.

	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Valor-p
• X_1	1	8.651	8.651	17.490	0.014
• X_2	1	34.223	34.223	69.170	0.001
• X_1X_2	1	19.184	19.184	38.770	0.003
• X_1^2	1	3.690	3.690	7.460	0.05
• X_2^2	1	31.630	31.630	63.920	0.001
• Falta de ajuste	3	14.189	4.729	9.560	0.027
• Error puro	4	1.979	0.494775		
Modelo	5				
Total	12	111.286			

Además se obtuvo una R^2 de 85.47 % con lo cual se muestra que se evaluaron las condiciones adecuadas en los factores de estudio, por lo que se explica de manera satisfactoria la respuesta (Y_{s1}^u). En tanto la R^2 ajustada es de 75.09 %, que muestra una correcta correlación entre las variables involucradas en el diseño propuesto. Se observó que el valor máximo obtenido es de 30.72 mg EAG g^{-1} y este se refleja en los valores óptimos a mayor tiempo (90 min) y menor temperatura (30 °C).

Se generó la superficie de respuesta que se muestra en la Figura 19, a partir del polinomio de respuesta encontrado. En donde se observaron las contribuciones negativas que se obtuvieron como parte de los efectos generados por la temperatura en su forma lineal, y en su interacción con el tiempo de extracción, mientras que los efectos restantes tuvieron contribución positiva y que

se reflejaron en formar una curva con una tendencia de pendiente negativa que se extendió hacia un punto alto de concentración de compuestos fenólicos totales (CFT).

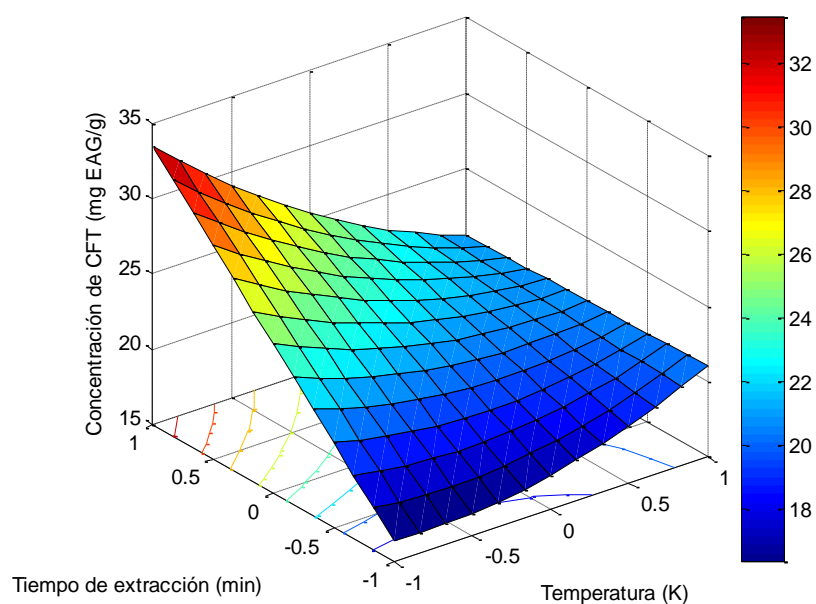


Figura 19. Superficie de respuesta de la extracción en base seca en solvente 1.

3.3.3. En base seca utilizando el solvente 2

La Tabla 20 muestra los resultados obtenidos expresados en concentración de fenoles totales, los cuales fueron obtenidos al realizar la extracción con el solvente 2.

Al realizar la extracción ultrasónica con muestra seca y con el solvente 2, los mejores resultados se alcanzan a una temperatura de 60 °C y un tiempo de 90 min obteniendo 19.62 mg EAG g⁻¹.

Tabla 20. Concentración de fenoles totales en medio acuoso (mg EAG g⁻¹).

	Código	X ₁ : Temperatura (K)	X ₂ : Tiempo (min)	Y _{S2} ^U : CFT (mg EAG g ⁻¹)	
	-1	-1	303	30	10.368
	-1	1	303	90	17.568
	1	-1	333	30	16.848
	1	1	333	90	19.620
	-1.414	0	297	60	17.820
	1.414	0	339	60	17.100
	0	-1.414	318	18	15.588
	0	1.414	318	102	17.496
	0	0	318	60	16.632
	0	0	318	60	16.956
	0	0	318	60	16.704
	0	0	318	60	16.92
	0	0	318	60	16.704

Los resultados se evaluaron mediante el análisis de varianza (Tabla 21), en donde se observa que los compuestos fenólicos totales presentaron efectos significativos ($p < 0.05$) de la temperatura y el tiempo de extracción, así como efectos simples y de interacción.

Tabla 21. Tabla de ANOVA para base seca en medio acuoso.

	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Valor-p
• X ₁	1	18.199	18.199	866.810	0.000
• X ₂	1	24.860	24.860	1184.090	0.000
• X ₁ X ₂	1	4.902	4.902	233.470	0.000
• Falta de ajuste	1	1.034	1.034	49.260	0.002
• Error puro	4	0.084	0.021		
Modelo	4				
Total	8	49.079			

La R² fue de 97.72 %, lo cual muestra que los factores influyeron estadísticamente en el resultado obtenido, y la R² ajustada del 96.35 % que mostró la variabilidad de los factores correlacionados para ajustarse al modelo

presentado, y esto es válido de acuerdo a lo reportado en la literatura (Del Ángel *et al.*, 2015) y por tanto el polinomio de respuesta ese muestra en la ecuación 8:

$$Y_{s2}'' = 16.48 + 2.1323X_1 + 2.4938X_2 - 1.1062X_1X_2 \quad (8)$$

La Figura 20 presenta la superficie de respuesta de la extracción por ultrasonido realizada a la muestra en base seca con el solvente 2. Presentó curvatura hacia los extremos laterales, y se considera no relevante desde el punto de vista estadístico al presentar un valor $p > 0.001$ en cuanto a falta de ajuste y este efecto se presentó por las interacciones existentes entre los factores de estudio. Por otra parte, los efectos de los factores de estudio contribuyeron positivamente en su forma lineal y se observó una aportación negativa producto de la interacción de ambos factores.

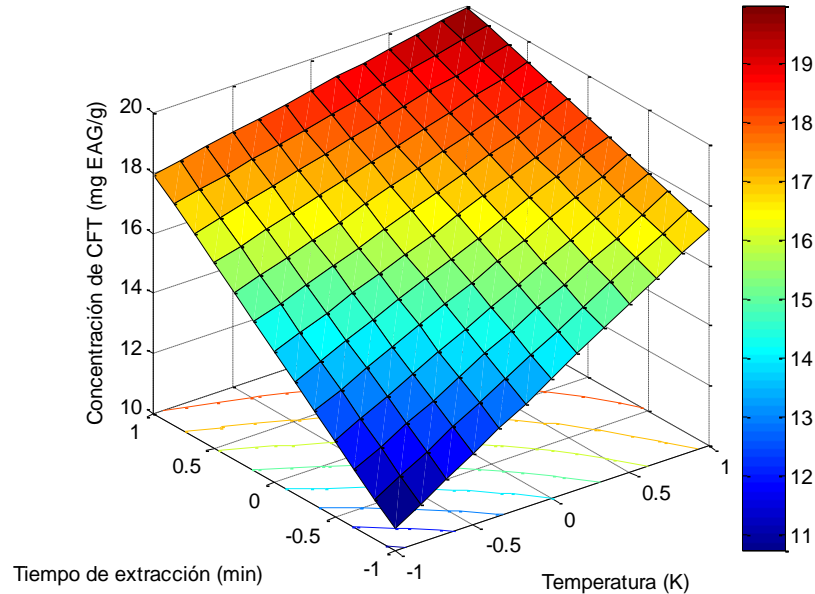


Figura 20. Superficie de respuesta de la extracción en base seca en solvente 2.

3.3.4. En base húmeda utilizando el solvente 1

Al realizar el procedimiento de extracción utilizando la hoja de chaya en base húmeda se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 22, las concentraciones son mas bajas al compararlas con las obtenidas en base seca para el mismo solvente.

Tabla 22. Concentración de fenoles totales con el solvente 1 (mg EAG g⁻¹).

Código		X ₁ : Temperatura (K)	X ₂ : Tiempo (min)	Y _{s1} ^{uh} : CFT (mg EAG g ⁻¹)
-1	-1	303	30	3.600
-1	1	303	90	6.012
1	-1	333	30	7.200
1	1	333	90	7.200
-1.414	0	297	60	6.000
1.414	0	339	60	9.120
0	-1.414	318	18	3.840
0	1.414	318	102	10.800
0	0	318	60	10.320
0	0	318	60	10.800
0	0	318	60	10.800
0	0	318	60	11.040
0	0	318	60	10.560

Los CFT que se obtuvieron como respuesta, generaron efectos significativos ($p < 0.05$) de la temperatura y el tiempo de extracción, así como efectos de interacción cuadráticos. En la Tabla 23, se expone el ANOVA del diseño de extracción, el polinomio de respuesta correspondiente se presenta en la Ecuación 9, y se construyó la superficie de respuesta del diseño (Figura 21).

$$Y_{s1}^{uh} = 10.704 + 1.15004X_1 + 1.53187X_2 - 0.603X_1X_2 - 1.93126X_1^2 - 2.05126X_2^2 \quad (9)$$

Se observa que los mejores resultados se obtuvieron para los puntos centrales a una temperatura de 45 °C y un tiempo de extracción de 60 min,

obteniendo una concentración de fenoles totales máxima de 11.04 mg EAG g⁻¹, con el solvente 1 de extracción. Además se presentaron efectos no lineales que fueron reflejados en la curvatura presentada en la superficie de respuesta con una R²_{adj} de 78.62 %.

Tabla 23. Tabla de ANOVA para base húmeda en medio etanólico.

	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Valor-p
• X ₁	1	10.580	10.580	141.30	0.000
• X ₂	1	18.772	18.772	250.710	0.000
• X ₁ X ₂	1	1.454	1.454	19.420	0.015
• X ₁ ²	1	25.950	25.950	346.500	0.000
• X ₂ ²	1	29.271	29.271	390.900	0.000
• Falta de ajuste	3	11.050	3.683	49.190	0.001
• Error puro	4	0.300	0.075		
Modelo	5				
Total	12	91.016			

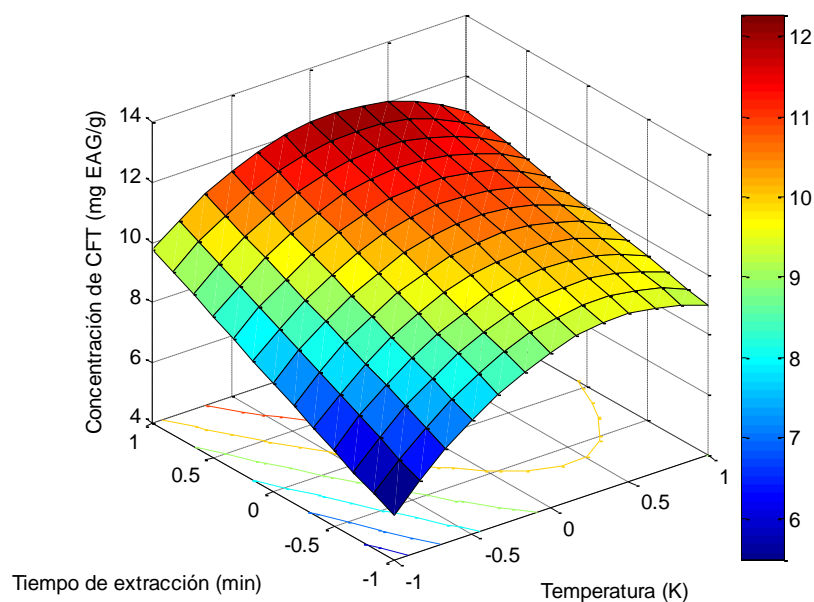


Figura 21. Superficie de respuesta de la extracción en base húmeda en solvente 1.

3.3.5. En base húmeda utilizando el solvente 2

Realizando la extracción con el solvente 2 con hoja de chaya en base húmeda, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Concentración de fenoles totales en solvente 2 (mg EAG g⁻¹).

Código		X1: Temperatura (K)	X2: Tiempo (min)	Y_{s2}^{uh} : CFT (mg EAG g ⁻¹)
-1	-1	303	30	3.420
-1	1	303	90	3.672
1	-1	333	30	6.189
1	1	333	90	3.284
-1.414	0	297	60	4.428
1.414	0	339	60	6.442
0	-1.414	318	18	2.772
0	1.414	318	102	7.326
0	0	318	60	5.811
0	0	318	60	5.558
0	0	318	60	5.811
0	0	318	60	5.558
0	0	318	60	5.684

La temperatura y el tiempo de extracción generaron efectos significativos ($p < 0.05$) sobre la concentración de fenoles totales (variable de respuesta), con efectos lineales, de interacción, y cuadráticos. El polinomio de respuesta se presenta en la Ecuación 10:

$$Y_{s2}^{uh} = 4.99852 + 0.595425X_1 - 0.663325X_2 - 0.789325X_1X_2 \quad (10)$$

Se obtuvieron los mejores resultados para los puntos centrales a una temperatura de 60 °C y un tiempo de extracción de 30 min, con una concentración de fenoles totales máxima promedio de 7.33 mg EAG g⁻¹.

El ANOVA del diseño se presenta en la Tabla 25, en donde los CFT como respuesta, se vieron afectados por los efectos significativos lineales, positivo para la temperatura y negativo para el tiempo de extracción, así como de interacción negativa entre los factores de estudio ($p < 0.05$).

Tabla 25. ANOVA de la extracción en medio acuoso en base húmeda.

	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Valor-p
• X_1	1	1.420	1.420	88.90	0.001
• X_2	1	1.760	1.760	110.330	0.001
• X_1X_2	1	2.492	2.492	156.23	0.000
• Falta de ajuste	1	5.290	5.290	331.580	0.000
• Error puro	4	0.064	0.016		
Modelo	4				
Total	8	11.023			

La R^2 fue de 51.44 % con lo cual se muestra una tendencia poco favorable de los factores de estudio para la aceptación del modelo propuesto, mientras R^2_{adj} fue de 22.30 % lo que indica que no existe una correlación entre los factores, lo cual generó una disminución completa de los CFT obtenidos en esta extracción.

Con los resultados obtenidos en el polinomio de respuesta se generó una superficie de respuesta (Figura 22). Se observó la ausencia de curvatura, tal y como se mostró en el ANOVA, por lo que la tendencia de la superficie fue de manera lineal, con muy poco estiramiento para alcanzar un punto alto de concentración de CFT.

3.3.6. Análisis de resultados de extracción ultrasónica

Se realizó la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos obtenidos a partir de la hoja de chaya en donde se obtuvieron resultados estadísticamente aceptables, el tratamiento (90 min y 30 °C) fue el que otorgó mayor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos de la hoja de chaya en base seca con el solvente 1, obteniendo 30.72 mg EAG g^{-1} . Mostrando mayor

resultado de extracción al obtenido por García-Rodríguez (2014) quien obtuvo 35.70 ± 24.60 mg EAG g^{-1} al realizar la técnica de extracción por maceración con mezcla de solventes orgánicos, mientras que Jiménez-Aguilar (2015) obtuvo un extracto con 5.66 ± 0.59 mg EAG g^{-1} de muestra fresca por medio de la técnica de maceración con agitación mecánica, el cual es menor al obtenido en esta investigación.

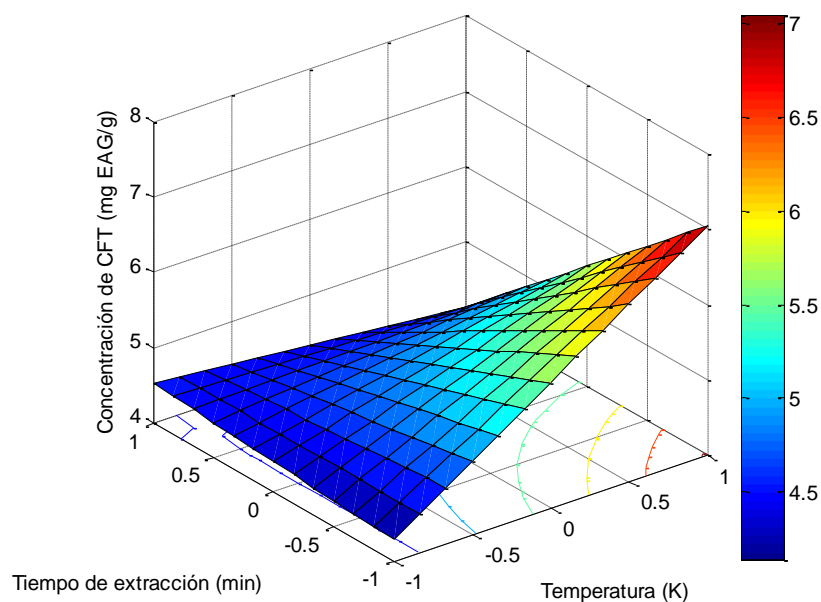


Figura 22. Superficie de respuesta de la extracción en base húmeda con el solvente 2.

Por otra parte Valenzuela (2015) obtuvo para la variedad *Cnidocolus chayamansa* perteneciente a la misma familia *Euphorbiaceae* un contenido de compuestos fenólicos de 6.34 mg EAG ml^{-1} , obteniéndolo mediante extracción por infusión, valor menor al obtenido por ultrasonido para la especie *C. aconitifolius*, aunque Loarca-Piña (2010) reporta un valor más alto al reportado por Valenzuela (2015) para la misma especie (71.3 ± 1.7 mg EAG g^{-1}) dato obtenido por maceración con una mezcla de solventes hexano-acetona, los

cuales son solventes tóxicos y difíciles de eliminar al momento de purificar el extracto.

Para los demás tratamientos realizados se observó que utilizando materia prima en base seca y el solvente 2, se obtuvo una concentración de 19.62 mg EAG g⁻¹ de compuestos fenólicos totales, que comparada con el tratamiento anterior representa un 63.86 % del total de extracto de interés.

Cuando los análisis se realizaron a la matriz vegetal en base húmeda se obtuvo menor cantidad de fenoles totales con 11.04 y 6.1895 mg EAG g⁻¹, para el solvente 1 y 2, respectivamente. Respecto a los resultados obtenidos cuando la hoja de chaya se encontraba seca, se obtuvo un rendimiento del 35.94 % para el solvente 1 y de 20.15 % para el solvente 2.

La ventaja de estos resultados con respecto a los publicados radica en el uso de solventes menos tóxicos, dañinos y de fácil recuperación, así como del sistema de extracción por lo cual se obtiene mayor rendimiento de extracción de los fenoles totales a partir la hoja de chaya.

3.4. Extracción supercrítica

3.4.1. En base seca utilizando el solvente 1

Después de obtener los extractos de la hoja de chaya en base seca mediante la extracción supercrítica se realizó el procedimiento de Folín-Ciocalteu utilizando el solvente 1 y apoyado mediante la espectrofotometría Uv-vis, con lo que se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT), estos resultados, así como el rendimiento de extracción se presentan en la Tabla 26.

La respuesta (CFT) presentó cambios significativos ($p < 0.05$) como efecto de la interacción lineal por parte de la temperatura, no así por parte de la presión, ni de la interacción entre ellos, lo cual se puede constatar en la Tabla 27, en la cual se presenta el análisis de varianza realizado al diseño propuesto.

Tabla 26. Concentración de fenoles totales en el solvente 1 (mg EAG g⁻¹).

Código		X ₁ : Temperatura (K)	X ₂ : Presión (psi)	Y ₁ ^S : CFT (mg EAG g ⁻¹)	Rendimiento %
1	1	333.000	6000.00	18.667	1.070
1	-1	333.000	2000.00	16.000	0.302
0	0	318.000	4000.00	30.667	1.080
0	0	318.000	4000.00	36.000	0.888
0	0	318.000	4000.00	33.400	0.967
-1	-1	303.000	2000.00	48.000	0.538
-1	1	303.000	6000.00	53.333	0.536
0	0	318.000	4000.00	32.000	1.043
0	0	318.000	4000.00	30.667	1.307

Con el análisis estadístico se encontraron los coeficientes que forman el polinomio de respuesta, que se muestran en la Ecuación 11.

$$Y_{S1}^S = 33.1927 - 16.6665X_1 + 2X_2 - 0.6665X_1X_2 \quad (11)$$

Tabla 27. Tabla de ANOVA para extracción supercrítica en base seca con el solvente 1.

	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Valor-p
• X ₁	1	1111.090	1111.090	224.81	0.000
• X ₂	1	16.000	16.000	3.240	0.132
• X ₁ X ₂	1	1.777	1.777	0.360	0.575
• Error puro	5	24.711	4.942		
Modelo	3				
Total	8	1153.580			

Además se obtuvo una R²_{adj} del 96.57 % y de acuerdo a (Kuehl, 2001) este valor de R representa una aceptación del modelo propuesto. Además se observa que el valor máximo promedio obtenido es de 53.333 mg EAG g⁻¹ y este se refleja en los valores de menor temperatura (30 °C) y a mayor presión (6000 psi).

Una superficie de respuesta se construyó con ayuda del polinomio de respuesta. La superficie se presenta en la Figura 23, teniendo como respuesta los CFT. En donde se observó una tendencia completamente lineal encaminada a obtener valores máximos cuando la temperatura se observó en sus valores mínimos.

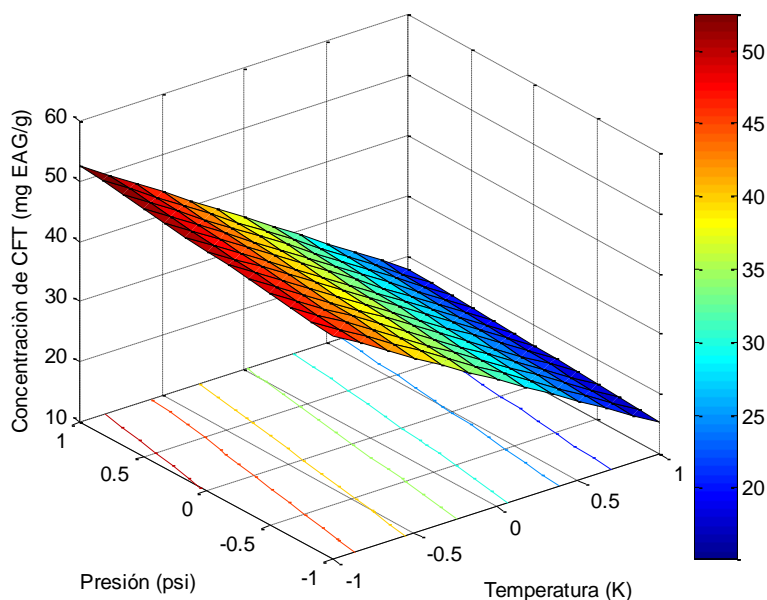


Figura 23. Superficie de respuesta de la extracción supercrítica en base seca con el solvente 1.

3.4.2. En base seca utilizando el solvente 2

La cuantificación de los compuestos fenólicos totales (CFT), se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Othman (2007), empleando la técnica de Folín-Ciocalteu para cuando se utilizó el solvente 2 y los resultados obtenidos, así como el rendimiento de la extracción supercrítica se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Concentración de fenoles totales en el solvente 2 (mg EAG g⁻¹).

Código		X ₁ : Temperatura (K)	X ₂ : Presión (psi)	Y ₃₂ ^S : CFT (mgEAG g ⁻¹)	Rendimiento %
1	1	333.00	6000.00	2.1053	1.761
1	-1	333.00	2000.00	11.930	0.669
0	0	318.00	4000.00	9.123	1.380
0	0	318.00	4000.00	11.930	1.742
0	0	318.00	4000.00	7.018	1.371
-1	-1	303.00	2000.00	9.123	0.698
-1	1	303.00	6000.00	16.842	1.095
0	0	318.00	4000.00	11.930	1.235
0	0	318.00	4000.00	10.526	1.416

El ANOVA (Tabla 29) se aplicó a los resultados obtenidos con la ayuda del software estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.I® y dicho análisis mostró que solamente hubieron efectos lineales y de interacción entre factores que provocaron cambios significativos ($p < 0.05$) en la respuesta (CFT), con excepción de los efectos lineales provocados por la presión, los cuales estadísticamente no fueron significativos.

Tabla 29. Tabla de ANOVA para extracción supercrítica en base seca con el solvente 2.

	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Valor-p
• X ₁	1	35.580	35.580	10.250	0.024
• X ₂	1	1.110	1.110	0.320	0.600
• X ₁ X ₂	1	76.950	76.950	22.160	0.005
• Error puro	5	17.360	3.471		
Modelo	3				
Total	8	130.993			

Se obtuvo un valor de R²_{adj} de 78.79 % lo que explica la variabilidad de los factores hacia el modelo (Del Ángel *et al.*, 2015) y una aceptación del mismo.

Por otra parte, se obtuvieron los coeficientes con los cuales se construyó el polinomio de respuesta de la Ecuación 12. Además con este polinomio se generó la superficie de respuesta que se muestra en la Figura 24.

$$Y_{S_2}^S = 10.0585 - 2.98245X_1 - 0.5263X_2 - 4.38595X_1X_2 \quad (12)$$

Se observa que el valor máximo obtenido es de 16.842 mg EAG g⁻¹ CFT y este se refleja en los valores de menor temperatura (30 °C) y a mayor presión (6000psi). Aunque se visualizó que no existió una tendencia hacia obtener una mayor concentración de CFT, quedándose este resultado muy debajo de lo obtenido solvente 1.

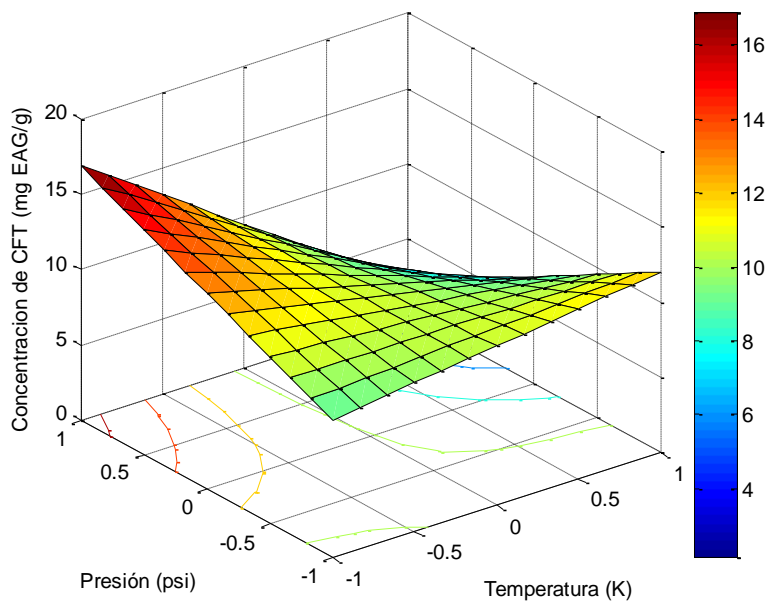


Figura 24. Superficie de respuesta de la extracción supercrítica en base seca en con el solvente 2.

3.5. Determinación por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

La Figura 25 presenta el espectro que corresponde a la muestra de chaya seca en polvo sin tratamiento, mientras que en la Tabla 30, se presentan las frecuencias y las atribuciones principales de los modos vibracionales de dicho espectro.

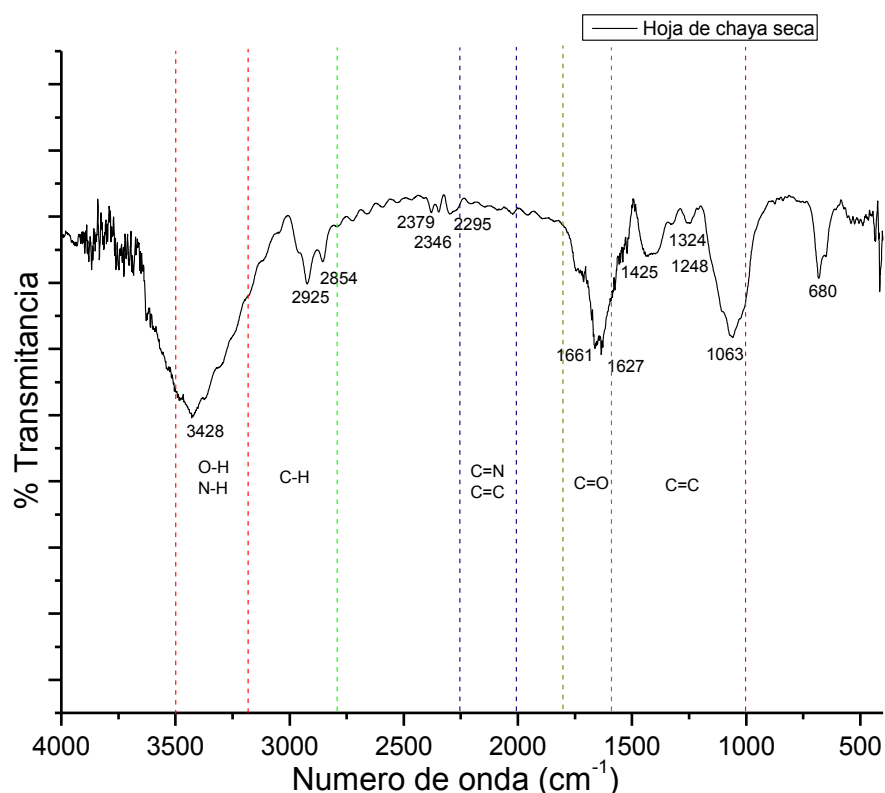


Figura 25. Espectro de FT-IR de la hoja chaya seca.

En la región de vibración de estiramiento X-H que comprende el intervalo entre 4000-2500 cm⁻¹ (Kamaranga *et al.*, 2012), la vibración de enlace OH se asignó a 3428 cm⁻¹ (Movasaghi *et al.*, 2008; Ostrowska-Ligeza *et al.*, 2012). Este tipo de vibración de enlace es característica para los grupos funcionales como alcoholes, fenoles, aminas y ácidos grasos (Badertscher *et al.*, 2009; Kamaranga *et al.*, 2012). Los modos vibracionales presentados por los grupos funcionales en

esta región están acoplados a grupos adyacentes por lo cual no son considerados como independientes. Por lo anterior, la presencia de ácidos grasos se puede descartar debido a que deberían presentar una banda de confirmación alrededor de 1744 cm^{-1} , que corresponde al enlace C=O del grupo carbonilo de los triglicéridos o fosfolípidos (Castorena-García *et al.*, 2011).

Tabla 30. Tabla de modos vibracionales del espectro de la Figura 25 que corresponde a la hoja de chaya seca sin tratamiento.

(cm^{-1})	Modo vibracional	Atribución principal
3428	ν_{AS} (OH)	Alcohol, Fenol, Flavonoide
2925	$\nu_{AS}(\text{CH}_2)$	Alcohol, Fenol, Flavonoide (grupo metileno)
2854	$\nu_S(\text{CH}_2)$	Alcohol, Fenol, Flavonoide (grupo metileno)
2379	ν_{AS} (X-H)	Aminas secundarias
2346	ν_t (P-H)	Derivados del fósforo (Fósforo)
2295	ν (P-OH)	Derivados del fósforo (Fitatos)
1661	ν_S (C=O)	Cetonas aromáticas, Amidas I
1627	δ_t (H-N-H)	Amida I, Aminas I
1425	δ (O-H)	Ácido carboxílico, alcoholes y fenoles, flavonoides
1325	δ_β (O-H)	Alcohol, Fenol, Flavonoide
1248	ν (C-O)	Fenol, Flavonoide
1063	ν (C-O)	Alcohol primario, aromático, fenol
680	δ_β (O-H)	Fenol, Flavonoides

ν = estiramiento; δ = flexión; AS= Asimétrica; S= Simétrica; t = tijereo; β = balanceo

Las vibraciones de estiramiento en 2925 cm^{-1} y 2854 cm^{-1} se asignaron al enlace C-H de grupos metilenos que están presentes en alcoholes, fenoles y aminas (Che, 2005). El pico correspondiente a 2379 cm^{-1} se asocia a enlaces de vibración del tipo X-H, y en este caso se asignó como un estiramiento del enlace NH_2 que corresponde a sales de aminas secundarias (Balasubramanian *et al.*, 2016). Consecutivamente, los picos a 2346 cm^{-1} y 2295 cm^{-1} , se asignaron a grupos funcionales que presentan fosfatos (PO_4) con estiramiento en forma de

tijereo y estiramiento respectivamente de acuerdo a (Castells, 1996). Investigaciones previas demuestran la presencia de fósforo y fitatos en la hoja de chaya (Oyagbemi *et al.*, 2011; Shittu *et al.*, 2014), con lo cual esta asignación es consistente a lo determinado previamente.

En la región de los aromáticos (2000-1660 cm^{-1}) y de las cetonas (1700-1640 cm^{-1}) se detectó un estiramiento simétrico que pertenece grupo carbonilo a 1661 cm^{-1} , esta vibración identificó la posibilidad de una cetona aromática (Lozada *et al.*, 2013), o una Amida I, por encontrarse en el intervalo de 1600 a 1700 cm^{-1} (Rieppo *et al.*, 2012). Un enlace de flexión de tijera se asignó a 1627 cm^{-1} , el cual se atribuye al grupo funcional Amida I (primaria) (Rieppo *et al.*, 2012), más sin embargo también en esta región puede presentarse una banda correspondiente a las Aminas I (Castells, 1996).

En la región de huella dactilar establecida en el intervalo de 1500-600 cm^{-1} , muchos enlaces absorben, por lo cual resulta compleja la asignación. En esta región un pico a 1425 cm^{-1} indico estiramiento del enlace OH y puede asociarse a un alcohol o fenol, al igual que la flexión de balanceo presentada a 1325 cm^{-1} por el enlace OH que se asignó a los mismo grupos funcionales (Castells, 1996), o también pueden contribuir a un flavonoide (Liu *et al.*, 2012). Por otra parte el pico asignado a 1248 cm^{-1} se presentó como un reflejo del grupo fenol aludiendo a un flavonoide de manera más específica, mediante el estiramiento del enlace C-O, al igual que el pico en 1063 cm^{-1} que se asignó al estiramiento del mismo enlace pero apuntando a un compuesto aromático o un flavonoide (Lozada *et al.*, 2013). Así también la flexión de balanceo que se presenta a 680 cm^{-1} se asignó a la presencia de un fenol, o un subsecuente flavonoide (Lozada *et al.*, 2013), aunque en esta región se puede presentar una vibración de flexión fuera del plano del enlace C-H, la cual abarca de 600 a 900 cm^{-1} (Movasaghi *et al.*, 2008).

En la Figura 26, se muestra el espectro de infrarrojo correspondiente de los extractos etanólico y acuoso. En tanto en la Tabla 31, se muestran las frecuencias y las atribuciones principales del espectro, que corresponde al

extracto ultrasónico con el solvente 1 y 2 respectivamente, además se añadieron las vibraciones presentadas por la muestra de la hoja de chaya seca a modo de comparativo.

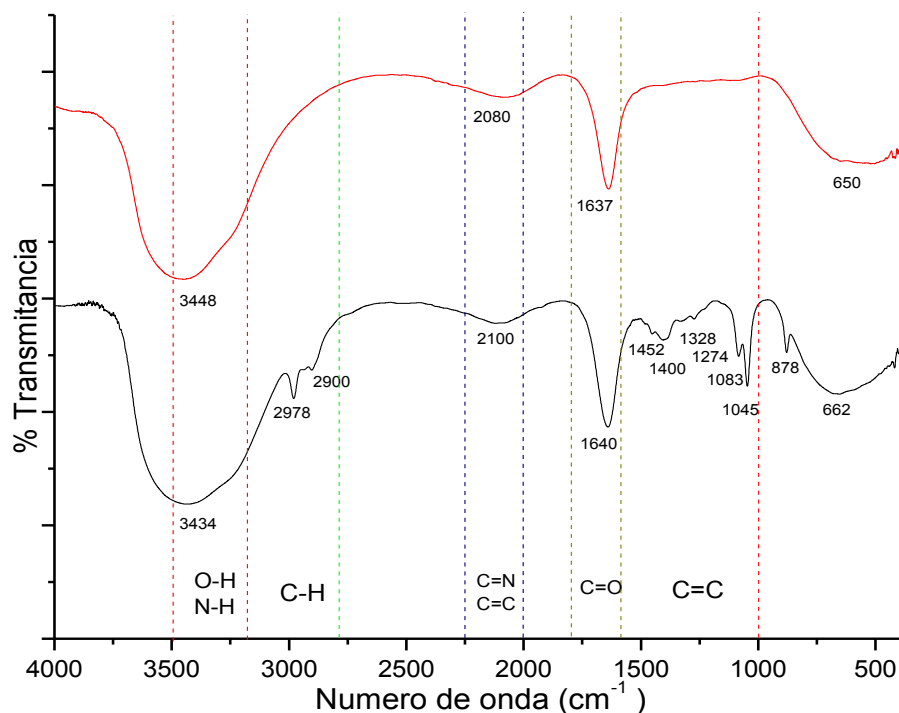


Figura 26. Espectro de FT-IR del extracto de la hoja de chaya con el solvente 1 (negro) y 2 (rojo).

En el espectro de infrarrojo correspondiente al extracto con el solvente 1 y 2 de la hoja de chaya de la Figura 26. El pico correspondiente a 3434 cm^{-1} , se generó debido a un estiramiento asimétrico del enlace OH que se atribuye al grupo funcional de los alcoholes o fenoles (Hu *et al.*, 2016; Movasaghi *et al.*, 2008), y en el espectro del extracto acuoso se presentó en 3448 cm^{-1} . Cerca de esa región se detectó también otro pico en 2978 cm^{-1} y que se atribuye a un estiramiento del grupo metilo con su enlace CH y en 2900 cm^{-1} un estiramiento del mismo enlace pero del grupo metileno (Lozada *et al.*, 2013).

En 2100 cm^{-1} se presentó una banda ligera con gran amplitud que se posiblemente representa al enlace C-C del grupo funcional de los alquinos, aunque de igual manera se puede atribuir a un enlace doble de C-C (Lozada *et*

al., 2013). De la misma manera se presentó en el espectro del extracto acuoso una vibración a 2080 cm^{-1} , y se asignó a los mismos enlaces.

Tabla 31. Tabla de modos vibracionales del espectro de la Figura 26 que corresponde al extracto los solventes 1 y 2 de la hoja de chaya.

C-Seca (cm^{-1})	EU-EtOH (cm^{-1})	EU-H ₂ O (cm^{-1})	Modo vibracional	Atribución principal
3428	3434	3448	ν_{AS} (OH)	Alcohol, Fenol, Flavonoide
-	2978	-	$\nu_{AS}(\text{CH}_3)$	Alcohol, Fenol, Flavonoide (grupo metil)
2925	-	-	$\nu_{AS}(\text{CH}_2)$	Alcohol, Fenol, Flavonoide (grupo metileno)
-	2900	-	$\nu_{AS}(\text{CH}_2)$	Alcohol, Fenol, Flavonoide (grupo metileno)
2854	-	-	$\nu_S(\text{CH}_2)$	Alcohol, Fenol, Flavonoide (Grupo metileno)
2379	-	-	ν_{AS} (X-H)	Aminas secundarias
2346	-	-	ν_t (P-H)	Derivados del fósforo (Fósforo)
2295	-	-	ν (P-OH)	Derivados del fósforo (Fitatos)
-	2100	2080	$\nu_S(\text{C}\equiv\text{C}), \nu(\text{C}=\text{C})$	Alquenos y alquinos
1661	-	-	$\nu_S(\text{C}=\text{O})$	Cetonas aromáticas, Amidas I
-	1640	1637	$\nu_S(\text{C}=\text{O}), \nu(\text{C}=\text{C})$	Alquenos, flavonoide
1627	-	-	δ_t (H-N-H)	Amida I, Aminas I
-	1452	-	$\delta_{AS}(\text{CH}_3)$	Grupo metil
1425	-	-	δ (O-H)	Alcoholes y fenoles, flavonoides
-	1400	-	δ (C-H), $\nu(\text{C}=\text{C})$	Alcano (grupos alquilo), modos de anillo aromático
1325	1328	-	δ_β (O-H), δ (C-H)	Alcohol, Fenol, Flavonoide
-	1274	-	$\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{C})$	Cetona aromática
1248	-	-	$\nu(\text{C}-\text{O})$	Fenol, Flavonoide
-	1083	-	$\nu_{AS}(\text{C}-\text{O}), \nu_S(\text{PO}_2)$	Éter, fenol, fosfato
1063	-	-	$\nu(\text{C}-\text{O})$	Alcohol primario, aromático, fenol
-	1045	-	$\delta_\beta(\text{C}-\text{O})$	Aromáticos, Fenol, Flavonoide
-	878	-	$\nu_S(\text{C}-\text{O})$	Éter
680	662	650	$\delta_\beta(\text{O}-\text{H})$	Fenol, Flavonoides

ν = estiramiento; δ = flexión; AS= Asimétrica; S= Simétrica; t = tijereo; β = balanceo
C-S = Muestra seca; EU-EtOH= Extracto etanólico; EU-H₂O= Extracto acuoso

En la región de los aromáticos se detectó un estiramiento simétrico que corresponde al grupo carbonilo y este se presenta en 1640 cm^{-1} , esta vibración se presentó posiblemente al detectarse una cetona aromática (Lozada *et al.*, 2013), aunque también puede ser una Amida I, por encontrarse en el intervalo de 1600 a 1700 cm^{-1} (Rieppo *et al.*, 2012) para la cual corresponde a dicho grupo funcional, de la misma manera dicho pico se detectó en el intervalo de 1640 - 1680 cm^{-1} que se atribuye a los alquenos (Lozada *et al.*, 2013). En el extracto acuoso el estiramiento se presentó a 1637 cm^{-1} . Se detectó un pico en 1452 cm^{-1} y se asignó a la flexión asimétrica del grupo metil (Movasaghi *et al.*, 2008). En 1400 cm^{-1} se encontró una banda de flexión del enlace C-H que se asignó a un grupo alquilo o de la misma manera se interpretó como estiramiento del enlace C-C que corresponde al doble enlace de un anillo aromático, o bien se presentó como un estiramiento asimétrico de un enlace C-C de un aromático y cualquier opción principalmente se asignó como un flavonoide (Liu *et al.*, 2012; Lozada *et al.*, 2013).

La flexión de balanceo que se presentó en el pico 1328 cm^{-1} corresponde a un enlace OH de un flavonoide o en su caso a un enlace CH de un anillo fenólico (Lozada *et al.*, 2013; Movasaghi *et al.*, 2008). Otro pico detectado fue de un enlace C-(CO)-C que se asignó a una cetona aromática en 1274 cm^{-1} (Lozada *et al.*, 2013).

De igual manera la banda detectada en 1083 cm^{-1} se determinó posiblemente como una vibración de estiramiento asimétrico del enlace C-O que corresponde a un alcohol secundario o un éter (Lozada *et al.*, 2013), más sin embargo dicha banda de estiramiento pudo considerarse como simétrica y asignarse también al grupo fosfato (PO_2) (Castorena-García *et al.*, 2011).

Un pico en 1045 cm^{-1} afirmó una flexión de balanceo que corresponde al enlace C-O y se atribuye a un alcohol primario o un flavonoide (Liu *et al.*, 2012). El grupo funcional éter presenta bandas características dentro del número de onda 878 cm^{-1} , las cuales pueden ser de estiramiento simétrico (Silverstein *et al.*, 2005). Así como los alcoholes primarios y también los fenoles presentan flexiones

de balanceo fuera del plano en 662 cm^{-1} se debió a la presencia de un fenol, o un flavonoide (Lozada *et al.*, 2013), aunque en esta región se puede presentar una vibración de flexión fuera del plano del enlace C-H, la cual abarca de 600 a 900 cm^{-1} (Movasaghi *et al.*, 2008). En el extracto con el solvente 2 se presentó en 650 cm^{-1} .

El espectro de infrarrojo generado por el extracto supercrítico con el solvente 1 y la hoja de chaya, es mostrado en la Figura 27 y la Tabla 32 son presentadas las asignaciones de los modos vibracionales del espectro.

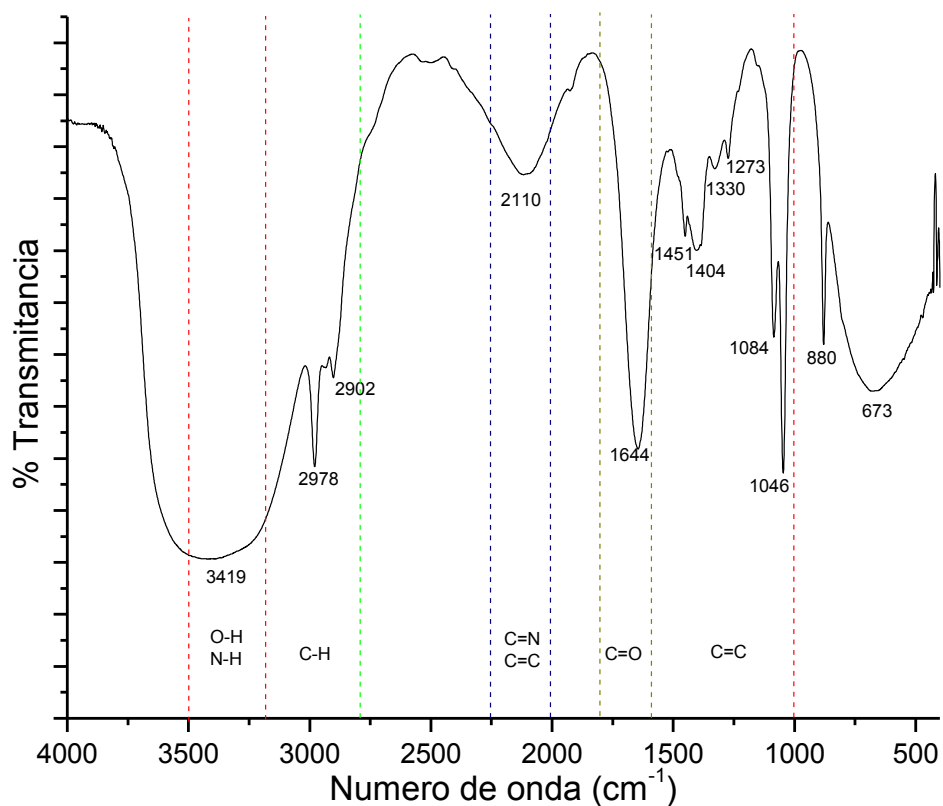


Figura 27. Espectro de FT-IR del extracto supercrítico con el solvente 1 y la hoja de chaya.

Tabla 32. Tabla de modos vibracionales del espectro de la Figura 27 que corresponde al extracto con el solvente 1 y la hoja de chaya que se obtuvo con fluido supercrítico.

(cm ⁻¹)	Modo vibracional	Atribución principal
3419	v _{AS} (OH)	Alcohol, Fenol, Flavonoide
2978	v _{AS} (CH ₃)	Alcohol, Fenol, Flavonoide (grupo metil)
2902	v _{AS} (CH ₃)	Alcohol, Fenol, Flavonoide (grupo metil)
2110	v _S (C≡C)	Alquinos
1644	v (C=O)	Alquenos, cetona aromática
1451	δ _{AS} (CH ₃), δ _t (CH ₂)	Alcano (grupos alquilo)
1404	δ (O-H)	Ácido carboxílico
1330	δ (O-H)	Alcohol primario, fenol, flavonoide
1273	δ (O-H)	Alcohol secundario
1084	v _{AS} (C-O), v _S (PO ₂)	Alcohol secundario, éter, fenol, fosfato
1046	δ _β (C-O)	Aromáticos, Fenol, Flavonoide
880	v _S (C-O)	Éter
673	δ _β (O-H)	Alcohol primario, fenol

v= estiramiento; δ= flexión; AS= Asimétrica; S= Simétrica; t= tijereo; β= balanceo

El pico encontrado a 3419 cm⁻¹ se generó debido a un estiramiento asimétrico del enlace OH que se atribuye al grupo funcional de los alcoholes o fenoles (Silverstein *et al.*, 2005), se detectó también otro pico en 2978 cm⁻¹ y 2902 cm⁻¹ y que se asignó a un estiramiento del grupo metilo con su enlace CH (Lozada *et al.*, 2013). En 2110 cm⁻¹ se presenta una banda ligera con gran amplitud que se atribuye al enlace C-C del grupo funcional de los alquinos (Silverstein *et al.*, 2005).

En el intervalo de 1600 a 1700 cm^{-1} se detectó un estiramiento simétrico que corresponde al grupo carbonilo en 1640 cm^{-1} , posiblemente de una cetona (Silverstein *et al.*, 2005) o una cetona aromática (Lozada *et al.*, 2013), de una Amida I (Rieppo *et al.*, 2012), de una Amida III, o en su defecto de un alqueno, debido a que se encuentra en el intervalo de dicho grupo funcional 1640-1680 cm^{-1} (Lozada *et al.*, 2013).

Una flexión asimétrica fue detectada en 1451 cm^{-1} y fue determinado como un enlace C-H ya sea del grupo metil (Badertscher *et al.*, 2009), o del grupo metileno (Lozada *et al.*, 2013).

En 1404 cm^{-1} se encontró una banda de flexión del enlace C-H que se asignó a un grupo alquilo o se interpretó como estiramiento del enlace C-C que corresponde al doble enlace de un anillo aromático y cualquier opción principalmente se asignó como un flavonoide (Liu *et al.*, 2012; Lozada *et al.*, 2013).

En 1330 cm^{-1} se presentó de igual manera una flexión del enlace O-H y se atribuyó a un flavonoide (Movasaghi *et al.*, 2008) o aun enlace CH de un anillo fenólico (Lozada *et al.*, 2013).

La banda detectada en 1084 cm^{-1} se atribuye posiblemente a una vibración de estiramiento asimétrico del enlace C-O que corresponde a un alcohol secundario o un éter (Lozada *et al.*, 2013), o del mismo modo dicha banda de estiramiento simétrico pudo ser asignada al grupo fosfato (PO_2) (Castorena-García *et al.*, 2011).

En el número de onda 1046 cm^{-1} se detectó un flexión de balance que corresponde al enlace C-O y se atribuye a un alcohol primario o un flavonoide (Liu *et al.*, 2012). Por otra parte el grupo funcional éter presenta bandas características cerca de 880 cm^{-1} , las cuales pueden ser de estiramiento simétrico (Silverstein *et al.*, 2005). Así como los alcoholes primarios y también los fenoles presentan flexiones de balanceo fuera del plano en 673 cm^{-1} se debe a la presencia de un fenol, o un flavonoide (Lozada *et al.*, 2013), aunque en esta

región se puede presentar una vibración de flexión fuera del plano del enlace C-H, la cual abarca de 600 a 900 cm^{-1} (Movasaghi *et al.*, 2008).

Se observó que las fases líquidas de los extractos con los solventes 1 y 2 ocultaron picos definidos que se tenían en la muestra seca, por lo que no se descarta la presencia de dichos grupos funcionales en las muestras líquidas, aunque el extracto etanólico reveló la presencia de grupos funcionales que pueden ser atribuidos a un flavonoide, presentando vibraciones de los enlaces característicos de dichos compuestos, los cuales son muy similares a los presentados en la muestra seca sin proceso previo. Todos los grupos funcionales detectados en el presente estudio, ya habían sido detectados por FT-IR a la misma especie por (Omotoso *et al.*, 2014).

En el espectro de quercetina como estándar se han reportado los siguientes picos: 3320 cm^{-1} , 2973 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} , 1453 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} , 1275 cm^{-1} , 1088 cm^{-1} , 1046 cm^{-1} y 880 cm^{-1} (Delgado, 2015), al comparar contra las frecuencias que se obtuvieron en este trabajo con la muestra seca se presentaron valores cercanos a éstos, pero al hacer el comparativo con el extracto etanólico es fácil identificar los picos mencionados con un ligero desplazamiento el cual se puede atribuir a la diferencia de equipos de análisis así como al solvente (etanol), los picos correspondientes son: 3434 cm^{-1} , 2978 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 1452 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1274 cm^{-1} , 1083 cm^{-1} , 1045 cm^{-1} y 878 cm^{-1} , con lo cual se determinó la presencia del flavonoide quercetina en el extracto etanólico de la hoja de chaya.

3.6. Optimización

En un proceso de extracción, el objetivo primordial debe ser la obtención del mayor rendimiento del extracto de interés, y esto se realiza mediante la optimización por la metodología de superficie de respuesta, que consiste en encontrar las condiciones de operación que permitan llegar a los mejores resultados que se puedan obtener de un determinado proceso, a través de técnicas matemáticas (Gutiérrez and De la Vara, 2008). En este trabajo, se utilizó

la optimización basada en los rendimientos de extracción, y para su análisis se requirió el uso del Software estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.I®.

El procedimiento de optimización se aplica cuando se quiere mejorar el valor más alto de la variable de respuesta, en este caso se aplicó al rendimiento de extracción. Consiste en evaluar estadísticamente la respuesta más alta obtenida. Se obtiene un valor de respuesta esperado, mediante una ruta experimental a seguir, por lo general esta ruta debe indicar parámetros cercanos a los evaluados, esto si se evaluó en la región experimental idónea para obtener un valor máximo de respuesta más alto que el valor de respuesta que se obtuvo con el diseño evaluado (el caso de este trabajo).

En caso de que la optimización indique parámetros de evaluación lejanos a los experimentados se debe proceder a modificar el diseño de experimentos y evaluar nuevamente en la región experimental propuesta y proceder a obtener estadísticamente el valor del punto óptimo de la nueva región experimental.

3.6.1. Extracción por ultrasonido

3.6.1.1. En base seca con el solvente 1

La Tabla 33, se aprecian las combinaciones obtenidas para mejorar los rendimientos de extracción (%) para muestra en base seca y con el solvente 1.

Tabla 33. Tabla de optimización para base seca con el solvente 1.

Respuesta	Valor observado		Código		Condiciones de operación		Valor óptimo	
	Mínimo	Máximo	Temperatura	Tiempo	X1: Temperatura (K)	X2: Tiempo (min)	Esperado	Obtenido
Rendimiento	2.099	3.072	-1.34085	1.16429	298	95	3.29041	3.2976

Se aprecia que el factor de temperatura tuvo tendencia hacia un punto axial de manera negativa y el factor tiempo tuvo tendencia de igual forma hacia el punto axial positivo, lo que demuestra que el diseño corresponde completamente a un central compuesto y que se abarcaron las adecuadas

regiones de experimentación debido a que el punto óptimo quedó dentro de la región experimental aplicada.

3.6.1.2. En base seca y con el solvente 2

Las combinaciones obtenidas para realizar la optimización de los rendimientos de extracción (%) en base seca y con el solvente 2, son mostradas en la Tabla 34.

Tabla 34. Tabla de optimización para base seca con el solvente 2.

Respuesta	Valor observado		Código		Condiciones de operación		Valor óptimo	
	Mínimo	Máximo	Temperatura	Tiempo	X1: Temperatura (K)	X2: Tiempo (min)	Esperado	Obtenido
Rendimiento	1.037	1.962	1	1	333	90	1.9999	2.016

En esta extracción los valores de los factores evaluados para obtener las condiciones óptimas cayeron exactamente en los puntos altos (+1) del diseño factorial, con lo cual se determina que se experimentó en las zonas cercanas al punto óptimo y con el diseño apropiado.

3.6.1.3. En base húmeda y con el solvente 1

Al realizar la optimización de la extracción en base húmeda y utilizando el solvente 1 como solvente de extracción, se obtuvieron los resultados que se indican en la Tabla 35.

Tabla 35. Tabla de optimización para base seca con el solvente 1.

Respuesta	Valor observado		Código		Condiciones de operación		Valor óptimo	
	Mínimo	Máximo	Temperatura	Tiempo	X1: Temperatura (K)	X2: Tiempo (min)	Esperado	Obtenido
Rendimiento	0.36	1.104	0.139653	0.319965	320	70	1.10801	1.1268

Los valores óptimos para los factores, temperatura y tiempo de extracción, se encontraron dentro de la región experimental correspondiente al diseño factorial, lo cual indica la correcta aplicación de la experimentación realizada.

3.6.1.4. En base húmeda con el solvente 2

Para optimizar el rendimiento de extracción (%) en base húmeda con el solvente 2. La Tabla 36 presenta las combinaciones con lo cual se consiguió el punto óptimo predicho por el software estadístico.

Tabla 36. Tabla de optimización para base húmeda con el solvente 2.

Respuesta	Valor observado		Código		Condiciones de operación		Valor óptimo	
	Mínimo	Máximo	Temperatura	Tiempo	X1: Temperatura (K)	X2: Tiempo (min)	Esperado	Obtenido
Rendimiento	0.3284	0.6189	0.641719	-0.75187	328	37	0.626003	0.6444

En esta extracción los valores de los factores evaluados para obtener las condiciones óptimas cayeron exactamente dentro de la región experimental estudiada por lo que se obtuvo el rendimiento máximo, mostrando un incremento ligeramente mayor al esperado.

Cabe mencionar que las optimizaciones realizadas a las extracciones por ultrasonido se realizaron en base al rendimiento de compuestos fenólicos totales extraídos con los solventes 1 y 2 y en bases seca y húmeda.

3.6.2. Extracción supercrítica

3.6.2.1. En base seca con el solvente 1

La Tabla 37, se indican las combinaciones obtenidas para mejorar los rendimientos de extracción (%) para muestra en base seca con el solvente 1 al realizar la extracción con CO₂ supercrítico.

En donde se muestra que tanto la temperatura como la presión de extracción tuvieron tendencias hacia los puntos altos (+1) del diseño factorial,

indicando con esto que la evaluación se realizó en la región experimental idónea para obtener el punto óptimo del elemento de análisis.

Tabla 37. Tabla de optimización para base seca con el solvente 1 para la extracción supercrítica.

Respuesta	Valor observado		Código		Condiciones de operación		Valor óptimo	
	Mínimo	Máximo	Temperatura	Presión	X1: Temperatura (K)	X2: Presión (psi)	Esperado	Obtenido
Rendimiento	0.302	1.307	0.989417	0.98058	332.99	5961.18	1.30726	1.36

3.6.2.2. En base seca con el solvente 2

La Tabla 38, se muestran las condiciones de operación con la cual se obtuvo el mejor rendimiento de extracción (%) para la muestra en base seca y con el solvente 2 al realizar la extracción con CO₂ supercrítico.

Tabla 38. Tabla de optimización para base seca con con el solvente 2 para la extracción supercrítica.

Respuesta	Valor observado		Código		Condiciones de operación		Valor óptimo	
	Mínimo	Máximo	Temperatura	Presión	X1: Temperatura (K)	X2: Presión (psi)	Esperado	Obtenido
Rendimiento	0.669	1.761	0.51457	0.98777	325.94	5975.55	1.80096	1.936

En donde se aprecia que la temperatura tuvo tendencia hacia el punto central mientras que la presión de extracción tuvo tendencia hacia el punto alto (+1) del diseño factorial, indicando con esto que la evaluación se realizó en la región experimental idónea del diseño factorial propuesto.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

En el presente trabajo, se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales de la hoja de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst), los cuales fueron extraídos con la técnica de ultrasonido asistido y con extracción supercrítica.

La extracción supercrítica otorgó un mayor rendimiento de compuestos fenólicos totales con 53.33 mg EAG g⁻¹. En cambio con la extracción por ultrasonido se obtuvieron 30.72 mg EAG g⁻¹, en ambos casos el solvente utilizado fue etanol al 70%. Cabe mencionar que ambos tratamientos mostraron mejoras significativas de cantidad total de fenoles totales con respecto a lo reportado por García-Rodríguez (2014), 35.70 ± 24.60 mg EAG g⁻¹ y por Jiménez-Aguilar and Grusak (2015), 5.66 ± 0.59 mg EAG g⁻¹, aunque menor a lo reportado por Loarca-Piña (2010) (71.3 ± 1.7 mg EAG g⁻¹). Así también se observó una reducción mayor del tiempo de extracción con ambas técnicas, esto al compararlo con datos obtenidos de la literatura para la misma especie *C. aconitifolius*.

Por otra parte, en las determinaciones realizadas mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) se detectó la presencia de los picos característicos del flavonoide quercetina y se coincidió con los picos reportados en la literatura para ese flavonoide.

4.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar la extracción supercrítica con un tamaño de partícula menor a 0.297mm con el fin de aumentar el área de contacto superficial y mejorar posiblemente el rendimiento de extracción, por otra parte se recomienda humedecer la materia prima de estudio con el solvente a utilizar de preferencia con etanol para verificar el aumento del rendimiento de extracción de compuestos fenólicos totales, dado que este solvente es polar y dichos compuestos son afines a disolverse en solventes polares.

5. Referencias

- Afoakwa, E.O., 2010. *Chocolate science and technology*. Wiley-Blackwell, Chichester, U.K. ; Ames, Iowa.
- Arukwe, U., Amadi, B.A., Duru, M.K.C., Agomuo, E.N., Adindu, E.A., Odika, P.C., Lele, K.C., Egejuru, L., Anudike, J., 2012. Chemical Composition of *Persea Americana* Leaf, Fruit and Seed. *International Journal of Recent Research and Applied Studies* 11, 346–349.
- Badertscher, M., Bühlmann, P., Pretsch, E., 2009. *Structure Determination of Organic Compounds*, Fourth. ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-93810-1
- Balasubramanian, S., Revathi, A., Gunasekaran, G., 2016. Studies on anticancer, haemolytic activity and chemical composition of crude epidermal mucus of fish *Mugil cephalus*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 4, 438–443.
- Baryeh, E.A., 2001. Effects of palm oil processing parameters on yield. *J. Food Eng.* 48, 1–6. doi:10.1016/S0260-8774(00)00137-0
- Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., Torres, A., Macías, F.A., Martínez de la Ossa, E.J., 2008. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from sunflower leaves with carbon dioxide and water on a pilot plant scale. *J. Supercrit. Fluids* 45, 37–42. doi:10.1016/j.supflu.2007.12.002
- Castells, J., 1996. *Tablas para elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectrocópicos*. ALHAMBRA LONGMAN, S.A., Madrid, España.
- Castorena-García, J.H., Rojas-López, M., Delgado-Macuil, R., Robles de la Torre, R.R., 2011. Análisis de Pulpa y Aceite de Aguacate con Espectroscopia Infrarroja. *Conciencia Tecnológica* 5–10.
- Che Man, Y., 2005. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* 90, 815–819. doi:10.1016/j.foodchem.2004.05.029

-
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 34, 540–560. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.035
- Costa, P., Grosso, C., Gonçalves, S., Andrade, P.B., Valentão, P., Gabriela Bernardo-Gil, M., Romano, A., 2012. Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér. *Food Chem.* 135, 112–121. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.108
- Cruz-Cansino, N.S., Alanís-García, E., Manríquez-Torres, J.J., Ariza-Ortega, J.A., Delgado-Olivares, L., Ramírez-Moreno, E., 2016. Efecto del ultrasonido sobre los compuestos bioactivos en Jugos de Frutas, in: *Biotecnología Y Alimentos En Hidalgo Líneas de Investigación En Desarrollo*. Universidad politécnica de Francisco I. Madero, Ciudad de México, p. 228.
- da Silva, R.P.F.F., Rocha-Santos, T.A.P., Duarte, A.C., 2016. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends Anal. Chem.* 76, 40–51. doi:10.1016/j.trac.2015.11.013
- de Melo, M.M.R., Silvestre, A.J.D., Silva, C.M., 2014. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *J. Supercrit. Fluids* 92, 115–176. doi:10.1016/j.supflu.2014.04.007
- Del Ángel Sánchez, M.T., García-Alamilla, P., Lagunez-Gálvez, L.M., García-Alamilla, R., Cabrera Culebro, E.G., 2015. Aplicación de metodología de superficie de respuesta para la degradación de naranja de metilo con TiO₂ sol-gel sulfatado. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 31, 99–106.
- Fagbohun, E.D., Egbebi, A.O., Lawal, O.U., 2012. Phytochemical Screening, Proximate Analysis and In-vitro Antimicrobial Activities of Methanolic

-
- Extract of *Cnidoscolus Aconitifolius* Leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 13, 28–33.
- Figueroa-Valverde, L., Díaz-Cedillo, F., Camacho-Luis, A., Ramos, M.L., 2009. Efectos inducidos por *Ruta graveolens* L., *Cnidoscolus chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L. sobre los niveles de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en un modelo de rata diabética. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19, 898–907. doi:10.1590/S0102-695X2009000600019
- García-Rodríguez, R.V., Gutiérrez-Rebolledo, G.A., Méndez-Bolaina, E., Sánchez-Medina, A., Maldonado-Saavedra, O., Domínguez-Ortiz, M.Á., Vázquez-Hernández, M., Muñoz-Muñiz, O.D., Cruz-Sánchez, J.S., 2014. *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *J. Ethnopharmacol.* 151, 937–943. doi:10.1016/j.jep.2013.12.004
- Geankoplis, C.J., 1999. *Procesos de transporte y operaciones unitarias*.
- Gutiérrez Avella, D.M., Ortiz García, C.A., Mendoza Cisneros, A., 2008. *Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal*. Mem. Simp. Metrol. Univ. Autónoma Querétaro Cent. Nac. Querétaro.
- Gutiérrez, P.H., De la Vara, S.R., 2008. *Análisis y diseño de experimentos*, Segunda. ed. McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. de C.V, México D.F.
- Harborne, J.B., 1980. *Phytochemical Methods*. Springer Netherlands, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-009-5921-7
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E., 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgaeA review. *Food Chem.* 98, 136–148. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.058
- Herzi, N., Bouajila, J., Camy, S., Romdhane, M., Condoret, J.-S., 2013. Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*:

-
- Yield, chemical composition and antioxidant activity. *Food Chem.* 141, 3537–3545. doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.065
- Hu, Y., Pan, Z.J., Liao, W., Li, J., Gruget, P., Kitts, D.D., Lu, X., 2016. Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. *Food Chem.* 202, 254–261. doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.130
- Jiménez-Aguilar, D.M., Grusak, M.A., 2015. Evaluation of Minerals, Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Mexican, Central American, and African Green Leafy Vegetables. *Plant Foods Hum. Nutr.* 70, 357–364. doi:10.1007/s11130-015-0512-7
- Jiménez-Arellanes, M.A., García-Martínez, I., Rojas-Tomé, S., 2014. Potencial biológico de especies medicinales del género *Cnidocolus* (Euphorbiaceae). *Rev Mex Cienc Farm* 45.
- Kamaranga, H.S.P., Bockus, W.W., Dowell, F.E., 2012. Infrared Spectral Properties of Germ, Pericarp, and Endosperm Sections of Sound Wheat Kernels and Those Damaged by *Fusarium graminearum*. *Appl. Spectrosc.* 66, 1053–1060. doi:10.1366/11-06683
- Kavitha, V., Saradha Ramadas, V., 2013. Nutritional composition of raw fresh and shade dried form of spinach leaf (*Spinach oleracea*). *JPR:BioMedRx* 1, 767–770.
- Khan, N., Ruqia, B., Hussain, J., Jamila, N., Ur Rahman, N., Tasleem Hussain, S., 2013. Nutritional Assessment and Proximate Analysis of Selected Vegetables from Parachinar Kurram Agency. *American Journal of Research Communication* 1, 184–198.
- Kimbaris, A.C., Siatas, N.G., Daferera, D.J., Tarantilis, P.A., Pappas, C.S., Polissiou, M.G., 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason. Sonochem.* 13, 54–60. doi:10.1016/j.ultsonch.2004.12.003

-
- Kuehl, R.O., 2001. Diseño de experimentos Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación, Segunda. ed. Thomson Learning, México D.F.
- Kuti, J.O., Kuti, H.O., 1999. Proximate composition and mineral content of two edible species of *Cnidoscolus* (tree spinach). *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* 53, 275–283.
- Liu, X., Xu, C., Sun, S., Huang, J., Zhang, K., Li, G., Zhu, Y., Zhou, Q., Zhang, Z., Wang, J., 2012. Discrimination of different genuine Danshen and their extracts by Fourier transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 97, 290–296. doi:10.1016/j.saa.2012.06.013
- Loarca-Piña, G., Mendoza, S., Ramos-Gómez, M., Reynoso, R., 2010. Antioxidant, Antimutagenic, and Antidiabetic Activities of Edible Leaves from *Cnidoscolus chayamansa* Mc.Vaugh. *J. Food Sci.* 75, H68–H72. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01505.x
- Lot, A., Chiang-Cabrera, F., 1986. Manual de Herbario. Administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos, Primera. ed. México: Consejo Nacional de la Flora de México A.C., México.
- Lozada García, M.C., Soria Arteché, O., Jaramillo Ortega, Y.L., 2013. Espectroscopia de infrarrojo, conceptos y problemas, Primera. ed. México: Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México D.F.
- Montgomery, D.C., 2004. DISEÑO Y ANÁLISIS DE EXPERIMENTOS, Segunda. ed. LIMUSA WILEY, México D.F.
- Morillo, O., Fernández, S., Hernández, H., Castillo, G., Germana, M., 2010. Optimización de los parámetros de extracción de aceite de palma africana utilizando CO₂ supercrítico. *Bioagro* 22, 89–94.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., ur Rehman, I., 2008. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* 43, 134–179. doi:10.1080/05704920701829043

-
- Naczek, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* 1054, 95–111. doi:10.1016/j.chroma.2004.08.059
- Omotoso, A.E., Eseyin, O.O., Suleiman, M., 2014. Phytochemical Analysis of *Cnidioscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae) leaf with Spectrometric Techniques. *Nigerian Journal of Pharmaceutical and Applied Science Research* 3, 38–49.
- Ooi, D.-J., Iqbal, S., Ismail, M., 2012. Proximate Composition, Nutritional Attributes and Mineral Composition of *Peperomia pellucida* L. (Ketumpangan Air) Grown in Malaysia. *Molecules* 17, 11139–11145. doi:10.3390/molecules170911139
- Ostrowska-Ligeza, E., Górska, A., Wirkowska, M., Koczon, P., 2012. An assessment of various powdered baby formulas by conventional methods (DSC) or FT-IR spectroscopy. *J. Therm. Anal. Calorim.* 110, 465–471. doi:10.1007/s10973-011-2158-5
- Othman, A., Ismail, A., Abdul Ghani, N., Adenan, I., 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* 100, 1523–1530. doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.021
- Oyagbemi, A.A., Odetola, A.A., Azeez, O.I., 2011. Phytochemical Investigation and Proximate Analysis on the Leaves of *Cnidioscolus aconitifolius*. *J. Med. Food* 14, 322–324. doi:10.1089/jmf.2008.0321
- Palafox, J.O., Navarrete, A., Sacramento-Rivero, J.C., Rubio-Atoche, C., Escoffie, P.A., Rocha-Urbe, J.A., 2012. Extraction and Characterization of Oil from *Moringa oleifera* Using Supercritical CO₂ and Traditional Solvents. *Am. J. Anal. Chem.* 03, 946–949. doi:10.4236/ajac.2012.312A125
- Peralta-Jiménez, L., Cañizares-Macías, M.P., 2013. Ultrasound-Assisted Method for Extraction of Theobromine and Caffeine from Cacao Seeds and Chocolate Products. *Food Bioprocess Technol.* 6, 3522–3529. doi:10.1007/s11947-012-1014-3

-
- Perea Domínguez, X.P., 2013. Análisis de compuestos fenólicos y valoración de la bioactividad de extractos de testa de *Jatropha curcas* L. no tóxica. Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa.
- Porrás-Loaiza, A.P., López-Malo, A., 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 3, 121–134.
- Quezada, T.T., 2007. Evaluación del Contenido de Minerales y Ácido Cianhídrico en Hojas de Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) con Tres Niveles de Fertilización Orgánica y Química. IX CONGRESO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y V FORO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS 641–648.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N.V.R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Controlled Release* 113, 189–207. doi:10.1016/j.jconrel.2006.04.015
- Reverchon, E., De Marco, I., 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids* 38, 146–166. doi:10.1016/j.supflu.2006.03.020
- Rieppo, L., Saarakkala, S., Närhi, T., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S., Rieppo, J., 2012. Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 451–459. doi:10.1016/j.joca.2012.01.010
- Robbins, R.J., 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866–2887. doi:10.1021/jf026182t
- Rocha-Urbe, J.A., Pérez, J.I.N., Kauil, H.C., Rubio, G.R., Alcocer, C.G., 2011. Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 56, 174–178. doi:10.1016/j.supflu.2010.12.007
- Ross-Ibarra, J., Molina-Cruz, A., 2002. The Ethnobotany of Chaya (*Cnidoscolus Aconitifolius* ssp. *Aconitifolius* Breckon): A Nutritious Maya Vegetable¹.

-
- Econ. Bot. 56, 350–365. doi:10.1663/0013-0001(2002)056[0350:TEOCCA]2.0.CO;2
- Salazar, F.G., 2010. PROCESOS DE SEPARACIÓN: UN ENFOQUE INTEGRADO. *Revista Ingeniería Primero* 70–83.
- Secretaría de Salud, 1995. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-116-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN ALIMENTOS POR TRATAMIENTO TÉRMICO. MÉTODO POR ARENA O GASA. *Determinación de Humedad en Alimentos*.
- Sharif, K.M., Rahman, M.M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M.H.A., Sahena, F., Zaidul, I.S.M., 2014. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. *J. Food Eng.* 124, 105–116. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.10.003
- Shittu, S.A., Olayiwola, O.A., Adebayo, O.R., 2014. Nutritional composition and phytochemical constituents of the leaves of *Cnidioscolous aconitifolius*. *American Journal of Food Science and Nutrition Research* 1, 8–12.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J., 2005. SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANIC COMPOUNDS, Seventh. ed. John Wiley & Sons. Inc., United States of America.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 579, 200–213. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023
- Spell, L., Bressani, R., 2011. Preparación y caracterización química y nutricional de la proteína foliar de chaya (*Cnidioscolus aconitifolius*). *Revista 23 de la Universidad del Valle de Guatemala* 54–60.
- Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends Anal. Chem.* 71, 100–109. doi:10.1016/j.trac.2015.04.013
- Valenzuela Soto, R., Morales Rubio, M.E., Verde Star, M.J., Oranday Cárdenas, A., Preciado Rangel, P., Antonio González, J., Esparza-Rivera, J.R., 2015. *Cnidioscolus chayamansa* hidropónica orgánica y su capacidad

-
- hipoglucemiante, calidad nutraceutica y toxicidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6, 815–825.
- Velasco, R.J., Villada, H.S., Carrera, J.E., 2007. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Inf. Tecnológica* 18. doi:10.4067/S0718-07642007000100009
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105, 940–949. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.038
- Zhang, D.-Y., Wan, Y., Xu, J.-Y., Wu, G.-H., Li, L., Yao, X.-H., 2016. Ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry leaves and their effect on enhancing antioxidant activity. *Carbohydr. Polym.* 137, 473–479. doi:10.1016/j.carbpol.2015.11.016
- Zhao, S., Zhang, D., 2013. A parametric study of supercritical carbon dioxide extraction of oil from *Moringa oleifera* seeds using a response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.* 113, 9–17. doi:10.1016/j.seppur.2013.03.041

ANEXOS

A. Guía rápida de operación del extractor supercrítico SFT-150



Figura 28. Equipo de extracción supercrítica SFT-150.

- 1. Encender el compresor de aire seco.** Para encender el compresor de aire seco, se deben seguir los siguientes pasos:
 - Conectar los cables de alimentación de energía del equipo.
 - Quitar el botón de paro, esto se hace girando suavemente hacia alguno de los lados del botón.
 - Oprimir el botón de apagado color rojo.
 - Oprimir el botón de encendido color verde. El compresor entrara en función inmediatamente y será necesario verificar que el aire este seco, la verificación se realiza en el tablero inferior del equipo y muestra un buen funcionamiento del secador cuando la aguja se encuentra en la zona

verde. También deben verificarse los filtros de limpieza del aire, estos operan correctamente cuando la aguja se encuentra en la zona verde.

- Abrir la válvula de alimentación lentamente.
- 2. Abrir el paso del tanque de CO₂.** La válvula indica el sentido de apertura, la apertura se debe realizar suave y lentamente.
 - 3. Encendido del extractor SFT-150 (Figura 28).** Para encender este equipo deben seguirse los siguientes pasos:
 - Verificar que todas las válvulas tanto del equipo, como de las tuberías, estén correctamente cerradas.
 - Conectar el cable de alimentación de energía del equipo.
 - Para encender el equipo se debe presionar el botón ON/OFF, en la posición ON, y se deben esperar 30 minutos para que entre en función la bomba Chiller, que tiene la tarea de controlar la temperatura del CO₂.
 - Transcurrido el tiempo anterior se procede a abrir las válvulas de la tubería para el CO₂ y aire seco.
 - Dentro de la celda se coloca la muestra, una vez colocada debe verificarse que no haya fugas de CO₂.
 - Se abren las válvulas de paso de CO₂ y aire seco respectivamente.
 - Se establecen las condiciones de operación del sistema, para ello se recomienda establecer en primer instancia la presión, este paso se realiza con el regulador de presión de la celda, antes de iniciar a operar este regulador se debe observar que el seguro del regulador no este puesto, esto será, cuando la línea color naranja este presente, de no ser así será necesario jalar suavemente para quitar el seguro, el regulador gira en el sentido de las manecillas del reloj.
 - Una vez establecida la presión, será necesario establecer la temperatura, esta se establece en el controlador oprimiendo una vez el botón SEL y moviendo los botones $\wedge \vee$ hacia arriba o abajo, respectivamente.

-
- El tiempo en el que se establecen las condiciones de operación puede ser tomado como tiempo de remojo.

4. Uso del equipo en fase estática / dinámica. Las muestras pueden tratarse en dos tipos de fases, su operación se describe a continuación:

- Fase estática: consiste en dejar reposar el CO₂ dentro de la celda del extractor, para que este penetre en la muestra, a las condiciones establecidas por un determinado tiempo, pasado este tiempo será necesario cerrar las válvulas de entrada de CO₂, aire seco y el regulador de presión, se retendrán por el tiempo deseado. Después del tiempo de reposo de la muestra en CO₂, se procede a girar la válvula de salida de CO₂ del equipo en sentido contrario de las manecillas del reloj hasta su completa despresurización.
- Fase dinámica: en la fase dinámica se realiza una parte de la fase estática, pues también, se deja reposar el CO₂ dentro de la celda del extractor, para que este penetre en la muestra, a las condiciones establecidas por un determinado tiempo, pero a diferencia de la extracción estática cuando pasa el tiempo de remojo, no será necesario cerrar las válvulas de entrada de CO₂, aire seco y el regulador de presión, solo se abrirán las válvulas de paso de CO₂ y posteriormente se tomaran lecturas del aumento del extracto para poder así evaluar el rendimiento.

5. Apagado del equipo: una vez terminada la operación del equipo, se verifica que todas las válvulas de paso de CO₂ y aire seco estén completamente cerradas y se oprime el botón de apagado/encendido, después solo se desconecta el equipo, se apaga el compresor (se cierra la válvula lentamente y luego se oprime el botón rojo del compresor y se asegura el botón de paro del equipo después se desconectan todos los cables de la alimentación eléctrica) y se cierra el tanque de CO₂.

B. Guía rápida de operación del baño ultrasónico Elmasonic S 40 H



Figura 29. Equipo de baño ultrasónico Elmasonic S 40 H.

1. Encendido del equipo: El encendido del equipo se efectúa conectándolo a la red eléctrica del laboratorio y pulsando el botón ON/OFF.
Previo al encendido es necesario colocarle aproximadamente 4 L de agua purificada o destilada y colocarlo en una superficie estable en un lugar amplio (se recomienda el uso de equipo de protección contra ruidos).
2. Una vez encendido el equipo se programan las variables controladas (temperatura y tiempo) en caso que el tiempo exceda a lo marcado en el controlador se coloca en el símbolo de infinito (∞).
3. Una vez que el equipo llega a las condiciones de operación deseadas las muestras pueden ser insertadas como se observa en la Figura 29.
4. Se realiza el proceso de baño ultrasónico (extracción asistida por ultrasonido) de acuerdo a las condiciones requeridas.
5. Una vez concluido el proceso, se procede a retirar las muestras y a apagar el equipo desconectándolo de la red eléctrica del laboratorio.

-
6. Se deja enfriar el equipo, se le retira el agua y se debe secar con un paño limpio y seco.
 7. Guardar el equipo en el lugar indicado.

C. Evidencias fotográficas



Figura 30. Molienda de muestras.



Figura 31. Tamizado con malla #50 (0.297mm).



Figura 32. Extracto supercrítico de la hoja de чая.