



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Estudio de la extracción de perezona de
Acourtia cordata empleando
CO₂-supercrítico.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL

P R E S E N T A

DOMÍNGUEZ FERNÁNDEZ ALAN EDMUNDO.

Asesor: Dr. René Miranda Ruvalcaba.

Coasesor: Dr. Julián Cruz Olivares.

Coasesor: cDr. Rene Gerardo Escobedo González.

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio de la extracción de perezona de Acourtia cordata empleando CO2-supercrítico.

Que presenta el pasante: Alan Edmundo Domínguez Fernández
Con número de cuenta: 307008264 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Junio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. René Miranda Ruvalcaba	
VOCAL	Dr. José Luis Arias Tellez	
SECRETARIO	M.C. Rubén Sanabria Tzintzun	
1er. SUPLENTE	Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo	
2do. SUPLENTE	M.C. Bernardo Francisco Torres	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio de la extracción de perezona de Acourtia cordata empleando CO2-supercrítico.

Que presenta el pasante: Alan Edmundo Domínguez Fernández

Con número de cuenta: 307008264 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Junio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. René Miranda Ruvalcaba	
VOCAL	Dr. José Luis Arias Tellez	
SECRETARIO	M.C. Rubén Sanabria Tzintzun	
1er. SUPLENTE	Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo	
2do. SUPLENTE	M.C. Bernardo Francisco Torres	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/lmc

El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección del Doctor René Miranda Ruvalcaba y la supervisión del candidato a Doctor René Gerardo Escobedo González, en el laboratorio de estudios sobre química verde L-122 de la sección de química orgánica del departamento de ciencias químicas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, así como también bajo la supervisión del Doctor Julián Cruz Olivares, en la nave de ingeniería química de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Agradecimientos.

Sin duda alguna para la realización del presente estudio se requirió de mucho tiempo de dedicación, tiempo que no solo data desde el momento en que comenzó su desarrollo y escritura, sino desde la obtención de las bases que permitieron llegar hasta la realización de este trabajo y me refiero a las bases como todas aquellas acciones, momentos y etapas que presidieron y encaminaron a este que considero es el clímax de varios años de esfuerzo y dedicación y que hoy con la escritura de este trabajo pretendo obtener. Es definitivo que estos esfuerzos no solo representan los personales, sino que también detrás de ellos y no por ello menos importantes, se encuentran los realizados por mis familiares, amigos, maestros e instituciones, que significaron la edificación desde los cimientos de mi trayectoria académica y formación profesional y que por ende es imperioso resaltar y por supuesto agradecer, pues el logro de la culminación de este trabajo que a su vez representa la finalización de esta trayectoria académica llamada licenciatura, se lo debo en gran medida a las acciones conjuntas de todas aquellas personas e instituciones que me guiaron y dieron la oportunidad de realizarlo. Claro está que la lista es demasiado grande pasando por mi formación preprimaria, primaria, secundaria, preparatoria y universitaria, pero como todo en la vida hay acciones y personas que marcan el camino, así también las personas e instituciones que tengo el agrado de mencionar son las mismas que considero las más representativas en mi vida académica. Empezando por mi familia a la cual le dedico este logro y que sin sus esfuerzos no hubiera sido posible nada de esto.

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* mi alma mater, mi cuna, mi inspiración, nombrar su simple nombre me eriza la piel. Ejemplo de valor, ética y profesionalismo, le estaré siempre agradecido por permitirme formar parte de ella, de vestir sus colores y llevar sus ideales. Gracias eternas por brindarme con ahínco y dedicación los conocimientos y valores que han hecho de mí la persona y profesionista que hoy soy, gracias por permitirme sentir ese orgullo de ser nombrado “universitario”.

A la *preparatoria 9 “Pedro de Alba”* y a *mis maestros* que representaron la introducción al mundo universitario y que sembraron en mí con dedicación valores, principios, aptitudes y actitudes necesarios en la vida y para la vida universitaria.

A la *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán*, mi segundo hogar, el lugar donde nací como profesionalista, el lugar que me brindó cuanto tenía en pro de mi formación, el lugar en donde conocí a grandes e importantes personas en mi vida. Mi segundo hogar, por que pase tantas horas en el que me volví parte de él, un lugar que será difícil de olvidar, porque siempre lo llevaré en mi mente y corazón. Gracias eternas a ti mi facultad, cuna de ciudadanos éticos y profesionales, cuna de experiencias maravillosas y mi cuna.

A mis *profesores de facultad*, los constructores de profesionistas, dadores de conocimiento, experiencias, valores, paciencia, confianza, en fin, fuente de sabiduría, actores principales en la formación de cientos de profesionales del área química y por supuesto mis queridos mentores a los cuales les estoy muy agradecido.

Al *Doctor Rene Miranda Ruvalcaba*, gran exponente en la investigación y enseñanza del área química, mi maestro, modelo a seguir, mi asesor y mentor al que le agradezco la oportunidad y el honor que me dio al permitirme colaborar con él en este proyecto, así como también la atención, esfuerzos y dedicación que brindó en la dirección y revisión del presente trabajo que hicieron posible su culminación. Por todo esto y por obsequiarme lo más importante que es su amistad, le agradezco infinitamente.

A mis coasesores el *Doctor Julián Cruz Olivares* y el *candidato a Doctor Rene Gerardo Escobedo González* por todo su apoyo, dedicación y asesoría en la realización del presente trabajo, así como también el brindado a mi persona. Indudablemente fueron pieza clave para la elaboración y culminación del mismo y al igual como lo manifesté con el doctor Rene Miranda, les agradezco por su amistad y paciencia, sin duda alguna más que mis asesores los considero mis amigos.

A la *Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México*, por concederme el apoyo y acceso a sus instalaciones, así como por facilitarme el uso del equipo indispensable para la realización del presente estudio. Esto gracias a la intervención del Doctor Julián Cruz Olivares, miembro, maestro e investigador de la misma, el cual tan amablemente puso a nuestra disposición los recursos necesarios para efectuar el estudio. Por esta razón nuevamente le reitero mi total agradecimiento.

A mis sinodales el Doctor José Luis Arias Téllez, el M. en C. Rubén Sanabria Tzintzun, el Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo y el M. en C. Bernardo Francisco Torres por sus contribuciones, consejos y apoyo enfocado al florecimiento del presente trabajo. Los cuales no solo fueron una pieza importante

en la culminación del mismo, sino que también fueron mis profesores durante la carrera y por ende pilares en mi formación académica, por lo que les agradezco muchísimo.

Dedicatoria.

La vida está llena de momentos difíciles, momentos de poca significancia, momentos buenos, y sin duda alguna de momentos extraordinarios, momentos que marcan la vida y claro está, este momento es uno de ellos, “la culminación de mi carrera”. La culminación de ese gran viaje que emprendí hace algunos años, el cual como todo en la vida estuvo lleno de alegrías, emociones, aprendizajes..., así como también de decepciones, caídas, momentos tristes, en fin, de “obstáculos” que a lo largo del camino recorrido fui superando y que al final del mismo se convirtieron en los mejores aprendizajes, que aunado a los buenos momentos hicieron del viaje, un momento inolvidable, una experiencia única y que siempre llevaré en mi corazón. Es por eso que hoy me siento muy agradecido con cada uno de los elementos que permitieron, contribuyeron y motivaron a emprender y finalizar este viaje. La lista es muy grande, hay a muchos a quien agradecer, pero no cabe duda que la lista la encabeza “mi familia”.

A *mis viejitos* que no tengo las palabras para describir lo agradecido y lo bendecido que me siento por tenerlos como mis padres, por el incondicional apoyo que me brindaron en esta hermosa aventura, porque sin su apoyo no hubiera tenido la oportunidad de emprender este viaje, que sin su presencia y aliento, el camino se hubiera tornado muy difícil, que gracias a su cobijo y cariño obtuve el valor y la fuerza para sobreponerme ante las adversidades, para vencer esos “obstáculos”. En serio mis viejitos, gracias por todo, no saben todo el amor, agradecimiento y orgullo que siento por ustedes.

Durante el transcurso de este camino no solo mis padres fueron mi apoyo, también estuvieron a mi lado mis abuelos, que en todo momento me alentaron a seguir adelante, que con sus sabios consejos, sus tiernas miradas y uno que otro jalón de cabello, me ayudaron siempre a reencontrar el camino, que con toda su experiencia fueron y han sido siempre mi guía. Gracias por todo el cariño, por todas sus experiencias y consejos que han hecho de mí el hombre que soy ahora.

Esta aventura hubiera estado incompleta sin dos hermosas personitas que sin duda alguna fueron fuente de mi motivación, la inspiración de terminar y hacer las cosas bien, para de dejar un buen ejemplo a seguir. Muchísimas gracias “mis chaparros” por llenar mi vida de alegría, por regalarme

sus palabras de aliento y motivación, en fin, por simplemente estar presentes en mi vida. Gracias mis hermanos por estar presentes en ella y llenarla de felicidad.

Gracias a las tres damitas más importantes en mi vida: *Sonia Fernández Roa*, mi hermosa madre. *Bertha Roa Gonzales*, mi tierna abuela y *Jacqueline Domínguez Fernández*, mi dulce y ocurrente hermana.

Gracias a los tres caballeros más importantes e influyentes en mi vida: *Edmundo Domínguez Ramírez*, mi incansable padre, *Cruz Manuel Fernández García*, mi abuelo, que desafortunadamente no alcanzó a ver culminado este sueño, pero que se, que se sentiría muy orgulloso de mí y a mi hermano, *Aldo de Jesús Domínguez Fernández*, la pizca de picardía y sazón de mi vida.

Dentro de esta bendición tan grande llamada familia, también se encuentran otras fuentes de inspiración que fueron pieza clave en la motivación de este logro, otras personitas con las que también me bendijo la vida y que siempre han estado ahí dándome lo mejor sí. Gracias a mis *tíos, tías, primos* y *primas* que sin duda alguna también les agradezco desde lo más profundo de mi corazón por todo su apoyo y aliento, y que si no fuera por el pequeño inconveniente de que son muchos los nombres que componen esta lista les agradecería uno por uno, como se lo merecen.

No cabe duda que toda historia tiene un lugar en donde se desarrolla, como Don Quijote en un lugar de La Mancha o Gulliver en Lilliput, mi aventura tuvo lugar en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, lugar que definitivamente nunca podré olvidar y es por ello y por muchas cosas más que también le dedico este trabajo a cada uno de los profesores, amigos y miembros que formaron parte de la atmósfera de este magnífico lugar. A mi alma mater la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi Facultad les dedico este logro, al final de cuentas es lo menos que puedo hacer por todo lo que me han dado, por permitirme sentir este orgullo de pertenencia esta mi universidad.

En fin dedico este logro a todas aquellas personas e instituciones que fueron participes directa e indirectamente en la consecución de este trabajo, a todas esas personitas que aunque no las haya mencionado no significa que no les este profundamente agradecido y que si leen esta dedicatoria sabrán que me refiero a ellos.

A la vida, por obsequiarme todas aquellas motivaciones que impulsaron la culminación de este pasaje en mi vida...

“La vida es como montar en bicicleta, para conservar el equilibrio hay que mantenerse en movimiento”.

Einstein.

“Locura, es hacer lo mismo una y otra vez esperando obtener resultados diferentes”.

Einstein.

ÍNDICE.

	Página.
1. Introducción.	<i>1</i>
2. Capítulo 1. Productos naturales.	<i>4</i>
2.1.1 Clasificación de los componentes químicos vegetales.	<i>4</i>
2.1.2 Características de los metabolitos secundarios o productos naturales vegetales.	<i>6</i>
2.1.3 Clasificación de los metabolitos secundarios.	<i>8</i>
2.1.4 Estudio de los constituyentes químicos de las plantas.	<i>9</i>
2.1.5 Preparación del material vegetal para ser analizado.	<i>10</i>
2.1.6 Extracción de compuestos orgánicos.	<i>11</i>
2.1.7 Agotamiento selectivo y sucesivo del material utilizando disolventes de diferente polaridad.	<i>13</i>
2.1.8 Métodos de separación e identificación.	<i>14</i>
2.1.9 Terpenoides, características y clasificación.	<i>15</i>
2.1.10 Hemiterpenos, características.	<i>17</i>
2.1.11 Monoterpenos, características y clasificación.	<i>17</i>
2.1.12 Sesquiterpenos, características.	<i>19</i>
2.1.13 Perezona.	<i>20</i>
2.2 Capítulo 2. Química verde y métodos de extracción alternativos.	
2.2.1 Química verde y sus doce principios.	<i>21</i>
2.2.1.1 Propuesta de evaluación del acercamiento verde.	<i>26</i>
2.2.2 Métodos alternativos de extracción.	<i>28</i>

2.2.3 Extracción asistida por microondas.	29
2.2.3.1 Teoría y principios de la EAM.	30
2.2.3.2 Parámetros que afectan al proceso de EAM.	33
2.2.4 Extracción asistida por ultrasonido.	35
2.2.4.1 Principios de la EAU.	36
2.2.4.2 Parámetros que afectan el proceso EAU.	37
2.2.5 Extracción asistida por infrarrojo.	38
2.3 Capítulo 3. Extracción con fluidos supercríticos (EFS-CO₂SC).	
2.3.1 Extracción con fluidos supercríticos.	43
2.3.2 Propiedades de los fluidos supercríticos, ventajas y desventajas de la técnica de EFS.	43
2.3.3 Dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ SC).	46
2.3.4 Solubilidad en gases densos.	48
2.3.5 Modelado de la solubilidad de compuestos en CO ₂ SC.	51
2.3.5.1 Ecuación de Chrastil y ecuación de Chrastil modificada.	52
2.3.6 Fluidos supercríticos modificados (codisolventes/entrainers).	54
2.3.7 Instrumentación y metodología en la extracción con fluidos supercríticos.	55
2.3.8 Tipos de extracción en EFS.	57
2.3.9 Aplicaciones de los fluidos supercríticos.	58
2.3.9.1 Aplicación de fluidos supercríticos al procesamiento de productos naturales.	59
2.3.9.2 Otras aplicaciones de los FSC.	61
2.3.10 Aspectos económicos del uso de FSC en la industria.	63

3. Capítulo 3. Objetivos e hipótesis.	
3.3.1	Objetivo general. 65
3.3.2	Objetivos particulares. 65
3.3.3	Hipótesis. 65
3.3.4 Parte experimental: reactivos, materiales, equipos y metodología.	
3.3.4.1	Espécimen vegetal (<i>Acourtia cordata</i>). 66
3.3.4.2	Localización geográfica del espécimen recolectado. 67
3.3.4.3	Tratamiento del espécimen vegetal (<i>Acourtia cordata</i>) preextracción. 68
3.3.4.4	Pruebas preliminares de solubilidad de perezona en CO ₂ SC. 69
3.3.4.5	Procedimiento experimental para la extracción de perezona con CO ₂ SC. 71
3.3.4.6	Cuantificación de perezona en los extractos por RMN ¹ H. 72
3.3.4.7	Evaluación del acercamiento verde del proceso de extracción de perezona de <i>Acourtia cordata</i> con CO ₂ SC. 74
4. Capítulo 4. Resultados y análisis de resultados.	
4.4.1	Identificación preliminar de perezona en la raíz de <i>Acourtia cordata</i> . 77
4.4.2	Estudio de la solubilidad de perezona en CO ₂ SC. 79
4.4.2.1	Modelado teórico de la solubilidad de perezona en CO ₂ SC. 82
4.4.2.2	Estudio cinético de la solubilidad de perezona en CO ₂ SC. 88
4.4.3	Estudio de la disolución de perezona a partir de la raíz de <i>Acourtia cordata</i> . 90
4.4.4	Comparación cuantitativa-selectiva de la extracción de perezona con CO ₂ SC contra los métodos de extracción térmico convencional, EAI, EAM y de EAU. 95
4.4.5	Análisis comparativo del consumo energético requerido para cada método analizado. 101

5. Capítulo 5. Conclusiones.	103
6. Anexos.	
6.1 Espectros de RMN ¹ H a 300 MHz de los extractos de perezona obtenidos con CO ₂ SC, utilizando al 1,4-dinitrobenceno como patrón interno.	105
6.2 Análisis estadístico por el método de Tukey y ANOVAS de los resultados comparativos de % de perezona obtenido en extracto y en la raíz de <i>A. cordata</i> mediante los procesos de EAI, EAM, EAU, CO ₂ SC y térmico.	115
7. Referencias.	122

Índice de tablas.

	Página.
Tabla 1. Técnicas analíticas que se utilizan generalmente para el análisis de compuestos químicos vegetales.	14
Tabla 2. Principales clases de terpenoides en las plantas y su clasificación en función de su número de unidades de isopreno.	16
Tabla 3. Parámetros dieléctricos de algunos disolventes.	32
Tabla 4. Parámetros críticos de las sustancias empleadas comúnmente en condiciones supercríticas.	44
Tabla 5. Valores típicos de densidad, viscosidad y difusividad para gases, fluidos supercríticos y líquidos.	46
Tabla 6. Ventajas y desventajas de los fluidos supercríticos comúnmente utilizados.	47
Tabla 7. Descripción física y taxonómica del espécimen <i>Acourtia cordata</i> .	67
Tabla 8. Cálculo del peso molecular (g/mol) y número de núcleos de H ⁺ correspondientes a la perezona y al 1,4-dinitrobenceno.	73
Tabla 9. Densidad real en función de la temperatura (°K) y de la presión (bar) del CO ₂ SC en g/l calculada en el reactor del equipo de EFS empleado.	83
Tabla 10. Solubilidad experimental y calculada con la ecuación de Chrastil, reportadas en fracción peso (f _p) y fracción molar (f _{mol}).	85
Tabla 11. Constantes ajustables de la ecuación de Chrastil modificada aplicada al proceso de solubilidad de perezona en CO ₂ SC obtenidos de los parámetros de regresión lineal.	86
Tabla 12. Solubilidad experimental y calculada con la ecuación de Chrastil modificada, reportadas en fracción peso (f _p) y fracción molar (f _{mol}).	86
Tabla 13. Extracción de perezona (Pz) a 106 bar, 323.15 °K para 6, 12 y 24 horas en CO ₂ SC. (Cuantificación por método del patrón interno RMN ¹ H).	91

Tabla 14. Concentración porcentual de perezona (Pz) encontrada en la raíz de <i>A. cordata</i> , extraída a 106 bar, 323.15 °K para 6, 12 y 24 horas en CO ₂ SC.	92
Tabla 15. Análisis de la selectividad de extracción de perezona (Pz) en función del tiempo de exposición de la raíz de <i>A. cordata</i> en CO ₂ SC a 106 bar, 323.15 °K para 6, 12 y 24 horas.	94
Tabla 16. Extracciones por método térmico convencional.	96
Tabla 17. Extracciones asistidas con irradiación infrarroja.	96
Tabla 18. Extracciones asistidas con irradiación con microondas.	97
Tabla 19. Extracciones asistidas con ultrasonido.	97
Tabla 20. Comparación extractiva y selectiva de perezona de la técnica supercrítica contra los métodos “tradicionales de extracción (térmico convencional, EAI, EAM y EAU)” y núm. de diferencias significativas.	98
Tabla 21. Comparación del consumo energético en Watts hora, requeridos en las metodologías de extracción térmico, infrarrojo, microondas, ultrasonido y CO ₂ SC.	102

Índice de figuras.

	Página.
Figura 1. Elementos básicos del metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario.	5
Figura 2. Origen de algunos metabolitos secundarios a partir del metabolismo primario.	7
Figura 3. Isopreno: $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}_2)$.	15
Figura 4. Estructuras de ejemplos representativos de monoterpenos acíclicos, monocíclicos y bicíclicos.	18
Figura 5. Acido abscisico.	19
Figura 6. Gosipol.	19
Figura 7. Estructura de la perezona (a) y de la isoperezona (b).	20
Figura 8. Código de color para evaluar un acercamiento verde.	27
Figura 9. Escala de análisis y evaluación para la propuesta de un procedimiento verde.	28
Figura 10. Mecanismo de extracción de un soluto desde una matriz vegetal.	29
Figura 11. Espectro electromagnético y zonas del infrarrojo.	39
Figura 12. Diagrama de fases de una sustancia pura en función de la presión y temperatura.	44
Figura 13. Relación de una molécula de soluto y de un disolvente en función de su densidad.	45
Figura 14. Variación de la densidad del CO_2 en función de la presión (bar) para diferentes isotermas.	48
Figura 15. Curvas características de solubilidad en gases densos.	49
Figura 16. Efecto de la presión sobre la solubilidad de distintos solutos en CO_2SC , a 333.15 °K.	53
Figura 17. Solubilidad de aceite de palma en CO_2 en función de la presión, a 323.15 °K.	55

Figura 18. Esquema general e instrumentación requerida en la EFS.	57
Figura 19. Espécimen de <i>Acourtia cordata</i> en su habitat natural.	66
Figura 20. Localización del cerro de viento en el parque ecológico Ehécatl, municipio de Ecatepec, Estado de México.	68
Figura 21. Raíz de <i>Acourtia cordata</i> .	68
Figura 22. Dispositivo construido con tubería de acero inoxidable empleado para la determinación de solubilidad y extracción de perezona con CO ₂ SC.	70
Figura 23. Equipo empleado para la extracción con CO ₂ SC. (<i>Equipo ubicado en la facultad de química de la UAEM</i>).	70
Figura 24. Celda metálica porosa empleada en la extracción de perezona.	72
Figura 25. Espectrómetro de RMN VARIAN MERCURY-300 y tubos de vidrio empleados para análisis de Resonancia Magnética Nuclear.	73
Figura 26. Diagrama de flujo y evaluación del acercamiento verde para el proceso de extracción de perezona de <i>Acourtia cordata</i> empleando CO ₂ SC.	76
Figura 27. Extracto de perezona recristalizada y espectro de RMN ¹ H a 300 MHz en CDCl ₃ .	78
Figura 28. Espectro de referencia de RMN ¹ H a 500 MHz de perezona en CDCl ₃	78
Figura 29. Isotermas de solubilidad de la perezona a 313.15, 323.15 y 333.15 °K	80
Figura 30. Variación real de la densidad del CO ₂ en función de la presión (bar) para diferentes isotermas. 303.15°K, 313.15°K, 323.15°K, y 333.15°K, P _c =73 bar.	84
Figura 31. Efecto comparativo de la presión a diferentes temperaturas sobre la solubilidad de perezona en CO ₂ SC experimental y calculada con la ecuación de Chrastil modificada.	87
Figura 32. Cinéticas de solubilidad de la perezona en CO ₂ SC.	89
Figura 33. Comparación rendimiento-selectiva de los procedimientos de extracción térmicos, IR, microondas, ultrasonido y CO ₂ SC.	99

Figura 34. Análisis de varianza (ANOVA) correspondiente a la comparación del % de extracción de perezona en el extracto de <i>A. cordata</i> obtenido.	115
Figura 35. Análisis por el método de Tukey correspondiente a la comparación del % de extracción de perezona en el extracto de <i>A. cordata</i> obtenido.	116
Figura 36. Análisis de varianza (ANOVA) correspondiente a la comparación del % de extracción de perezona en la raíz de <i>A. cordata</i> obtenido.	118
Figura 37. Análisis por el método de Tukey correspondiente a la comparación del % de extracción de perezona en la raíz de <i>A. cordata</i> obtenido.	118

Lista de abreviaturas.

AADR: Promedio absoluto de desviaciones relativas.

ABA: Ácido abscísico.

CE: Electroforesis capilar.

CO₂SC: Dióxido de carbono supercrítico.

COVB: Compuestos orgánicos volátiles biogénicos.

C_{std}: Concentración de estándar.

DHA: Ácido docosahexanoico.

DMF: Dimetilformamida.

DMSO: Dimetilsulfoxido.

EAI: Extracción asistida con infrarrojo.

EAM: Extracción asistida con microondas.

EAU: Extracción asistida con ultrasonido.

EFS: Extracción con fluidos supercríticos.

EPA¹: Ácido eicosapentaenoico.

EPA: Agencia de protección ambiental.

FDA: Administración de alimentos y medicamentos.

FSC: Fluido supercrítico.

GAS: Gas antidisolvente.

GC: Cromatografía gaseosa.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

I_p: Integral de perizona.

IR: Infrarrojo.

I_{std}: Integral de estándar.

ITP: Isotacoforesis.

MS: Espectrometría de masas.

MW: Peso molecular.

NDS: Número de diferencias significativas.

NIR: Infrarrojo cercano.

N_p: Número de núcleos de H⁺ en perezona.

N_{std}: Número de núcleos de H⁺ en estándar.

NW_p: Peso molecular de perezona.

NW_{std}: Peso molecular del estándar.

PAS: Precipitación utilizando antidisolventes comprimidos.

Pc: Presión crítica.

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados.

Pz: Perezona.

RESS: Expansión rápida de soluciones supercríticas.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RMN ¹H: Resonancia magnética nuclear de protón.

SEM: Microscopía electrónica de barrido.

SFC: Cromatografía de fluidos supercríticos.

Tc: Temperatura crítica.

TLC: Cromatografía en capa fina.

TLE: Electroforesis en capa fina.

TMS: Tetrametilsilano.

UV: Ultravioleta.

μ-LC: Cromatografía líquida capilar.

1. Introducción.

El maravilloso suceso de la vida tiene lugar en nuestro planeta gracias en gran medida al surgimiento de diferentes y numerosas moléculas orgánicas y a la complejidad de interacciones que se producen entre ellas. A partir del intrincado diseño molecular sobre el que subyace, se ha posibilitado la síntesis de innumerables compuestos con funciones diferentes y de distribución variada.

El mundo vegetal, es quizá, aquel que muestra un abanico de moléculas más diversas y del cual el hombre ha hecho y hace una provechosa utilización. La maquinaria química de un vegetal es tan ingeniosa que asombra al estudiar en su profundidad la estructura, función, metabolismo y regulación de cada molécula identificada y de los innumerables procesos en que participan a nivel celular.

Por otra parte, al no contar con el mecanismo de evasión y encontrarse ancladas al suelo o algún otro sustrato, las variadas especies vegetales han necesitado desarrollar mecanismos químicos de defensa que posibilitan su supervivencia frente al ataque de parásitos y herbívoros. A dichos mecanismos se les han contribuido, sin lugar a duda, el amplio espectro de sustancias orgánicas propias de los organismos vegetales. A toda esa diversidad de compuestos que el hombre extrae de un vegetal y aprovecha o intenta darle alguna utilización los denominamos productos naturales vegetales⁵⁶.

Las plantas poseen una variedad de mezclas de compuestos bioactivos tales como lípidos, grasas, fotoquímicos, fragancias, pigmentos y sabores que son ampliamente utilizados en la agroindustria alimentaria y no alimentaria, metabolitos empleados en la industria farmacéutica y en la industria cosmética. Para separar estos compuestos (solutos) de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida, ambas fases entran en interacción y el soluto se difunde desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes de su estructura natural original. Este proceso se conoce como lixiviación y para realizarlo existen varios métodos. Existen procesos muy utilizados que consisten en la extracción de aceites vegetales, en los cuales se emplean disolventes orgánicos como hexano, acetona, éter, entre otros muchos para extraer por ejemplo, aceites de maní, soja, semillas de lino, ricino, girasol o algodón¹⁶.

Los métodos de extracción convencionales empleados tanto a nivel industrial como a nivel de laboratorio, utilizan costosos y tóxicos disolventes orgánicos, nocivos tanto para la salud humana como para el ambiente. Además se acompañan de altas temperaturas que aceleran la degradación de los productos de interés y la formación de impurezas. Estos métodos se basan en la selección del disolvente asociado con el uso de calor y/o agitación e incluyen el equipo Soxhlet, la hidrodestilación

y maceración mezclada con agua, alcohol o grasa caliente. El Soxhlet es una técnica estándar y la principal referencia para evaluar el rendimiento de otros métodos de extracción sólido - líquido.

De un tiempo a la fecha se han desarrollado varias técnicas para la extracción de solutos de matrices sólidas, entre ellas se tiene a la extracción asistida con ultrasonido, la extracción asistida con microondas, la extracción por irradiación infrarroja, y la extracción con disolvente acelerado, con el objeto de acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de disolvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad del extracto.

Gracias al estímulo de la investigación de nuevas tecnologías respetuosas con el ambiente, que no representen ningún riesgo para la salud y garanticen una calidad superior de los productos, emerge la llamada **tecnología de fluidos supercríticos**, basada en la utilización de un fluido en condiciones supercríticas, como disolvente alternativo, siendo el más utilizado el **dióxido de carbono** en su estado supercrítico.

La extracción con CO₂SC es una tecnología que converge con las exigencias actuales del mercado y que se presenta como un acercamiento verde en los procesos extractivos, en el sentido de promover el uso de procesos de nulo impacto ambiental, cada vez más limpios en términos ecológicos, que cumplan la normativa en cuanto a las restricciones de utilización de disolventes contaminantes y que respondan a la creciente demanda de productos naturales por parte del consumidor. Tal procedimiento coincide perfectamente con las ideologías y principios de la llamada “química verde”, incidiendo por ejemplo a la perfección con su “quinto principio”, el cual exhorta a no usar disolventes o sustancias auxiliares, y en caso de usarse sean lo más inocuo posibles.

Son conocidas las bondades presentadas por parte de la tecnología supercrítica en la extracción de metabolitos de interés de sustratos vegetales, por tal razón el presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar la versatilidad de tal tecnología, llevando a cabo el **estudio de la extracción de perezona del espécimen vegetal *Acourtia cordata* empleando como disolvente al dióxido de carbono en estado supercrítico**. Tal estudio abarcará desde la búsqueda y establecimiento de las mejores condiciones de presión, temperatura y tiempo que permitan la mayor solubilidad de la perezona en el CO₂SC, pasando por la prueba de tales condiciones, cuantificación y evaluación de los parámetros de rendimiento y selectividad conseguidos, hasta la comparación de tales resultados entre los presentados en anteriores estudios de extracción de perezona por “métodos convencionales de extracción” como son los métodos térmicos y no tan convencionales, como la irradiación con infrarrojo, la extracción asistida por ultrasonido y la extracción asistida por microondas. En este punto partimos de la premisa de que la irradiación infrarroja y la extracción asistida por ultrasonido son las

técnicas más efectivas en la extracción de perezona de *A. cordata* en cuanto a los parámetros de rendimiento y selectividad respectivamente.⁶⁰ Por ende los resultados obtenidos en el presente estudio tomaron como estándar los resultados de ambas técnicas, aunados a los obtenidos por los métodos térmicos convencionales y la irradiación con microondas, con el objetivo de conocer la relevancia de la técnica supercrítica dentro de estas técnicas extractivas.

En este sentido a lo largo del presente estudio no solo se observará la eficaz extracción de perezona haciendo uso de CO₂SC, sino también se hará presente el hallazgo de las mejores condiciones que permitieron su extracción con el más alto rendimiento y selectividad posible. Tales peculiaridades en rendimiento y selectividad resultarán muy interesantes al compararlas con los resultados obtenidos por los antes mencionados “métodos de extracción convencionales”, pues resulta que la extracción con CO₂SC presentó superioridad tanto en rendimiento como en selectividad, marcando una clara ventaja sobre tales métodos para la extracción de perezona de la raíz de nuestro espécimen vegetal seleccionado.

Capítulo 1. Productos naturales.

Los productos naturales comprenden una gran gama de compuestos que son extraídos de especies vegetales así como de otros organismos. Estos son metabolitos secundarios que suelen presentar estructuras complejas y cuya función metabólica, en los organismos de los que son obtenidos, en su gran mayoría resulta desconocida.

Muchos de estos productos han sido utilizados desde tiempos remotos como parte de la medicina tradicional, en terapias y tratamientos basados en el consumo, así como, la aplicación de extractos herbales. Además de su uso directo, estos productos han sido tomados de base para el desarrollo de una gran cantidad de fármacos, además de ser recopilados en bases de datos de química combinatoria con la intención de obtener una gran diversidad de productos y de efectos deseados.

En las últimas tres décadas ha renacido el interés por los productos naturales y las posibles aplicaciones en la industria farmacéutica en su búsqueda de nuevos medicamentos más eficientes¹⁹, es importante señalar que cerca del 30 % de los fármacos empleados en los países industrializados proceden o se han modelado a partir de productos vegetales²³, por lo que debemos valorar a las plantas como una fuente importante para la producción de medicamentos.

Los productos naturales han ganado importancia y popularidad en sus usos terapéuticos, por ser considerados sustancias seguras, eficientes y con bajos costos, así como también, por contribuir a la posibilidad de hallar alternativas a la medicina convencional para el alivio de malestares. Además de ello, se ha incrementado el uso de los mismos como agentes preventivos para diversos padecimientos.

2.1.1 Clasificación de los componentes químicos vegetales.

Un tejido vegetal, como toda materia viva, se encuentra en un estado dinámico estacionario desde el punto de vista químico. Hay una constante síntesis y degradación de biomoléculas o metabolitos que determina el dinamismo de los sistemas biológicos, pero a su vez, al estar en equilibrio la velocidad de síntesis o aparición con la de degradación o desaparición de componentes celulares, las concentraciones de los mismos se mantienen constantes o bien estacionarias. Los compuestos químicos celulares (metabolitos) pueden ser clasificados en primarios y secundarios. Los compuestos primarios son todos aquellos que son esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento, el desarrollo y la reproducción. Comprenden los glúcidos o carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos,

principalmente. A pesar de las características extremadamente diferentes entre los seres vivos, las rutas generales para modificar y sintetizar estas sustancias son esencialmente las mismas para todos con muy pequeñas modificaciones. Estos procesos se conocen como metabolismo primario y los compuestos implicados en las diferentes rutas se conocen como metabolitos primarios (**Figura 1**).

Los glúcidos representan compuestos útiles como reserva energética (glucosa y almidón en plantas, glucógeno en animales), como material estructural y cementante (celulosa, pectinas, hemicelulosa en vegetales). Muchos de ellos son altamente solubles en agua y otros insolubles en la misma e incluso en otros disolventes, como es el caso de la celulosa. Los lípidos son típicos compuestos de reserva energética y de carbono, componentes estructurales fundamentales de las membranas biológicas, solubles en disolventes no polares. Las proteínas son quizás los compuestos más versátiles, esenciales por sus actividades catalíticas, estructurales, hormonales y una gran diversidad de otras funciones. Los ácidos nucleicos, en cambio, cumplen la primordial función de ser las moléculas depositarias de la información genética y permitirle a los seres vivos transmitir sus características a la descendencia.

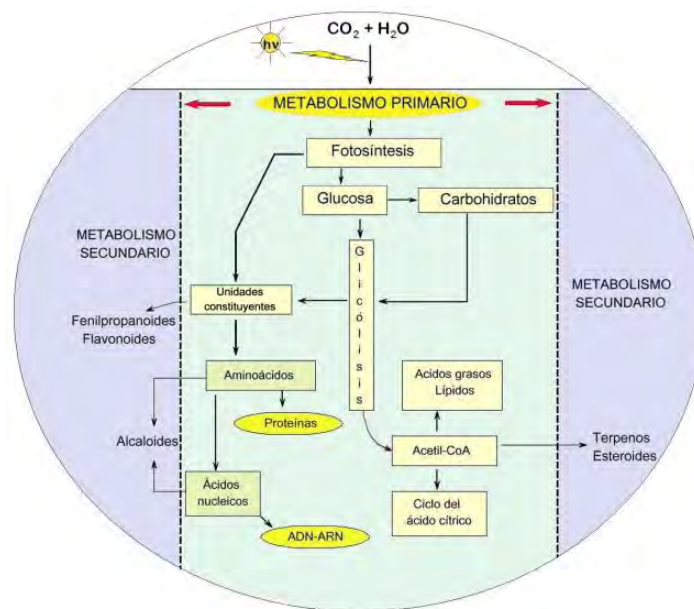


Figura 1. Elementos básicos del metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario.

Se denomina metabolismo secundario al conjunto de procesos en el que participan compuestos con una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo (**Figura 2**). Los compuestos que participan en este metabolismo se denominan metabolitos secundarios, son específicos de las especies y son los que a partir de ahora definiremos como **productos naturales**.

En sentido amplio un producto natural está formado por todos los compuestos de la naturaleza. En sentido más restrictivo un producto natural solo es un metabolito secundario. Los compuestos secundarios cumplen funciones que no resultan estrictamente vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho del metabolismo. No están, en general, directamente involucrados con el crecimiento y desarrollo, ni participan en procesos tales como la obtención de energía. Muchos de ellos son aprovechados por la planta que los sintetiza para interactuar con el medio, ya sea para atraer insectos y otros polinizadores, repeler predadores o seres dañinos, impedir la competencia con otras plantas, adaptarse a condiciones adversas de suelo o clima, etc. Es decir que cumplen preferentemente funciones ecológicas.

De todos modos, hay moléculas cuya inclusión en alguno de estos agrupamientos es dificultosa o discutible ya que no cumplen con la totalidad de los criterios seleccionados en la clasificación, sino sólo con algunos de ellos. Un ejemplo sería el caso de la clorofila en las plantas superiores, que es vital para las mismas, aunque no es un componente que este distribuido en todas las células del organismo sino sólo en tejidos verdes, fotosintéticos. No respondería estrictamente a las características de los compuestos primarios mencionados, pero sin su presencia las plantas carecerían de la capacidad de sintetizar las triosas que dan lugar al resto de los componentes glucídicos del vegetal.

2.1.2 Características de los metabolitos secundarios o productos naturales vegetales.

Gran diversidad de metabolitos secundarios han sido y son utilizados por el hombre para aplicarlos en la industria farmacéutica, terapéutica de cultivos, perfumera, alimenticia (como suplementos, aditivos o colorantes), en el curtido de cueros, etc. Éstos son los comúnmente llamados productos naturales vegetales y representan moléculas con variadas estructuras, diferentes propiedades de solubilidad y distintos orígenes biosintéticos. En muchos casos los metabolitos secundarios pueden ser materia prima para sintetizar otros compuestos útiles, originando productos de semisíntesis. La utilidad de los mismos está solamente limitada por la imaginación humana o por el avance de los conocimientos científicos¹². Debemos aclarar que los metabolitos primarios también representan productos naturales, son parte de la química vegetal y su utilización por el hombre en alimentación y en diversas industrias es esencial y muy conocida. Pero los metabolitos secundarios están restringidos generalmente al metabolismo de algunas especies vegetales o familias botánicas.

La glucosa es sintetizada vía fotosíntesis por prácticamente todas las plantas, mientras que la morfina por ejemplo es una estructura molecular biosintetizada solamente por especies de la familia *Papaveraceae*. Por ello, el término productos naturales vegetales se refiere generalmente a los metabolitos secundarios, con real o potencial utilidad para el hombre y/o para la adaptación de la planta al ambiente. Como precursores

in vivo de todos los metabolitos secundarios siempre aparece algún compuesto presente en una vía del metabolismo primario. Así es como los compuestos nitrogenados, como aminoras, amidas, glicósidos cianogénicos y alcaloides, tienen algún aminoácido o derivado de ellos como precursor en su ruta biosintética; compuestos de la vía primaria de las pentosas-fosfato como la eritrosa-fosfato y el fosfoenolpiruvato de la glucólisis dan lugar a las distintas clases de metabolitos fenólicos; los terpenoides tienen como precursores a intermediarios de la glucólisis o grupos acetilos. Esto pone en evidencia que hay una verdadera integración metabólica entre los compuestos primarios (principalmente glúcidos, lípidos y proteínas) y los compuestos secundarios.

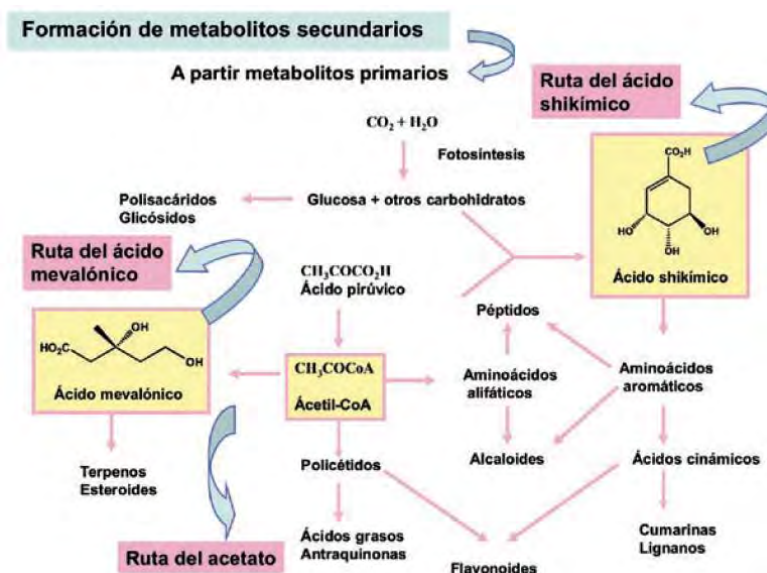


Figura 2. Origen de algunos metabolitos secundarios a partir del metabolismo primario.

Algunos metabolitos secundarios o productos naturales cumplen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Ciertos grupos actúan como pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción al atraer a insectos polinizadores o animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen una función protectora frente a predadores, como disuasorios, proporcionando al vegetal sabores amargos, convirtiendo a las plantas en materiales indigestos o venenosos. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales⁹. Aunque en casos aislados, algunos metabolitos secundarios se encuentran en animales⁵⁶, la gran mayoría de los productos naturales de interés son de origen vegetal.⁷⁰

2.1.3 Clasificación de los metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios tienen características especiales respecto a su distribución, debido a que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. A fin de establecer un orden, estos compuestos se clasifican teniendo en cuenta su origen biosintético, las características estructurales comunes y las propiedades de solubilidad. Teniendo en cuenta esto se pueden agrupar en tres grandes grupos:

- **Compuestos nitrogenados y azufrados.** Caracterizados por poseer nitrógeno y/o azufre en su estructura, de solubilidad y origen biosintético diverso, pero mayoritariamente derivados de aminoácidos. Dentro de esta clasificación se encuentran principalmente a los alcaloides y los glucósidos cianogénicos. Los alcaloides son un grupo diverso de compuestos con cerca de 4 000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y por supuesto de gran interés en la industria farmacológica. Por otra parte, los glucósidos cianogénicos, se consideran posiblemente, los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa.⁴⁰

- **Compuestos fenólicos.** Cuentan con al menos un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos aromáticos en su estructura química, la mayoría son hidrosolubles y derivados biosintéticamente del ácido shikímico. Entre estos compuestos se incluyen a los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, lignina y taninos. Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos son considerables, se refieren sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, entre muchos otros.

- **Terpenoides.** Se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides, siendo la molécula de isopreno la unidad estructural. Son liposolubles, y biosintéticamente asociados a la vía del ácido mevalónico o a la vía gliceraldehído fosfato - ácido pirúvico, dependiendo de la clase de terpenoides en cuestión. Constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios con más de 40 000 moléculas diferentes, divididos en seis grupos: monoterpenos, **sesquiterpenos**, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides, dentro de los cuales se encuentran los carotenos, glucósidos cardiotónicos, taxoles, entre otros.⁴⁰

Es importante mencionar que varios compuestos no esenciales considerados metabolitos secundarios distribuidos en plantas y microorganismos, pueden no estar incluidos en estos grupos por no compartir algunas propiedades o características propias de los mismos.

2.1.4 Estudio de los constituyentes químicos de las plantas.

La disciplina que tiene como principal objetivo el estudio de los constituyentes químicos de las plantas es la fitoquímica. El estudio de tales compuestos abarca desde sus estructuras químicas, metabolismo (biosíntesis y degradación), distribución natural, función biológica, extracción, hasta su evaluación cuali-cuantitativa. Esta especialidad se apoya y participa de otras disciplinas como la biología celular, bioquímica y fisiología vegetal, bioquímica ecológica, fitopatología, sistemática vegetal, entre muchas otras. En cuanto a su aplicación, la fitoquímica constituye una herramienta importante en las ciencias agrícolas y forestales, tanto en las áreas de producción vegetal y animal, como en lo relativo a tecnología agrícola y forestal por su vinculación con las materias primas y productos finales de diversas industrias agroforestales. Asimismo, presenta aplicaciones importantes en relación a las ciencias farmacéuticas y la biotecnología vegetal.

Muchos de los compuestos orgánicos producidos por el metabolismo secundario de las plantas, tienen interés terapéutico o industrial, dichos compuestos están implicados en la adaptación bioquímica de la planta al ambiente, así como en otras interacciones químicas entre planta-planta, planta-animal y entre la planta y los factores abióticos del entorno. Mientras que la ecología como ciencia estudia o trata las interacciones entre organismos vivos en su hábitat, la fitoquímica se enfoca, entre otros aspectos de las plantas, en las interacciones a nivel molecular. Podemos definir entonces a la fitoquímica ecológica como la disciplina que tiene como objeto de estudio a las interacciones químicas entre las plantas, las plantas y los animales y las plantas con el medio en general.

Esta área de estudio permite profundizar los conocimientos sobre la arquitectura de los ecosistemas y el rol que juegan en las plantas los metabolitos secundarios. Como resultado de estos conocimientos basados en las interacciones químicas entre las plantas con otros organismos y el medio, se pueden lograr nuevas y útiles aplicaciones para el hombre en diversas áreas como farmacología, manejo y conservación del ambiente, cambio climático y prácticas agrícolas sustentables⁵⁷. Cabe señalar por otra parte que la bioquímica ecológica incluye en esos estudios las interacciones químicas entre todos los seres vivos y entre ellos y el ambiente⁴¹. Para el estudio de esas interacciones debe priorizarse el análisis de la estructura y metabolismo de los metabolitos secundarios o productos naturales sintetizados en los tejidos. Sin duda alguna, la naturaleza, en especial las plantas, constituyen la fuente más eficaz de estructuras moleculares que interactúan vinculando los diversos sistemas biológicos y el ambiente.

2.1.5 Preparación del material vegetal para ser analizado.

La composición química de los vegetales varía entre las diferentes especies, en las distintas partes de la planta y según sus estados fenológicos. Por lo tanto, el método de muestreo es fundamental en el momento de enviar para su análisis al laboratorio una muestra representativa de lo que se quiere estudiar. La forma de tomar la muestra depende del objetivo que se persigue. Si se trata de plantas o partes de ellas, es fundamental evitar la contaminación de las muestras en estudio con plantas enfermas, heces, orina, tierra, etc. La correcta identificación botánica del material es de primordial importancia en los análisis fitoquímicos. Se han cometido muchos errores en el pasado sobre la identidad de las plantas, por eso es esencial verificar que las especies hayan sido correctamente identificadas, ya sea para el estudio de nuevas sustancias presentes en las plantas o para el análisis de sustancias ya conocidas obtenidas a partir de plantas de las que no habían sido determinadas con anterioridad. La preparación del material a analizar depende de varios factores, como el método fitoquímico a seguir y el o los compuestos a determinar, entre otros. Los métodos de análisis fitoquímicos pueden ser de diversos tipos²⁷:

a) Histológicos. Consisten en la observación de cortes de tejidos que han sido tratados con reactivos que producen reacciones de coloración o precipitación ante la presencia de ciertos compuestos de interés a investigar. Un ejemplo es la identificación de almidón en tejidos observando el color azul que se desarrolla ante la reacción con el reactivo lugol.

b) Químicos. Generalmente comprenden el tratamiento de extractos con reactivos que dan lugar a la producción de colores o precipitados característicos.

c) Fisicoquímicos. Como el uso de métodos cromatográficos y espectrométricos u otros métodos a partir de los extractos obtenidos del material en ensayo.

d) Biológicos. Donde se observa el efecto de los extractos vegetales sobre cultivos de microorganismos, células, tejidos o sobre animales.

La investigación fitoquímica de una planta comprende varios aspectos:

- Extracción de los compuestos a analizar a partir de una muestra o espécimen.
- Separación y aislamiento de los mismos.
- Identificación y/o caracterización de los compuestos aislados.
- Investigación de las rutas biosintéticas de determinada molécula.
- Determinación o valoración cuantitativa.

En algunos casos se debe trabajar con material recién cosechado o recolectado, ya que los principios a estudiar sufren una rápida y fácil degradación. Pero en otras circunstancias, transcurre un tiempo variable entre la toma de muestras, la llegada al laboratorio y el comienzo de los análisis. En esos casos debe realizarse lo que se conoce como estabilización del material. La planta recién cosechada continúa viviendo durante cierto tiempo a expensas de sus reservas y de los constituyentes del tejido; así se producen cambios químicos donde la planta aprovecha sus componentes merced a la acción de enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción, ruptura, reordenamiento, transferencia de grupos y condensación. La mayoría de las alteraciones que se producen una vez que el material ha sido recolectado las podemos agrupar de la siguiente manera:

a) Modificaciones de la estructura, b) caramelizaciones, c) pérdida de compuestos volátiles, d) fermentaciones y e) oxidaciones.

A fin de mantener una muestra sin cambios desde el momento en que se obtiene, es necesario detener los procesos enzimáticos que comienzan en el mismo instante del corte. La fijación relativa de la composición química de la planta se denomina estabilización. Antes de encarar un análisis químico el material debe ser estabilizado tratando de fijar la composición química del vegetal, procurando que la misma sea lo más parecida posible a la que tenía en su estado original. Para llevar a cabo este proceso se pueden aplicar diferentes métodos que, en general, van a producir una deshidratación y una desnaturalización de los sistemas enzimáticos propios de los tejidos, inactivando la acción catalítica de los mismos. Una forma práctica y sencilla de estabilización es mediante el tratamiento con calor moderado, aplicado por ejemplo en estufa a una temperatura de referencia de 60 °C hasta que las muestras alcancen peso constante. Otras variantes incluyen la conservación a bajas temperaturas, produciendo el congelamiento de los tejidos, o la liofilización o criodesecación, empleando en este caso bajas temperaturas acompañadas de un rápido descenso de la presión.

2.1.6 Extracción de compuestos orgánicos.

En la extracción y purificación de compuestos orgánicos mediante el empleo de disolventes, se suelen seguir ciertas reglas basadas en las analogías estructurales existentes entre la sustancia a extraer y el disolvente que se empleará para tal fin. De este modo, para la extracción de glúcidos, lípidos, alcaloides, pigmentos, etc., a partir de los tejidos vegetales o animales que los contienen (o de los líquidos orgánicos provenientes de ellos) se emplearán disolventes cuya estructura sea semejante o afín a la de las sustancias que se quieren extraer. La polaridad de los compuestos es otro elemento a tener en cuenta al considerar la solubilidad de un soluto en un disolvente dado. Es así que los disolventes fuertemente polares disuelven

solutos iónicos o altamente polares, mientras que los disolventes poco polares no disuelven de manera eficiente los solutos iónicos, pero sí a los solutos de baja polaridad. Un factor vinculado a la polaridad de un disolvente es su capacidad para formar uniones de tipo puente hidrógeno. Los disolventes con posibilidad de formar este tipo de interacciones facilitan la disolución de sustancias que también pueden participar de estas asociaciones.

Desde el punto de vista general los disolventes pueden clasificarse en polares y no polares, existiendo además algunos de polaridad intermedia.

- **Disolventes polares:** La polaridad de estos disolventes está vinculada no sólo al tipo de uniones interatómicas (de tipo iónicas o covalentes polares), sino también a la presencia de grupos funcionales polares (hidroxilo o amino) y la capacidad de formar uniones de tipo puente hidrógeno. Los compuestos con grupos funcionales polares son solubles en este tipo de disolventes, siempre que el componente hidrocarbonado no sea relativamente grande (no más de 4 átomos de carbono, como regla general). Dentro de esta clase de disolventes encontramos al agua, los alcoholes de bajo peso molecular (metanol y etanol), la dimetilformamida (DMF), el dimetilsulfóxido (DMSO) y algunos ácidos de bajo peso molecular como el fórmico y el acético, aunque en este último caso hay que tener en cuenta la reactividad de los mismos.

-**Disolventes no polares:** Poseen estructura de hidrocarburos, sin grupos que confieran una marcada polaridad a la molécula. En su estructura predominan las uniones químicas C-C. Entre éstos, y en orden de polaridad creciente, encontramos al éter de petróleo, tetracloruro de carbono, ciclohexano y benceno.

- **Disolventes de polaridad intermedia:** Son en general aquellos disolventes cuya estructura molecular es eléctricamente asimétrica. Es el caso típico de la molécula de cloroformo, donde la distribución de polaridades creadas por los distintos tipos de uniones (de tipo covalente) crea una zona con densidad de carga negativa (átomos de cloro) y otra con densidad de carga positiva (átomo de hidrógeno) formando un dipolo. Entre este tipo de disolventes se encuentran también ciertos compuestos oxigenados que, al no poseer funciones hidroxilo como los alcoholes, pueden actuar como aceptores pero no como dadores en uniones de tipo puente hidrógeno. Es el caso del éter etílico, la acetona y el acetato de etilo.

2.1.7 Agotamiento selectivo y sucesivo del material utilizando disolventes de diferente polaridad.

El método clásico para obtener distintos constituyentes orgánicos de tejidos vegetales secos (madera, semillas, raíces, hojas) es una extracción continua del material pulverizado en un equipo Soxhlet con distintos disolventes que permiten extraer las sustancias buscadas con un mayor o menor grado de pureza. El material vegetal (seleccionado y pulverizado) es agotado en primer lugar con un disolvente de tipo no polar o bien de polaridad intermedia como éter de petróleo, benceno, cloroformo, éter etílico, etc. Luego la muestra es tratada con distintos alcoholes como etanol o metanol (disolventes de tipo polar) y finalmente con agua. Los extractos obtenidos se pueden dividir de la siguiente forma:

a) Extracto etéreo, b) extracto alcohólico y c) extracto acuoso.

En el extracto etéreo se encuentran los compuestos químicos lipofílicos, y en los otros dos extractos, los compuestos hidrofílicos.

a) El extracto etéreo contiene compuestos liposolubles, tales como:

- Materia grasa (lípidos), aceites esenciales, esteroides (triterpenos), carotenoides (tetraterpenos), alcaloides (bases), clorofila, vitaminas liposolubles, entre otros.

b) En el extracto alcohólico se pueden encontrar:

- Azúcares simples, glucósidos triterpénicos, compuestos fenólicos (taninos, pigmentos, flavonoides).

c) Mediante el agotamiento del material con agua se obtienen compuestos hidrosolubles. Entre otros:

- Glúcidos simples, glucósidos, alcaloides (sales), vitaminas hidrosolubles.

Generalmente, cuando el agotamiento con alcohol o metanol ha sido total, no es posible identificar los mismos compuestos químicos en el extracto acuoso. Cuando se requiere aislar compuestos hidrosolubles de tejidos de hoja, los lípidos deben ser removidos al principio, lavando el extracto repetidamente con éter de petróleo. Para identificar los compuestos extraídos, los tres extractos son analizados separadamente a través de una metodología conforme a las características físico-químicas de cada grupo de principios activos. Los extractos obtenidos pueden ser clarificados por filtración a través de celite con una bomba de vacío y luego concentrados a presión reducida. Esto se lleva a cabo generalmente en un evaporador rotatorio, en el cual se concentran las soluciones hasta lograr una reducción de su volumen, a temperaturas comprendidas entre 30 a 40 °C. Los extractos concentrados deben ser almacenados, refrigerados y con agregado de tolueno para prevenir crecimiento de hongos y evitar así pérdidas y alteración del material.

Las extracciones de compuestos volátiles de las plantas requieren precauciones especiales y procedimientos específicos.

2.1.8 Métodos de separación e identificación.

La química analítica cumple un rol fundamental en el análisis, aislamiento y cuantificación de los diferentes compuestos fitoquímicos, además de hacerlo en aspectos de investigación básica referidos al metabolismo vegetal. Actualmente se van delimitando nuevos campos de estudio y, sumándose a las disciplinas involucradas con la genómica y la proteómica, se hace referencia también a la fitómica, un área que se aboca al análisis del metabolismo primario y secundario en las plantas, incluyendo helechos, musgos, hongos y algas⁷⁹. El desarrollo completo de un determinado método analítico incluye una serie de pasos que involucran el almacenamiento de la muestra, su preparación, la separación y el aislamiento de analitos, su identificación y, finalmente, su cuantificación. Todos los pasos implican un trabajo detallado y cuidadoso, aunque las instancias de preparación de la muestra y el aislamiento de los analitos suelen mencionarse como etapas críticas. En la actualidad, la química analítica permite el estudio de componentes fitoquímicos a través de una serie de diversas técnicas de análisis. La **tabla 1** muestra una visión general de las que pueden ser utilizadas en fitómica. Dentro de las técnicas disponibles, los métodos cromatográficos guardan gran relevancia. Las técnicas básicas de separación son, la cromatografía sobre papel, cromatografía en capa fina, cromatografía gaseosa y la cromatografía líquida de alta resolución. La elección de cada una de ellas depende principalmente de las propiedades de solubilidad y volatilidad de los compuestos a separar.⁷⁹

Tabla 1. Técnicas analíticas que se utilizan generalmente para el análisis de compuestos químicos vegetales.⁷⁹

Cromatografía.	Cromatografía en capa fina (TLC).
	Cromatografía gaseosa (GC).
	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
	Cromatografía líquida capilar (μ -LC).
Electroforesis.	Electroforesis en capa fina (TLE).
	Isotacoforesis (ITP) (electroforesis a velocidad uniforme).
	Electroforesis capilar (CE).
Técnicas espectroscópicas.	Espectrofotometría UV.
	Espectrofotometría infrarrojo (IR).
	Espectrofotometría en el infrarrojo cercano (NIR).
	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).
	Espectrometría de masas (MS).

La cromatografía sobre papel es aplicable a los compuestos hidrosolubles de las plantas, principalmente glúcidos sencillos, aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. La cromatografía en capa fina se utiliza para separar lípidos, esteroides, carotenoides y clorofilas. La cromatografía gaseosa se aplica para aislar compuestos volátiles o que mediante una derivatización dan lugar a compuestos que resultan volátiles bajo las condiciones de corrida, tales como ácidos grasos, mono y sesquiterpenos, entre otros. Muchas veces estas técnicas se utilizan en forma combinada, por ejemplo, la cromatografía en capa fina-cromatografía gaseosa, para separar una clase de compuestos en particular de las plantas. Las técnicas cromatográficas pueden usarse en micro o en macro escala, en el último caso es común la cromatografía en columna. Una técnica muy común de separación de compuestos en fitoquímica es la electroforesis. En un primer momento esta técnica se aplicó sólo para separar sustancias con carga como aminoácidos, algunos alcaloides, aminas, ácidos orgánicos y proteínas. Otras clases de compuestos neutros (azúcares, fenoles) también pueden ser separados en un campo eléctrico previa conversión de los mismos en complejos metálicos.

2.1.9 Terpenoides, características y clasificación.

Un gran número de sustancias vegetales están incluidas en este grupo de metabolitos secundarios o productos naturales denominados **terpenoides**. Quizás es el grupo más numeroso, con varios miles de estructuras descritas.

Todas tienen al isopentenil-PP como precursor biosintético, teniendo como unidad estructural básica a la molécula de isopreno (**Figura 3**), de cadena abierta, ramificada e insaturada:

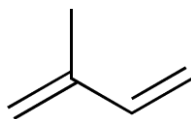


Figura 3. Isopreno: $H_2C=C(CH_3)-CH=CH_2$.

Sus esqueletos carbonados se forman por la unión de dos o más de estas unidades de 5 carbonos, de ahí que también se les denomina isoprenoides.

Son liposolubles, o sea solubles en disolventes orgánicos, aunque algunos se encuentran solubles en el contenido celular por estar formando parte de glicósidos o poseer alguna transformación estructural.

Se les clasifica según la cantidad de unidades de isopreno que contengan en su estructura (**Tabla 2**). Cada una de estas clases de terpenoides tiene importancia en diversos aspectos, algunas en el crecimiento, otras en el metabolismo o en funciones ecológicas de las plantas.

Tabla 2. Principales clases de terpenoides en las plantas y su clasificación en función de su número de unidades de isopreno.

N° Unidades de isopreno	N° C	Nombre o clase	Ejemplos
1	5	Hemiterpenos	Isovaleraldehído en esencia de <i>Eucalyptus spp.</i> Componentes de aceites esenciales.
2	10	Monoterpenos	Mentol, mircenol, limoneno, pineno. Otros componentes de aceites esenciales.
3	15	Sesquiterpenos	Ácido abscísico (hormona), perezona (quinona sesquiterpénica) .
4	20	Diterpenos	Ácidos diterpénicos en resina (ácido abiético y fitol). Componentes de algunas esencias. Giberelinas, steviósidos y diterpenos tóxicos.
5	25	Sesterpenos	Presentes en algunos hongos, escasos y poco importantes por ahora.
6	30	Triterpenos	Esteroles (colesterol). Triterpenos verdaderos: amirina y limonina.
8	40	Tetraterpenos	Carotenoides (carotenos y xantófilas).
N	n	Politerpenos	Caucho en <i>Hevea brasiliensis</i> .

Casi todos los terpenoides naturales tienen estructuras cíclicas con uno o más grupos funcionales (hidroxilos, carbonilos, etc.). Químicamente los terpenoides son en general, solubles en lípidos y están localizados en el citoplasma. En el caso de los aceites esenciales, éstos se ubican generalmente en glándulas especiales en la superficie de las hojas, mientras que los carotenoides están asociados con cloroplastos en las hojas y con cromoplastos en los pétalos. Son extraídos de los tejidos de las plantas con éter o cloroformo y pueden ser separados por cromatografía en placas de sílico-gel usando los mismos disolventes. Sin embargo ofrecen dificultad para ser detectados en pequeña escala, puesto que todos (salvo los carotenoides), son levemente coloreados y no hay un reactivo cromogénico para ellos. En el caso de los compuestos volátiles como los hemiterpenos, mono y sesquiterpenos, los métodos de identificación y cuantificación más recomendables y utilizados son los cromatográficos en fase gaseosa acoplados a espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear.¹¹

Es común en los terpenoides encontrar pares de formas isoméricas aislados de las plantas, como es el caso del nerol y geranial, dos monoterpenos e isómeros ópticos muy distribuidos, cuya mezcla en los aceites esenciales se conoce como “citral”.

A los **terpenoides** se les atribuye un gran número de funciones. La producción, acumulación, emisión y secreción de terpenoides está generalmente asociada con la presencia de estructuras anatómicas altamente

especializadas como, tricomas glandulares, cavidades secretoras, glándulas epidérmicas, conductos y cavidades resiníferas, canales laticíferos, entre otros.

2.1.10 Hemiterpenos, características.

Es el grupo más pequeño de terpenoides, constituidos por una sola unidad de isopreno, y por ende muy volátiles. El hemiterpeno mejor conocido es el **isopreno** propiamente dicho, producto volátil, que es emitido a través de las hojas por muchos vegetales, principalmente árboles, helechos y plantas tropicales. La emisión foliar por año es verdaderamente importante, está estimada en 5×10^8 toneladas de carbono, siendo el principal catalizador de ozono troposférico.⁹

El isopreno y los monoterpenos son los más abundantes compuestos orgánicos volátiles biogénicos (COVB) emitidos naturalmente por la vegetación a la atmósfera, que se caracterizan por una alta reactividad en la interacción que efectúan en la tropósfera durante períodos diurnos y nocturnos.

La cuantificación de los COVB es fundamental cuando se intenta establecer una adecuada estrategia para el control del ozono troposférico. Se ha fomentado el uso de herramientas como la teledetección de imágenes satelitales y la aplicación de modelos matemáticos, permitiendo así obtener resultados aproximados de los aportes de los COVB y su contribución en la dinámica atmosférica con los posibles efectos nocivos para la salud humana, los ecosistemas y el ambiente.¹⁵

Otro ejemplo de hemiterpeno es el isovaleraldehído, presente en el aceite esencial de varias especies de *Eucalyptus*. Se presenta como un líquido incoloro-amarillo, pálido y con olor frutal, recordando al durazno y cacao.

2.1.11 Monoterpenos, características y clasificación.

Estos compuestos formados estructuralmente por la unión de dos isoprenos, son abundantes en los aceites esenciales junto con los sesquiterpenos, alcoholes simples, aldehídos simples y otros. Poseen punto de ebullición entre 140 y 180 °C, a diferencia de los sesquiterpenos que generalmente lo tienen por encima de los 200 °C.

Pueden encontrarse ejemplos con estructura acíclica, monocíclica o bicíclica, que a su vez pueden ser hidrocarburos no saturados o pueden tener grupos funcionales oxigenados (alcoholes, aldehídos o cetonas):

- **Acíclicos:** Entre otros hidrocarburos no saturados, dentro de este grupo podemos mencionar al mirceno y ocimeno, así como también al geraniol, nerol y linalol, que presentan funciones alcohólicas y al neral y geranial con funciones aldehído.

- **Monocíclicos:** Entre ellos se encuentra el mentol, mentona y el limoneno.

- **Bicíclicos:** Como el α - pineno, tuyona, alcanfor y el 1,8-cineol. Algunas de las estructuras químicas de los ejemplos mencionados anteriormente se encuentran representadas en la **figura 4**.

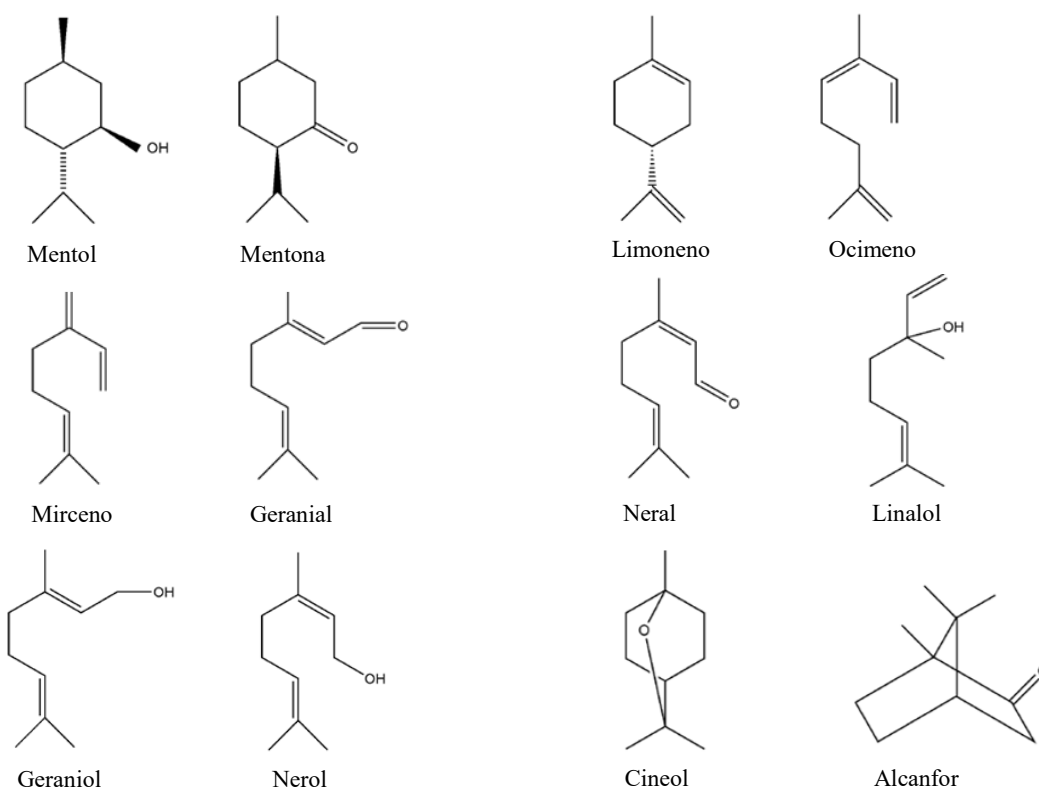


Figura 4. Estructuras de ejemplos representativos de monoterpenos acíclicos, monocíclicos y bicíclicos.

El α - pineno es el compuesto más difundido como componente de los aceites esenciales, mientras que el segundo más difundido se le considera al vulgarmente conocido como cineol o eucaliptol. Este último es el 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo octano, éter monoterpeneo bicíclico ampliamente difundido en el reino vegetal.⁸⁶ Varias especies del género *Eucalyptus* poseen altas cantidades de este monoterpeneo, por lo que son fuente para la industria farmacéutica, perfumística y todas aquéllas que hacen uso de este producto natural. En *E. globulus* podemos encontrar aproximadamente 70 % o más de este compuesto, en *E. polybractea* un 90 % y en *E. cinerea* un 65 %. En hojas de laurel comestible, *Laurus nobilis*, se encuentra entre un 35 a 48 % y en sus hidrolatos hasta en un 69 %.²⁶

2.1.12 Sesquiterpenos, características.

En este grupo tenemos ejemplos de moléculas con estructura acíclica como el farnesol (en aceite esencial de rosa y de *petitgrain*); monocíclicos como el γ -bisaboleno o limeno (en aceites de limón, lima, bergamota, manzanilla y alcanfor); bicíclicos como el cariofileno (en aceites de clavo, lúpulo y canela). Otros productos naturales con esta estructura son las lactonas sesquiterpénicas, presentes en muchas especies de la familia botánica *Compositae*, de importancia en quimiotaxonomía. Se conocen más de 500 estructuras con esta naturaleza y pueden clasificarse de acuerdo a su esqueleto carbocíclico, en germacranólidos, guayanólidos, eudesmanólidos y xantonólidos. Algunos poseen actividades antitumorales, antimicrobianas y citotóxicas. Un ejemplo es la artemisinina, en *Artemisia annua*, con actividad antimalárica, antitumoral y efectivo agente antiparasitario en el hombre y animales, con promisorios resultados en el control de nemátodos de importancia en agricultura.²⁵

El ácido abscisico (ABA) es otro ejemplo de sesquiterpeno, siendo una importante hormona ampliamente distribuida en plantas (**Figura 5**). Anteriormente conocido como abscisina o dormina, actúa sobre la apertura y cierre de estomas, sobre la abscisión de frutos y hojas. Es también un potente inhibidor del crecimiento, tiene efectos contrarios a los de las hormonas de crecimiento como auxinas, giberelinas y citocininas. Mientras que la concentración normal en vegetales es de 0.01 a 1 ppm, en plantas marchitas puede haber 40 veces más.

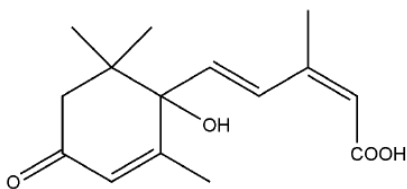


Figura 5. Acido abscisico.

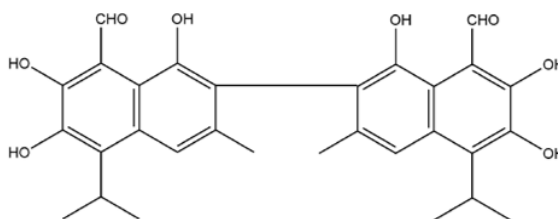


Figura 6. Gosipol.

El gossipol es otro ejemplo de sesquiterpeno pero con estructura dímica o sea con 30 carbonos, polihidroxlado, por lo que se considera también como un compuesto fenólico (**Figura 6**), presente en semillas de algodón y tóxico para no rumiantes y rumiantes jóvenes. Como es termolábil, la semilla de algodón pierde su toxicidad al ser tratada con altas temperaturas en el proceso de extracción de aceite.

2.1.13 Perezona.

La perezona (2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-3-hidroxi-5-metil-1,4-benzoquinona) es una quinona sesquiterpénica abundante en la raíz de los miembros de la familia perezia (**Figura 7a**), es un compuesto cristalino de coloración anaranjada, que posee un punto de fusión de 102-103 °C, que al disolverse en álcalis origina soluciones purpuras. Ésta es reconocida como uno de los primeros metabolitos secundarios aislados en forma cristalina, obtenido por el doctor Leopoldo Rio de la Loza en 1852. Fue aislada por primera vez de la raíz de la planta *Perezia adnata*, la cual era conocida como “raíz del pipitzahuac” en la medicina tradicional de México.

Inicialmente se identificó erróneamente a la sustancia como ácido pipitzahoico por su ligero carácter ácido, sin embargo, investigaciones posteriores determinaron que en vez de ser un ácido carboxílico, se trataba de una *p*-quinona con un grupo hidroxilo ácido que era capaz de formar sales metálicas como un fenol. Posteriormente se determinó su estereoquímica con un centro quiral *R*, y se propuso una de las primeras aproximaciones a la estructura en 1935 por Kögl, la cual no era del todo correcta⁴⁵, sin embargo sirvió como base para un estudio posterior realizado en México, en el cual gracias al uso de la RMN ¹H se determinó finalmente la posición de los sustituyentes del anillo quinónico.

Este compuesto forma parte de la medicina tradicional mexicana y se le han adjudicado importantes propiedades farmacológicas, siendo las más conocidas, su uso como laxante, diurético, analgésico, agente antiparasitario, su empleo para la reducción del tono basal del músculo liso, así como también su eficaz efecto antihiper glucémico. Aunadas a estas características farmacológicas, recientemente se le han asociado a la perezona y también a su isómero, la isoperezona (**Figura 7b**), propiedades benéficas contra diversos tipos de cáncer, como el de mama, útero y leucemia, despertando el interés de los investigadores en su aplicación como agente preventivo o terapéutico.³¹

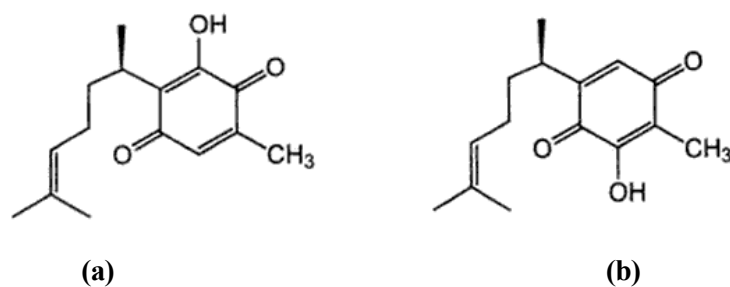


Figura 7. Estructura de la perezona (a) y de la isoperezona (b).

Capítulo 2. Química verde y métodos de extracción alternativos.

2.2.1 Química verde y sus doce principios.

En los últimos años del siglo XX se han desarrollado numerosas industrias que tienen como base algún proceso químico, entre las que se pueden mencionar la producción de nuevos polímeros, materiales semiconductores, productos farmacéuticos, agroquímicos e incluso la aparición reciente de nuevas tecnologías como la nanotecnología, la cual está basada, en gran medida, en la química, entre muchas otras.

Uno de los mayores inconvenientes de la química y de la industria química es el problema de la generación de residuos y productos que afectan al ambiente. Esto ha ocasionado que la química tenga una imagen negativa ante la sociedad, ya que por lo general se destacan más los aspectos negativos que los positivos.

En los inicios de la industria química se tenía la percepción de que los recursos naturales eran infinitos y que el uso y explotación indiscriminada no tendría ningún efecto sobre el ambiente. Esta percepción comenzó a cambiar a mediados del siglo XX cuando, al final de la Segunda Guerra Mundial, hubo un crecimiento exponencial en la demanda y producción de productos químicos, lo que ocasionó la aparición de una conciencia ecológica derivada de la aparición de los efectos de la emisión de contaminantes a la atmósfera y los efluentes. En los años recientes esta conciencia ha sido reforzada por el cambio climático derivado del calentamiento global producto de la emisión de gases con efecto invernadero.⁹⁴

La aparición de estos efectos sobre el ambiente incitó al desarrollo de legislaciones que tenían como finalidad abatir la emisión de contaminantes al ambiente. En general, el objetivo de estas leyes era implantar límites a las emisiones de gases y líquidos al ambiente, generalmente a través de la implementación de sistemas que atraparán los contaminantes. Este enfoque comenzó a cambiar por otros más eficientes, como el desarrollo de procesos de producción que disminuyeran o eliminaran la generación de emisiones contaminantes, así como la producción de compuestos con mejores propiedades y que pudieran ser reprocesados o biodegradados a sustancias inocuas para el ambiente.⁴

Existen en nuestro planeta alrededor de 12 millones de sustancias químicas, de las cuales unas cien mil son utilizadas en producción de diversos materiales usados en la vida diaria. De estas, alrededor de tres mil son producidas en gran escala (miles a millones de toneladas por año), y en su gran mayoría no se conocen sus efectos sobre la salud humana o sobre el ambiente⁹⁴. Por otro lado, se han caracterizado alrededor de 600 sustancias cuyo uso ha sido restringido o totalmente prohibido. Esto

ha estimulado a los químicos a estudiar la obtención de compuestos que posean las propiedades deseadas en función de su utilidad pero que carezcan de las propiedades dañinas al ambiente, así como al desarrollo de procesos de producción que eliminen o minimicen la generación de emisiones contaminantes.

La emisión de contaminantes puede ser reducida de diversas maneras, como es el empleo de rutas que reduzcan la generación de subproductos, con la consiguiente maximización del aprovechamiento de las materias primas. Por otra parte, el empleo de catalizadores puede ayudar a reducir la generación de subproductos de desecho, pero además puede ayudar a reducir el consumo de energía de los procesos de producción. De esto se desprende lo que hoy se conoce como “desarrollo sostenible”.⁹⁴

En los Estados Unidos, el Acta de Prevención de la Contaminación de 1990 estableció la reducción de las fuentes de contaminación como prioridad para solucionar los problemas ambientales. La aprobación de esta acta significó un alejamiento de los antiguos conceptos de control de la contaminación, evolucionando el concepto de control de las emisiones hacia la prevención de la generación de emisiones, esto es, aplicar el criterio de que es mejor prevenir que remediar. Este pensamiento dio origen a la aparición del concepto de “química verde”, que surge como conjunto de acciones encaminadas a reducir el deterioro ambiental. Desde su inicio conceptual e integración a la EPA en 1991, la química verde ha crecido de forma continua, nacional e internacionalmente, con la creación de organismos, redes, instituciones, revistas y programas educativos, cuyo objetivo principal es incentivar el diseño de productos y procesos que reduzcan o eliminen el uso y generación de sustancias nocivas para el ser humano y para el ambiente.

La química verde se constituye del empleo de rutas sintéticas alternativas, uso de condiciones de reacción no convencionales, que puedan obtener los mismos productos que la química tradicional, pero de manera menos contaminante, reduciendo o eliminando el uso o producción de sustancias peligrosas, con el fin de conservar el ambiente natural y sus recursos, así como limitar los efectos negativos del desarrollo humano, e incentivar la utilización de sustancias químicas menos tóxicas que las disponibles actualmente o inherentemente más seguras respecto a su potencial de accidentes.

En tal sentido la US Environmental Protection Agency (EPA) define a la “Química verde” como: *"La utilización de un conjunto de principios que reduzcan o eliminen el uso o la generación de sustancias peligrosas en el diseño, fabricación y aplicación de productos químicos"*.

La implementación de la química verde tiene la ideología de reducir y eliminar sustancias peligrosas para el ambiente y la salud desde un ámbito educativo, de investigación, hasta la industria química.

En este sentido, se han propuesto prácticas destinadas a favorecer la sostenibilidad del planeta, mediante la conservación y uso racional de bienes y servicios medio ambientales, así como la planificación y administración eficiente de los recursos naturales por parte de las autoridades competentes, teniendo en cuenta tres aspectos fundamentales: el ambiente, la economía y la sociedad, por ser estos, las bases de la sostenibilidad y principal aplicabilidad de los principios de la química verde.

La química verde plantea 12 principios para conseguir sus objetivos los cuales fueron propuestos originalmente por Paul Anastas y John Warner en su libro *Green Chemistry, theory and practice* en 1998, los cuales constituyen el pilar de la química verde. Concretamente, estos 12 principios son⁴:

1. **Prevención:** Es preferible evitar la producción de un residuo, que tratar de limpiarlo una vez que se haya formado.

2. **Economía atómica:** Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que incorporen al máximo todos los materiales en el producto final.

3. **Uso de metodologías que generen productos con toxicidad reducida:** Siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el ambiente.

4. **Generación de productos eficaces pero no tóxicos:** Los productos químicos deberán ser diseñados de manera que mantengan la eficacia a la vez que reduzcan su toxicidad.

5. **Reducción del uso de sustancias auxiliares:** Se evitará, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etcétera), y, en el caso de que se utilicen, deberán ser lo más inocuas posible.

6. **Disminución del consumo energético:** Los requerimientos energéticos deberán ser catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose su consumo todo lo posible. Se intentará llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambientes.

7. **Utilización de materias primas renovables:** Debe preferirse el uso de materia prima renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.

8. **Reducción de derivados:** Los procesos deben minimizar o evitar derivaciones innecesarias, ya que cada nueva etapa requiere reactivos y energía adicional, además de producir más desechos.

9. Potenciación de la catálisis: Se emplearán catalizadores lo más selectivos posible, preferiblemente reutilizables, en lugar de reactivos estequiométricos.

10. Generación de productos biodegradables: Los productos químicos se diseñarán de tal manera que, al finalizar su función, no persistan en el ambiente sino que se transformen en productos de degradación inocuos.

11. Desarrollo de metodologías analíticas para el seguimiento en tiempo real: Las metodologías analíticas deberán permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas.

12. Productos inherentemente más seguros: Deben seleccionarse las sustancias y su forma de uso a manera de minimizar el potencial de accidentes, incluyendo escapes, explosiones e incendios.

En la actualidad, existen muchos estudios en los cuales se utiliza la química verde para reducir el impacto ambiental de los residuos industriales y lograr un manejo adecuado de los recursos ambientales. Sin embargo, son muchos los retos pendientes a los cuales debemos dar respuesta, y por lo tanto es necesario seguir investigando sobre las interacciones ambientales en un rango de escalas espacial y temporal, teniendo en cuenta el ciclo de vida completo de los productos, desarrollar nuevas metodologías de detección, identificación y separación de contaminantes, mecanismos de los cambios fotoquímicos y los de toxicidad, impulsar las fuentes renovables de materias primas, adelantar estudios en el campo de la biomasa, y en la reutilización de residuos de las catálisis en las células solares fotovoltaicas.³³

En este rubro el término química verde debe entenderse dentro del concepto fundamental de lo que es química y como tal, estudia la materia y todas sus transformaciones. Bajo este contexto, los químicos diseñadores de síntesis pueden elaborar sustancias químicas y transformaciones moleculares para modificar las propiedades fisicoquímicas indeseables de un compuesto peligroso (reacciones de adición, isomerización y transformaciones directas de la unión C-H), mediante pequeños cambios en su estructura, de tal forma que puedan afectarse significativamente sus propiedades, como por ejemplo la biodegradabilidad, movilidad ambiental y toxicidad. El diseño verde busca generar productos muy efectivos y que además, tengan un mínimo impacto sobre el ambiente. Precedentes en la industria química demuestran cómo el cambio estructural de una molécula puede mejorar su comportamiento ambiental sin reducir su funcionalidad, como en el caso del tetrapropilbencensulfonato (TPS), un surfactante que se usó en detergentes durante los años 50.

Su biodegradabilidad era baja y dio lugar a grandes formaciones de espuma en los ríos y plantas de tratamiento de aguas residuales. Los químicos lograron solucionar este problema, transformando el TPS en sulfonato de alquil benceno lineal (LAS), que se degrada con mayor facilidad.³³

El desarrollo de nuevos medicamentos y la síntesis de moléculas bioactivas que implican procesos extremadamente costosos, incluyendo la formulación, presentación final del fármaco y control de calidad en cada etapa de la manufactura del producto, son otras áreas de oportunidad en las que la industria farmacéutica requiere rutas de síntesis amigables con el ambiente, sin dejar de cumplir con las demandas económicas y especificación de los productos.³³

Actualmente un gran número de compañías farmacéuticas están reduciendo drásticamente la cantidad de residuos peligrosos en la manufactura de los productos farmacéuticos más vendidos. Pfizer, por ejemplo, rediseñó la síntesis de varios principios activos por medio de química verde, como el sildenafil citrato, ingrediente activo del Viagra (R), resultando incluso en una ruta de síntesis más eficiente que requiere menos trabajo y proporciona una mayor recuperación de disolventes. Del mismo modo, el proceso de fabricación del clorhidrato de sertralina, principio activo del Zoloft (R), fue rediseñado, siguiendo los principios de química verde. GlaxoSmithKline, también modificó la ruta de síntesis del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), mediante la síntesis enzimática, reduciendo el número de etapas requeridas por la ruta de síntesis química.³³

Por otro lado la industria utiliza disolventes en grandes cantidades; más del 50% de los materiales usados en procesos farmacéuticos, corresponden a disolventes orgánicos, algunos de los cuales son recuperados y reutilizados. Sin embargo, la mayoría son incinerados como método de disposición final⁴⁶, lo cual causa un gran impacto en términos económicos y ambientales. El uso de reacciones que utilicen menos disolventes o prescindan de los mismos, son las más eficientes.

En este sentido también los métodos tradicionales comúnmente utilizados en la extracción de principios activos de productos naturales (Soxhlet, maceración, decocción, infusión, etc.) generalmente requieren largos tiempos de extracción y uso intensivo de disolventes orgánicos que pueden tener potenciales efectos negativos sobre el ambiente y la salud humana. Por otra parte, los disolventes orgánicos son caros y su eliminación del producto final es muy costosa. Por lo tanto, el uso de tecnologías verdes para reducir y/o eliminar el uso o la producción de materiales peligrosos es altamente deseable.

Estudios recientes proponen otros disolventes y catalizadores, tales como el dióxido de carbono supercrítico que se utiliza como catalizador y se considera como un buen “disolvente verde” en

diferentes tipos de síntesis. Por ejemplo, en las reacciones de bromación de compuestos aromáticos y en las de polimerización del metacrilato de metilo. Los líquidos iónicos también son buenos catalizadores y disolventes que pueden reemplazar el diclorometano, por que no son volátiles, ni inflamables, eliminan los peligros asociados con disolventes orgánicos volátiles, reducen el uso de energía y minimizan las emisiones.⁴⁶

En este aspecto un ejemplo práctico del uso de disolventes verdes es la extracción de aceites esenciales, de metabolitos secundarios y de componentes activos de semillas, frutas, plantas, tallos y raíces, mediante la **tecnología de los fluidos supercríticos (FSC)**, este es un proceso alternativo, sostenible y que puede implicar un “acercamiento verde” si se utiliza un disolvente con las características que este demande, como es el caso del **dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC)** en lugar de los tradicionales disolventes químicos. Esta tecnología aparte tiene la ventaja de que se evitan los procesos de eliminación de disolventes para la purificación, mejorando la calidad de los productos obtenidos. Realmente la única limitante que existe para el empleo de esta tecnología, es la escasa información disponible de la solubilidad de compuestos naturales en CO₂SC, ya que para potenciar la selectividad del proceso de extracción se requiere conocer la solubilidad del componente que se desea extraer en el fluido supercrítico.

Uno de estos compuestos es la ya mencionada **2-(1,5-dimetil-4-hexenil)-3-hidroxi-5-metil-1,4-benzoquinona “la perezona”**. La cual es la molécula principal del presente estudio que comenzaremos y para el cual se propone un proceso de extracción con un gran acercamiento verde a partir de la raíz de la planta conocida comúnmente como “pipitzahuac” o bien, *Acourtia cordata* **utilizando CO₂SC**.

2.2.1.1. Propuesta de evaluación del acercamiento verde.

Con la finalidad de contribuir a la transformación en la forma de hacer química, que favorezca la búsqueda cotidiana de la sostenibilidad y teniendo en consideración los 12 principios de la química verde, se han propuesto metodologías para evaluar el nivel de acercamiento verde que tiene un método experimental.⁶² Una de estas propuestas se desarrolló dentro del programa de maestría y doctorado en ciencias químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual implica un proceso de análisis, crítica y propuesta que permite inculcar e incentivar a los estudiantes, científicos e industriales, tanto los conocimientos como los valores que los consoliden como profesionales capaces de instituir y practicar una química que contribuya a la conservación de los recursos naturales del planeta, generando en ellos la conciencia sobre su poder de decisión al optar por la realización de

procesos que dañan al ambiente o prevenir su contaminación mediante las modificaciones necesarias para minimizar y, si es posible, eliminar tanto la generación de residuos y efluentes, como la utilización de sustancias tóxicas en todo proceso de síntesis y extracción de compuestos químicos.⁶²

Para determinar la cualidad verde de un proceso experimental es necesario en primera instancia conocer con profundidad los 12 principios de la química verde y sus implicaciones, debido a que el análisis se efectúa en relación al cumplimiento de estos. La herramienta metodológica que se ha propuesto es mixta:⁶² cualitativa, mediante un código de color (**Figura 8**) y semicuantitativa, a través del uso de una escala numérica tipo Linkert (1-10), que para tales evaluaciones se consideró adecuado indicarlas entre paréntesis. Esta herramienta de evaluación en resumen incluye el código de colores y la escala tipo Linkert que va de totalmente café (1) a totalmente verde (10), y que de manera ponderal indica cual es el grado de acercamiento al protocolo de la química verde.

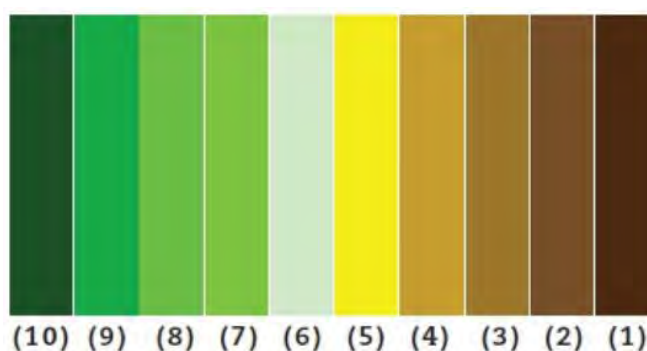


Figura 8. Código de color para evaluar un acercamiento verde. (10, completamente verde, 1 totalmente café).⁶²

Para una mejor evaluación y mayor comprensión del significado de los principios de la química verde, se propone hacer el diagrama de flujo del proceso o método experimental a evaluar, incluyendo pictogramas de los reactivos y disolventes, mostrando que principio de la química verde se está evaluando, que tan verde o café es su aplicación o incidencia en la escala del 1 al 10 conforme a la **figura 9**, y para otorgar una calificación se debe tomar en cuenta la participación de lo que se está analizando en la reacción y cuál es el daño y/o riesgo que esto representa para el ambiente.

	(10)	Totalmente verde
	(9)	Gran acercamiento verde
	(8)	Muy buen acercamiento verde
	(7)	Buen acercamiento verde
	(6)	Ligero acercamiento verde
	(5)	Transición café a verde
	(4)	Ligeramente café
	(3)	Medianamente café
	(2)	Muy café
	(1)	Totalmente café

Figura 9. Escala de análisis y evaluación para la propuesta de un procedimiento verde.⁶²

2.2.2 Métodos alternativos de extracción.

En los últimos años se han incrementado los requerimientos sobre los procesos de extracción de compuestos alimenticios y farmacéuticos a partir de productos naturales renovables. Por tal motivo se busca la aplicación de nuevas técnicas de extracción que den mayores rendimientos, requieran menores tiempos de procesamiento, utilicen disolventes menos peligrosos y nocivos para la salud y el ambiente y apliquen condiciones operativas benignas durante el procesamiento de compuestos termolábiles.

Varios artículos en la literatura discuten la teoría y principios que rigen el mecanismo de extracción de un soluto a partir de una matriz vegetal.²⁸

En esencia, la extracción y recuperación del analito desde la matriz vegetal se puede describir a través de cuatro pasos secuenciales (**Figura 10**):

1. El soluto desorbe desde los sitios activos de la matriz vegetal.
2. Difunde por la matriz hasta alcanzar la interfase matriz-fluido.
3. El analito se distribuye y difunde a través del fluido de extracción presente dentro del poro, para llegar así al seno de la fase extracto.
4. El extracto se recolecta y analiza mediante una técnica analítica apropiada.

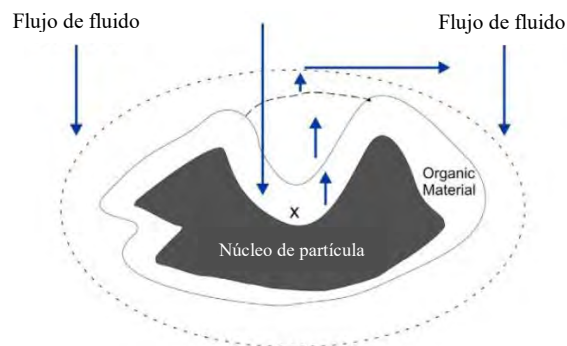


Figura 10. Mecanismo de extracción de un soluto desde una matriz vegetal.

El hecho de que una única planta pueda contener cientos de metabolitos secundarios, hace necesario el desarrollo de métodos de extracción selectivos, rápidos y de alta eficiencia.

Por más de 120 años la extracción Soxhlet ha sido la técnica más utilizada en la separación de fitocompuestos⁵¹. La aplicación de esta técnica requiere en general largos tiempos de extracción, lo que conlleva un alto consumo de energía y la potencial degradación térmica de los fitocompuestos. Por otra parte, como ya se había puntualizado, el uso de disolventes orgánicos puede traer consigo efectos negativos sobre el ambiente y la salud humana.⁹⁰

En las últimas décadas han comenzado a explorarse métodos alternativos, más amigables con el ambiente, que buscan lograr mayores rendimientos con menor consumo de disolvente, energía y menores tiempos de procesamiento.

Entre estas nuevas técnicas cabe mencionar a la extracción asistida con microondas (EAM), ultrasonido (EAU), infrarrojo (EAI), procesos triboquímicos y el uso de fluidos en condiciones supercríticas (EFS).

2.2.3 Extracción asistida con microondas.

A finales de la década de los 80 se utilizó por primera vez la energía de microondas para la extracción de compuestos orgánicos, empleando un horno de microondas doméstico¹. Desde entonces se ha incrementado significativamente el uso de microondas para la extracción de compuestos bioactivos a partir de material vegetal, debido en gran medida a las inherentes ventajas que presenta en cuanto a la reducción del tiempo de extracción (alrededor de 30 minutos) y del volumen de disolvente orgánico requerido.⁵⁸

La EAM consiste básicamente en poner en contacto una matriz que contiene un compuesto de interés con un disolvente adecuado, el cual será calentado por la energía de las microondas⁶⁵. La extracción del analito de interés desde la muestra hasta el extractante va a depender de la temperatura y de la naturaleza del disolvente.

Hay que resaltar que, contrariamente a lo que sucede en un calentamiento convencional, las microondas tienen la capacidad de interaccionar con las moléculas de disolvente y no con los recipientes contenedores (generalmente de vidrio). Así, el calentamiento es directo y es posible alcanzar con rapidez el punto de ebullición, disminuyendo el tiempo de extracción.

La extracción asistida con microondas constituye una tecnología que debe ser considerada entre las opciones tendientes a reducir el consumo de energía⁶. La EAM se rige principalmente por dos fenómenos: la conducción iónica y la rotación dipolar, que en la mayoría de los casos, se producen simultáneamente en disolventes polares⁵³. Esto hace que la temperatura del disolvente aumente, mejorando la solubilidad de los solutos.

2.2.3.1 Teoría y principios de la EAM.

Las microondas son ondas electromagnéticas no ionizantes que comprenden un campo eléctrico y un campo magnético que oscilan perpendicularmente entre sí en un rango de frecuencia de 0.3 a 300 GHz. En la **figura 11** se puede observar el espectro electromagnético, en el cual la región de radiación de microondas se encuentra entre la radiación infrarroja y las ondas de radio.⁵²

El principio del calentamiento de las microondas se basa en su impacto directo sobre materiales o disolventes polares y está regido por los fenómenos de conducción iónica y rotación dipolar.

En la mayoría de los casos estos dos mecanismos de interacción se producen simultáneamente⁵⁵. A continuación se detalla cada mecanismo.

- **Conducción iónica:** Es la migración de iones cuando están sometidos a la acción de un campo eléctrico. La resistencia que ofrece el medio (solución) a la migración de iones produce rozamiento, lo que eventualmente calienta la solución.

- **Rotación dipolar:** Implica el reordenamiento de los dipolos cuando se les aplica un campo eléctrico. Los hornos de microondas generan campos eléctricos rápidamente cambiantes, lo que hace que las moléculas dipolares oscilen hacia adelante y atrás. La capacidad de las moléculas para alinearse con el campo eléctrico

dependerá de la frecuencia de la onda y de la viscosidad del medio en donde se encuentren. Si la frecuencia es baja, la molécula oscilará en fase con el campo eléctrico. Con este comportamiento la molécula ganará energía interna, aunque el calentamiento global no será alto. Si en cambio, la frecuencia de onda es alta, la molécula no tendrá el tiempo suficiente para oscilar en fase con el campo eléctrico y por lo tanto no rotará. En este caso, al no existir movimiento, no hay transferencia de energía y por lo tanto no hay calentamiento.

A frecuencias de 2450 MHz ocurre el proceso de calentamiento, que es el alineamiento de las moléculas con el campo, seguido de su vuelta al desorden, y ocurre 4.9×10^9 veces por segundo, lo que implica un rápido calentamiento.⁸²

La radiación aplicada en los hornos de microondas utiliza esta frecuencia, y ocurre un fenómeno intermedio; es decir, que la frecuencia es lo suficientemente baja como para que el dipolo tenga tiempo de rotar y seguir al campo eléctrico alternante. Sin embargo, la frecuencia es lo suficientemente alta como para que el dipolo no pueda seguir al campo con precisión, por lo que, cuando el dipolo se realinea con el campo, éste ya ha cambiado. Esto generará una diferencia de fase entre la orientación del campo y del dipolo. Esta diferencia de fase hace que el dipolo, por fricción y colisión con otras moléculas, absorba la energía de microondas como calor, dando lugar al calentamiento³⁵. Está claro que, para se produzca el calentamiento bajo los dos mecanismos anteriores, es preciso que esté presente un compuesto dieléctrico o disolvente dipolar.

La eficiencia en la generación de calor en diferentes disolventes dependerá del factor de disipación, que mide la relación entre la pérdida dieléctrica de la muestra o factor de pérdida y la constante dieléctrica. El factor de disipación se cuantifica según la siguiente ecuación:

$$\delta = \epsilon'' / \epsilon \quad \text{Ecuación (1).}$$

Donde δ representa el ángulo de pérdida, ϵ'' es la pérdida dieléctrica, que mide la capacidad de conversión de la energía de la microonda en calor y ϵ es la constante dieléctrica, que cuantifica la capacidad de un material dieléctrico de almacenar energía potencial eléctrica cuando es sometido a un campo eléctrico.

De hecho, la constante dieléctrica es una medida de la capacidad de absorber energía de microondas, mientras que el factor de pérdida sería la capacidad de disipar la energía absorbida. De acuerdo a lo expuesto, el efecto de la energía de microondas depende de la naturaleza del disolvente y de la muestra.

Este factor es un importante parámetro de comparación cuando se analizan dos disolventes de constantes dieléctricas parecidas y ángulo de pérdida bajos. Aquellos que posean un factor de pérdida mayor, serán más capaces de disipar energía como calor y por lo tanto calentarán más al medio.

En la **tabla 3** se muestran las constantes dieléctricas y los factores de disipación de algunos disolventes comúnmente utilizados en EAM. Es apreciable el elevado valor que poseen los alcoholes de bajo peso molecular, con un máximo para el etanol, disminuyendo con la cantidad de carbonos.

Tabla 3. Parámetros dieléctricos de algunos disolventes.

Disolvente	Constante Dieléctrica (ϵ) ^a	Factor de disipación $\tan(\delta)$ ^b
Agua	80.4	0.123
Metanol	32.8	0.659
Etanol	24.6	0.941
1-Propanol	19.5	0.757
1-Butanol	17.8	0.571
1-Pentanol	15.8	0.427

^a= Constante dieléctrica del disolvente a 25°C y sometido a un campo eléctrico estático. ^b= Determinados a 25°C y con una frecuencia de 2.45 GHz.

Con respecto al principio de extracción con microondas, el material vegetal seco que se utiliza en la mayoría de los casos, tiene pequeñas trazas de humedad en las células vegetales, permitiendo que se produzca el calentamiento por las microondas. Cuando se calienta el interior de la célula vegetal debido al efecto de las microondas, la humedad se evapora y genera una enorme presión sobre la pared celular. La presión empuja la pared celular desde el interior, estirándola y produciendo su ruptura, lo que facilita la lixiviación de los componentes activos de las células rotas hacia el disolvente.⁹⁰

El efecto de la energía de microondas depende fuertemente de la susceptibilidad dieléctrica, tanto de la matriz vegetal como del disolvente. Este fenómeno puede incluso ser más intensificado si la matriz vegetal se impregna con disolventes con un mayor factor de disipación. La radiación de las microondas puede hidrolizar enlaces éter de la celulosa, principal constituyente de la pared celular vegetal, produciendo compuestos solubles en unos pocos minutos. La temperatura más alta alcanzada por la pared celular durante la EAM mejora la deshidratación de la celulosa y reduce su resistencia mecánica y esto a su vez ayuda al disolvente a acceder más fácilmente dentro de la célula y liberar los componentes en el disolvente caliente.⁵¹

Sin embargo, en caso de trabajar con componentes termolábiles, se suele sumergir la muestra en un disolvente transparente a las microondas (hexano, cloroformo) para evitar altas temperaturas que puedan producir su degradación.⁹⁵

2.2.3.2 Parámetros que afectan al proceso de EAM.

Los parámetros comúnmente más estudiados para la optimización de las condiciones de extracción son la composición y volumen del disolvente, temperatura, presión (en equipos de vasos cerrados), potencia de microondas, tiempo de extracción y características de la matriz.

- Disolvente.

La correcta elección de disolvente es fundamental para la obtención de un proceso de extracción eficiente. Esta elección está determinada por la solubilidad del analito, por la interacción entre el disolvente y la matriz vegetal y, finalmente, por las propiedades que tiene el disolvente de absorber las microondas.

Las propiedades dieléctricas del disolvente juegan un papel importante en la extracción con microondas. Los disolventes que son transparentes a las microondas no se calientan y aquellos que tienen la capacidad de absorber las microondas sí lo hacen. Así, el hexano ($\epsilon = 1.8$) es transparente a las microondas y no se calienta en virtud de las microondas, mientras que el etanol ($\epsilon = 24.6$) tiene buena capacidad de absorción de las microondas y por lo tanto se calienta más rápido mejorando el proceso de extracción². La capacidad de un disolvente para interactuar con las microondas puede ser modulada mediante el uso de mezclas, con la finalidad de aumentar el factor de disipación y de esta manera mejorar la eficiencia y selectividad del proceso⁸¹. Una de las mezclas más comunes es acetona-hexano. En algunos casos pequeñas cantidades de agua en el disolvente de extracción permiten que éste pueda penetrar fácilmente en las células y facilitar un mejor calentamiento de la matriz vegetal. Esto a su vez aumenta la transferencia de masa de los componentes activos en el disolvente de extracción.⁷⁸

El volumen del disolvente de extracción es también un factor crítico. Debe ser suficiente para asegurar que la matriz vegetal esté completamente sumergida en el mismo durante todo el tiempo de irradiación. En la literatura existe una gran variación de relaciones disolvente/muestra reportadas. A menudo se utilizan entre 10 y 30 ml de disolvente por cada 1-10 g de muestra⁷⁸. En general, en los métodos convencionales de extracción una mayor relación disolvente/matriz puede ser muy eficaz. Sin embargo, en EAM una relación más alta puede producir menores recuperaciones, debido a una distribución y exposición no uniforme de las microondas.⁹⁰

- Temperatura / presión.

La potencia del microondas y la temperatura de operación están muy relacionadas entre sí, por lo que se debe prestar especial atención cuando se trabaja con sistemas de recipiente cerrado.

En los sistemas cerrados la temperatura puede llegar a alcanzar valores muy por encima del punto de ebullición normal del disolvente, por aumento de la presión en el interior del recipiente.

Las temperaturas elevadas permiten una mayor eficiencia de extracción, al aumentar la desorción del analito desde los sitios activos de la matriz. Además, los disolventes tienen una mayor capacidad de solubilizar los analitos a temperaturas más altas, debido a que la tensión superficial y la viscosidad del disolvente disminuyen con la temperatura, mejorando la humectación de la muestra y la penetración en la matriz.⁵⁸ Sin embargo, la potencia debe elegirse correctamente, tanto para evitar temperaturas excesivas que puedan producir la degradación de solutos, como para que no se produzcan altas presiones en el interior de los vasos.

Con respecto a los sistemas de recipientes abiertos, éstos permiten un control más efectivo de las combinaciones de disolventes de extracción que se calientan de manera diferente. Además, ofrecen una mayor seguridad al realizarse la extracción a presión atmosférica.⁵⁸

- Tiempo de extracción.

Como en otras técnicas de extracción, el tiempo es otro parámetro cuya influencia necesita ser tenida en cuenta. Generalmente, la cantidad de analitos extraídos se incrementa con el tiempo de extracción, aunque existe el riesgo de que se pueda producir degradación del material procesado.

En la literatura se reporta una gran variabilidad en los tiempos de extracción, lo que puede atribuirse en parte al tipo de matriz vegetal procesada. A menudo 15 - 20 minutos son suficientes, aunque se han reportado excelentes recuperaciones incluso con 40 segundos.⁵⁴

Las propiedades dieléctricas del disolvente influyen en los tiempos de irradiación. Altos tiempos de exposición con disolventes como agua, etanol y metanol, que absorben fácilmente las microondas y por lo tanto pueden calentarse con facilidad, no son recomendables ya que los componentes termolábiles pueden verse afectados.⁸²

-Naturaleza de la matriz.

El tamaño de partícula del material procesado y el estado en el que se presenta pueden tener un efecto importante en los porcentajes de recuperación de los compuestos de interés. En general las partículas de los materiales extraídos tienen tamaños en el intervalo de 100 micras - 2 mm.

El polvo fino puede mejorar la extracción, proporcionando una mayor área superficial y por ende un mejor contacto entre la matriz vegetal y el disolvente. Las partículas más finas también permiten una mejor

penetración de las microondas. Sin embargo, una de las desventajas asociadas con el uso de partículas finas es la dificultad para separar la matriz con el disolvente después de la extracción.

El tratamiento previo de la muestra antes de la extracción puede producir un calentamiento más efectivo y selectivo de la misma. En muchos casos el contenido de humedad natural de la matriz mejora las recuperaciones, como sucede en la extracción de aceites esenciales⁹². En algunos casos, una estrategia que mejora la eficiencia del proceso es remojar el material vegetal seco con el disolvente, antes de la extracción.

2.2.4 Extracción asistida por ultrasonido.

Otra técnica que ha cobrado interés en los últimos años es la extracción asistida por ultrasonido, principalmente por su eficiencia, bajo costo, y por la posibilidad de realizar extracciones a bajas temperaturas, utilizando menores cantidades de disolvente que los procesos tradicionales⁸⁷. En esta técnica se utiliza alta potencia y baja frecuencia para poder separar el soluto de interés de la matriz vegetal. Las ondas sonoras que se propagan en el medio disolvente resultan en la alternancia de ciclos de alta y baja presión, que producen burbujas de cavitación. La energía generada a partir del colapso de las burbujas de cavitación proporciona una mayor penetración del disolvente en el material celular y mejora la transferencia de masa hacia y desde las interfaces⁴⁶. Entre las nuevas técnicas de extracción, la EAU es de las más económicas y la que tiene menos requerimientos instrumentales.

La primera aplicación comercial del ultrasonido se produjo en el año 1917, con la técnica de ecosonda desarrollada por Langevin para la determinación de profundidad en agua. Desde entonces, el tema se ha desarrollado y expandido a un gran número de aplicaciones⁵⁹. El ultrasonido de baja potencia y alta frecuencia (en el rango de MHz) no afecta el carácter físico o químico del medio en el que se aplica. Por su parte, una frecuencia más baja (generalmente en el rango de 20-40 kHz) y una potencia más alta pueden producir cambios físicos y químicos significativos en el medio, a través de la generación y posterior colapso de burbujas de cavitación. La cavitación acústica producida por el ultrasonido es la base de la sonoquímica y de un número importante de técnicas de procesamiento, incluyendo extracción, impregnación, emulsificación, cristalización, filtración, entre otras.⁵⁹

La extracción asistida por ultrasonido consiste en utilizar ondas sonoras de alta frecuencia (superiores a los 20 kHz), con el fin de desprender el compuesto de interés del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado de lo cual el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente³⁶. La extracción de lúpulo en un medio acuoso constituye una de las primeras aplicaciones de ultrasonido en el procesamiento de productos naturales.⁸⁷

Esta técnica es económica, sencilla y tiene requerimientos instrumentales bajos, comparada con otros métodos innovadores como la extracción con fluidos supercríticos y la extracción asistida por microondas.⁷³

2.2.4.1 Principios de la EAU.

La sonicación es el acto de aplicar energía sonora para agitar partículas en una muestra. A diferencia de las ondas electromagnéticas, las ondas sonoras deben propagarse en un medio material, induciendo la vibración molecular. Se generan ciclos alternos de expansión y compresión, acompañados por la separación de las moléculas durante la expansión y su acercamiento en la compresión.

La expansión puede generar burbujas en un medio líquido e inducir presiones negativas. Una vez formadas, las burbujas crecen y finalmente colapsan. Este efecto se denomina cavitación. Cerca de una superficie sólida, el colapso es asimétrico y produce chorros líquidos de alta velocidad que impactan fuertemente sobre la superficie sólida. Si el sólido es una matriz vegetal y la fase líquida es un disolvente, las fuerzas de cizallamiento resultantes de la cavitación rompen mecánicamente la estructura celular, proporcionando una mayor penetración del disolvente en el material celular, mejorando así la transferencia de masa hacia y desde la interfase.⁴⁶

La destrucción de las paredes celulares por los efectos mecánicos del ultrasonido ha sido verificada mediante ensayos analizados por microscopía electrónica de barrido (SEM). En contraste con las extracciones convencionales, donde los compuestos de interés difunden a través de las paredes celulares, en este caso los analitos son liberados por la ruptura de la pared celular.⁸⁸

La aplicación de ultrasonido favorece los dos fenómenos físicos que tienen lugar durante la extracción de solutos desde una matriz vegetal, el primero, es el mojado del material vegetal por el disolvente y transferencia de masa de los solutos por difusión o procesos osmóticos a través de las paredes celulares, y segundo, el lavado y enjuague del contenido de las células una vez que la pared celular se ha roto. Efectivamente, la irradiación con ultrasonido favorece el mojado y la hidratación de la matriz vegetal, expandiendo los poros de la pared celular y mejorando la difusión y la transferencia de masa. En algunos casos el mojado del tejido puede llegar a ocasionar la ruptura de las paredes celulares y favorecer al segundo fenómeno, que es el lavado y enjuague del contenido celular. Estos fenómenos pueden ser favorecidos si se muele el material vegetal, ya que se incrementa el número de células expuestas a la extracción por difusión y al fenómeno de cavitación producido por el ultrasonido.⁸³

2.2.4.2 Parámetros que afectan el proceso EAU.

Los factores principales a tener en cuenta durante la extracción con ultrasonido son, la característica de la planta (contenido de humedad y tamaño de partícula) y el disolvente empleado para la extracción. Por otra parte, hay otros factores que gobiernan la acción del ultrasonido, como son la frecuencia, presión, temperatura y tiempo de sonicación.

-Disolvente.

La intensidad de las cavitaciones ultrasónicas se ve afectada por la tensión superficial, la viscosidad y la presión de vapor del medio.²¹

Los líquidos con baja presión de vapor producen pocas burbujas de cavitación. Sin embargo líquidos con alta presión de vapor, crean más burbujas pero éstas colapsan con menor intensidad debido a una diferencia de presión interna / externa.

Por otra parte, la cavitación se produce más fácilmente en líquidos de baja viscosidad porque la intensidad ultrasónica aplicada puede superar más fácilmente las fuerzas moleculares del líquido. Además, un líquido de baja viscosidad tiene una baja densidad y alta difusividad, y puede difundir fácilmente en los poros de la matriz vegetal.⁷¹

Por último, los líquidos que tienen baja tensión superficial requieren menor energía y producen burbujas más fácilmente.²¹

-Temperatura.

La aplicación de ultrasonido permite trabajar a temperatura ambiente y presión atmosférica. Por este motivo, el uso de la extracción asistida por ultrasonido es recomendable para compuestos termolábiles, ya que éstos pueden sufrir alteraciones si se les somete a las condiciones típicas de funcionamiento del Soxhlet, que corresponden a la temperatura de ebullición del disolvente⁷². Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el ultrasonido genera calor, por lo que es importante controlar con precisión la temperatura de extracción.⁷⁵

-Tiempo de Extracción.

El fenómeno de cavitación conduce a la intensificación de la transferencia de masa y la interacción entre el disolvente y los tejidos de la planta. El rendimiento de la extracción se incrementa con la duración del ultrasonido; esto es, con el incremento en el tiempo de contacto entre el líquido y el material vegetal sólido.⁴²

No obstante, se debe ser cuidadoso con el tiempo de exposición a la sonicación, ya que ésta puede dañar la calidad de los compuestos de interés. Este efecto está relacionado con la energía de ultrasonido, la estabilidad de los compuestos y el medio.⁹¹

-Características del ultrasonido.

En general, la frecuencia de ultrasonido tiene un efecto importante sobre el rendimiento y la cinética de extracción. Sin embargo, estos efectos dependen de la naturaleza del material vegetal a extraer.

Por su parte, un aumento en la potencia del ultrasonido genera una mayor recuperación del producto. Una explicación para este efecto es que, cuanto mayor es la amplitud de la onda de ultrasonido que se propaga en el medio, debido al incremento de la potencia, más violentamente colapsan las burbujas. Sin embargo, este aumento en la eficiencia de la extracción no es tan notable, posiblemente debido a que sólo una pequeña fracción de la energía eléctrica del transductor entra en el disolvente de extracción del baño de ultrasonido.⁴²

La distribución de las ondas ultrasónicas dentro de un extractor es también un parámetro clave en el diseño del equipo. La intensidad del ultrasonido disminuye abruptamente a medida que aumenta la distancia de la superficie radiante. También la intensidad de ultrasonido es atenuada con un aumento de partículas sólidas. Para evitar ondas estacionarias o la formación de regiones con sólidos libres, normalmente se utiliza agitación.⁸⁸

2.2.5 Extracción asistida por infrarrojo.

La radiación infrarroja (*IR*) es un tipo de radiación electromagnética, cuya longitud de onda es más larga que la de la luz visible pero más corta que la de las microondas, esta comprende desde los 760 - 780 nm, limitando con el color rojo de la zona visible del espectro electromagnético (**Figura 11**), hasta los 1000 μm . Su descubrimiento se debe al renombrado astrónomo William Herschel, quien en 1800 detectó en el espectro de la radiación solar un aumento importante de temperatura en la zona situada más allá del rojo, de la que no provenía ninguna luz visible. Posteriormente, Kirchhof, Wien y Stephan estudiaron de forma experimental sus leyes y propiedades.⁶³

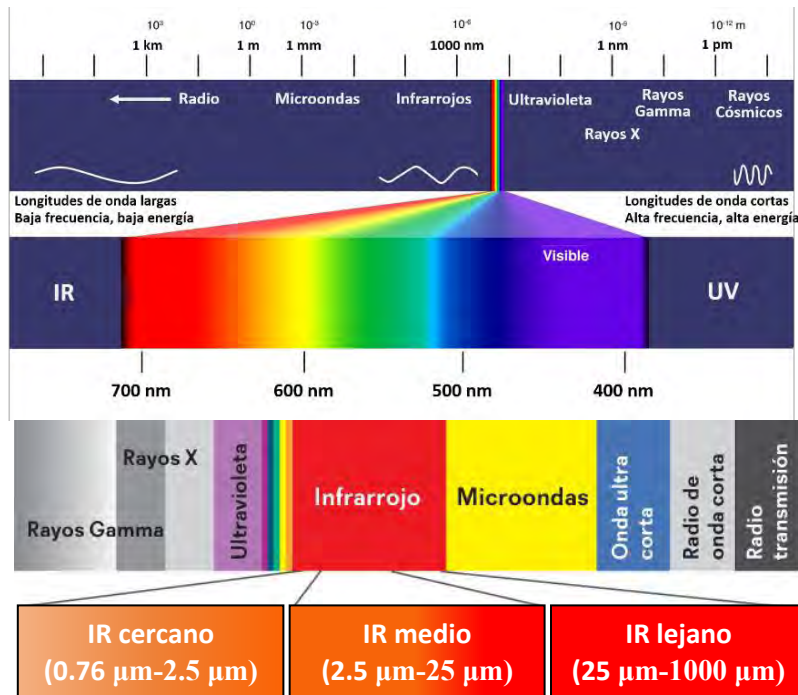


Figura 11. Espectro electromagnético y zonas del infrarrojo.

La región del infrarrojo se divide en tres zonas principales:

- Infrarrojo lejano (FIR): 25 μm – 1000 μm
- Infrarrojo medio (MIR): 2.5 μm – 25 μm
- Infrarrojo cercano (NIR): 760 nm – 2.5 μm

La absorción de radiación infrarroja se limita en gran parte a las moléculas en las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales y rotatorios. Una molécula que absorbe este tipo de radiación experimenta un cambio importante como consecuencia de sus movimientos vibracionales y rotacionales.

Al irradiar una molécula, esta absorbe energía, lo que a su vez provoca un movimiento vibratorio y como consecuencia cambia el movimiento dipolar de esta⁶³. Además, los núcleos de los átomos enlazados por uniones covalentes, experimentan vibraciones u oscilaciones de modo similar a dos pelotas unidas por un resorte, cuando las moléculas absorben irradiación infrarroja, la energía adquirida causa una modificación de las vibraciones entre los átomos unidos, es decir, la molécula se sitúa en estado vibracional excitado. Esta energía absorbida se disipa posteriormente en forma de calor, al regresar la molécula al estado basal.

La longitud de onda a la que un enlace presenta absorción depende de la energía requerida para realizar esa vibración.

Por lo tanto, en los diferentes tipos de enlace (C-H, C-C, C-O, O-H, etc.) hay absorción de radiación infrarroja a diferentes longitudes de onda. Dicho de otra manera, un enlace dentro de una molécula puede experimentar diferentes tipos de oscilación y por consiguiente, esta absorberá energía a más de una longitud de onda, por ende, para una molécula compleja, es posible que existan diferentes tipos de vibración:

a) Estiramiento-compresión.

b) Flexiones sobre el plano.

c) Flexiones fuera del plano.

Debido a que el infrarrojo es un tipo de radiación electromagnética, tiene una dependencia tanto espectral como direccional. La dependencia espectral del infrarrojo necesita ser considerada debido a que la energía procedente de un emisor está compuesta por diferentes longitudes de onda, y la fracción de la radiación en cada banda es dependiente de un número de factores como la temperatura del emisor y la emisividad de la lámpara. El fenómeno de la radiación se vuelve más complejo debido a que la radiación que incide en una superficie, no solo tiene una dependencia espectral, sino que también una dependencia direccional. La longitud de onda a la cual la máxima radiación ocurre es determinada por la temperatura del emisor.⁶³

La transmisión de la radiación electromagnética no necesita un medio para su propagación. El espectro de longitud de onda depende de la naturaleza y de la temperatura de la fuente de calor. Todos los cuerpos emiten radiación debido a su nivel de temperatura, lo cual se conoce como “radiación térmica” debido a que se genera calor. La radiación térmica que incide en un cuerpo puede ser absorbida, y su energía ser convertida en calor, reflejada desde la superficie o transmitida a través del material. La suma de estos mecanismos se conoce como pérdida o extinción de la radiación⁶³ y se representa por el siguiente balance:

$$\rho + \alpha + \tau = 1 \quad \text{Ecuación (2).}$$

Dónde ρ es la reflexión, α es la absorción y τ es la transmisión.

Los materiales pueden ser clasificados en base a su transmisión, dependiendo del estado físico del cuerpo donde la radiación incide. Un cuerpo que no permite que la radiación se transmita a través de él se llama “opaco” y su transmisión (τ) es igual a cero. Ejemplos de esto son la mayoría de los

sólidos. Por otra parte, líquidos y algunos sólidos como rocas de sal o vidrio se consideran como “transparentes” a la radiación. Generalmente los sólidos absorben toda la radiación en una capa muy delgada cercana a la superficie. Esta es una consideración muy importante en el modelamiento de la transferencia de calor. Un cuerpo ideal que absorbe toda la energía incidente sin reflejarla o transmitirla, se llama “cuerpo negro” en donde $\alpha = 1$.

Si se considera que la transmisión es infinitesimal, entonces el material reflejará o absorberá la radiación infrarroja dependiendo de la naturaleza de la radiación y de las características de la superficie del material. Esto se conoce como emisividad (ϵ) y varía entre 1 y 0. Los cuerpos negros absorben toda la radiación que incide sobre ellos y por lo tanto su emisividad es igual a uno, en contraposición a las superficies completamente reflectivas ($\epsilon = 0$).⁶³

Con respecto a las matrices vegetales y los disolventes, cuando la radiación electromagnética incide en su superficie, puede provocar cambios en los estados electrónicos, vibracionales y rotacionales de átomos y moléculas. El nivel de absorción a diferentes longitudes de onda varía dependiendo de los componentes de los mismos. El tipo de mecanismo de absorción de energía determinado por el rango de longitudes de onda de la energía radiante, puede ser categorizada en:

1. Cambios en el estado electrónico, cuando la longitud de onda varía de 0.2 a 0.7 μm (ultravioleta y rango visible)
2. Cambios en el estado vibracional, cuando la longitud de onda varía de 2.5 a 1000 μm (radiación infrarroja lejana o FIR)
3. Cambios en el estado rotacional, cuando la longitud de onda es mayor a 1000 μm .

En general, las matrices vegetales absorben radiación infrarroja lejana (FIR) más eficientemente a través de los mecanismos de cambio en el estado vibracional de las moléculas, lo que puede llevar a calentamiento por radiación. El agua y los disolventes orgánicos, principalmente absorben la energía FIR a longitudes de onda mayores a 2.5 μm . Dentro de estos componentes, el agua tiene un rol predominante en la absorción de la energía radiante en todas las longitudes de onda. Los enlaces O-H en el agua absorben la energía infrarroja y comienzan a rotar con la misma frecuencia que la radiación incidente. La transformación de la radiación infrarroja en energía rotacional causa la evaporación del agua.⁶³

En tal sentido la extracción asistida por infrarrojo se fundamenta en dichos fenómenos de inducción de vibraciones, los cuales se ha encontrado potencializa la extracción de productos naturales, al provocar la vibración de las moléculas del producto natural en sí mismo, del disolvente utilizado para dicho fin y/o de la matriz biológica que lo contiene.

Tales peculiaridades en el comportamiento de las moléculas al ser irradiadas, han traído consigo una amplia utilización de la radiación infrarroja, e incluso como una alternativa para la activación de diversas reacciones como por ejemplo la condensación aldólica, síntesis de Paal-Knorr, síntesis de bases de Schiff, reacción de Biginelli, reacción de Hantzsch y la síntesis de diindolilmetanos, entre otras.⁶¹

Capítulo 3. Extracción con fluidos supercríticos (EFS-CO₂SC).

2.3.1 Extracción con Fluidos Supercríticos.

En esencia, el proceso de extracción con fluidos supercríticos es similar al de una extracción clásica, con la peculiaridad de utilizar como agente extractor un fluido supercrítico en lugar de un líquido. No obstante, las peculiares propiedades del estado supercrítico hacen que las características generales de esta novedosa técnica se aproximen a las exigidas a un proceso de extracción ideal, el cual debe de ser rápido, simple, barato, no contaminante, selectivo, aplicable a analitos termolábiles y conducir a la obtención de extractos finales listos para el análisis.

2.3.2 Propiedades de los fluidos supercríticos, ventajas y desventajas de la técnica de EFS.

Antes de pasar a discutir los aspectos prácticos de la técnica de EFS, es preciso abordar el porqué de sus magníficas cualidades, para lo cual es imprescindible que se tenga una idea clara sobre lo que es un fluido supercrítico y conozcamos sus principales propiedades fisicoquímicas.

Es conocido que toda sustancia está caracterizada por tener un diagrama de fases que nos permite conocer el estado de agregación de la misma a cualquier valor de presión y temperatura (**Figura 12**). Estos diagramas de fases están definidos por al menos tres secciones, la línea de fusión, la de sublimación y la de vaporización, que vienen determinadas por el conjunto de parejas de valores de presión y temperatura a los cuales se produce el correspondiente cambio de estado. La línea de vaporización, al contrario de las otras dos, presenta la particularidad de desaparecer en un punto del diagrama, llamado “punto crítico”, a una presión y una temperatura que se denominan asimismo, “presión crítica (P_c) y temperatura crítica (T_c)”.

La zona de un diagrama de fases en la que tanto los valores de presión como los de temperatura son superiores a los críticos, se caracterizan por el hecho de que la sustancia no puede llegar a licuarse ni es posible su vaporización por mucho que aumentemos la presión, así como tampoco es posible su vaporización por mucho que se aumente la temperatura. En esta zona del diagrama la sustancia no puede ser considerada ni como gas ni como líquido y se dice que se encuentra en “estado supercrítico” o dicho de otra manera, es un “fluido supercrítico”.

Los valores de la presión y temperatura críticas son característicos de cada sustancia y pueden ser muy diferentes de una a otra (**Tabla 4**). Algunas sustancias, tales como el dióxido de carbono o el monóxido de dinitrógeno, alcanzan el estado supercrítico a temperaturas y presiones relativamente

moderadas. Otras, sin embargo, necesitan condiciones de presión y/o temperatura muy drásticas para poder convertirse en fluidos supercríticos, siendo un ejemplo claro de este tipo de sustancias el agua o el amoníaco. Lógicamente, la mayor o menor facilidad para alcanzar el estado supercrítico será uno de los factores determinantes a la hora de elegir un compuesto para ser utilizado en EFS. De hecho, el fluido más ampliamente utilizado a escala analítica e industrial es el CO₂, el cual adquiere la condición de supercrítico a la temperatura de 31°C y a la relativamente moderada presión de 73 bar.

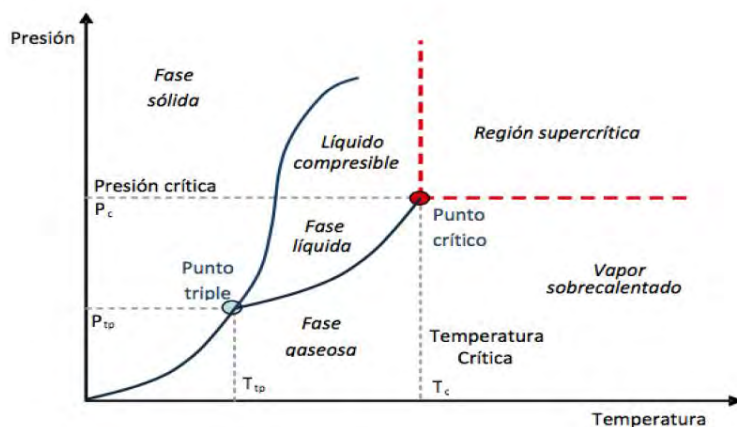


Figura 12. Diagrama de fases de una sustancia pura en función de la presión y temperatura.

Tabla 4. Parámetros críticos de las sustancias empleadas comúnmente en condiciones supercríticas.

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Presión crítica (bar)	Temperatura crítica (°C)
Dióxido de carbono	44.01	73.0	31
Agua	18.02	214.8	374
Amoniaco	17.03	109.8	132
Acetona	58.08	47.0	235
Etanol	46.07	72.0	243
Metanol	32.04	78.9	239
Dióxido de nitrógeno	46.10	72.7	37
n-Hexano	86.16	30.1	234
n-Propano	44.10	42.4	96.7
Acetato de etilo	88.11	38.8	523
Etileno	28.05	50.4	9
Dimetiléter	46.07	52.6	126

El gran atractivo que presentan los fluidos supercríticos para ser utilizados como agentes extractores radica en que poseen densidades similares a las de los líquidos, y por lo tanto similares propiedades disolventes (**Figura 13**), pero a la vez su viscosidad es mucho menor (entre 5 y 20 veces menor), lo que hace que los coeficientes de difusión de los solutos en un fluido supercrítico sean mucho mayores que en un disolvente líquido³⁴ (**Tabla 5**). Así pues, cabe esperar que las extracciones con fluidos supercríticos sean, en primer lugar, tan completas como las llevadas a cabo con disolventes líquidos, debido a que ambos presentan similares características solvatantes, y en segundo lugar, mucho más rápidas y eficientes, ya que su baja viscosidad favorece los fenómenos de transferencia de masa (transporte de los analitos) y la penetrabilidad en los poros de la matriz de la muestra.

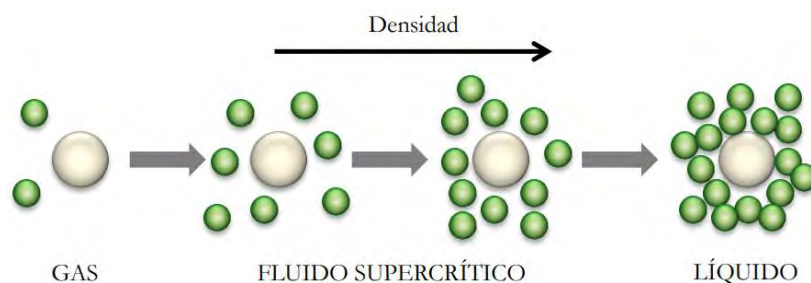


Figura 13. Relación de una molécula de soluto y de un disolvente en función de su densidad.

Otra importante propiedad de los fluidos supercríticos es que, contrariamente a lo que ocurre con los líquidos, su densidad está estrechamente relacionada con la presión y, en una menor medida, con la temperatura. A temperatura constante, la densidad de un fluido supercrítico aumenta notablemente al aumentar la presión. Por ejemplo, a la temperatura de 50 °C, la densidad del CO₂ supercrítico pasa de 250 g/l a 920 g/l cuando la presión aumenta de 80 bar a 300 bar¹⁴; mientras que a esta última presión, la densidad disminuye desde 920 g/l hasta 670 g/l al aumentar la temperatura de 50 °C a 100 °C (**Figura 14**). Esta propiedad, unida al hecho de que el poder disolvente de un fluido supercrítico es directamente proporcional a su densidad, hacen posible que la capacidad de solvatación de un determinado fluido supercrítico sobre un analito pueda ser fácilmente modificada mediante un cambio de presión y/o temperatura. Esto significa que en la EFS existe la posibilidad de llevar a cabo la extracción selectiva de diferentes tipos de analitos variando la densidad del fluido, lo cual puede conseguirse con un simple cambio de la presión de extracción.

Tabla 5. Valores típicos de densidad, viscosidad y difusividad para gases, fluidos supercríticos y líquidos.

Fluido	Densidad (g/ml)	Viscosidad (Pa.s)	Difusividad (cm ² /s)
Gases	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻¹
F. Supercríticos	0.2-0.9	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Líquidos	0.6-1.6	10 ⁻³	10 ⁻⁵

2.3.3 Dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC).

Otra ventaja adicional de la técnica de EFS se presenta cuando el fluido utilizado tiene la propiedad de ser gas a presión atmosférica (CO₂, N₂O, etc). En estos casos el agente extractor puede dejarse escapar a la atmósfera tras la etapa de extracción, pudiéndose recoger los analitos en un pequeño volumen de disolvente. Esto permite llevar a cabo las extracciones sin utilizar prácticamente disolventes orgánicos y obtener extractos finales listos para ser analizados sin necesidad de efectuar posteriores etapas de concentración.

El dióxido de carbono, además de ser gas a presión atmosférica, presenta otras importantes ventajas prácticas que han hecho que sea, y por mucho, el fluido más utilizado en las aplicaciones hasta ahora utilizadas de la técnica EFS. De entre ellas pueden destacarse el hecho de ser inerte, no tóxico, no explosivo, económico, puede adquirirse con un alto grado de pureza y, tal como ya se ha comentado, adquiere el estado supercrítico a baja temperatura (31 °C) y a una presión de fácil manejo (73 bar), lo cual lo hace muy atractivo para la extracción de compuestos termolábiles. Realmente, la única desventaja que presenta el CO₂SC frente a otros fluidos supercríticos es su carácter apolar, lo que lo hace que pueda no ser adecuado para extraer analitos de elevada polaridad. En este sentido, la estructura química del soluto es un factor muy importante a tener en cuenta a la hora elegir un disolvente supercrítico. En el caso particular del CO₂SC algunos solutos pueden presentar ciertos grupos funcionales o características que pueden ejercer efectos benéficos o adversos en la solubilidad. Dentro de los aspectos que benefician el aumento de la solubilidad se encuentran, la presencia de insaturaciones, ramificaciones, esterificaciones y eterificaciones y por el contrario los aspectos adversos que disminuyen la solubilidad son, el aumento del peso molecular, la aromaticidad, la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, halógenos, amínas y nitroderivados.

Para la extracción de este tipo de compuestos podrían utilizarse otros fluidos polares, tales como amoníaco o metanol; sin embargo, estos presentan grandes inconvenientes, al ser químicamente reactivos y tóxico en el caso del amoníaco, o presentar una elevada temperatura crítica y ser líquido a temperatura ambiente en el caso del metanol (**Tabla 6**). O bien, agregar cantidades pequeñas de

compuestos polares al CO₂ y así aumentar su poder de disolución y selectividad hacia los compuestos polares. Los compuestos que se agregan se conocen como codisolventes o entrainers y los más usados para tal caso son los alcoholes.

Tabla 6. Ventajas y desventajas de los fluidos supercríticos comúnmente utilizados.

Propiedades	Inorgánicos				Orgánicos		
	CO ₂	HN ₃	H ₂ O	N ₂ O	CFC _s	HC	Alcoholes
Toxicidad	V	D	V		V	V	D
Inflamabilidad	V	D	V		V	D	D
Costo	V	D	V		V	V	D
Reactividad	V	D	D	D	V	V	D
Obtención de las condiciones supercríticas	V	D	D	V	V	V	D
Agresividad medioambiental	V		V		D		
Gas en condiciones ambientales	V		D	V	V	V	D
Compatibilidad con detectores	V					D	
Polaridad	D	V		V	V	D	V

CFC_s= clorofluorocarbonos; HC= hidrocarburos. V=ventaja; D= desventaja.

Otra desventaja del CO₂ es que no es un buen disolvente para compuestos de muy baja volatilidad. Por citar un ejemplo, la solubilidad de aceite de semillas de palma en CO₂ supercrítico a 300 bar y 80 °C es aproximadamente del 2.5 % en peso relativamente alta comparada con 1 % en peso para aceite de soja y de algodón, bajo las mismas condiciones.¹⁴

Por otro lado es importante resaltar que el uso del CO₂, como cualquier otro fluido supercrítico es altamente sensible a la variación en presión y temperatura, como se mencionó en el anterior apartado estas variaciones afectan el equilibrio y la cinética de extracción además de la densidad y por lo tanto, la capacidad disolvente del CO₂SC. Su poder disolvente está relacionado con la densidad y, en condiciones isotérmicas, aumenta con la presión (**Figura 14**). Cerca de la región crítica, pequeños cambios en la presión pueden dar lugar a importantes cambios en la densidad.

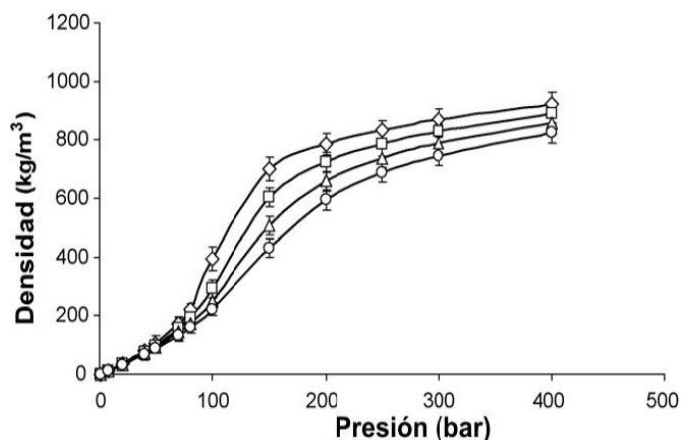


Figura 14. Variación de la densidad del CO₂ en función de la presión (bar) para diferentes isotermas. ◇ 323°K, □ 333°K, △ 343°K, ○ 353°K, P_c=73 bar.

2.3.4 Solubilidad en gases densos.

La masa de soluto disuelto en un fluido supercrítico depende de las similitudes y diferencias en las propiedades termodinámicas y estructurales del soluto y del disolvente. Por ser una condición de saturación, esta propiedad es representada como un límite sobre un diagrama de fases. Productos naturales de interés, tales como aceites, son mezclas multicomponentes que deben ser caracterizadas previamente antes de analizar su solubilidad en disolventes supercríticos. Sin embargo, el comportamiento de mezclas complejas puede predecirse estudiando sistemas más simples, como binarios y ternarios.

Con el objetivo de explorar la extracción con disolventes, Francis A. estudio en 1954 la solubilidad mutua de dióxido de carbono líquido cuasicrítico con cada uno de 261 solutos analizados, comparando dicha solubilidad con la que tendrían en hidrocarburos parafínicos, aromáticos y poliaromáticos³⁴. En el mismo trabajo reportó 464 diagramas ternarios, distinguiendo zonas de equilibrio bifásico sólido-líquido y líquido-líquido, así como zonas de equilibrio trifásico sólido-líquido-líquido y líquido-líquido-líquido. La importancia de su trabajo radica no solo en la amplitud de sistemas analizados, sino también en la posibilidad de extender sus conclusiones de solubilidad a otras condiciones, esto es, si un compuesto es soluble en CO₂ líquido, también lo será en CO₂ supercrítico.

La **figura 15** muestra curvas típicas (en forma de “S”) de solubilidad en gases a dos temperaturas ($T_1 < T_2$), con mínimos y máximos bien definidos a moderada y alta presión, respectivamente.

A presiones bajas y moderadas la solubilidad está dada por la relación entre la presión de vapor del sólido y la presión total, de modo que la curva tendrá una pendiente negativa al aumentar la presión llegando a un mínimo a partir del cual se produce un aumento abrupto de la solubilidad como resultado de grandes cambios de densidad en la fase gaseosa con pequeños aumentos de presión. El máximo ocurre a altas densidades, cuando las fuerzas repulsivas entre soluto y disolvente llegan a ser importantes; posteriores aumentos de densidad (o presión) provocan la expulsión del soluto de la solución.

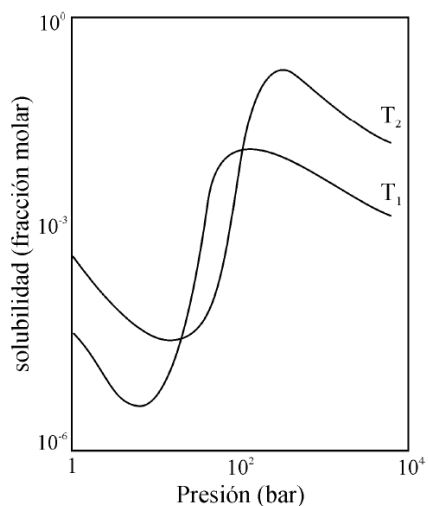


Figura 15. Curvas características de solubilidad en gases densos.

Un sistema ampliamente estudiado que exhibe este tipo de comportamiento es el binario naftaleno-etileno, con un mínimo aproximadamente de 10 bar y máximo cerca de 500 bar y solubilidades de naftaleno en etileno comprimido del orden del 10 % a 500 bar y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ⁶⁹. Sin embargo, la solubilidad de un sólido puro en gas puede verse fuertemente afectada cuando el sólido se encuentra en un sistema sólido multicomponente. Kurnik y colaboradores⁴⁸ midieron solubilidades de sólidos puros y de mezclas sólidas multicomponentes en gases, encontrando que la solubilidad de un componente sólido en un sistema soluto multicomponente puede ser de un 300 % superior a la del mismo componente en un sistema sólido puro, bajo las mismas condiciones operativas. Si bien este es un ejemplo extremo, debe tenerse en cuenta que en la mayoría de los casos la solubilidad de un componente es afectada por la presencia de otros componentes de la mezcla.

Es posible modelar el equilibrio entre un gas a alta presión y un sólido despreciando la solubilidad del gas en el sólido, resultando entonces una fase sólida pura en equilibrio con una fase vapor no lineal. Para el componente pesado debe verificarse la igualdad de fugacidades en ambas fases: $f_2^s = f_2^v$,

donde los superíndices s y v indican fase sólida y fase vapor, respectivamente. Debido a que la fase sólida es pura, su fugacidad está dada por la presión de vapor del componente puro P_2^{sat} a la temperatura T , corregida por el coeficiente de fugacidad por desviaciones del vapor saturado del comportamiento de gas ideal ($\phi_2^{sat} = f_2^{sat}/P_2^{sat}$) y por un término exponencial llamado factor de Poynting ($Poyn$) que tiene en cuenta que el sólido puro está a una presión total P diferente de su presión de saturación P_2^{sat} :

$$f_2^s = P_2^{sat} \phi_2^{sat} Poyn; \quad \text{Ecuación (3).} \quad \text{donde:} \quad Poyn = \exp\left(\int_{P_2^{sat}}^P \frac{V_2^s}{RT} dP\right) \quad \text{Ecuación (4).}$$

Con P_2^{sat} , ϕ_2^{sat} y v_2^s medidos a la temperatura T .

En el equilibrio, igualamos esta fugacidad con la del componente puro en la fase vapor: $f_2^v = \phi_2 y_2 P$, de donde podemos despejar la solubilidad del sólido en el gas:

$$Y_2 = \frac{P_2^{sat}}{P} E \quad \text{con} \quad E = \frac{\phi_2^{sat}}{\phi_2} poyn \quad \text{Ecuación (5).}$$

El factor de enriquecimiento E es una medida de la extensión en que la solubilidad de un sólido se ve afectada por la presión, es mayor que la unidad y tiende a 1 cuando la presión total P tiende a la presión de saturación del componente puro. De los tres términos que lo forman, el más importante es el coeficiente de fugacidad del sólido en la mezcla gaseosa a alta presión ϕ_2 , el que puede hacerse mucho menor que uno a temperaturas cercanas a T_c , dando factores de enriquecimiento del orden de 10^3 o superiores. Para el cálculo de ϕ_2 puede utilizarse la ecuación del Virial, pero está limitado a presiones limitadas. A altas presiones la complejidad de las ecuaciones del Virial se incrementa sustancialmente, y una ecuación de estado como Redlich y Kwong o Peng-Robinson⁷⁰ puede utilizarse para hallar ϕ_2 con muy buenos resultados.⁴⁹

2.3.5 Modelado de la solubilidad de compuestos en CO₂SC.

Si bien la aplicación de ecuaciones como las de Redlich y Kwong, Peng-Robinson o en general cualquier ecuación de estado, para el cálculo de solubilidades, resulta de gran valía y confiabilidad, cuentan con la limitación de estar reducidas a un pequeño rango de temperatura y presión. Para evitar esta limitación, se han desarrollado modelos que permiten calcular, predecir y comparar el poder disolvente de una sustancia.

Para ver de una forma más clara las ventajas que la técnica de EFS tiene sobre las extracciones convencionales, sería de gran ayuda conocer con cierto detalle algunos de los modelos teóricos más utilizados para tal propósito.

Uno de los modelos establece el poder disolvente en términos del denominado parámetro de solubilidad de Hildebrand, que puede determinarse empíricamente para cualquier sustancia. En general, cuanto mayor es este parámetro, mejores son las propiedades como disolvente de una sustancia, siendo los compuestos polares los que presentan valores más altos del mismo. Para los fluidos supercríticos este parámetro puede ser calculado a partir de la siguiente relación empírica³⁹:

$$\delta = 1.25 P_c^{1/2} (\rho_f / \rho_l) \quad \text{Ecuación (6).}$$

Siendo δ el parámetro de solubilidad de Hildebrand, P_c la presión crítica, ρ_f la densidad del fluido supercrítico y ρ_l la densidad del fluido en estado líquido. Esta relación nos indica que el poder disolvente de un fluido supercrítico depende de dos efectos diferentes. El primero es un efecto químico, semejante al que se da en los disolventes líquidos, definido por $1.25P_c^{1/2}$ (este es el máximo valor que puede tomar δ y corresponde al de la sustancia en estado líquido, $\rho_f/\rho_l=1$). El segundo es un efecto de estado, representado en la ecuación por ρ_f/ρ_l , que depende de la densidad del flujo y por lo tanto de la presión y temperatura. Como puede observarse, el poder disolvente de un fluido supercrítico es directamente proporcional a su densidad, y varía con la presión y la temperatura en la misma extensión que ésta. Esto contrasta marcadamente con el comportamiento de los disolventes líquidos, para los que el parámetro de solubilidad, y por tanto su poder disolvente, permanece prácticamente invariable con los cambios de presión y temperatura.

2.3.5.1 Ecuación de Chrastil y ecuación de Chrastil modificada.

Otro de los modelos más utilizados es el camino alternativo que Chrastil encontró en 1982, para determinar solubilidades de sólidos y líquidos en gases densos, derivando una ecuación empírica que relaciona dicha solubilidad directamente con la densidad del gas⁸⁰. Chrastil considera que las moléculas de un soluto A se asocian con las moléculas de un gas B para formar un solvato complejo AB_k que está en equilibrio con el gas: $A + kB \leftrightarrow AB_k$, obteniéndose la siguiente expresión:

$$S = d^k \exp\left(\frac{a}{T} + b\right) \quad \text{o bien} \quad \ln S = k \ln d + a/T + b \quad \text{Ecuación (7).}$$

Donde S es la concentración del soluto en el gas en g/l, d es la densidad del gas en g/l, T la temperatura en °K y a , b y k son parámetros ajustables del modelo. La constante k es un factor de asociación que representa el número de moléculas de CO_2 en el complejo, a depende de las entalpías de solvatación y de vaporización del soluto, y b de los pesos moleculares y puntos de fusión del soluto y disolvente. Graficando datos experimentales de $(\ln d)$ contra $(\ln S)$ a dos temperaturas diferentes T_1 y T_2 y obteniendo el análisis de regresión lineal, pueden determinarse las constantes a , b y k en forma directa:

Siendo: $K = 1/\text{pendiente}$ Ecuación (8). $a = \frac{kT_1T_2 \ln I_1 I_2}{T_2 - T_1}$ (9). $b = -k \ln I_1 - a/T_1 = -k \ln I_2 - a/T_2$ (10).

Donde I_1 e I_2 son las intersecciones de las isothermas con eje de ordenadas en $y=1$.

Utilizando esta técnica, Chrastil obtuvo excelentes ajustes de la solubilidad de sistemas complejos en gases densos, tales como tripalmitín y α -tocoferol en dióxido de carbono y naftaleno en etileno, en un amplio rango de temperaturas, y presiones de hasta 300 bar. No obstante, la ecuación de Chrastil es válida para solubilidades menores que 100-200 g/l de soluto; por encima de este valor la densidad de la solución difiere significativamente de la del gas puro. Por otro lado, esta ecuación no da información acerca de la solubilidad del fluido supercrítico en la fase pesada.⁸⁰

En extracción supercrítica, temperatura y presión tienen un marcado efecto sobre la solubilidad, en tanto que en extracción líquida, solo la temperatura tiene un fuerte efecto sobre la solubilidad en el equilibrio. Cualquiera que sea el caso, trabajando en condiciones óptimas de temperatura y presión, es posible separar un compuesto de otro (u otros) aprovechando sus diferentes solubilidades. La **figura 16** muestra tales diferencias para algunos productos naturales de interés, a 333.15 °K y distintas presiones. Puede verse que, en principio, es posible separar los componentes livianos de aquellos de baja volatilidad, trabajando a presiones entre 10 y 20 MPa (100 y 200 bar). De la habilidad de modelar y predecir solubilidades de equilibrio de sistemas multicomponentes dependerá el diseño de procesos de separación en condiciones óptimas.

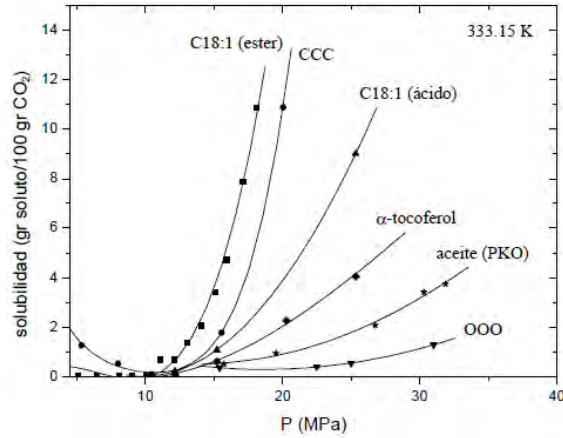


Figura 16. Efecto de la presión sobre la solubilidad de distintos solutos en CO₂SC, a 333.15°K. Datos experimentales¹⁴: ■ etil oleato, C18:1, • tricaprilin CCC, ▲ ácido oleico, C18:1. ♦ α-tocoferol * aceite de palma, PKO ▼ triolein, OOO.

Si bien, la solubilidad de muchos compuestos en CO₂SC puede modelarse con diferentes ecuaciones en función de la temperatura y de la presión. Se tiene que tener presente que estas variables tienen influencia principalmente sobre la densidad del fluido y por lo tanto sobre el poder extractivo del CO₂SC.

Es decir, debido a tal influencia la tendencia del número de moléculas de CO₂ en el complejo, a disminuir incrementa al aumentar la temperatura. Por otro lado la constante a , como observamos en la **ecuación 7**, también tiene una relación directa con la temperatura, por ende, y aunado al hecho de que la ecuación de Chrastil es un modelo basado en la densidad, Sun y Li⁸⁰ tomando como base esta ecuación, incorporaron más parámetros en k y a , en función de la densidad del fluido supercrítico. La ecuación de “Chrastil modificada” (**Ecuación 11**) tiene un mayor intervalo de aplicaciones y está representada por:

$$\ln S = k' \ln d + a'/T + b \quad (\text{Ecuación base}) \quad \text{Donde: } \left\{ \begin{array}{l} k' = k_0 + k_1 \cdot d \\ a' = a_0 + a_1 \cdot d \end{array} \right\}$$

(Parámetros adicionales).

$$\ln S = (K_0 + K_1 \cdot d) \ln d + (a_0 + a_1 \cdot d)/T + b \quad (\text{Ecuación modificada}) \quad \text{Ecuación (11).}$$

En tal ecuación S es la solubilidad expresada como fracción de masa (w/w), T es la temperatura en °K, los números de asociación k_0 y k_1 son el número promedio de moléculas de disolvente en el complejo solvatado; a_0 y a_1 dependen del calor de solvatación y vaporización del soluto, y b está en

función de k y depende también de peso molecular del soluto y el fluido supercrítico, k también depende de la densidad del fluido supercrítico (d).

2.3.6 Fluidos supercríticos modificados (codisolventes/entrainers).

Un codisolvente o entrainer es un componente adicional, generalmente de volatilidad intermedia, que se agrega en pequeñas cantidades al disolvente supercrítico con la finalidad de aumentar la solubilidad del soluto en la fase supercrítica, logrando así separaciones más efectivas. El incremento de solubilidad es debido al hecho de que los codisolventes son seleccionados de modo que interactúen más fuertemente con el soluto que con el disolvente supercrítico, creando puente de hidrógeno o fuertes interacciones dipolo-dipolo. Por ejemplo, el factor de separación del binario hexadecano-octadecano (relación de solubilidades del alcohol al hidrocarburo en ambas fases) puede ser aumentado significativamente si se utiliza metanol como entrainer debido a la formación de puente de hidrógeno entre ambos alcoholes. Sin embargo, compuestos extremadamente polares son extraídos más eficientemente utilizando acetona como codisolvente en lugar de metanol, debido a su mayor polaridad. Esto significa que, dependiendo de la naturaleza de los solutos, un entrainer puede no solo aumentar la solubilidad de los mismos en la fase supercrítica, sino también aumentar la selectividad de la extracción de solutos de diferente polaridad. El comportamiento del sistema analizado por Wong y Jhonston⁹⁴, confirman lo dicho anteriormente. Si bien los autores reportan aumentos de solubilidad de un orden de magnitud cuando se agregó etanol al sistema formado por 3 esteroides y CO₂ supercrítico, el factor de separación no se vio modificado debido a la polaridad similar de los esteroides. Por otro lado, Sivik B. y Hammam H. lograron extraer lípidos polares agregando pequeñas concentraciones de disolventes polares al CO₂SC.⁷⁶

La **figura 17** muestra el efecto del agregado de un codisolvente sobre la solubilidad de aceite de palma en CO₂SC. A presiones cercanas a 20 MPa (200 bar), la solubilidad del aceite en dióxido de carbono aumenta casi 9 veces cuando se utiliza 10 % de etanol como entrainer. Para lograr el mismo grado de extracción que con CO₂ puro, el agregado de etanol permite reducir las presiones requeridas entre un 30 a un 40 %.

Ciertas consideraciones deben tenerse en cuenta cuando se agrega un codisolvente a un fluido supercrítico. La adición del codisolvente aumenta los grados de libertad del sistema, de modo que puede formarse una segunda fase líquida. Por otro lado, el entrainer puede ser soluble en productos de la extracción, lo que requerirá un fraccionamiento posterior.

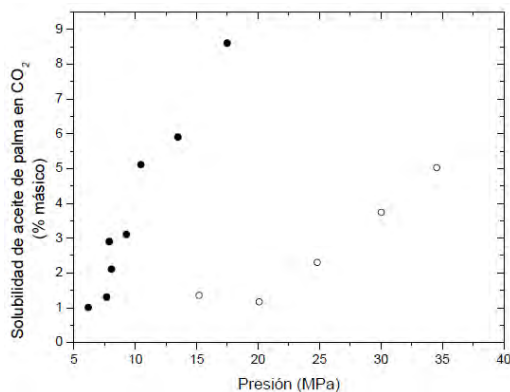


Figura 17. Solubilidad de aceite de palma en CO₂ en función de la presión, a 323.15 °K. Datos experimentales¹⁴:
 ○ sin entrainer, ● con 10 % de etanol como entrainer.

2.3.7 Instrumentación y metodología en la extracción con fluidos supercríticos.

El proceso de extracción con fluidos supercríticos presenta dos retos muy significativos para su aplicación, empezando por el desarrollo de la técnica y el diseño de la instrumentación, así como la inversión requerida. Ciertamente en primer instancia se requiere un esfuerzo por parte del investigador en el diseño debido a los pocos datos existentes relativos a equilibrios de fases y de transferencia de materia en sistemas complejos, lo cual obliga al investigador a diseñar empíricamente las condiciones operativas ingenieriles y termodinámicas en la mayoría de los casos. También requiere de una alta inversión dirigida al montaje del equipo. Estas condiciones han impedido el empleo masivo de esta técnica de extracción. Sin embargo a pesar de lo complejo que pudiera sonar el proceso de EFS consta básicamente de cuatro etapas:

- 1. Etapa de presurización**, en donde se eleva la presión del gas a utilizar como disolvente a un valor P_1 por encima de su presión crítica P_c ; esta operación se realiza por medio de un compresor o bomba.
- 2. Etapa de ajuste de temperatura**, en la cual se remueve o adiciona energía térmica, ya sea con un intercambiador de calor, baños térmicos o resistencias eléctricas, para llevar el disolvente comprimido a la temperatura de extracción requerida, estado que está por encima de su temperatura crítica.
- 3. Etapa de extracción**, en la que se conduce el FSC al extractor donde se encuentra la muestra o materia prima que contiene el soluto de interés.
- 4. Etapa de separación**, en esta el gas se descomprime a una presión P_2 inferior a la presión crítica, liberándose el soluto en un recipiente separador.

La instrumentación necesaria para realizar una extracción con fluidos supercríticos es, en principio, también bastante simple (**Figura 18**). Básicamente, el sistema de extracción consiste en una bomba de alta presión, una celda de extracción, una zona en la que se produce la descompresión del fluido, y por último un sistema adecuado de recolección de los analitos.

En general, los sistemas comerciales están constituidos por bombas que permiten trabajar a presiones comprendidas entre 100 y 700 atm (101.32 y 709.27 bar), siendo capaces de suministrar el fluido a presión y flujo constantes, y de mantener la presión seleccionada a lo largo de todo el sistema de extracción. El extractor propiamente dicho consta de una o varias celdas de extracción, donde se sitúa la muestra, y de un sistema adecuado que permite fijar y mantener la temperatura del fluido durante toda la etapa de extracción. Las temperaturas usuales de trabajo oscilan entre 30 y 150 °C. El tamaño de las celdas de extracción pueden variar ampliamente, aunque los volúmenes típicos de las mismas oscilan entre 0.5 y 10 ml, por lo que el tamaño de la muestra en EFS suele ser considerablemente menor que los empleados en las extracciones convencionales.

La parte del equipo donde se produce la descompresión del fluido (restringidor) suele consistir en un simple tubo de diámetro interno pequeño, metálico o de sílice fundida (restringidor fijo), o bien en una serie de válvulas micrométricas que permiten controlar de forma mecánica el diámetro del orificio de salida del restringidor (restringidor variable). La temperatura de la zona del restringidor también suele estar termostatazada con el fin de evitar que los analitos extraídos precipiten dentro de él y lo obturen, ya que cuando se utilizan fluidos que son gases a presión ambiente (que es lo más usual), la expansión de estos durante el proceso de descompresión produce un fuerte enfriamiento.

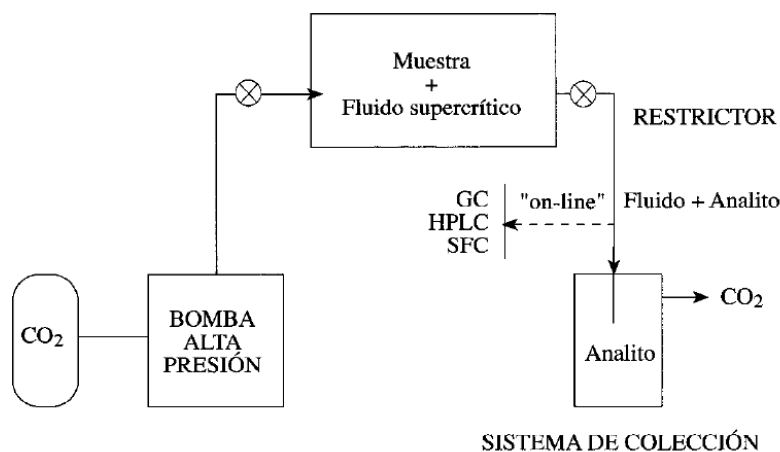


Figura 18. Esquema general e instrumentación requerida en la EFS.

El diseño del sistema utilizado para recoger los analitos es un factor decisivo para conseguir que las extracciones sean efectivas. Este puede consistir en un simple vial o tubo de ensayo conteniendo un volumen pequeño de disolvente orgánico, en el que se hace burbujear el fluido a la salida del restrictor, o en sistemas más complejos, como aquellos que utilizan cartuchos de un material adsorbente enfriados criogénicamente. Una vez finalizado el proceso de extracción, los extractos obtenidos pueden pasar a ser analizados en el correspondiente sistema cromatográfico sin necesidad de realizar posteriores etapas de concentración. (Off-line EFS).

En EFS también existe la posibilidad de acoplar directamente el equipo de extracción al cromatográfico (On-line EFS). En este caso, los analitos extraídos son transferidos y recogidos en el loop de inyección, en una trampa térmica o adsorbente situada antes de la columna, o incluso en la misma fase estacionaria en la cabeza de la columna. En la bibliografía pueden encontrarse descritas distintas aplicaciones de la técnica de EFS acoplada “on-line” a cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de fluidos supercríticos (SFC).⁷⁶ Esta posibilidad de acoplamiento “on-line” representa, sin duda, otra ventaja de la técnica EFS frente a las extracciones convencionales, ya que permite una fácil automatización del proceso analítico completo. Además, el acoplamiento on-line es inherentemente más sensible, ya que todo el analito extraído es introducido en el sistema cromatográfico.

2.3.8 Tipos de extracción en EFS.

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

En principio, cabe pensar que la extracción dinámica de mejores y más rápidas recuperaciones, ya que con esta forma de operación, durante todo el proceso de extracción, se produce la continua renovación del fluido que entra en contacto con la muestra, lo que hace que sea difícil que el fluido pueda llegar a saturarse. No obstante, el modelo estático permite una mayor penetración del fluido en

los poros de la matriz de la muestra, así como el que se pueda alcanzar el equilibrio de reparto del analito entre la matriz y el fluido. Esta es la razón de que, en la práctica, las extracciones suelen llevarse a cabo realizando una extracción estática, a la que sigue un periodo de extracción dinámica (extracción estática/dinámica).

2.3.9 Aplicaciones de los fluidos supercríticos.

La tecnología supercrítica surgió en Alemania en el año de 1974, con la primera aplicación patentada a gran escala en la industria alimenticia para descafeinización de café y té, extracción de resinas de lúpulo, y posteriores aplicaciones de menor volumen en extracción de aromas, colorantes y en la industria farmacéutica y cosmética¹⁸. Actualmente existen plantas similares en los Estados Unidos, Francia e Italia; China y Corea cuentan con plantas de extracción supercrítica para obtención de productos farmacéuticos; India para extracción de especias y aromas; plantas de mediana escala en España e Inglaterra aplican cromatografía supercrítica para la obtención de nutraceuticos y en Estados Unidos opera una de las mayores plantas del mundo en fabricación de pinturas.

Numerosas plantas comerciales de extracción con fluidos supercríticos se encuentran actualmente operando principalmente a lo largo del continente Europeo, Asiático y Americano, por ejemplo, en Alemania (Flavex), en Francia (Pfizer y Separex), en Estados Unidos (US Nutra), Gran Bretaña (Universal Flavors), Suiza (Givaudan-Roure), Austria (Natex), India (SMS Natural Products), en Corea (Il WA), etc. En España, la compañía Solutex es pionera en la extracción y fraccionamiento supercrítico para la obtención de ingredientes alimentarios funcionales. Son plantas que en general poseen extractores de 100-500 L, que operan en modo discontinuo o continuo, y que trabajan con diferentes materias primas. Algunos grupos como el Instituto de procesos térmicos e ingeniería ambiental o la compañía Natex obtienen con CO₂ supercrítico extractos a partir de materias primas estimulantes, hierbas medicinales o especias, para su posterior comercialización.¹⁸

En este sentido, la EFS es la principal aplicación de los fluidos supercríticos y ha tenido un gran desarrollo en los últimos años cubriendo una amplia gama de aplicaciones que se basan en la capacidad para controlar las propiedades disolventes mediante la compresión o expansión del disolvente, teniendo básicamente dos objetivos:

- Recuperar compuestos de interés o valor añadido a partir de matrices de diverso origen.

- Eliminar compuestos no deseables de matrices que se quieren purificar o refinar (por ejemplo: desacidificación de aceites, eliminación de hexano de diversas sustancias, procesos de descafeinización, etc.).

2.3.9.1 Aplicación de fluidos supercríticos al procesamiento de productos naturales.

Gracias a la ventaja que presentan los fluidos supercríticos sobre los disolventes líquidos, el uso de los FSC cada vez representa una mejor alternativa en los diferentes procesos. En este sentido el procesamiento de productos naturales no es la excepción, presentando grandes áreas de oportunidad en cada uno de los aspectos de su procesamiento en su uso nutracéutico y farmacológico.

- Extracción, refinado y fraccionamiento de aceites comestibles, grasas y ceras. La extracción se refiere a la separación de algunos solutos presentes en materiales naturales sólidos, tales como semillas, frutos o cáscaras de cítricos. El término refinado se aplica a la separación de determinados compuestos, generalmente perjudiciales, como carotenoides, fosfolípidos y ácidos grasos libres, que favorecen la oxidación y como consecuencia el enranciamiento de aceites. El fraccionamiento permite separar selectivamente triglicéridos de cadena corta e insaturados de aceites vegetales y animales, y determinados compuestos presentes en productos naturales, generalmente de alto valor, como vitaminas, aromas y ácidos grasos poliinsaturados (PUFASs), entre otros.

La extracción de aceites por metodologías convencionales (prensado de semillas y extracción con hexano) requiere posterior refinado para remover fosfolípidos, ácidos grasos libres y productos de oxidación. El CO₂SC puede ser utilizado para refinar dichos aceites crudos en procesos continuos utilizando columnas multietapas con flujos a contracorriente.

Como se mencionó anteriormente, una limitación en cada una de estas aplicaciones es el relativo “moderado poder disolvente” del dióxido de carbono, por lo que frecuentemente es requerido el agregado de codisolventes, tales como propano o etanol, de modo que la separación no solo se produce por diferencias de presiones de vapor, sino también por interacciones químicas específicas. Ejemplo de esto es la separación supercrítica de ácidos grasos libres de los triglicéridos de un aceite natural, donde los coeficientes de distribución (relación de masa de soluto en la fase liviana y pesada respectivamente) se duplican cuando se utiliza etanol como entrainer.⁶⁷

Algunas otras aplicaciones en esta área, son la extracción de alcaloides de materiales vegetales, la extracción de aromas, especias, aceites esenciales y la extracción de terpenos de aceites cítricos. Así como la separación de compuestos valiosos como carotenos (colorantes naturales obtenidos a partir

de aceite de palma y de zanahoria), tocoferoles (antioxidantes naturales extraídos de aceites vegetales), lecitina (emulsionante natural de grasas, obtenida de aceites vegetales y animales). En general estos compuestos son obtenidos de subproductos de la extracción de aceites, provenientes de una de las etapas de refinado llamada desodorización. Los destilados desodorizados son ricos en compuestos de alto valor agregado, los que pueden ser extraídos por técnicas supercríticas.

- **Purificación de materiales.** Dentro de este rubro algunos de los procesos que hacen uso de la aplicación de los FSC son los siguientes:

1. Producción de extractos libres de pesticidas (ginseng, aceites vegetales y aceites de pescado).
2. Desalcoholización de vinos y cervezas.
3. Tratamiento de productos naturales para eliminación de disolventes orgánicos residuales provenientes de una extracción previa con disolventes líquidos, tales como hexano.
4. Obtención de productos de bajo tenor graso y bajo colesterol.
5. Extracción de terpenos de aceites esenciales.

En todos los casos, las impurezas son fácilmente separadas de los fluidos supercríticos por descompresión a presión atmosférica, por adsorción con carbono activado, o bien por medios mecánicos tales como el uso de membranas.

- **Producción de nutraceuticos.** Se denomina nutraceutico a aquellos extractos que tienen aplicaciones nutritivas y medicinales, como vitaminas y antioxidantes. Es una de las aplicaciones de rápido crecimiento en el mundo.²²

- **Aplicaciones farmacéuticas.** Los fluidos supercríticos pueden ser utilizados para micronizar drogas, encapsular drogas en matrices poliméricas, fraccionar mezclas de proteínas y esterilizar organismos bacterianos. Principios activos farmacéuticos y cosméticos pueden ser obtenidos por extracción supercrítica de plantas medicinales (extracto de camomilla y de ginseng) o del fraccionamiento supercrítico de aceites como ácidos grasos poliinsaturados obtenidos de aceites de pescado³² y utilizados en el control de enfermedades coronarias.

-**Cromatografía supercrítica.** Esta técnica permite separar compuestos de alto peso molecular y térmicamente lábiles que no pueden ser separados por cromatografía gaseosa. Los cromatógrafos supercríticos utilizan dióxido de carbono como fase móvil, modificada generalmente con 1 a 5 % de disolventes orgánicos polares, y cuentan con características adicionales tales como presión y densidad

programadas, lo que permite un mejor control de la solubilidad. Actualmente está enfocada casi exclusivamente a la industria farmacéutica para el procesado de relativamente pequeños volúmenes de materiales de alto valor agregado, en particular a la obtención de ácidos grasos poliinsaturados (EPA y DHA) de aceites de pescado con plantas a escala industrial en Inglaterra y España.³

2.3.9.2 Otras aplicaciones de FSC.

Sin duda alguna el uso de los FSC al procesamiento de productos naturales es muy atractiva, por lo que la hace una de las principales aplicaciones, sin embargo su potencial uso no se limita solamente a este campo, es obvio que al presentar tan peculiares características su uso se extienda a muchas más aplicaciones, como las que se mencionaran a continuación:

-Extracción de alcoholes del agua. La extracción de alcoholes de mezclas acuosas ha sido extensamente analizada, utilizando fundamentalmente CO₂ y propano como fluidos supercríticos. Briones¹⁷, discute aspectos termodinámicos de mezclas alcohol-agua-disolvente cuasicrítico, modelado y análisis de costos de diferentes procesos de extracción y sistemas de recuperación de disolvente.

- Destrucción de residuos peligrosos en unidades con agua supercrítica. Es un proceso que transforma residuos acuosos en subproductos, tales como, agua, CO₂, N₂, sales y NO₂ en pequeña cantidad. Debido a la baja constante dieléctrica del agua supercrítica, la mezcla de productos orgánicos y oxígeno forma una fase homogénea, haciendo que la oxidación sea más rápida y eficiente (conversiones mayores que el 99.99 % para tiempos de residencia en el reactor de menos de 1 minuto), y menos contaminante para el medio ambiente que la incineración convencional.¹³

-Extracción de disolventes orgánicos. Como hidrocarburos clorados y aromáticos de corrientes residuales de aguas industriales, con CO₂SC y propano cuasicrítico (propano líquido en condiciones cercanas a las del punto crítico) como disolventes típicos.

-Tratamiento de materiales. Tales como la purificación y expansión de polímeros en medios supercríticos, impregnación de materiales porosos (drogas medicinales en parches, agentes desacidificantes en libros, aromas en productos alimenticios), diseño de partículas especialmente aplicado a la fabricación de pinturas y sistemas de distribución de drogas (micro y nano partículas que favorecen la distribución rápida y homogénea de medicamentos en el cuerpo humano), secado y formación de aerosoles, desengrasado de metales, limpieza en seco y tinturas textiles, así como también la limpieza de semiconductores.

-Fluidos supercríticos como medios de reacción. La característica de los fluidos supercríticos de ajustar sus propiedades físicas modificando su densidad permite reducir las limitaciones de difusión de las reacciones cinéticas y separar los productos de reacción del disolvente variando la temperatura y/o la presión, dando como resultado productos de alta pureza. Un clásico ejemplo es la producción a alta presión de polietileno utilizando etileno supercrítico como medio reactivo. Reacciones de hidrogenación de aceites en medios supercríticos han sido reportadas, así como también reacciones de oxidación con agua supercrítica para la destrucción de residuos peligrosos¹³. Los parámetros de reacción pueden controlarse en forma independiente, lo que permite manipular las condiciones del proceso para lograr que la reacción se desarrolle en un medio homogéneo, siendo por lo tanto altamente selectiva. Unidades a gran escala están actualmente operando en EUA para fabricación de pinturas combinando las ventajas de reacción y atomización en dióxido de carbono supercrítico; en tanto que inversiones de 275 millones de dólares han sido anunciadas por DuPont para la producción de fluoropolímeros con dióxido supercrítico como medio de reacción.²²

-Diseño de partículas. La tecnología supercrítica permite obtener partículas, aplicadas fundamentalmente en el área farmacéutica, del orden de 50 nanómetros hasta 50 micrones. Para ello, existen 3 tecnologías diferentes: expansión rápida de soluciones supercríticas (RESS), gas antidisolvente (GAS) y precipitación utilizando antidisolventes comprimidos (PAS). En el primer caso la precipitación de partículas se logra disminuyendo repentinamente el poder disolvente de la fase supercrítica que contiene el soluto disuelto, en el segundo caso, el soluto que se encuentra disuelto en una fase orgánica líquida precipita al ponerse en contacto con un fluido supercrítico con el que tiene una baja afinidad y en la técnica PAS, un gas antidisolvente es inyectado en condiciones súper o subcríticas. Las técnicas RESS y GAS están siendo aplicadas no solo a la formación de partículas sino al encapsulado de drogas.

Es importante resaltar que para aplicaciones que no involucran procesamiento de productos naturales, los disolventes supercríticos ensayados van más allá de los seleccionados en la **tabla 4**. Productos que no son afectados por las altas temperaturas admiten ser tratados con disolventes a temperaturas críticas elevadas, como butano, amoníaco y agua, pero en casos donde no es limitante el grado de toxicidad del disolvente, permite utilizar benceno, tolueno, tetrahidrofurano, metanol y acetona, entre otros.

2.3.10 Aspectos económicos del uso de FSC en la industria.

El desarrollo de la tecnología supercrítica en la industria de procesamiento de productos naturales y el creciente aumento de sus aplicaciones en otras áreas, se debe fundamentalmente a una serie de factores mencionados a continuación:

- La producción mundial de aceites, grasas vegetales y animales, y de productos derivados, se ha incrementado en las últimas décadas, mientras que al mismo tiempo ha habido un aumento en el precio de agentes de extracción tradicionales, tales como hexano.
- En número creciente de países, la mayoría de los disolventes orgánicos están prohibidos para extracción de productos alimenticios, o bien autorizados con extremadamente bajas concentraciones residuales, inferiores a 5 ppm para hexano y 0.01 ppm para aromáticos y derivados (regulaciones de la FDA: Food and Drug Administration).²²
- Los consumidores tienden a exigir productos producidos a partir de tecnologías limpias, descartando disolventes orgánicos frente a disolventes naturales como el CO₂.
- Los productos extraídos con fluidos supercríticos son de calidad superior a los obtenidos por extracción con disolventes orgánicos, fundamentalmente porque no hay residuos de disolvente en los mismos, pero también porque los materiales son procesados a temperaturas moderadas, de modo que sus propiedades no son alteradas. En el caso de extracción de condimentos y fragancias, las muestras pueden sufrir hidrólisis cuando se los somete a destilación con vapor, en tanto que sus propiedades organolépticas son prácticamente las del material original cuando se los produce por extracción supercrítica. Similarmente, Arreola y colaboradores⁷ reportaron que jugos cítricos procesados con CO₂SC son de mayor calidad que los sometidos a destilación a vacío, en tanto que Eggers²⁹ compara el refinado de aceites por métodos clásicos con aquellos que utilizan extracción supercrítica, concluyendo que la EFS permite la omisión de varios pasos de refinado después de la extracción con CO₂, reduciendo el consumo de álcalis y minimizando pérdidas de lípidos neutros.
- Los procesos supercríticos permiten resolver problemas ambientales tales como reducción de emisiones de compuestos orgánicos volátiles y reemplazo de disolventes halogenados convencionales utilizados en el desgrasado de pinturas y metales, o en limpieza y secado textil.
- A partir de tecnología supercrítica están siendo obtenidos diversos productos difíciles de extraer con disolventes tradicionales (extractos de jengibre, pimienta y pimienton) y otros productos completamente innovadores, tales como los llamados sistemas de distribución de drogas, de reciente aplicación en la industria farmacéutica.

A pesar de lo expuesto anteriormente, existen otros factores, fundamentalmente económicos que se oponen a la rápida difusión de la tecnología supercrítica. Altas presiones requieren altos gastos de inversión y de operación. En la actualidad los procesos supercríticos compiten con los procesos de extracción tradicionales cuando se aplican a la obtención de productos de alto valor agregado (ácidos grasos poliinsaturados como eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), aceites cítricos esenciales, extracto de vainilla, ginseng, etc.), o cuando se procesan grandes volúmenes de materiales como en el caso de procesamiento de café y té, lúpulo, fabricación de pinturas y tratamiento de residuos, entre otros. Sin embargo, todo es cuestión de tiempo. Las regulaciones cada vez más estrictas en relación con los efectos sobre la capa de ozono, descargas de compuestos orgánicos volátiles y concentraciones residuales en el producto final para protección de consumidores y ambiente, facilitarán el desarrollo de procesos de extracción y fraccionamiento supercrítico, haciéndolos más competitivos que en la actualidad.

Capítulo 3. Objetivos e hipótesis.

3.3.1 Objetivo general.

Llevar a cabo el estudio de la extracción de perezona “ácido pipitzahoico” del espécimen vegetal *Acourtia cordata* mediante el empleo de CO₂ en condiciones supercríticas, lo anterior como un método de extracción alternativo, limpio y que represente una vía química para contribuir a la sostenibilidad.

3.3.2 Objetivos particulares.

1. Efectuar el estudio cooperativo enfocado al hallazgo de las mejores condiciones de temperatura, presión y tiempo que permitan la máxima solubilidad de perezona en CO₂SC, mediante la técnica y equipo de extracción supercrítica empleado.
2. Corroborar la presencia de perezona en la muestra de raíz del espécimen *Acourtia cordata*, seleccionada para el tratamiento y estudio, mediante una sencilla comparación de su espectro de RMN ¹H y un espectro de referencia.
3. Llevar a cabo la evaluación en función del tiempo de contacto de las mejores condiciones de temperatura y presión encontradas, desde un aspecto cuantitativo-selectivo para la extracción de perezona del espécimen vegetal *Acourtia cordata* empleando como disolvente al CO₂SC.
4. Efectuar la cuantificación de perezona en las muestras extraídas mediante el uso de un método alternativo de cuantificación por resonancia magnética nuclear de ¹H, utilizando al 1,4-dinitrobenceno como un patrón de referencia interno.
5. Comparar los resultados desde un punto de vista de rendimiento-selectividad, obtenidos por el método de extracción con CO₂SC contra los resultados teóricos obtenidos por los métodos térmicos convencionales de extracción, y métodos más novedosos como la EAI, EAU y la EAM, efectuados en condiciones similares.

3.3.3 Hipótesis.

Puesto que se ha observado que los métodos alternativos de activación, como la extracción asistida por infrarrojo, con microondas y la sonicación con ultrasonido, han resultado ser viables e incluso más eficientes en la extracción de metabolitos provenientes de especímenes vegetales que los métodos convencionales de extracción, entonces la utilización de la tecnología supercrítica como método

alternativo de extracción, traerá consigo no solo mejores resultados que los presentados por los métodos convencionales, sino también la posibilidad de superar la eficiencia obtenida por los métodos novedosos, anteriormente citados, en el rubro rendimiento-selectivo de la extracción de perezona de *Acourtia cordata*, gracias a las bondades del CO₂SC como disolvente.

3.3.4 Parte experimental: reactivos, materiales, equipos y metodología.

3.3.4.1 Espécimen vegetal (*Acourtia cordata*).

El género *Acourtia* contiene más de 110 especies, en su mayoría Mexicanas, extendiéndose desde el suroeste de Estados Unidos hasta Honduras, conocidas con el nombre común de “pipitzahuac”, nombre náhuatl que se relaciona con las características raíces fibrosas, delgadas y largas de sus plantas, las cuales presentan la propiedad de producir y acumular una amplia variedad de metabolitos, como es el caso de diversas quinonas sesquiterpénicas entre las cuales se encuentra la perezona⁷⁴. Esta presenta un uso potencial en diversas áreas de la industria como se mencionó en los apartados pasados, así como también su conocido uso como colorante en la industria. Dentro de las especies que producen perezona se encuentra la *Acourtia cordata*.

La especie *Acourtia cordata*, es una planta herbácea con espinas, que presenta hojas de color verde oscuro de aspecto aserrado y flores de blancas a lilas con cáliz vellosa, de una extensión aproximada a un 1 cm (**Figura 19**). Crece principalmente en climas templados, como los que se dan en las zonas montañosas del centro de México.⁷⁴



Figura 19. Espécimen de *Acourtia cordata* en su habitat natural.

Tabla 7. Descripción física y taxonómica del espécimen *Acourtia cordata*.



Información taxonómica.	
Reino	Plantae.
Phylum	<i>Magnoliophyta</i> .
Clase	<i>Magnoliopsida</i> .
Orden	<i>Asterales</i> .
Familia.	<i>Asteraceae</i> .
Género.	<i>Acourtia</i> .
Epíteto específico.	<i>Cordata</i> .
Nombre Científico.	<i>Acourtia cordata</i> .
Altura máxima.	1.10 – 1.40 m.
Color de flor.	Lila, muy escaso.
Habitad.	Matorral en ladera de cerro.
Nombres comunes.	Cola de zorra (español). Hierba del zopilote (español). Pipitzáhuac (náhuatl). Xararo (Tarasco). Coapatli (náhuatl).
Homólogos.	<i>Perezia hebeclada</i> . <i>Acourtia hebeclada</i> . <i>Perdium cordatum</i> . <i>Acourtia matudae</i> .
Distribución en México.	Ciudad de México, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Estado de México, Puebla, Querétaro y Tlaxcala.

3.3.4.2 Localización geográfica del espécimen recolectado.

Las raíces de la planta *Acourtia cordata* empleadas en la extracción de perezona, pertenecen a la colecta de octubre del 2016 efectuada en el parque ecológico Ehécatl, específicamente en el cerro de Ehécatl “cerro de viento”, que forma parte de la sierra de Guadalupe, ubicado en el municipio de Ecatepec, Estado de México (**Figura 20**). Las plantas se obtuvieron de una población de dicha especie ubicada por el botánico japonés Eizi Matuda, con coordenadas N 19° 35.620', W 99° 03.978' a 8150 pies de altura. El espécimen se comparó con una existente en el Herbario Nacional de México, del Instituto de Biología de la UNAM, resultando compatible. Conjuntamente se envió un espécimen para su corroboración al Dr. Juan Nava Serrano del IPN y al Dr. Luis Isaac Aguilera Gómez de la UAEM, quienes coincidieron con tal identificación.

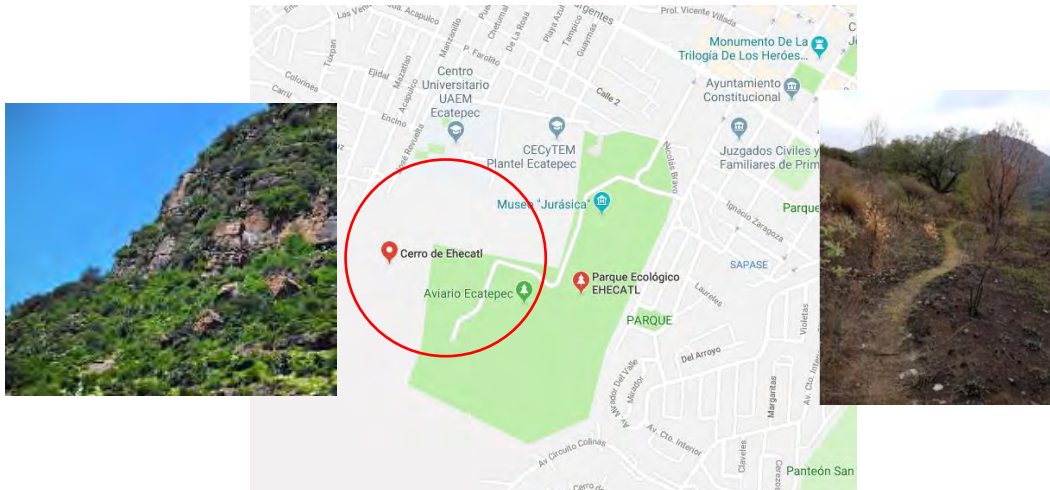


Figura 20. Localización del cerro de viento en el parque ecológico Ehecatl, municipio de Ecatepec, Estado de México.

3.3.4.3 Tratamiento del espécimen vegetal (*Acourtia cordata*) preextracción.

Es conocido que la *Acourtia cordata* presentan mayor cantidad de perezona en sus raíces⁶⁰, por tal razón en el presente trabajo solo se empleó esta parte de la planta. Una vez recolectada y separada la



Figura 21. Raíz de *Acourtia cordata*.

planta de la raíz, dicho material fue colocado sobre papel absorbente y expuesto a la intemperie por un periodo aproximado de un mes. Alcanzada la mayor sequedad posible se prosiguió a fragmentar de forma manual con ayuda de herramientas de golpeo, ya que las raíces presentan núcleos de ramificación muy sólidos (**Figura 21**), hasta lograr un tamaño de partícula considerablemente pequeño (menor a 1cm).

Una vez obtenido un tamaño de partícula adecuado se prosiguió a realizar una trituración fina, haciendo uso de un molino manual portátil para carne. En esta operación se obtuvo un tamaño de partícula menor a 0.05 mm de diámetro aproximadamente.

Aprovechando el aumento en el área de contacto, el triturado fino de la raíz se extendió nuevamente sobre papel absorbente por cerca de 1 semana, efectuando rotaciones periódicas para tratar de alcanzar la mayor sequedad posible. Posteriormente se envaso en recipientes anchos y sin tapa para su posterior uso en el proceso de extracción.

3.3.4.4 Pruebas preliminares de solubilidad de perezona en CO₂SC.

En la **figura 22** se muestra el esquema del equipo que fue utilizado en el presente estudio para determinar la solubilidad de perezona en CO₂SC, en el cual también se encuentran señalizadas cada una de las partes que lo integran y de las cuales a continuación se dará una breve descripción. Cabe señalar que este equipo fue manufacturado y se encuentra ubicado en la facultad de química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), al cual se tuvo acceso gracias a la cooperación de la misma para tal estudio.

Este ensayo comenzó con el pesaje de 0.1 g de perezona purificada, la cual se colocó dentro de una celda de solubilidad de 3 cm³ con tapa porosa, la cual a su vez se introdujo en una celda de extracción de alta presión. Esta celda o reactor de 875 cm³ se instaló dentro de una cámara de acrílico equipada con un controlador de temperatura y dotada de ventiladores que promueven la recirculación de aire caliente. Sellada e instalada la celda dentro de la cabina y conectada la tubería de entrada y salida, se prosiguió a abrir el sistema y desplazar el aire contenido dentro de estas, mediante la purga con un flujo inicial de dióxido de carbono. Finalizada la purga, se cerró el sistema y el CO₂ de alta pureza, comenzó a ser alimentado y comprimido mediante una bomba de alta presión. De forma simultánea al proceso de alimentación del dióxido de carbono, se efectuaba el calentamiento del sistema mediante la recirculación de aire calentado por contacto con bombillas incandescentes colocadas dentro de la cabina de extracción, hasta que se alcanzó la temperatura de experimentación. Alcanzada esta temperatura, la celda se terminó de presurizar con CO₂ hasta alcanzar de igual manera la presión experimental deseada. Estabilizadas y obtenidas las condiciones de estudio, el sistema se cerró por completo impidiendo entradas o salidas y de esa forma promover la conservación de la presión interna intacta, la cual se monitoreo periódicamente mediante el uso de un transductor extensométrico, el cual aunado al sensor y regulador térmico del controlador de temperatura hicieron posible que las condiciones permanecieran lo más constante posible a lo largo del tiempo de experimentación determinado.

El proceso de contacto de la perezona con el fluido supercrítico se mantuvo durante un periodo de 4 horas. Concluido ese tiempo, se abrió el sistema y aprovechando la diferencia de presiones se direccionó el flujo del CO₂SC con la perezona disuelta a través de tubería que conducía directamente hacia la válvula micrométrica climatizada, la cual conecta con la celda de expansión; lugar donde el fluido se descomprime y enfría, propiciando la pérdida de las propiedades supercríticas y la inherente incapacidad de mantener disuelta a la perezona, dando paso a su precipitación y cristalización. Una vez aislada la perezona del CO₂, este se pudo dejar escapar al ambiente o bien como fue el caso, se recolectó y se direccionó de vuelta al sistema, con la finalidad de recircularlo e incrementar la

sostenibilidad del proceso. Ahora bien, la cantidad de perezona recuperada en la celda de expansión representó directamente la cantidad de perezona solubilizada en el CO₂SC, la cual fue determinada gravimétricamente en una balanza analítica, partiendo de la diferencia de la masa de perezona inicial colocada en la celda de solubilidad aunada a la masa de la misma, entre la masa final de la celda de solubilidad con la perezona no solubilizada.

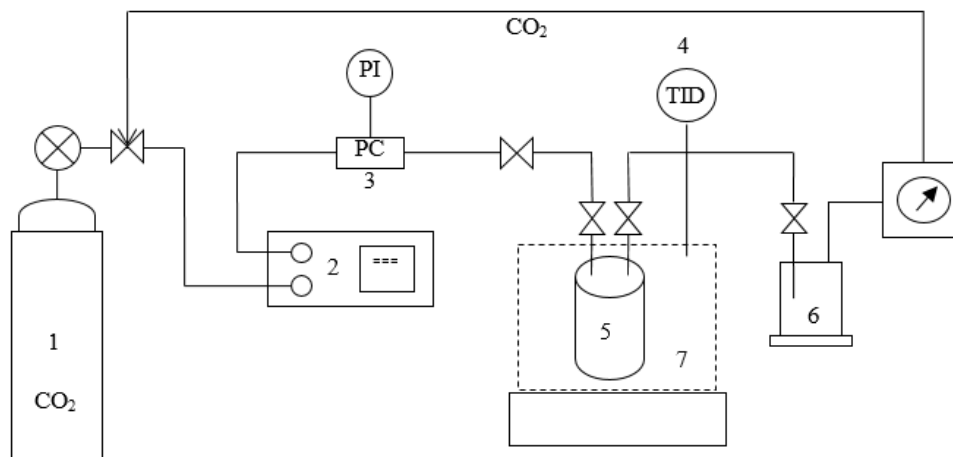


Figura 22. Dispositivo construido con tubería de acero inoxidable empleado para la determinación de solubilidad y extracción de perezona con CO₂SC.

(1) Tanque de CO ₂ presurizado.	(5) Celda de extracción de alta presión.
(2) Bomba de alta presión (LabAlliance A19284).	(6) Celda de expansión.
(3) Transductor (Sensotec THE/7093-03).	(7) Cámara de acrílico con recirculación de aire.
(4) Controlador de temperatura.	



Figura 23. Equipo empleado para la extracción con CO₂SC. (Equipo ubicado en la facultad de química de la UAEM).

3.3.4.5 Procedimiento experimental para la extracción de perezona con CO₂SC.

Una vez concluidas las pruebas de solubilidad de perezona en CO₂SC y por ende, establecidas las condiciones de presión y temperatura idóneas para tal propósito, se prosiguió a realizar el estudio central del presente trabajo, es decir, el ensayo y análisis del proceso de extracción de perezona de una matriz vegetal, en este caso de la raíz de *Acourtia cordata*, teniendo como variable al tiempo de contacto, tomando en consideración 4 horas como un mínimo estándar. Cabe recordar que este estudio también se efectuó mediante el uso el equipo de EFS mencionado anteriormente (**Figura 23**).

El proceso de extracción en esencia fue muy similar al ensayo enfocado a las pruebas de solubilidad, comenzando con el pesaje de 5 g del material pretratado de la raíz de *Acourtia cordata* y colocado dentro de una celda metálica y porosa (**Figura 24**) de aproximadamente 25 cm de longitud y un radio de 3.5 cm, la cual es una parte interna y desmontable de la celda de extracción de alta presión. La celda con la muestra se fijó dentro de la celda de alta presión, la cual se selló con la ayuda de una llave especial y se colocó dentro de la cámara de acrílico con recirculación de aire caliente. Una vez ensambladas a la celda todas las líneas de entrada y salida, igualmente se prosiguió a desplazar el aire contenido en la tubería y en la misma celda de extracción mediante la purga con un flujo incipiente de CO₂. Para que después haciendo uso de la bomba de alta presión se alimentara y comprimiera el CO₂ hasta alcanzar la presión de 106 bar (presión puesta a prueba y preestablecida de las pruebas de solubilidad). Conjuntamente gracias a la recirculación de aire caliente a la cual estaba expuesta la celda de extracción, también se logró alcanzar la temperatura idónea, establecida para este ensayo en 323.15 °K o bien 50 °C. Lograda la estabilización de la presión y temperatura, la variable tiempo entró en escena, es decir, se evaluaron diferentes tiempos de contacto, partiendo de lo observado en las pruebas de solubilidad. Para tal propósito se establecieron como prueba tres tiempos de contacto mayores a 4 horas, siendo 6, 12 y 24 horas los inervalos elegidos para la extracción de perezona, los cuales con fines estadísticos se efectuaron por triplicado. Finalizado cada uno de los tiempos de contacto y por lo tanto concluida la prueba, fue hora de obtener el extracto de *A. cordata* resultante, para ello se direccionó el flujo de CO₂SC con el extracto disuelto, mediante la apertura de la válvula de salida que conecta a la válvula micrométrica climatizada, para su posterior paso a la celda de expansión, en donde el fluido perdió su capacidad para mantener disuelto al extracto, el cual por ende se disoció del CO₂ y precipitó dentro de la celda. Por último se determinó la cantidad de extracto obtenido mediante determinaciones gravimétricas, en donde se relacionó sustractivamente la masa final de la celda de expansión aunada al extracto obtenido entre la masa inicial de la celda. Determinada dicha cantidad el extracto fue recolectado para su posterior cuantificación a continuación descrita.



Figura 24. Celda metálica porosa empleada en la extracción de perezona.

3.3.4.6 Cuantificación de perezona en los extractos por RMN ^1H (método del patrón interno).

Conseguidos los extractos de *Acourtia cordata*, se prosiguió a determinar gravimétricamente, en balanza analítica, la cantidad de extracto obtenido en cada una de las pruebas. Esta determinación gravimétrica permitió relacionar la cantidad de extracto obtenida en función del tiempo. Registradas las masas de extracto obtenido, se efectuó el análisis cuantitativo de perezona presente en cada uno de los extractos. Es importante recordar que para este momento ya se conocía muy bien por estudios anteriores⁶⁰, la disponibilidad e incluso la cantidad aproximada de perezona presente en los extractos de *Acourtia cordata*. Una vez aclarado la inherente presencia de perezona en el extracto, se prosiguió a su determinación cuantitativa utilizando como técnica de apoyo la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H). Para la cuantificación se empleó una técnica basada en el uso de un patrón interno, para tales fines se eligió al 1,4-dinitrobenceno como el patrón interno más adecuado. Una vez establecida la técnica y patrón interno a utilizar, se inició la preparación de las muestras a analizar, siguiendo la metodología demandada por la RMN ^1H . Las muestras a analizar se prepararon mezclando 30 mg del extracto de perezona con 20 mg del patrón interno, disolviendo la mezcla en 0.7 ml de cloroformo deuterado (CDCl_3) aditivado con tetrametilsilano (TMS, el cual es un compuesto de referencia en RMN ^1H), posteriormente la muestra preparada se tomó con una pipeta Pasteur para verterla dentro de un tubo para RMN. Una vez listas las muestras, se identificaron e introdujeron en un espectrómetro VARIAN MERCURY-300 a 300 MHz (**Figura 25**). Obtenidos los espectros correspondientes a cada análisis, se llevó a cabo la interpretación respectiva y determinación cuantitativa de la cantidad de perezona presente en cada una de las muestras. Para llevar a cabo tal determinación se relacionó el área de la integral perteneciente a la señal asignada al protón **H-6** de la

perezona (I_p) (**Figura 29**), el área de la integral del 1,4-dinitrobenzono (I_{std}), el número de núcleos de H^+ presentes en la perezona (N_p), el número de núcleos de H^+ presentes en el patrón interno (N_{std}), el peso molecular de la perezona (MW_p), el peso molecular del patrón interno (MW_{std}) y la concentración en mg agregada del 1,4-dinitrobenzono (C_{std}). Tal relación se llevó a cabo como se muestra en la **ecuación 12** a continuación desarrollada.

$$C_p = \frac{I_p}{I_{std}} \times \frac{N_{std}}{N_p} \times \frac{MW_p}{MW_{std}} \times C_{std} \quad \text{Ecuación (12).}$$

Para efectuar el cálculo de concentración de perezona en mg presente en cada uno de los extractos por medio de la ecuación anterior, fue necesario primeramente conocer cada uno de los parámetros involucrados, para lo cual se requirió primeramente realizar el cálculo del peso molecular (MW) tanto para la perezona, como para el 1,4-dinitrobenzono, así como también fue necesario establecer el número de núcleos de H^+ presentes en ambas especies (**Tabla 8**) e identificar en ambos casos el área de la integral, la cual se encuentra establecida en las señales correspondientes presentadas en los espectros de RMN 1H (**anexo 6.1**). Por último la concentración del patrón interno es la cantidad en mg de 1,4-dinitrobenzono (+/- 20 mg) que se adicionó en la preparación de la muestra.

Tabla 8. Cálculo del peso molecular (g/mol) y número de núcleos de H^+ correspondientes a la perezona y al 1,4-dinitrobenzono.

Propiedad	Perezona	1,4-Dinitrobenzono
Área de integral	El correspondiente para cada extracto	El correspondiente para cada extracto
Peso molecular (MW)	248	168.1
Número de núcleos de H^+	1	4



Figura 25. Espectrómetro de RMN VARIAN MERCURY-300 y tubos de vidrio empleados para análisis de Resonancia Magnética Nuclear.

Es importante mencionar que la razón por la cual se eligió a la integral de la señal **H-6** de perezona es debido a que pertenece a un protón que se ha observado no sufre cambios en su localización por el ambiente molecular, además de que la integral al provenir de un solo hidrógeno no se ensancha de más, lo cual permite llevar el cálculo de forma directa.

En función de este criterio también radica la elección del 1,4-dinitrobenceno como el patrón interno más adecuado para la cuantificación; la razón de ello es debido principalmente a su conveniente cualidad de originar pocas señales en el espectro, las cuales además se manifiestan alejadas de la señal del **H-6** de la perezona y por ende no interfieren con la zona de integración de la misma. Aunado a estas oportunas características, el 1,4-dinitrobenceno cumple con la condición de ser soluble en CDCl_3 , estable, no volátil y de fácil acceso.

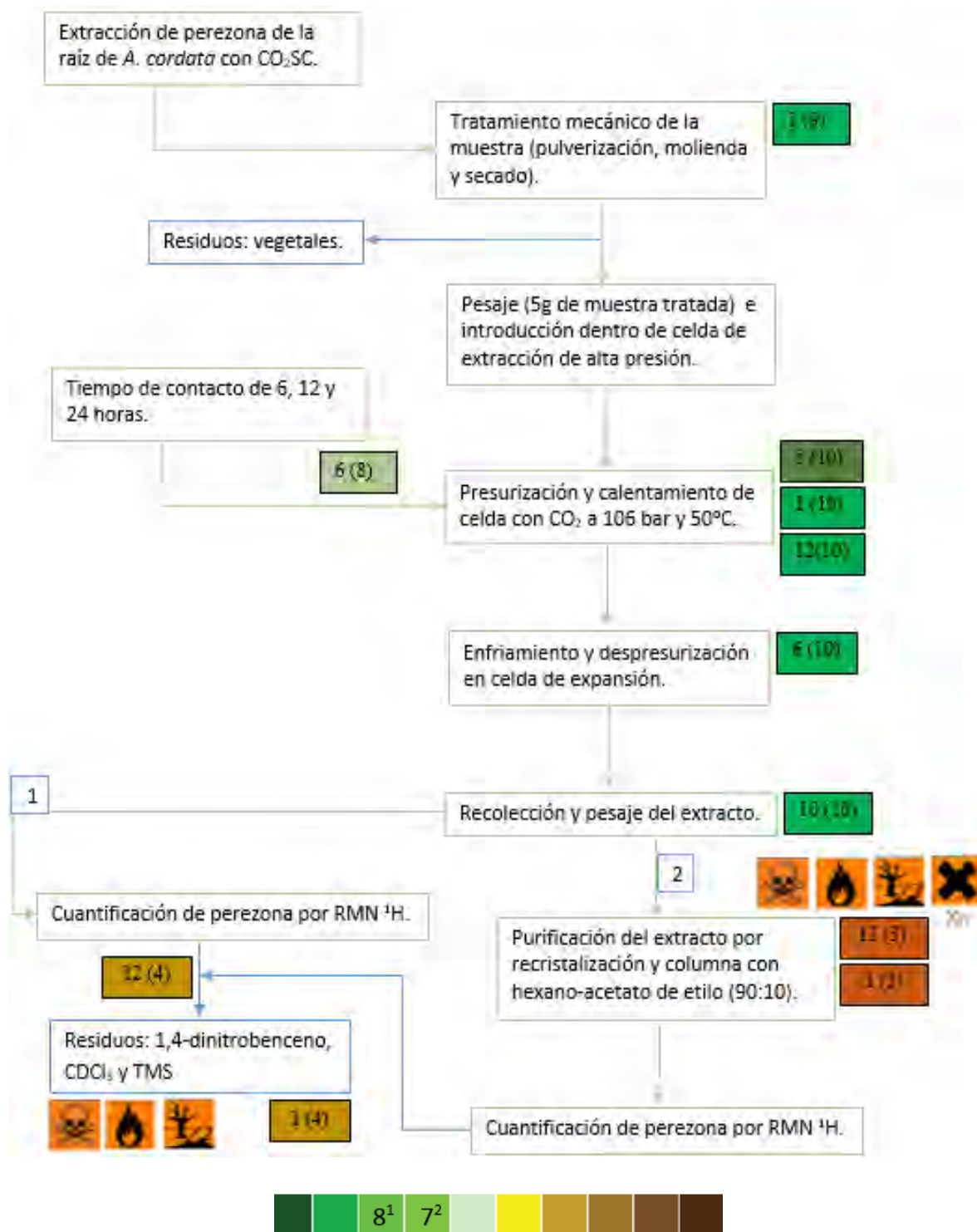
3.3.4.7 Evaluación del acercamiento verde del proceso de extracción de perezona de *Acourtia cordata* con CO_2SC .

En base a la propuesta de evaluación del acercamiento verde de un proceso químico, tratado en el **apartado 2.2.1.1**, se buscó identificar a grandes rasgos el status del cual goza el proceso de extracción supercrítica que se propuso en el presente estudio para la obtención de perezona de *A. cordata*. Según los principios y metodología por los cuales se rige esta evaluación, en primera instancia fue necesario tener en claro y adquirir plena conciencia de los aspectos generales y particulares tratados en la misma, lo cual condujo al reconocimiento de la esencia propia del procedimiento. Una vez inmerso en las peculiaridades de la metodología se inició con la construcción del diagrama de proceso, en el cual se resaltó cada uno de las etapas experimentales, colocando para cada una los pictogramas correspondientes a la toxicidad, inflamabilidad, corrosión y daño al ambiente de los reactivos, disolventes, productos y residuos generados en cada una de estas. Aunado ello se colocó la evaluación correspondiente en base al cumplimiento de cada uno de los principios de la química verde aplicables a la etapa. Esta evaluación, en una escala del 1 al 10 se colocó dentro de un rectángulo, junto al número del principio que se evaluó, tal rectángulo aunado a la evaluación y el principio evaluado, llevó en su interior el color correspondiente que indicó cualitativamente el grado de acercamiento verde, tomado de un código de color y tono establecido para tal fin (**Figura 26**).

Establecida la evaluación de cada etapa se efectuó la determinación de la evaluación global del proceso, mediante la sumatoria de todas las evaluaciones realizadas y su posterior división entre el número de eventos evaluados. Obteniendo así la evaluación correspondiente al proceso, presentada al final del mismo haciendo uso de una escala tipo Linkert (**Figura 26**). En el caso particular del

proceso de extracción de perezona de *A. cordata* empleando CO₂SC la evaluación arrojó 9.6 lo cual deja al proceso con un status totalmente verde. Cabe aclarar que esta evaluación abarca solo el proceso de extracción o bien hasta la obtención del extracto. Sin embargo el presente estudio no solo llega hasta ahí, debido que el estudio contempla también la cuantificación de perezona obtenida por medio de RMN. Es un hecho que contemplarla fue bastante exagerado, debido a que la metodología contempla requerimientos casi despreciables de soluciones que se consideran tóxicas y nocivas para la salud y el ambiente, como es el caso del 1,4-dinitrobenceno utilizado como patrón interno o el uso de cloroformo deuterado como disolvente. Sin embargo esta representa una fuente de producción de residuos, que aunque sea muy pequeña, es considerable para la evaluación. Tal evaluación también considera un camino alternativo, el cual no se siguió en el presente estudio, pero que se hubiera podido seguir, el cual conlleva a una posterior purificación de la perezona por métodos cromatográficos simples, como es el uso de columnas cromatográficas, la cual es auxiliada por disolventes de carácter tóxico y nocivo. La evaluación por la ruta extractiva y cuantitativa, así como la evaluación de la vía hipotética se muestran en la **figura 26** presentada a continuación, en la cual incluso considerando los aspectos antes mencionados, se observan resultados aún muy alentadores en ambos casos, obteniendo evaluaciones de 8 y 7, es decir, un muy buen y buen acercamiento verde respectivamente.

Figura 26. Diagrama de flujo y evaluación del acercamiento verde para el proceso de extracción de perezona de *Acourtia cordata* empleando CO₂SC.



Superíndice ¹=Evaluación de la ruta extractiva-cuantitativa; ²= Evaluación hipotética.

Capítulo 4. Resultados y análisis de resultados.

4.4.1 Identificación preliminar de perezona en raíz de *Acourtia cordata*.

Como se mencionó desde la introducción el presente trabajo es la continuidad de trabajos anteriores enfocados a la extracción de perezona, de la raíz de *Acourtia cordata* empleando métodos y fuentes alternativas de activación. Claro está, que tales trabajos partieron desde la identificación de perezona en la raíz utilizada, por lo que al inicio del presente trabajo ya se conocía perfectamente de su presencia dentro de la misma. Aun así, en colaboración con los responsables de los trabajos antes mencionados⁶⁰ se obtuvo una muestra del extracto de perezona del mismo espécimen obtenido mediante extracción Soxhlet y purificado mediante columna cromatográfica. El producto de esta purificación así como de su posterior recrystalización consistió en un sólido naranja cristalino (**Figura 27**), el cual sin duda alguna compartía las características cualitativas propias de la perezona observadas mediante la comparación con una muestra fidedigna de la misma. Aunado a esta comparación cualitativa, se obtuvo su punto de fusión mediante un Fisher-Elmer, el cual se registró entre 102-103 °C, dato congruente con lo reportado en la literatura para la perezona. En adición a lo anterior y como prueba confirmatoria se llevó a cabo la comparación del espectro de resonancia magnética nuclear de protón, del compuesto extraído (**Figura 27**) contra el espectro reportado teóricamente para la molécula de perezona⁸⁹ (**Figura 28**). En dicha comparación se observa gran homogeneidad en la presencia de las señales en ambos espectros, lo cual es un claro indicativo de que se trata de la misma molécula. Tales resultados espectroscópicos aunados a las pruebas físicas y cualitativas de caracterización corroboraron y dejaron en claro de forma muy sencilla la indudable presencia de perezona en el extracto de la raíz de *Acourtia cordata*.

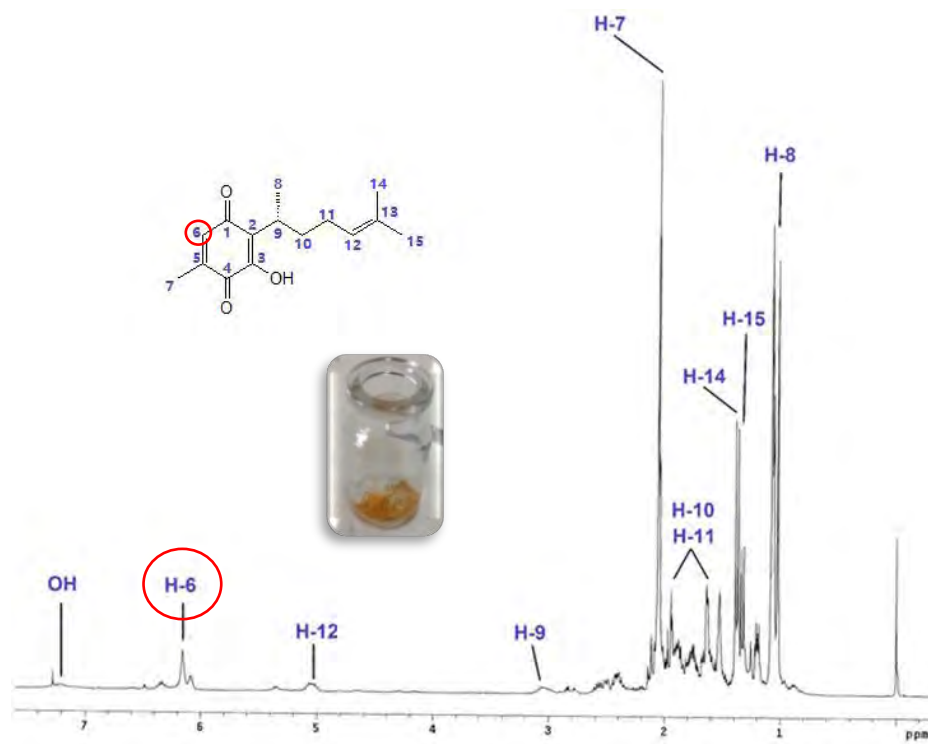


Figura 27. Extracto de perezona recristalizada y espectro de RMN ^1H a 300 MHz en CDCl_3 .

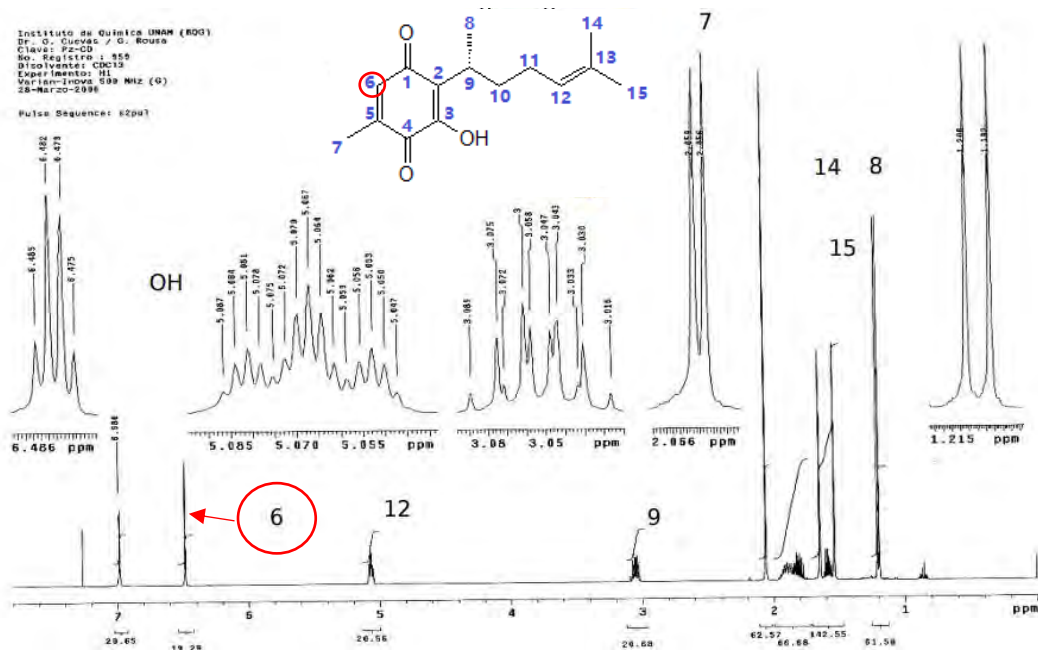


Figura 28. Espectro de referencia de RMN ^1H a 500 MHz de perezona en CDCl_3 .⁸⁹

4.4.2 Estudio de la solubilidad de perezona en CO₂SC.

Corroborada la presencia de perezona en la raíz del espécimen a tratar, entonces se prosiguió a efectuar el trabajo experimental central, es decir se llevaron a cabo las metodologías experimentales descritas anteriormente, enfocadas al estudio de la extracción de perezona con CO₂SC.

Como es lógico de pensar antes de pasar a efectuar la extracción supercrítica a partir de la matriz vegetal, fue necesario establecer un punto de partida, es decir, hallar las condiciones requeridas para asegurar la mejor extracción; para ello fue indispensable comenzar con el análisis de solubilidad de perezona en CO₂SC de forma aislada, utilizando una muestra pura de la misma; esto permitió tener un primer acercamiento y poder observar el comportamiento del metabolito en presencia del CO₂SC y de esta forma poder asentar las mejores condiciones en función de los parámetros de presión y temperatura bajo las cuales es posible tener la mayor solubilización del compuesto puro en el fluido supercrítico. Tomando esta experiencia fue posible extrapolarla a la extracción de perezona del espécimen vegetal, teniendo en cuenta ciertas consideraciones al tratarse de una matriz vegetal compleja, que llevaron a realizar ajustes enfocados a lograr obtener el mejor rendimiento en la extracción del metabolito. Cabe mencionar que para tal evaluación se sumaron esfuerzos con los realizados por el químico Rene Escobedo en sus estudios de doctorado enfocados a un propósito similar; con el cual se colaboró en la obtención de los resultados a continuación brevemente presentados, los cuales sin duda alguna representan los cimientos del estudio realizado en el presente trabajo.

Tal estudio de solubilidad comenzó con la revisión documental de ensayos reportados en algunos artículos sobre el análisis de solubilidad en CO₂SC de ciertas sustancias con características similares a las de la perezona, esto con la intención de orientarnos y establecer un punto de partida en el desarrollo del estudio aplicado a la perezona. Para tal propósito se consideró los resultados generados del análisis de solubilidad de la *p*-benzoquinona en CO₂SC³⁷, debido a que comparte similitud estructural con nuestro metabolito. Así, derivado de las observaciones de los resultados descritos en tal análisis y tomando en consideración la metodología seguida, se decretaron las presiones de 80, 93, 106 y 148 bar como las más convenientes para ensayar. De igual forma se fijaron las temperaturas de 313.15, 323.15 y 333.15 °K (40, 50 y 60 °C), al ser consideradas las más adecuadas para la prueba. Es preciso tener en cuenta que tal elección de condiciones fue determinada en función de los parámetros que indujeran la obtención de las condiciones supercríticas de nuestro fluido.

Teniendo las condiciones definidas se prosiguió a efectuar el análisis enfocado al hallazgo de la combinación presión-temperatura que propiciara la óptima solubilidad de nuestro metabolito. De este

análisis se obtuvieron los peculiares resultados discutidos a continuación, con los cuales fue posible determinar las isotermas del proceso disolución de perezona en CO₂SC, mismas que están representadas en el gráfico (presión-fracción molar) en seguida presentado en la **figura 29** y que sirvieron como parámetros gráficos para la determinación de las condiciones combinatorias más efectivas en tal proceso.

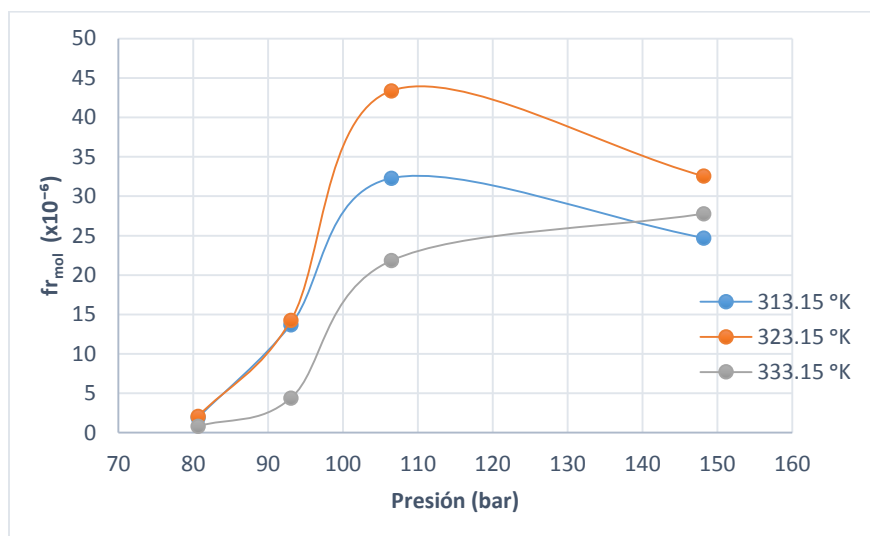


Figura 29. Isotermas de solubilidad de la perezona a 313.15, 323.15 y 333.15 °K.

Analizando el comportamiento de las isotermas de solubilidad resultantes, las cuales por cierto están expresadas en fracción molar de perezona disuelta en CO₂SC, se observa que a presiones por arriba de los 106 bar se presenta un punto máximo de solubilidad, seguido de una zona de saturación en la cual no obstante se continúe aumentando la presión, la solubilidad de la perezona no se ve favorecida, sino todo lo contrario, se percibe un leve decaimiento en la capacidad disolvente del CO₂SC, esto en el caso particular de la isoterma a 333.15 °K, pues en lo que respecta a las isotermas a 323.15 y 313.15 °K la disminución es mucho más pronunciada. Dejando en claro que si bien el aumento en la temperatura es un factor que aparentemente tiene un leve beneficio en la solubilidad de perezona al ser tratadas a presiones más altas, la realidad es que la presión idónea para este proceso de disolución es alrededor de 106 bar, debido que en este punto se registraron los valores más altos de disolución.

Tal intervalo de presión en el cual se encontró esta zona de saturación, es también observado en los análisis de solubilidad de la *p*-benzoquinona y la 8,9-antroquinona en CO₂SC reportados en la literatura, en los cuales de igual manera se distingue una zona de declive por arriba de los 110 bar³⁷. Esta referencia por lo tanto viene a confirmar lo antes observado en nuestro ensayo, sin dejar de lado

el echo inherente de que si bien ambas quinonas presentan similitud con nuestro metabolito, no son del todo iguales, lo cual causa pequeños cambios en su solubilidad a consecuencia de sus evidentes diferencias estructurales. A pesar de ello estos resultados son puntos de referencia confiables e importantes parámetros de corroboración.

Ahora bien en el caso puntual del análisis de la temperatura también se observan peculiaridades en el comportamiento de la solubilidad en función de ella. En primer instancia salta a la vista el resultado presentado dentro de la isoterma correspondiente a los 323.15 °K, debido a su gran amplitud en comparación con las otras isothermas, lo cual significa independientemente del efecto de la presión, que bajo esta temperatura se obtuvo mayor cantidad de perezona solubilizada, la cual en combinación ahora si de una presión de 106 bar, propician las condiciones más convenientes y cuantitativas de solubilidad. Esta zona es claramente visualizada como el punto más alto de las isothermas obtenidas, zona en donde fue posible disolver cerca del 96 % de la totalidad del metabolito sometido inicialmente a la prueba. De igual manera se puede observar lo acontecido en la isoterma a 313.15 °K la cual se aprecia justo por debajo de la anterior isoterma, presentando al igual su punto máximo de solubilidad cerca de los 106 bar de presión, distinguiéndose como la segunda zona más cuantitativa de disolución, lográndose solubilizar cerca del 90 % de la perezona inicial. Hasta el momento observando ambas isothermas se puede distinguir un patrón lógico en el comportamiento que apunta a una relación directamente proporcional entre la temperatura y la solubilidad, sin embargo al observar la última isoterma a 333.15 °K se detectó una alteración en el comportamiento que se venía dando, debido a que se registraron los valores más bajos de solubilidad e incluso en el punto más cuantitativo que también se presentó a los 106 bar, zona que aparece por debajo de ambas isothermas de menor temperatura. Tal peculiaridad nos lleva a una similar conjetura como a la que se llegó en el análisis de presión, es decir, al aumentar la temperatura por arriba de los 323.15 °K se presenta una zona de disminución en la solubilidad, con la peculiaridad de que no se presenta una zona de saturación tan marcada, como antes se mencionó, aparentemente el incremento en la temperatura favorece ligeramente a la disminución del efecto de saturación. Este fenómeno en la disminución de la solubilidad con el incremento de la temperatura de igual manera fue observado en los análisis reportados para la *p*-benzoquinona e hidroquinonas³⁷ en los cuales se observa también un comportamiento inverso a partir de 333.15 °K, puesto que, a medida que se aumenta la temperatura disminuye considerablemente la solubilidad.

4.4.2.1 Modelado teórico de la solubilidad de perzona en CO₂SC.

Una vez asentadas las condiciones que favorecen al proceso de solubilidad de perzona en CO₂SC resultó interesante llevar a cabo el modelado teórico de los datos obtenidos a fin de establecer los parámetros termodinámicos del proceso de disolución, haciendo uso de un interesante algoritmo que permite hacer valiosas predicciones en función de la tendencia marcada por los resultados experimentales. En el **apartado 2.3.5** se planteó la posibilidad de modelar la solubilidad de muchos compuestos en CO₂SC empleado diferentes ecuaciones que consideran a la temperatura y a la presión como variables críticas, debido a que como se ha observado, tienen una influencia directa sobre la densidad del fluido y por lo tanto sobre el poder extractivo del CO₂SC.²⁴

La mayoría de las ecuaciones para el modelado son de carácter semiempírico y poseen diversos grados de dificultad. Por tal razón debido a su relativa sencillez, fácil aplicación y por ende su amplio uso en la correlación de datos de equilibrio de sistemas sólido-fluido, las ecuaciones de Chrastil y Chrastil modificada⁸⁰ se presentan como los modelos ideales y por razones lógicas, los elegidos para el modelado de nuestros datos. De esta forma haciendo uso de tales ecuaciones (**ecuaciones 4 y 7**) se efectuó el modelado de los resultados experimentales de la solubilidad de nuestro metabolito en CO₂SC previamente representados en la **figura 29** y condensados en las **tablas 10 y 12**, en breve presentadas, en donde se comparan contra los resultados derivados del modelado.

Como se había discutido la ecuación de Chrastil y su modificación representan una clase de ecuación llamada “semiempírica” debido en gran medida a la presencia de “constantes ajustables” como ***k***, ***a*** y ***b*** que dependen del sistema con el que se trabaje, las cuales se pueden obtener directamente de la relación y análisis de regresión lineal de los resultados experimentales de la solubilidad de perzona (*S*) en relación a la densidad del CO₂ (*d*) expresados por la representación gráfica del *ln d* contra *ln S* a diferentes temperaturas en °K (en este caso 313.15, 323.15 y 333.15), obteniendo los valores de la pendiente (*k*) y la ordenada al origen (*a/T + b*).

Ecuación de Chrastil: $\ln S = k \ln d + a/T + b$

Ecuación de Chrastil modificada: $\ln S = (K_0 + K_1 \cdot d) \ln d + (a_0 + a_1 \cdot d)/T + b$

Por otra parte, es importante observar que para poder llevar a cabo el cálculo de las constantes y por lo tanto poder aplicar la ecuación de Chrastil, es necesario conocer las densidades reales del CO₂ en condiciones supercríticas, presente en el sistema (**Tabla 9**). Para ello anteriormente en coparticipación con investigadores de la UAEM se encontraron las densidades del CO₂SC en el sistema haciendo uso de la ecuación de Peng-Robinson (**Ecuación 12**), que corresponde a una

ecuación cubica tipo Van der Waals que modifica el termino atractivo de las fuerzas moleculares introduciendo una dependencia tanto de la temperatura, como del volumen.

$$P = \frac{RT}{v-b} - \frac{a_c \alpha}{v^2 + k_1 b v + k_2 b^2} \quad \text{Ecuación (12).}$$

En donde P, v y T son la presión, el volumen por mol y la temperatura respectivamente, **R** es la constante de los gases ideales (83.145 bar.cm³/mol °K), **b** está relacionado con el volumen molar ocupado por las moléculas del fluido, **α** es la función de atracción que depende de la temperatura reducida y los parámetros **a_c** y **b** son parámetros ajustables dados por:

$$a_c = \Omega_a \frac{R^2 T_c^2}{P_c} \quad \text{Ecuación (13).} \quad b = \Omega_b \frac{RT_c}{P_c} \quad \text{Ecuación (14).}$$

Los valores reportados para las constantes de Peng-Robinson son: k₁= 2, k₂= -1, Ω_a= 0.457240 y Ω_b= 0.7780.

Tabla 9. Densidad real en función de la temperatura (°K) y de la presión (bar) del CO₂SC en g/l calculada en el reactor del equipo de EFS empleado.

Densidad del CO₂ (g/l)				
P(bar)	T(°K)			
	303.15 °K	313.15 °K	323.15 °K	333.15 °K
100	819.4	584.7	354.7	276.9
150	851.5	786.3	703.4	607.2
200	892.2	841.8	786.1	725.4
250	923.3	880.3	835.1	787.6
300	948.5	910.4	870.9	830.1

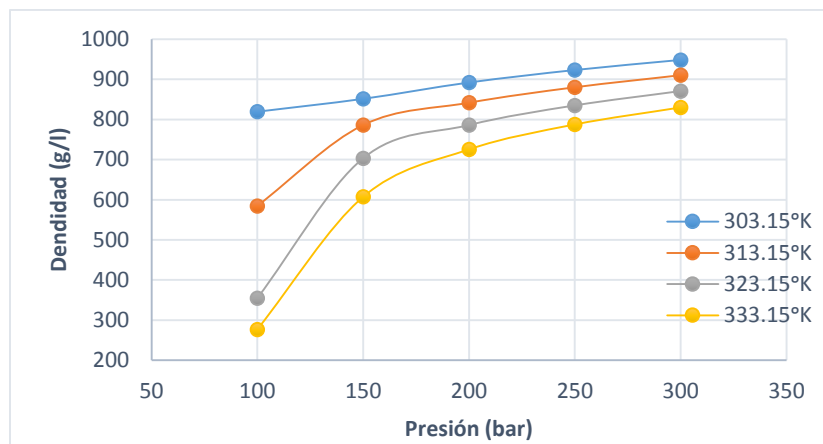


Figura 30. Variación real de la densidad del CO₂ en función de la presión (bar) para diferentes isotermas. 303.15°K, 313.15°K, 323.15°K, y 333.15°K, P_c=73 bar.

Reunidas las condiciones necesarias para llevar a cabo el cálculo, se prosiguió a efectuar el modelado del proceso de disolución mediante el uso de la ecuación de Chrastil, obteniéndose singulares resultados presentados dentro de la **Tabla 10**. Los cuales al ser correlacionados mostraron un comportamiento poco satisfactorio pues presentaron un valor de coeficiente de correlación ($r^2=0.7695$) estadísticamente considerado muy por debajo de lo aceptado. Lo cual quiere decir que la ecuación no es el modelo más confiable para la predicción en este proceso. A pesar de ello el modelo no se descartó hasta someterlo a una segunda prueba estadística, la cual consistió en la determinación de los valores del promedio absoluto de las desviaciones relativas (AADR%), calculadas mediante el empleo de la **ecuación 15** en seguida presentada, cuya función fue evaluar la correlación de los valores de solubilidad experimentales y los calculados a través del modelado e identificar las desviaciones que existen entre uno y otro. Fruto de esta evaluación se obtuvieron valores que van desde el 22.6 % hasta el 78.15 % que corresponden a la temperatura más baja y la más alta, los cuales nuevamente resultan ser muy elevados, lo cual denota grandes desviaciones entre lo obtenido experimentalmente y lo modelado. En este sentido tales resultados reafirman la falta de confiabilidad de la ecuación y por ende lo poco recomendable que es para la predicción de la solubilidad de nuestro metabolito en CO₂SC.

$$AADR(\%) = \frac{100}{n} \sum \left[\frac{C_{cal} - C_{exp}}{C_{exp}} \right] \quad \text{Ecuación (15)}$$

Donde C_{cal}= solubilidad calculada y C_{exp}= solubilidad experimental.

Tabla 10. Solubilidad experimental y calculada con la ecuación de Chrastil, reportadas en fracción peso (f_p) y fracción molar (f_{mol}).

P(bar)	T (K)	$S^{exp}(f_p) * 10^{-5}$	$S^{exp}(f_{mol}) * 10^{-6}$	$S^{cal}(f_p) * 10^{-5}$	AARD (%)
80.63	313.15	1.08	1.92	1.53	22.66
93.03	313.15	7.74	13.72	8.90	
106.47	313.15	18.21	32.29	15.06	
148.16	313.15	13.94	24.72	22.62	
80.63	323.15	1.17	2.08	1.22	35.50
93.03	323.15	8.04	14.26	3.01	
106.47	323.15	24.47	43.39	8.75	
148.16	323.15	18.36	32.55	26.22	
80.63	333.15	0.46	0.81	1.29	78.15
93.03	333.15	2.48	4.39	2.67	
106.47	333.15	12.32	21.84	5.54	
148.16	333.15	15.67	27.78	26.52	

S^{exp} =solubilidad experimental; S^{cal} =solubilidad calculada; AARD%=promedio absoluto de las desviaciones relativas.

Tomando en cuenta lo poco apegados a la realidad que resultaron los cálculos efectuados por la ecuación de Chrastil, se llevó a cabo nuevamente el modelado de los datos, pero en esta ocasión con la finalidad de evaluar la veracidad de la ecuación de Chrastil modificada. Los resultados arrojados del cálculo de este nuevo modelado, resumidos en la **tabla 12** junto a los resultados experimentales, cumplieron de mejor manera las expectativas puestas en la búsqueda de la ecuación que se aproximara a la descripción real del proceso de disolución de perezona en nuestro fluido supercrítico, pues presentó menor desviación contra los resultados experimentales, así como también una mejor correlación cuyo coeficiente fue de 0.9055. A pesar de que esta ecuación en teoría es mucho más confiable, resulta que el análisis de AADR% nos indicó que si bien las desviaciones disminuyeron notablemente en particular a los 323.15 y 333.15 °K, estas aún continuaron siendo considerablemente altas, y que incluso aumentaron a los 313.15 °K. Hay que tener en cuenta que entre menor sea este valor, menor es la diferencia que existe contra los resultados reales, lo cual pone a este modelo solo como el más confiable de los dos evaluados y como el que en el presente estudio se ajusta más al comportamiento experimental encontrado. En todo caso en base a este modelado fue posible obtener la ecuación que describe de manera más satisfactoria la solubilidad (**Ecuación 16**), la cual está dada por la siguiente expresión y para la cual se presentan las “constantes ajustables”, obtenidas mediante el correspondiente análisis de regresión lineal en la **tabla 11**.

$$\ln S = (6.962 - 0.00777d) \ln d + \frac{(14.4245 - 1.044 \times 10^4 d)}{T} - 17.6974 \quad \text{Ecuación (16).}$$

En donde **d** y **T** son la densidad del CO₂SC y la temperatura a definir en el sistema.

Tabla 11. Constantes ajustables de la ecuación de Chrastil modificada aplicada al proceso de solubilidad de perezona en CO₂SC obtenidos de los parámetros de regresión lineal.

T °K	K ₀	K ₁	a ₀	a ₁	B
313.15	6.962	-0.00777	14.4245	-1.044x10 ⁴	-17.6974
323.15					
333.15					

Tabla 12. Solubilidad experimental y calculada con la ecuación de Chrastil modificada, reportadas en fracción peso (f_p) y fracción molar (f_{mol}).

P(bar)	T (°K)	S ^{exp} (f _p) *10 ⁻⁵	S ^{exp} (f _{mol}) *10 ⁻⁶	S ^{cal} (f _p) *10 ⁻⁵	AARD (%)
80.63	313.15	1.082	1.92	1.571	45.91
93.03	313.15	7.736	13.72	16.03	
106.47	313.15	18.21	32.29	16.01	
148.16	313.15	13.94	24.72	11.27	
80.63	323.15	1.175	2.08	0.7619	31.60
93.03	323.15	8.043	14.26	4.391	
106.47	323.15	24.47	43.39	16.81	
148.16	323.15	18.36	32.55	15.69	
80.63	333.15	0.4593	0.81	0.6795	35.18
93.03	333.15	2.478	4.39	3.007	
106.47	333.15	12.32	21.84	10.07	
148.16	333.15	15.67	27.78	24.00	

S^{exp}=solubilidad experimental; S^{cal}=solubilidad calculada; AARD%=promedio absoluto de las desviaciones relativas.

En la **figura 31** se compara el comportamiento observado experimentalmente contra la tendencia obtenida del cálculo de la solubilidad de perezona en el fluido supercrítico con base al ajuste a la ecuación de Chrastil. En tal figura se representan conjuntas las isotermas resultantes en ambos ensayos y se puso especial atención a la influencia que tienen sobre las mismas tanto la temperatura como la presión. En tal sentido se detectó un aumento considerable de la solubilidad al aumentar la presión, no solo experimentalmente, como se había comentado, sino también se observó esta misma

influencia en el modelado, encontrándose incluso la misma zona de saturación después de los 106 bar y el mismo efecto de desaturación a los 333.15 °K. Bajo este mismo criterio se asemeja el efecto de la temperatura en ambos casos, apreciándose que a temperaturas bajas como a los 313.15 y 323.15 °K la solubilidad alcanza el equilibrio después de los 106 bar de presión; mientras que a temperaturas relativamente más altas, como por ejemplo a 333.15 °K, la solubilidad a partir de este punto continua moderadamente incrementando en todo el intervalo de presión estudiado experimentalmente, siendo en el caso particular del modelado mucho más marcada esta tendencia.

En función a la anterior comparación y a los resultados previamente discutidos, a manera de resumen se distinguen ciertas particularidades encontradas en el estudio de solubilidad, ejemplo de ello es la máxima solubilidad de perzona lograda en CO₂SC, alcanzando un valor expresado en fracción peso de 24.5×10^{-5} conseguido bajo una zona localizada a temperatura de 323.15 °K y 106 bar de presión. Condiciones que fueron establecidas como las idóneas en el proceso experimental, cuya influencia positiva también quedó evidenciada en el modelado mediante el cálculo con la ecuación de Chrastil modificada, considerada también como el modelo que se aproxima de mejor manera al comportamiento experimental.

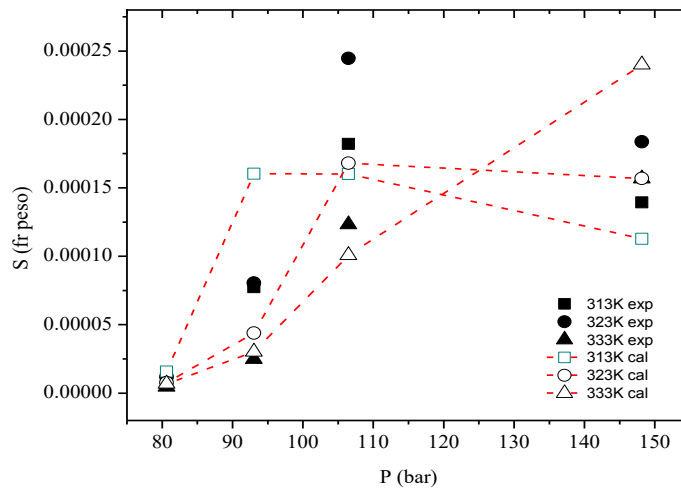


Figura 31. Efecto comparativo de la presión a diferentes temperaturas sobre la solubilidad de perzona en CO₂SC experimental y calculada con la ecuación de Chrastil modificada.

Ahora bien en lo que respecta a este modelo, mucho se mencionó que fue elegido como el más cercano a la descripción real del proceso de disolución de perezona en CO_2SC , apoyado de los resultados favorecedores arrojados por las pruebas estadísticas a las cuales fue expuesto, sin embargo también se dejó en claro que tales resultados a pesar de ser mucho más propicios, no se ajustaban del todo al comportamiento real, presentando valores de AARD% que fueron señalados como valores altos. A pesar de ello este fue el elegido y no de forma arbitraria, tal elección fue influenciada en gran medida por lo observado en las referencias literarias antes mencionadas⁴⁴, en donde se reportaron intervalos de desviación semejantes a los presentados en nuestro estudio. Este comportamiento ha sido atribuido por algunos autores al manejo de las unidades requeridas por los métodos de Chrastil, pues en estos la solubilidad es propuesta en gramos por litros, la cual es una forma de expresar la concentración que presenta importantes variaciones en función de la temperatura y la presión; razón por la cual el uso de la fracción molar resulta un mejor parámetro al ser independiente de tales variables.⁴⁴

Aunado a esta característica se encontró reportado también la peculiaridad de que la mayoría de los modelos con funciones logarítmicas como es el caso de las ecuaciones de Chrastil, han registrado casos en los cuales se carece de relación lineal entre la solubilidad y la presión a condiciones isotérmicas, así como también entre la solubilidad y la temperatura en procesos isobáricos, presentándose regiones aisladas de ciertas linealidad.⁷⁷

En tal sentido si se plantea el objetivo de efectuar la predicción de la solubilidad de perezona en el fluido supercrítico en base al uso de modelos teóricos de manera más precisa, es necesario analizar los datos experimentales en función de la propuesta de otros modelos que describan de mejor manera este comportamiento. Tales propuestas realmente quedan fuera de los fines del presente trabajo, al establecerse solo los modelos de Chrastil como las ecuaciones a evaluar, sin embargo representarían un gran complemento al presente estudio.

4.4.2.2 Estudio cinético de la solubilidad de perezona en CO_2SC .

Definidas las condiciones adecuadas y el modelo más apropiado para el proceso de solubilidad de perezona en CO_2SC , solamente resta analizar el comportamiento de la solubilidad en función del tiempo de contacto, es decir, se efectuó el estudio cinético de la disolución de perezona en el fluido supercrítico partiendo de la asignación de los tiempos de monitoreo, para los cuales se establecieron cuatro corridas con una duración aditiva de una hora, es decir, el primer punto de análisis de 1 hora, el segundo de 2 horas, el tercero se limitó a 3 horas y por último, el cuarto se detuvo a un tiempo de contacto de 4 horas, en los cuales se mantuvieron constantes las condiciones combinatorias de la

presión y la temperatura anteriormente ensayadas de 80.6, 93.03, 106.47 y 148.16 bar de presión, así como 313.15, 323.15 y 333.15 °K. De tal relación de cada presión con cada una de las temperaturas se derivaron las correspondientes líneas solubilidad expresadas en fracción molar por hora representadas en la siguiente figura.

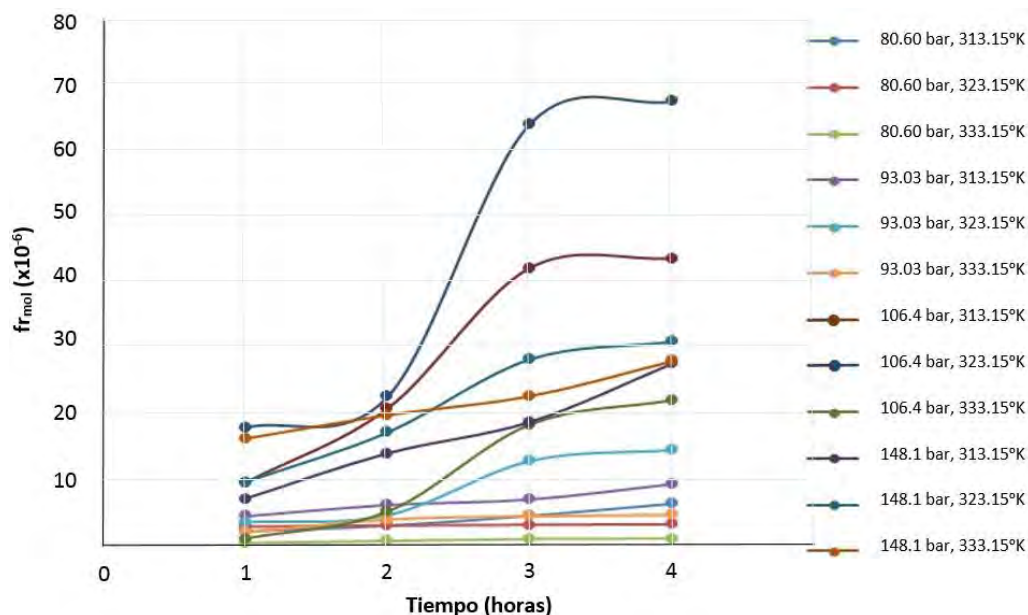


Figura 32. Cinéticas de solubilidad de la perezona en CO₂SC.

Observando detenidamente la figura anterior se aprecia una tendencia a la alza de la solubilidad en función del incremento del tiempo de exposición llegando al equilibrio en el punto cuatro, es decir a las 4 horas, percibiéndose de forma muy marcada en algunos ensayos y en otros no tanto. Tal discrepancia se debe al efecto ejercido por cada una de las combinaciones de las condiciones de presión y temperatura analizadas, saltando a la vista inmediatamente la línea de solubilidad producto de la influencia de una presión de 106 bar y de una temperatura de 323.15 °K, condiciones que se establecieron como las idóneas para el proceso de disolución y que en este estudio cinético se confirma su efecto, registrando la línea más pronunciada sobre el eje de solubilidad; seguida de la línea resultante a los 106 bar de presión y 313.15 °K, tal y como sucedió en las pruebas de solubilidad. Tales resultados reafirman la elección de las condiciones requeridas para alcanzar el estado conveniente de solubilidad y aportan a su vez el lapso de tiempo apropiado para alcanzar el equilibrio. Estableciendo 106 bar de presión, 323.15 °K de temperatura y 4 horas de tiempo de contacto como las condiciones indicadas para lograr establecer el ambiente propicio para efectuar el proceso de disolución de perezona en CO₂SC.

Por ultimo cabe señalar a manera de complemento que el especial comportamiento del dióxido de carbono en condiciones supercríticas observado a lo largo de este estudio de solubilidad de perezona es una consecuencia claro está, en primer lugar de las propiedades obtenidas por el estado supercrítico, pero también es debido a la conveniente naturaleza no polar del fluido, la misma que también puede cambiar a ligeramente polar debido a la existencia de un momento cuadrupolar propio de su estructura. Esto dota al dióxido de carbono supercrítico de un fuerte carácter hidrofóbico y de una polaridad muy semejante a la presentada por el *n*-hexano, el cual por si fuera poco es considerado como el disolvente ideal para la extracción de perezona⁴³, lo que significa que el CO₂SC puede ser considerado en base a los resultados arrojados, como un disolvente ideal para la disolución de perezona, que por supuesto en base a sus buenos resultados se pondrá a prueba ya en la extracción de tal metabolito de una matriz vegetal real.

4.4.3 Estudio de la disolución de perezona a partir de la raíz de *Acourtia cordata*.

Establecidas las condiciones para un ambiente propicio de solubilidad de perezona en nuestro fluido supercrítico, definidos los parámetros cinéticos requeridos para alcanzar el equilibrio y convencidos de las bondades del dióxido de carbono en condiciones supercríticas, por fin se logró estar preparado para efectuar el estudio de la extracción de perezona de la raíz de nuestro espécimen vegetal.

Para ello una muestra de la raíz de *Acourtia cordata* pretratada fue expuesta al fluido supercrítico bajo las condiciones prestablecidas de máxima solubilidad siguiendo la metodología experimental previamente detallada en el **apartado 3.3.4.5**, en donde teniendo presente los estudios cinéticos y tomando en consideración los nuevos requerimientos en función de la penetrabilidad del fluido en el tejido vegetal, así como la asequibilidad de la perezona debido a la complejidad estructural dentro del mismo, se contemplaron tiempos de contacto mayores a 4 horas estableciéndose periodos de 6, 12 y 24 horas. Resulta oportuno mencionar que el aumento en el tiempo mínimo de exposición de 4 a 6 horas queda justificado con las diferencias de disponibilidad que sufre la perezona al pasar de su estudio en estado puro a encontrarse dentro de una matriz vegetal de gran diversidad molecular, tal diferencia también es la razón por la cual se optó por tiempos aparentemente prolongados, debido a que si bien 6 horas podrían ser suficientes para alcanzar el equilibrio, lo que se busca en este estudio es alcanzar a extraer la mayor cantidad de perezona. Estudios relacionados con el uso de fluidos supercríticos consultados en la literatura reportan en la mayoría de los casos porcentajes de extracción cercanos al 50 % dentro de las primeras horas contacto, llegando a un punto en donde debido principalmente a la disponibilidad del metabolito se requiere de tiempos de contacto de hasta 10 veces

mayores para lograr obtener cerca del 99 % del metabolito extraído⁸⁴, tales antecedentes aunados al echo inherente de tratar con una matriz vegetal compleja trajeron consigo la planeación de los otros dos periodos de contacto, que si bien no son tan prolongados como los reportados en la literatura, son al menos dos y cuatro veces mayores respecto al mínimo.

Aclarada la razón de los intervalos de tiempo de contacto establecidos, resta mencionar que se efectuaron las extracciones en función de tales periodos manteniendo una presión de 106 bar y una temperatura de 323.15 °K.

Finalizadas las pruebas y obtenidos los extractos, por fin llegó la hora de averiguar el efecto producido en una matriz vegetal por las condiciones y tiempos de contacto establecidos. Tal indagación se llevó a cabo mediante la cuantificación de perezona obtenida en cada extracto de la raíz de *Acourtia cordata* a partir de un método alternativo previamente detallado en el **apartado 3.3.4.6**, denominado del patrón interno, en el cual si recordamos, se hizo uso de la RMN ¹H utilizando al 1,4-dinitrobenceno como patrón de referencia. Los resultados obtenidos de tal cuantificación fueron condensados en las **tablas 13 y 14**, en donde se hizo referencia a un parámetro muy importante denominado *integral*, nombre que se adoptó literalmente del concepto de integral aplicado en RMN, debido a que realmente se trata del valor arrojado por la integración de número de núcleos de ¹H de cada tipo reportados en los espectros de RMN ¹H, tanto para la perezona denominado *integral de perezona*, como para el 1,4-dinitrobenceno, identificado como *integral de estándar*, tales resultados se muestran a continuación aunados de las cantidades de extracto y perezona obtenidos.

Tabla 13. Extracción de perezona (Pz) a 106 bar, 323.15 °K para 6, 12 y 24 horas en CO₂SC. (Cuantificación por método del patrón interno RMN ¹H).

Tiempo (horas)	Extracto ² de Pz (mg)	Integral perezona	Estándar (mg)	Integral estándar	Pz en extracto ² (mg)	% Pz en extracto ²
6	26	0.52	24	12.10	6.0866	23.41
	30	1.03	17	6.05	17.094	56.98
	26	0.77	18	7.96	10.2753	39.52
Promedio	26	0.645		10.03	8.1809	31.46
12	27	0.9	17	5.40	16.7202	61.92
	26	0.83	22	10.23	10.5334	40.51
	27	0.84	23	11.34	10.0540	37.23
Promedio	26.7	0.8567		8.9900	12.4358	46.55
24	30	1.22	17	6.00	20.3986	67.99
	29	1.07	19	8.72	13.7583	47.44
	29	1.03	25	12.21	12.4453	42.91
Promedio	29.3	1.1067		8.9767	15.5340	52.78

Extracto²= muestra de +/-30mg del extracto de la raíz; Pz=Perezona.

Tabla 14. Concentración porcentual de perezona (Pz) encontrada en la raíz de *A. cordata*, extraída a 106 bar, 323.15 °K para 6, 12 y 24 horas en CO₂SC.

Tiempo (horas)	Raíz ¹ molida (mg)	Extracto ¹ (mg)	% extracto ¹ en raíz	Pz en extracto ¹ (mg)	% Pz en extracto ¹	% Pz en raíz ¹
6	5002	99	1.98	23.17	23.41	0.46
	5005	105	2.1	59.82	56.98	1.19
	5009	103	2.06	40.71	39.52	0.81
Promedio	5005.3	101	2.02	31.94	31.46	0.63
12	5012	161	3.21	99.70	61.92	1.98
	5000	157	3.14	63.61	40.51	1.27
	5005	159	3.18	59.21	37.23	1.18
Promedio	5005.7	159	3.17	74.17	46.55	1.47
24	5003	179	3.58	121.71	67.99	2.43
	5000	181	3.62	85.87	47.44	1.71
	5011	184	3.67	78.96	42.91	1.57
Promedio	5004.7	181	3.62	95.51	52.78	1.91

Extracto¹= Extracto de la raíz¹; Raíz¹= muestra de raíz de *A.cordata* (5g); Pz=Perezona

Una vez analizados los datos arrojados de la cuantificación de perezona en cada uno de los extractos, resultó muy visible el particular comportamiento presentado, en el cual se observa, al igual que en la mayoría de los procesos de extracción con fluidos supercríticos reportados, que la cantidad del metabolito extraído aumentó en función del incremento en el tiempo. Tal conducta realmente no fue una experiencia nueva, debido a que ya se había percibido esta tendencia en los estudios cinéticos, lo verdaderamente interesante de esta observación es que permitió resolver las interrogantes entorno a como respondería la perezona dentro de una matriz vegetal al ser tratada bajo las condiciones seleccionadas. Las cuales por cierto, tocando este punto, resultaron ser las adecuadas para el proceso de extracción de nuestro metabolito, encontrándose interesantes rendimientos. En este sentido la experiencia más peculiar se derivó de las diferencias percibidas en la cantidad de perezona obtenida en cada periodo, es decir, si bien la extracción se beneficia con el aumento del tiempo de contacto, esta no se dio de forma proporcional a tal aumento. Este singular suceso es característico de la mayor parte de los procesos supercríticos, el cual fue la razón de que se optara por intervalos de tiempo relativamente prolongados, previamente se había comentado acerca de este comportamiento y se decía que en diversos estudios reportados la mayor parte del metabolito se extraía durante las primeras horas de contacto, estableciendo un porcentaje cercano al 50 % de la cantidad total obtenida y que para alcanzar a sustraer mayor cantidad se requerían de tiempos hasta 10 veces mayores a este. En tal sentido los resultados de nuestra extracción se presentaron bajo la misma tendencia, encontrándose que dentro de las 6 primeras horas se logró obtener 31.46 % de perezona en el extracto, lo que representó cerca del 59 % de la totalidad de perezona extraída, el 41 % restante se consiguió en las 6

y 18 horas restantes, es decir, entre los periodos de 12 y 24 horas de exposición, siendo en el primer intervalo en donde se alcanzó el mayor porcentaje restante, consiguiéndose el 28 % de este, a comparación del 13 % restante conseguido a las 24 horas.

De estas interesantes observaciones se desprenden diversas conclusiones del proceso de extracción de perezona con CO₂SC, en primer lugar como se había indicado el aumento del tiempo de contacto es un factor favorable en el proceso, si bien el efecto no es proporcional, es un hecho que a mayor tiempo se obtuvieron los mejores rendimientos, por ende se considera el intervalo de 24 horas como el periodo más adecuado en la extracción cuantitativa de perezona de la raíz de *Acourtia cordata* haciendo uso de dióxido de carbono supercrítico bajo las condiciones de presión y temperatura establecidas; logrando la extracción de 52.78 % de perezona en el extracto que representa el 1.91 % de los 5 gramos de muestra tratada y que para tal propósito simboliza los mejores porcentajes de extracción.

Ahora bien desde el punto de vista cuantitativo el periodo de contacto de 24 horas resultó ser el más adecuado, sin embargo hay un segundo criterio a tomar en cuenta que va muy de la mano con la cuantitatividad, se trata de la selectividad. Surgen ciertas inquietudes que ponen en entredicho la total aceptación de las 24 horas de exposición, como el tiempo más viable para la extracción de perezona, estas surgen de la reflexión que lleva a creer que al permanecer más tiempo la raíz de perezona en contacto con el CO₂SC, pudiera existir la posible e indeseable extracción de otros componentes que provocarían el inminente menoscabo de la selectividad, e incluso un hipotético efecto contraproducente en la cuantitatividad de la extracción. Es de nuestro conocimiento, que por lo menos se han identificado otras tres quinonas sesquiterpénicas presentes en el extracto de raíz de *A. cordata* las cuales por si fuera poco se encuentran en mayor proporción que la misma perezona y presentan propiedades y características similares. Estudios previamente consultados de la obtención de perezona del mismo espécimen vegetal mediante diferentes métodos de extracción⁶⁰, revelan la presencia de hidroxiperezona, la cual se encuentra casi en igual proporción que la perezona, así como también la presencia de monoangelato de hidroxiperezona y de angelato de perezona, las cuales incluso se encuentran en mayor proporción.⁶⁰

Teniendo en cuenta tales antecedentes se analizaron los datos detenidamente con la finalidad de descartar un posible efecto adverso en la selectividad de la extracción de perezona por la posible extracción de moléculas semejantes a mayor tiempo de exposición. En tal sentido se observa que al aumentar el tiempo aumenta la cantidad de extracto obtenido, pero también aumenta la concentración de perezona de forma aparentemente proporcional (**Tabla 15**). Resulta que de las 6 horas a las 12 horas de exposición se obtuvo 58 mg más del extracto, así como también se registró un aumento en

la cantidad de perezona extraída de 42.23 mg. Tal aumento también es visible de las 12 horas a las 24 horas de exposición, en donde, se registró un aumento en el extracto de 22 mg semejante a los 21.34 mg de incremento en la concentración de perezona. En otras palabras los aumentos en la cantidad de extracto obtenido vinieron acompañados de incrementos de similar cuantía en la concentración de perezona, lo cual es una sencilla prueba que deja de manifiesto la nula afectación de la selectividad de extracción en función del incremento en los periodos de contacto y aclara el panorama para poder ultimar sin ninguna duda que los intervalos relativamente prolongados de tiempo no traen con sí algún efecto desfavorable, sino al contrario. En este punto, despejadas todas las dudas se establece un tiempo de contacto de 24 horas como el intervalo idóneo para alcanzar la mayor cantidad de perezona extraída. Luego entonces solo queda debatir si llevar el proceso de extracción hasta las 24 horas es lo más conveniente desde un punto de costo-beneficio, puesto que cuantitativamente queda claro que si lo es, pero desde un punto de vista económico la viabilidad de 6 o 12 horas más de exposición por una cantidad relativamente pequeña del metabolito podría generar algunas dudas; lo cual deja pendiente un futuro análisis costo beneficio del tiempo de exposición, que sería muy interesante desde el punto de vista industrial.

Tabla 15. Análisis de la selectividad de extracción de perezona (Pz) en función del tiempo de exposición de la raíz de *A. cordata* en CO₂SC a 106 bar, 323.15 °K para 6, 12 y 24 horas.

Tiempo de exposición (horas)	Extracto ^{1P} (mg)	ΔExt^P (mg)	Pz ^P en extracto ¹ (mg)	ΔPz^P (mg)
6	101	58	31.94	42.23
12	159		74.17	
24	181	22	95.51	21.34

^P=promedio; ΔExt^P =Diferencia de los promedios de masa de extracto de raíz por cada tiempo de exposición ($m_{12h}-m_{6h}$ | $m_{24h}-m_{12h}$); ΔPz^P =Diferencia de la cantidad de perezona promedio en el extracto raíz).

4.4.4 Comparación cuantitativa-selectiva de la extracción de perezona con CO₂SC contra los métodos de extracción térmico convencional, EAI, EAM y EAU.

Por fin establecidas las mejores condiciones de extracción de perezona con CO₂SC, así como conocidos los alcances de la extracción supercrítica, solamente resta conocer su estatus como técnica de extracción. Para poder conocer lo anterior, fue necesario comparar los resultados obtenidos contra otros métodos. Recordando nuestros objetivos, uno de ellos mencionaba la comparación de las cualidades extractivas de la extracción supercrítica, en cuanto a rendimiento y selectividad, contra los métodos tradicionales y novedosos de extracción. Para ello se tomaron resultados provenientes del estudio de la extracción de perezona por diferentes métodos, reportados para la misma especie⁶⁰, los cuales se mencionarán en breve resumidos en las **tablas 16-19**, en donde se realizaron los estudios correspondientes a su extracción por medio de métodos térmicos convencionales, irradiación con infrarrojo, irradiación con microondas y extracción asistida con ultrasonido.⁶⁰

Antes de efectuar el análisis comparativo se consideró interesante dar a conocer un poco acerca de la obtención de los resultados de referencia señalados. En primera instancia fue de vital importancia determinar el disolvente más adecuado para efectuar el estudio, la elección de este disolvente partió de pruebas preliminares de extracción con etanol, acetato de etilo y *n*-hexano, tres disolventes de distinta polaridad, que se pusieron en contacto con la raíz de *A. cordata* pretratada, mezclando 30 ml de cada uno por separado con 5 gramos de la raíz y llevado a reflujo por 1 hora. Finalizado este procedimiento se compararon los extractos obtenidos por cromatografía en capa fina empleando una mezcla de elución de *n*-hexano/acetato de etilo en proporciones 90:10 contra una muestra de perezona pura de referencia, observándose que el extracto obtenido con *n*-hexano era el único que contenía perezona, mientras que los extractos de etanol y acetato de etilo contenían otra variedad de compuestos, razón por la cual se decidió utilizar al *n*-hexano como el disolvente para realizar el estudio comparativo.

Tomando en cuenta tales resultados se mezclaron en un matraz de 50 ml 5 g de raíz pretratada y 30 ml de *n*-hexano para posteriormente someter dicha mezcla a los diversos métodos de activación, es decir, al método térmico convencional, a irradiación con infrarrojo, microondas y ultrasonido. En los cuales se probaron diversas variaciones en la temperatura, potencia y en el tiempo de extracción. Concluidas las pruebas se filtraron los extractos y se concentraron mediante la evaporación del disolvente utilizado un evaporador rotatorio hasta llevar los extractos a sequedad.

Posteriormente se evaluó la pureza del producto por cromatografía en capa fina con el mismo sistema de elución de *n*-hexano/acetato de etilo en proporción 90:10 y se determinó gravimétricamente la

cantidad de extracto y de perezona recristalizada obtenida por cada método. Los resultados obtenidos se resumieron en las siguientes tablas.

Método térmico convencional.

En tal prueba es conveniente mencionar que la razón de que no se reportaran tiempos mayores a 1 hora es debido a que los ensayos efectuados a periodos más prolongados no reflejaban incrementos significativos en el rendimiento, por ende se consideró suficiente este intervalo.

Tabla 16. Extracciones por método térmico convencional.⁶⁰

Térmico						
Experimento	Repetición	T / °C	m _{extracto} / g	m _{perezona} / g	% _{en extracto}	% _{en raíz}
T18060	1	61	0.280	0.030	10.71	0.60
	2	61	0.220	0.020	9.09	0.40
	3	61	0.240	0.020	8.33	0.40

T18060: La mezcla de 5 gramos y 30 ml de n-hexano se sometió a reflujo por 1 hora.

Extracción asistida con infrarrojo.

La observación de los resultados de esta prueba apuntan inmediatamente al ensayo nombrado como IRCS2 como el que permitió obtener la mayor cantidad de perezona en el extracto, mientras que los ensayos restantes no presentaron aparentemente diferencia entre ellos.

Tabla 17. Extracciones asistidas con irradiación infrarroja.⁶⁰

Infrarrojo						
Ensayo	Repetición	T / °C	m _{extracto} / g	m _{perezona} / g	% _{en extracto}	% _{en raíz}
IRSS	1	121	0.270	0.030	11.11	0.60
	2	121	0.220	0.025	11.36	0.50
	3	121	0.160	0.020	12.50	0.40
IRCS1	1	121	0.250	0.025	10.00	0.50
	2	121	0.240	0.020	8.33	0.40
	3	121	0.270	0.030	11.11	0.60
IRCS2	1	121	0.390	0.050	12.82	1.0
	2	121	0.300	0.040	13.33	0.80
	3	121	0.310	0.035	16.67	0.70

IRSS: Se irradió la raíz seca por 15 minutos, con el equipo irradiando a 121 °C, se dejó reposar por 15 minutos, se le agregó n- hexano y se irradió de nuevo por 15 minutos bajo las mismas condiciones, para finalmente dejar reposando por 15 minutos; IRCS1: Se irradió la mezcla de n-hexano y raíz por 15 minutos y se dejó reposar 15 minutos; IRCS2: Se irradió la mezcla de n-hexano y raíz por 30 minutos y se dejó reposar por 30 minutos.

Extracción asistida con microondas.

La prueba de extracción con microondas se repartió en tres ensayos entre los cuales realmente no se apreció diferencias significativas, sin embargo el ensayo MO10060 es el que registró valores un poco más arriba de la media de extracción.

Tabla 18. Extracciones asistidas con irradiación con microondas.⁶⁰

Microondas						
Ensayo	Repetición	T / °C	m _{extracto} / g	m _{perezona} / g	% _{en extracto}	% _{en raíz}
MO10050	1	50	0.220	0.020	9.09	0.40
	2	50	0.200	0.015	7.50	0.30
	3	50	0.200	0.015	7.50	0.30
MO3050	1	50	0.220	0.020	9.09	0.40
	2	50	0.200	0.015	7.50	0.30
	3	50	0.190	0.020	10.53	0.40
MO10060	1	60	0.360	0.025	6.94	0.50
	2	60	0.190	0.020	10.53	0.40
	3	60	0.270	0.025	9.26	0.50

MO3050: Potencia 30 W, temperatura 50 °C, con 30 segundos de rampa y 3.5 minutos de radiación; MO10050: Potencia 100 W, temperatura 50 °C, con 30 segundos de rampa y 5 minutos de radiación; MO10060: Potencia 100 W, temperatura 60 °C, con 30 segundos de rampa y 10 minutos de radiación.

Extracción asistida con ultrasonido.

Para dar por concluidas las pruebas se efectuaron los ensayos asistidos por ultrasonido, en tales estudios se observó mayor cuantía de perezona extraída por el ensayo US6060. En este se detectó cantidades semejantes a las extraídas por el ensayo IRCS2 e incluso un porcentaje de extracción promedio superior al de este.

Tabla 19. Extracciones asistidas con ultrasonido.⁶⁰

Ultrasonido						
Ensayo	Repetición	T / °C	m _{extracto} / g	m _{perezona} / g	% _{en extracto}	% _{en raíz}
US6030	1	60	0.280	0.030	10.71	0.6
	2	60	0.230	0.030	13.04	0.6
	3	60	0.210	0.025	11.90	0.5
US6060	1	60	0.280	0.040	14.29	0.8
	2	60	0.240	0.035	14.58	0.7
	3	60	0.230	0.035	15.22	0.7

US6030: Baño de agua a 60 °C, tiempo de 30 minutos; US6060: Baño de agua a 60 °C, tiempo de 60 minutos.

A continuación se muestran sintetizados en la siguiente tabla a manera de comparación los resultados conseguidos por cada uno de los métodos de extracción probados en la obtención de perezona, con la intención de hacer visible las diferencias cuantitativas-selectivas que se presentaron en cada uno de ellos y así poder apuntar al método que en base a sus cualidades extractivas cumpla los requerimientos necesarios para ser elegido como el mejor proceso en la extracción de nuestro metabolito. En tal sentido en forma adicional se incluyen los valores arrojados de un análisis estadístico obtenido gracias a la aplicación del método de Tukey o hsd (honestly significant difference). Este es un método auxiliar en la comparación múltiple de resultados y funciona creando intervalos de confianza para todas las diferencias entre las medias. Tales resultados en función del número de diferencias significativas representan un parámetro complementario que da soporte y asistencia a la fundamentación de las conjeturas a continuación presentadas y de las cuales se deriva la elección del proceso adecuado.

Tabla 20. Comparación extractiva y selectiva de perezona de la técnica supercrítica contra los métodos “tradicionales de extracción (térmico convencional, EAI, EAM y EAU)” y núm. de diferencias significativas.

Método de extracción	Ensayo	Ext ^P (mg)	Pz ^P (mg)	% Selectividad	NDS (%Pz ^E , Pz ^R)	
Térmico convencional.	T18060	247	23.33	9.44	3	2
Irradiación infrarroja.	IRSS	216	25	11.57	3	2
	IRCS1	253	25	9.88	3	2
	IRCS2	333	41	12.31	3	2
Irradiación con microondas.	M010050	206	16.66	8.09	3	2
	M03050	203	18.33	9.03	3	2
	M010060	273	23.33	8.54	3	2
Ultrasonido.	US6030	240	28.33	11.80	3	2
	US6060	250	36.66	14.66	3	2
CO₂SC.	SC6H	101	31.94	31.46	9	2
	SC12H	159	74.17	46.55	9	10
	SC24H	181	95.51	52.78	9	10

Ext^P=Extracto de raíz promedio; Pz^P= Cantidad de perezona promedio en 5g de muestra de raíz; % Selectividad=%Pz en Extracto¹; SC6H, 12H y 24H= Extracción con CO₂SC a 6,12 y 24 horas, NDS (%Pz^E, Pz^R)= Número de diferencias significativas en %Pz extraída en ^E=Extracto y ^R=Raíz.

El análisis de la comparación entre métodos extractivos deja de manifiesto que la extracción con CO₂SC se presenta y por mucho como la técnica extractiva más eficiente tanto en rendimiento como selectividad para la extracción de perezona, siendo el ensayo SC24H o bien la extracción con CO₂SC a un tiempo de exposición de 24 horas la que permitió la extracción de la mayor cantidad de perezona de la raíz de *A. cordata*, permitiendo la extracción de 95.51 mg de perezona, que representa más del doble de lo obtenido por el mejor proceso probado, que corresponde a la irradiación infrarroja en su ensayo IRCS2, por la cual apenas se logró obtener 41 mg en promedio, lo cual incluso es menos que lo obtenido con la mitad del tiempo en el ensayo supercrítico SC12H, y solo un poco mayor de lo

extraído por la cuarta parte del tiempo de exposición presentado por el ensayo SC6H con el cual se logró la obtención de 31.94 mg. Tales observaciones son pruebas claras que nos llevan a señalar a la extracción con CO₂SC como la técnica extractiva más conveniente de los métodos analizados en el presente trabajo para la extracción de perezona, pues como bien apuntan los resultados este proceso provee el ambiente propicio para la extracción cuantitativa y selectiva de perezona de una matriz vegetal.

Tan especial ambiente sin duda alguna es producto en gran medida de la peculiar capacidad que posee el CO₂SC de penetración en materiales sólidos, y su naturaleza poco polar semejante al de la perezona, condición conocida para una buena extracción. Tales características tan particulares del CO₂SC, no solo permitieron la mayor extracción sino que también indujeron la atmosfera consecuente de la superior selectividad mostrada de entre todos los métodos probados, superando por más del triple la selectividad observada por la extracción con ultrasonido que ostentaba tal cualidad (**Figura 33**). En relación a ello se observa que el ensayo SC24H presenta un porcentaje de selectividad del 52.78 referido al % de perezona presente en el extracto de la raíz, el cual supera y por mucho al mejor de los resultado presentado por las técnicas en comparación, que fue del 14.66 % presentado por el ensayo US6060, condición que fue posible debido a que la extracción supercrítica permite extraer mayor cantidad de perezona en comparación a la del extracto, que para el caso del ensayo SC24H se extrajo 181 mg que resulta bastante menor que los 250 mg de extracto de raíz obtenidos por el ensayo US6060⁶⁰.



Figura 33. Comparación rendimiento-selectiva de los procedimientos de extracción térmicos, IR, microondas, ultrasonido y CO₂SC.

Resulta interesante recordar que los estudios previamente reportados de la extracción de perezona por diferentes métodos⁶⁰, concluyeron que la extracción con irradiación infrarroja presentaba los mejores rendimientos de extracción, esto al encontrarse que el ensayo IRCS2 permitía extraer la mayor cantidad de perezona entre los ensayos probados, aunque no fue la extracción más selectiva, pues esta cualidad le correspondió a la extracción con ultrasonido US6060, la cual presentó la mejor selectividad porcentual. Ahora bien, concluidos los objetivos del presente estudio se puede incluir a la extracción con CO₂SC como un nuevo proceso viable para la extracción de perezona que por sí fuera poco resultó ser en todos los casos la opción más recomendada para la extracción de perezona, al presentarse tanto como la opción que permite los mayores rendimientos, así como también la más selectiva.

Como en toda comparación metodológica se consideró importante fundamentar los resultados alcanzados por cada uno de los procesos involucrados, tal sustento debería estar no solo basado en sus resultados experimentales, sino también respaldado por un análisis estadístico que permitiera inclinarse a uno u otro proceso en función de las diferencias presentadas encaminadas al mejor desempeño. Para ello se eligió al método de Tukey al ser un análisis que permite la comparación múltiple de resultados, el cual se basa en la observación de diferencias significativas halladas entre cada método, en donde a mayor número de diferencias significativas presentadas por cada uno, más alejado se encuentra de la media presentada, es decir, el método presenta mejores o peores resultados.

Propiamente en nuestro caso el número de diferencias significativas alcanzó su mayor predominancia en los métodos de extracción supercrítica, lo cual significa que el análisis reconoció a estos procesos como los que presentaron los resultados más distantes a la media, en otras palabras reafirmaron la premisa de que la extracción con CO₂SC obtuvo mejores resultados tanto en la obtención de perezona, como en selectividad. Esto se puede constatar en las últimas dos columnas de la **tabla 20**, en donde se comparan el NDS obtenido del % de perezona en el extracto, para el cual la extracción supercrítica obtuvo 9 diferencias en cada uno de sus ensayos en comparación con las 3 presentadas por los demás métodos. Esto significa que estos métodos presentaron mayor selectividad, sin embargo observando lo obtenido por el NDS del % de perezona en la raíz que representa la cuantitatividad de la extracción, la tendencia aparentemente es la misma, pero resulta que el ensayo SC6H de la extracción supercrítica sale de esta tendencia, registrando solo 2 diferencias, las mismas halladas en los demás métodos, exceptuando a los ensayos SC12H y SC24H que registraron 10 diferencias, lo cual significa que el análisis los considera los ensayos con mejores resultados o más cuantitativos y discrimina a los demás incluyendo al método SC6H colocándolo cerca de la media y por consiguiente considerándolo un método selectivo, pero que carece de la cualidad cuantitativa de las pruebas con mayor tiempo de

contacto. En fin, estos resultados coinciden con lo antes observado, representando una simple confirmación de las conjeturas que antes se habían formulado y que ciertamente eran muy claras. Cabe mencionar que el análisis de Tukey se efectuó haciendo uso del programa computacional REAL STATICS, el cual se presenta adicionalmente junto al análisis de ANOVAS en el **apartado 6.2** de los anexos.

Una vez sustentada la elección de la extracción supercrítica como el proceso más conveniente en la obtención de nuestro metabolito, resta mencionar que aunado a sus especiales características que permitieron alcanzar resultados verdaderamente prometedores, la extracción de perezona haciendo uso de dióxido de carbono en condiciones supercríticas se presenta como un proceso con un gran potencial verde, ya que no solo incide de manera perfecta en el “quinto principio de la química verde”, el cual recordando a grandes rasgos exhorta a no usar disolventes o sustancias auxiliares nocivas para el ambiente, sino que también en esencia el proceso coincide muy bien con la ideología que caracteriza a la química verde, partiendo desde su carácter inofensivo al ambiente y a los seres vivos, la posible obtención de un producto cristalino con alta pureza, por ende la eliminación de procedimientos de purificación del producto, la utilización de una temperatura mucho menor a la de los métodos convencionales, la reutilización de disolventes y en fin una serie de características más que señalan al proceso como una alternativa totalmente viable en procesos extractivos.

4.4.5 Análisis comparativo del consumo energético requerido para cada método analizado.

Ciertamente el único inconveniente encontrado en la extracción supercrítica, como se había comentado es la utilización de tiempos de contacto un tanto prolongados que si bien tienen un efecto positivo extractivamente hablando, como ya se ha discutido, también trae consigo condiciones un poco desfavorables en el rubro económico, debido a que tiempos prolongados derivan en grandes gastos energéticos, que afectan la economía del proceso. A continuación se muestra condensado en la **tabla 21** un breve análisis de la demanda energética requerida para cada proceso, la cual se expone en términos de Watts por hora (Wh), o bien vatio-hora, que representa una unidad de energía expresada en forma de unidades de potencia por tiempo y en kilojoules (KJ), teniendo en cuenta que el pago del consumo energético en México es por Kilowatt hora (KW*h).

Tabla 21. Comparación de los consumos energéticos en Watts hora, requeridos en las metodologías de extracción térmico, infrarrojo, microondas, ultrasonido y CO₂SC.

Método	Ensayo	Requerimiento energético (Wh)	Tiempo de empleo (horas)	Consumo energético (KJ)
Térmico	T18060	152	3	0.456
Infrarrojo	IRSS	1300	0.17	0.217
	IRCS1		0.08	0.108
	IRCS2		0.17	0.217
Microondas	MO3050	30	0.0583	1.749 x10 ⁻³
	MO10050	100	0.0833	8.33 x10 ⁻³
	MO10060	100	0.1667	1.667 x10 ⁻²
Ultrasonido	US6030	160	0.5	0.080
	US6060		1	0.160
CO₂SC	SC6H	240 ^P /100 ^T	0.25/1.5	0.210
	SC12H		0.25/3	0.360
	SC24H		0.25/6	0.660

^P=Consumo energético de bomba de alta presión; ^T= Consumo energético de bombilla (control de temperatura).

Finalmente en la tabla anterior podemos observar que el consumo energético presentado por los ensayos del proceso supercrítico son los más altos de todos las metodologías probadas, siendo lógicamente el ensayo SC24H el que arroja los mayores consumos de Watts por hora. En cuanto a los otros ensayos supercríticos (SC6H y SC12H) podemos observar que se encuentran muy cercanos a los consumos presentados por el uso de infrarrojo, por debajo del consumo del ensayo térmico, considerablemente por arriba del ultrasonido y bastante más altos que el consumo presentado por las microondas, la cual según este análisis energético es la metodología más viable desde el punto de vista de ahorro energético y por ende económico. Cabe mencionar que si bien los ensayos supercríticos presentaron aparentemente los mayores gastos energéticos, este efecto se debió indudablemente a lo prolongado de los tiempos de exposición probados en comparación por ejemplo con los tiempos de exposición a las microondas, los cuales no pasaron de los 10 minutos. En este sentido nos encontramos ante dos procesos que presentan una gran dualidad, mientras que la EAM representa el método más viable económicamente y la EFS el método más costoso bajo ese mismo rubro de consumo energético, irónicamente la extracción con CO₂SC representa el proceso con los mejores resultados cuantitativos-selectivos de todos los ensayos aquí probados para la extracción de perezona de *Acourtia cordata* y por su parte la EAM resulta ser la que presentó los rendimientos y porcentajes de selectividad más bajos de todas las metodologías probadas.

Si bien el status económico por efecto de requerimiento energético de la extracción supercrítica no es del todo el mejor entre las metodologías comparadas, este puede verse mejorado si se hacen ajustes en los tiempos de contacto. Sin embargo para los fines aquí perseguidos este status no modifica en lo

absoluto la imagen de la extracción con CO₂SC como el método ideal entre los analizados en el presente estudio para la extracción de perezona, sino solo abre la posibilidad de mejora.

Capítulo 5. Conclusiones.

Sin duda alguna el presente estudio trajo consigo pequeños pero interesantes resultados en pro de la obtención de productos naturales por métodos alternativos amigables con el medio ambiente, tales resultados refuerzan e incentivan la innovación no solo de los procedimientos aplicables en esta área de obtención de metabolitos secundarios, sino también de la forma de hacer química. Actualmente es una necesidad esta evolución de la química, y los principios propuestos por la química verde son la mejor opción para lograrlo. Inspirados en ello, el presente estudio trajo consigo contribuciones al desarrollo de un acercamiento verde para la extracción de perezona a partir de la raíz de *Acourtia cordata*. En este sentido se logró satisfactoriamente la extracción de perezona haciendo uso de CO₂SC, el cual es considerado un disolvente verde, confiriéndole esta cualidad a este procedimiento que como ya se había mencionado incide apropiadamente en los principios en los que se basa la química verde. Como bien pudimos observar a lo largo de este estudio, no solo se hizo posible la extracción de la perezona, sino que también se hallaron las mejores condiciones que permitieron la extracción con el más alto rendimiento, gracias a los estudios de solubilidad de perezona en CO₂SC realizados, los cuales también tuvieron un efecto positivo en la selectividad. Tales peculiaridades en rendimiento y selectividad resultaron muy interesantes al compararlas con los resultados obtenidos por otros “métodos de extracción convencionales”, como son los métodos térmicos y no tan convencionales, como la irradiación infrarroja, la irradiación con microondas y la extracción asistida con ultrasonido, pues resulta que la extracción con CO₂SC presentó superioridad tanto en rendimiento como en selectividad, marcando una clara hegemonía sobre tales métodos para la extracción de perezona de la raíz de nuestro espécimen vegetal seleccionado.

Claro está, que este primer acercamiento a la extracción de perezona con CO₂SC, dista de ser completamente veraz y absoluto, debido a que como bien se menciona es un primer estudio que marca un precedente a futuras contribuciones, que traerán consigo definitivamente mejoras que afectarán positivamente al rendimiento y selectividad de la extracción. Tales contribuciones podrían ir desde el rediseño del equipo de extracción supercrítica enfocado a minimizar las pérdidas por contacto o fugas del producto e incluso la adición de modificaciones que hagan del método un proceso más automatizado que permita erradicar desviaciones por manipulación y pesajes fuera del equipo, estudios enfocados a la manipulación de la polaridad del CO₂SC con el uso de modificadores o

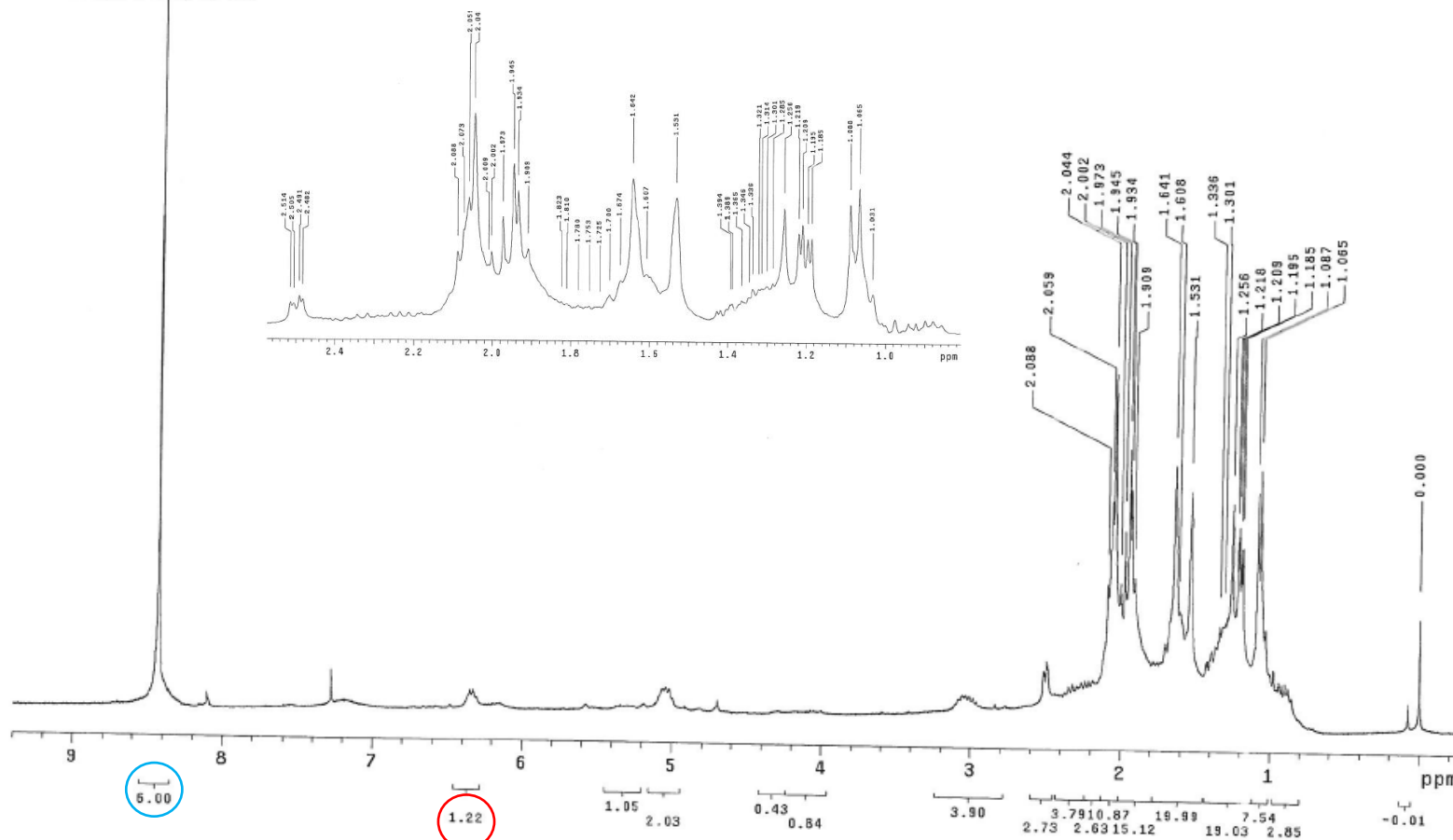
entrainers que permitan aumentar la selectividad y la cuantitatividad, contribuciones que permitan romper la barrera de la asequibilidad del metabolito dentro de una matriz vegetal y den por resultado tiempos de contacto menos prolongados y por lo tanto periodos mucho más escalables tanto a nivel laboratorio como industrial; mejoras que podrían representar una solución a la aparente desventaja presentada frente a los tiempos de activación requeridos por los métodos convencionales, los cuales como pudimos constatar no exceden de los 60 min. Los cuales por cierto no pasan de los 60 min de contacto debido principalmente a que la selectividad se vería muy comprometida, así como también la integridad del metabolito, por tratarse de procedimientos de una naturaleza un tanto más agresiva.

Por ultimo en lo personal me encuentro muy satisfecho por los resultados obtenidos ya que indudablemente superaron y por mucho las expectativas creadas en torno a esta novedosa aplicación de los fluidos supercríticos, logrando así el cumplimiento de cada uno de los objetivos e hipótesis planteadas y despertando personalmente gran curiosidad por el conocimiento del alcance de esta tecnología, no solo en el campo de las extracciones, sino como tal en la química.

En fin este estudio sienta las bases y exhorta a futuras contribuciones que hagan del mismo un procedimiento altamente confiable para la extracción de perezona tanto a nivel laboratorio, como industrial y aplicable a otros metabolitos de similar naturaleza. Logrando así la premisa de utilizar las energías alternas para extraer metabolitos que por ejemplo puedan servir como posibles activos con actividad farmacológica, dando un gran paso en la obtención verde de productos naturales enfocados a combatir y tratar diversas condiciones patológicas en humanos, animales y plantas, sin afectarlos paradójicamente de otra forma por su obtención.

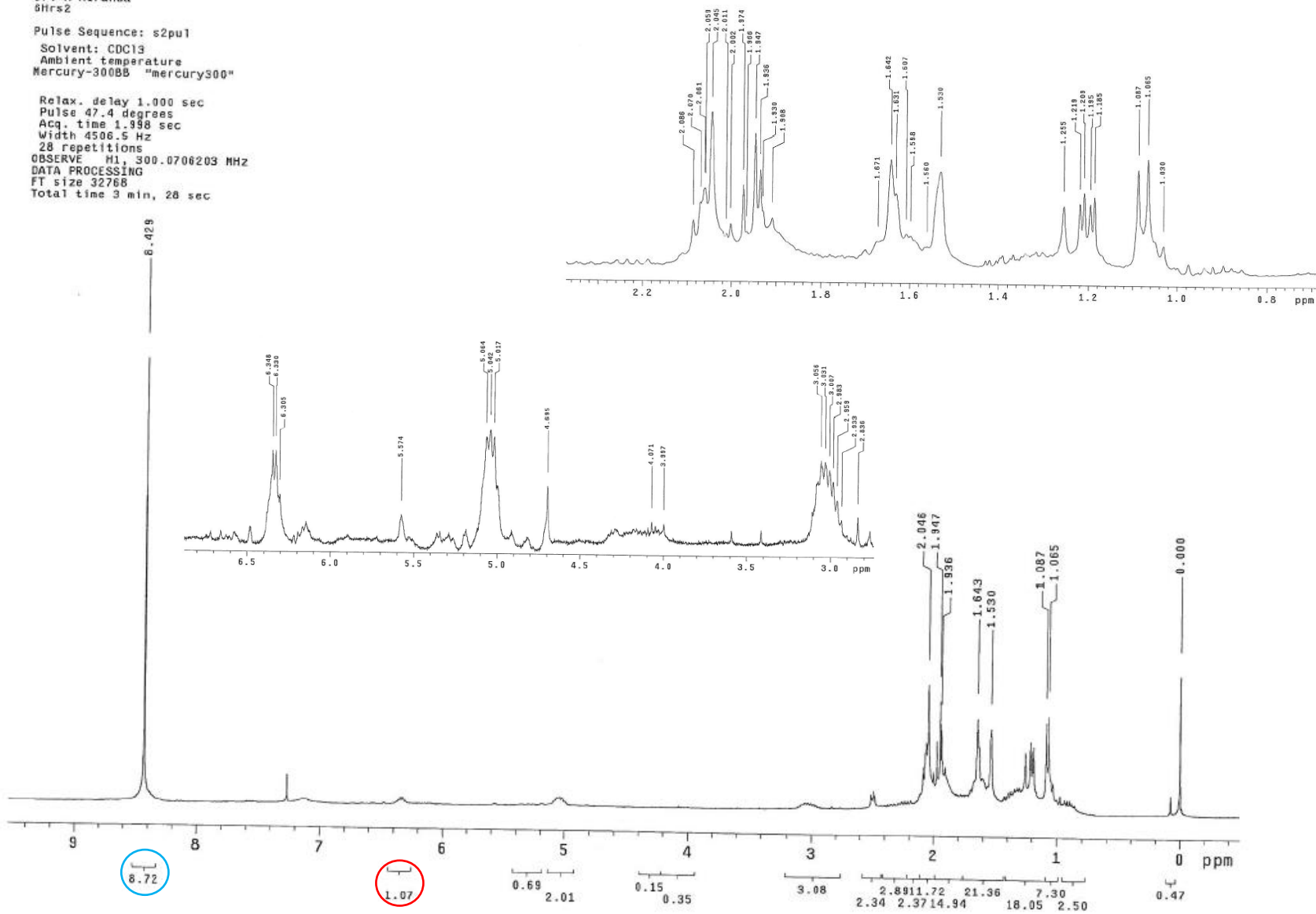
6.1 Espectros de RMN ^1H a 300 MHz de los extractos de perezona obtenidos con CO_2SC , utilizando al 1,4-dinitrobenceno como patrón interno.

Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl₃
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "mercury300"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 47.4 degrees
 Acq. time 1.398 sec
 Width 4506.5 Hz
 36 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0705143 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32758
 Total time 3 min, 28 sec



Espectro 1: RMN ¹H a 300 MHz del extracto de perejón con CO₂SC a 24 horas¹ en CDCl₃ y 1,4-dinitrobenzeno como patrón interno. (superíndices *1,2,3 representan número de repetición de ensayo)

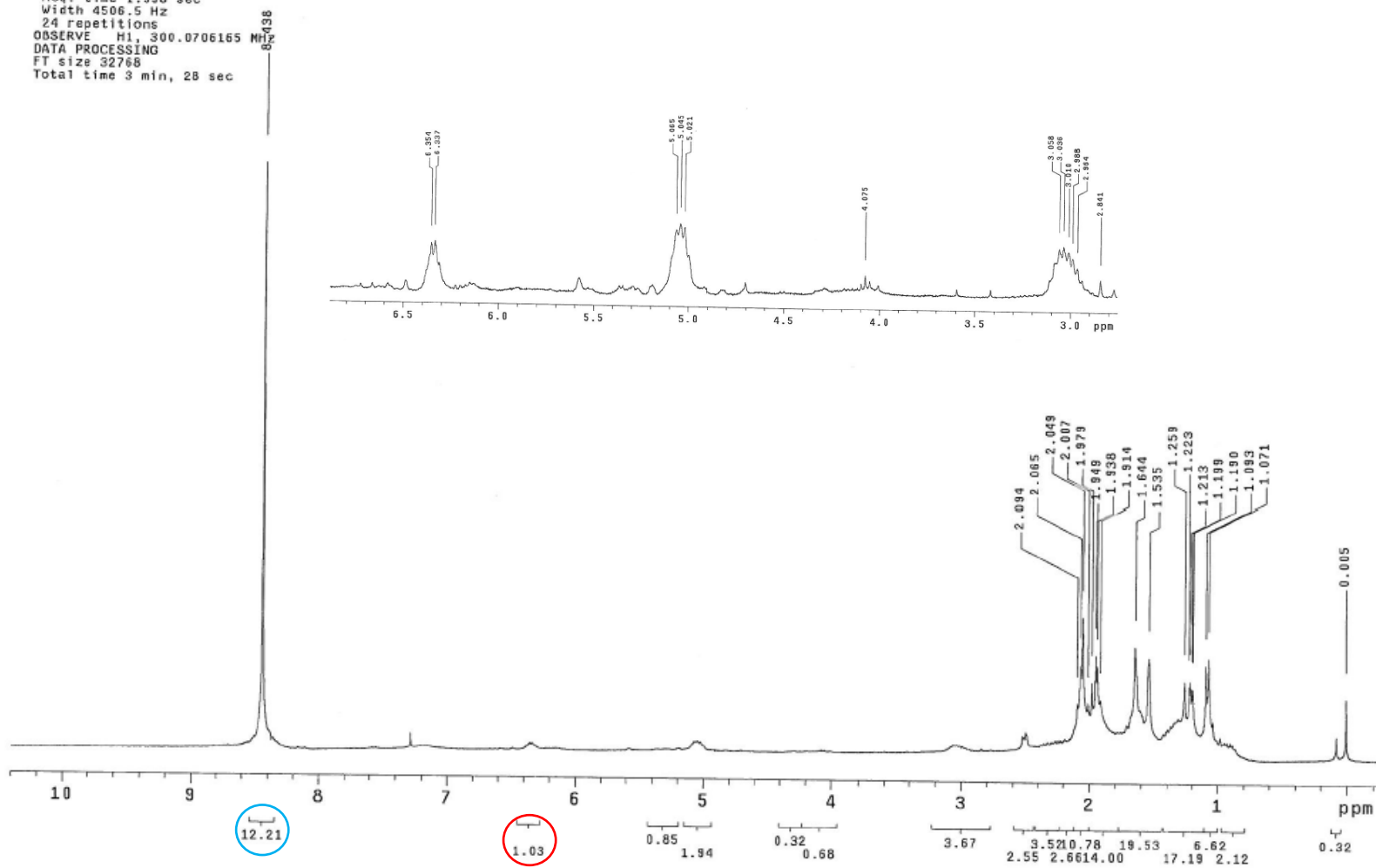
01_12_13 13:11:11
 6Hrs2
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "mercury300"
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 47.4 degrees
 Acq. time 1.998 sec
 Width 4506.5 Hz
 28 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0706203 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 3 min, 28 sec



Espectro 2: RMN ^1H a 300 MHz del extracto de perejón con CO_2SC a 24 horas² en CDCl_3 y 1,4-dinitrobenzenceno como patrón interno.

onrs3
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "mercury300"

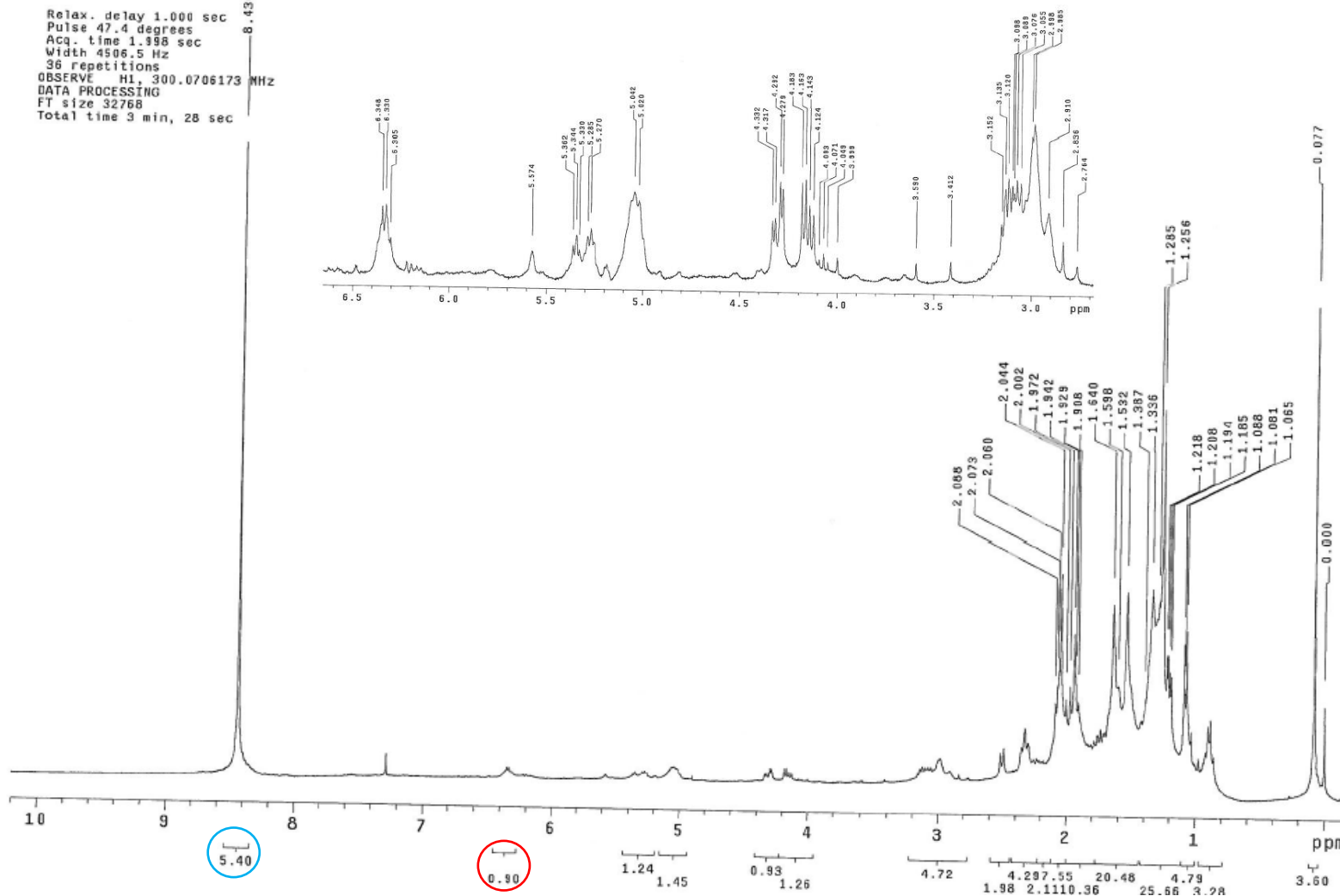
Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 47.4 degrees
 Acq. time 1.998 sec
 Width 4506.5 Hz
 24 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0706165 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 3 min, 28 sec



Espectro 3: RMN ^1H a 300 MHz del extracto de perejóna con CO_2SC a 24 horas³ en CDCl_3 y 1,4-Dinitrobenzeno como patrón interno.

Dr. R Miranda
 12Hrs1
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "mercury300"

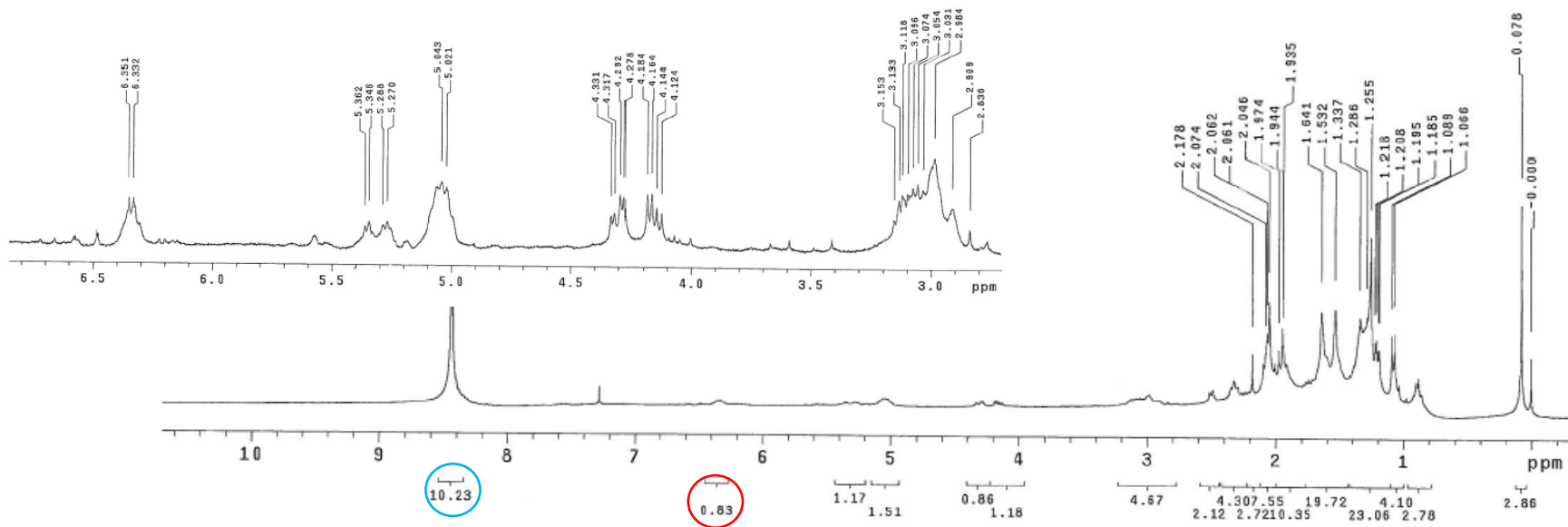
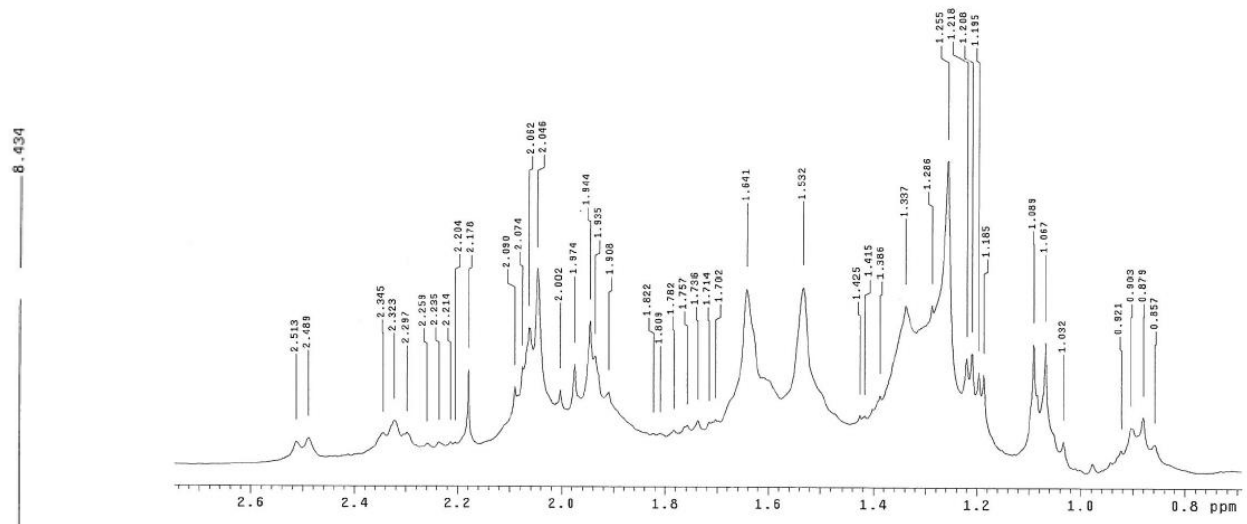
Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 47.4 degrees
 Acq. time 1.998 sec
 Width 4506.5 Hz
 36 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0706173 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 3 min, 28 sec



Espectro 4: RMN ¹H a 300 MHz del extracto de perezona con CO₂SC a 12 horas¹ en CDCl₃ y 1,4-dinitrobenzeno como patrón interno.

Dr. R Miranda
 12Hrs2
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "mercury300"

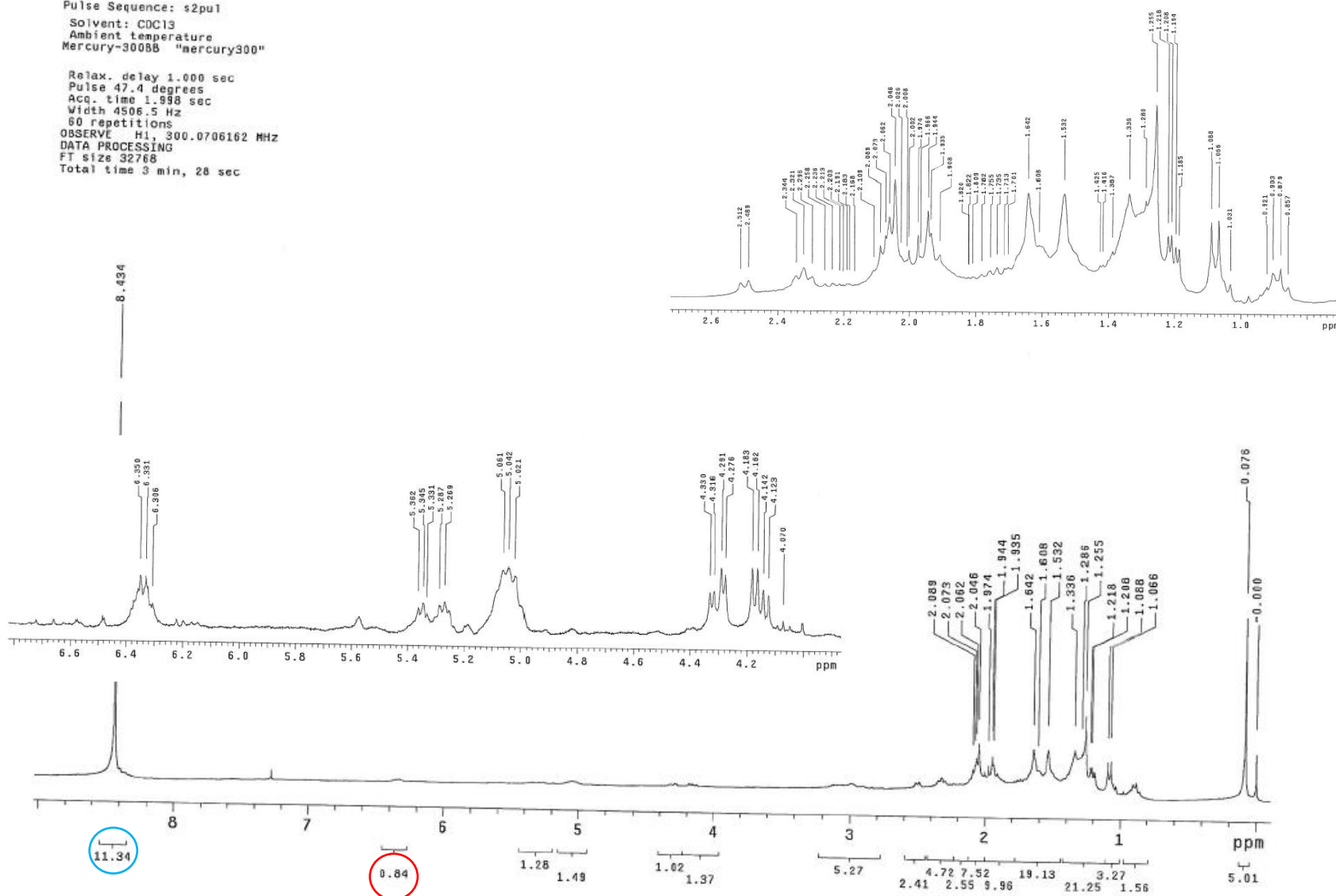
Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 47.4 degrees
 Acq. time 1.998 sec
 Width 4506.5 Hz
 62 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0706165 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 3 min, 28 sec



Espectro 5: RMN ¹H a 300 MHz del extracto de perezona con CO₂SC a 12 horas en CDCl₃ y 1,4-dinitrobenceno como patrón interno.

U. K. Miranda
12Hrs3
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-300BB "mercury300"

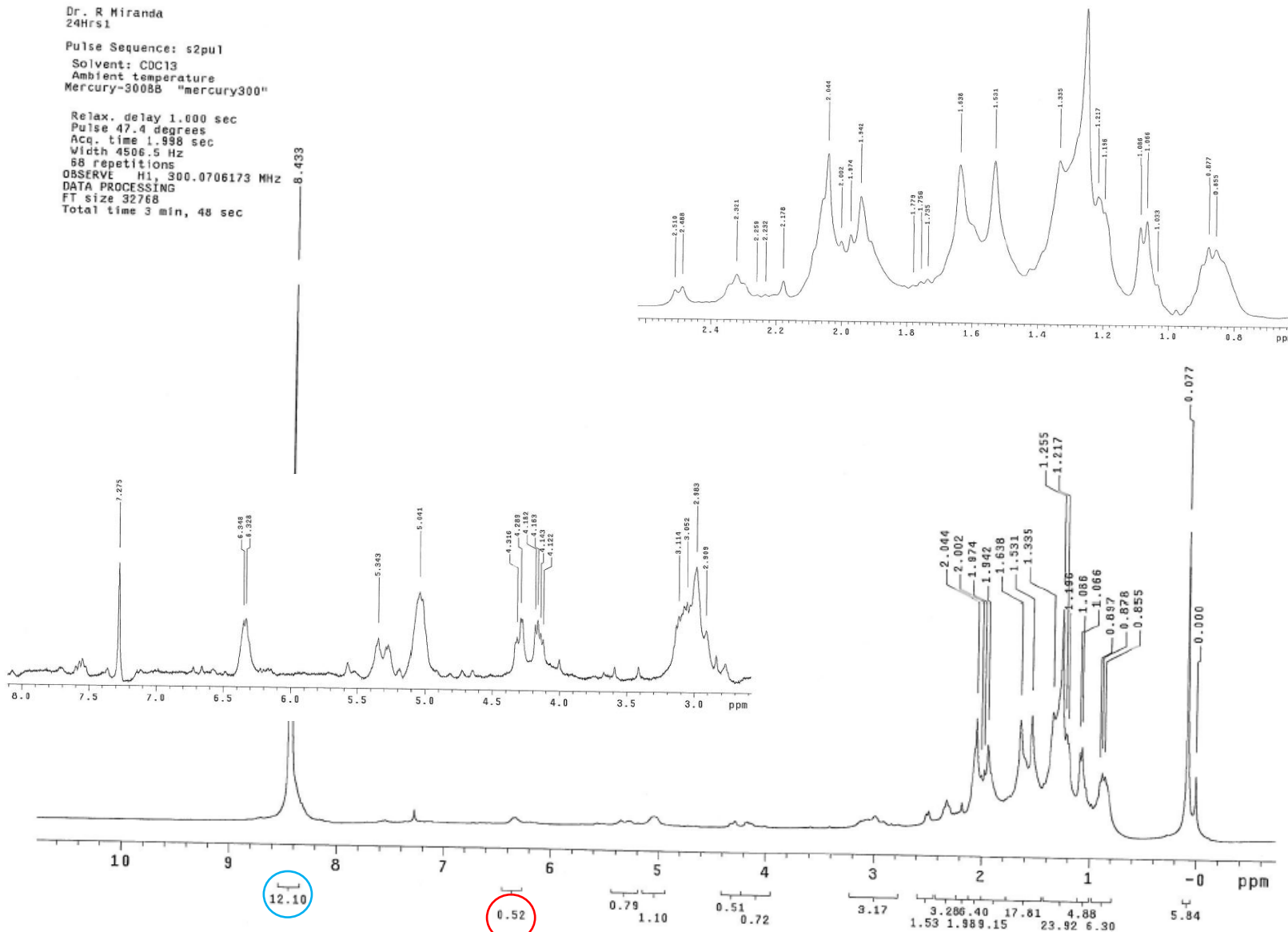
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 47.4 degrees
Acq. time 1.998 sec
Width 4506.5 Hz
60 repetitions
OBSERVE H1, 300.0706162 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 3 min, 28 sec



Espectro 6: RMN ¹H a 300 MHz, del extracto de perezona con CO₂SC a 12 horas³ en CDCl₃ y 1,4-dinitrobenceno como patrón interno.

Dr. R Miranda
 24Hrs1
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-300SB "mercury300"

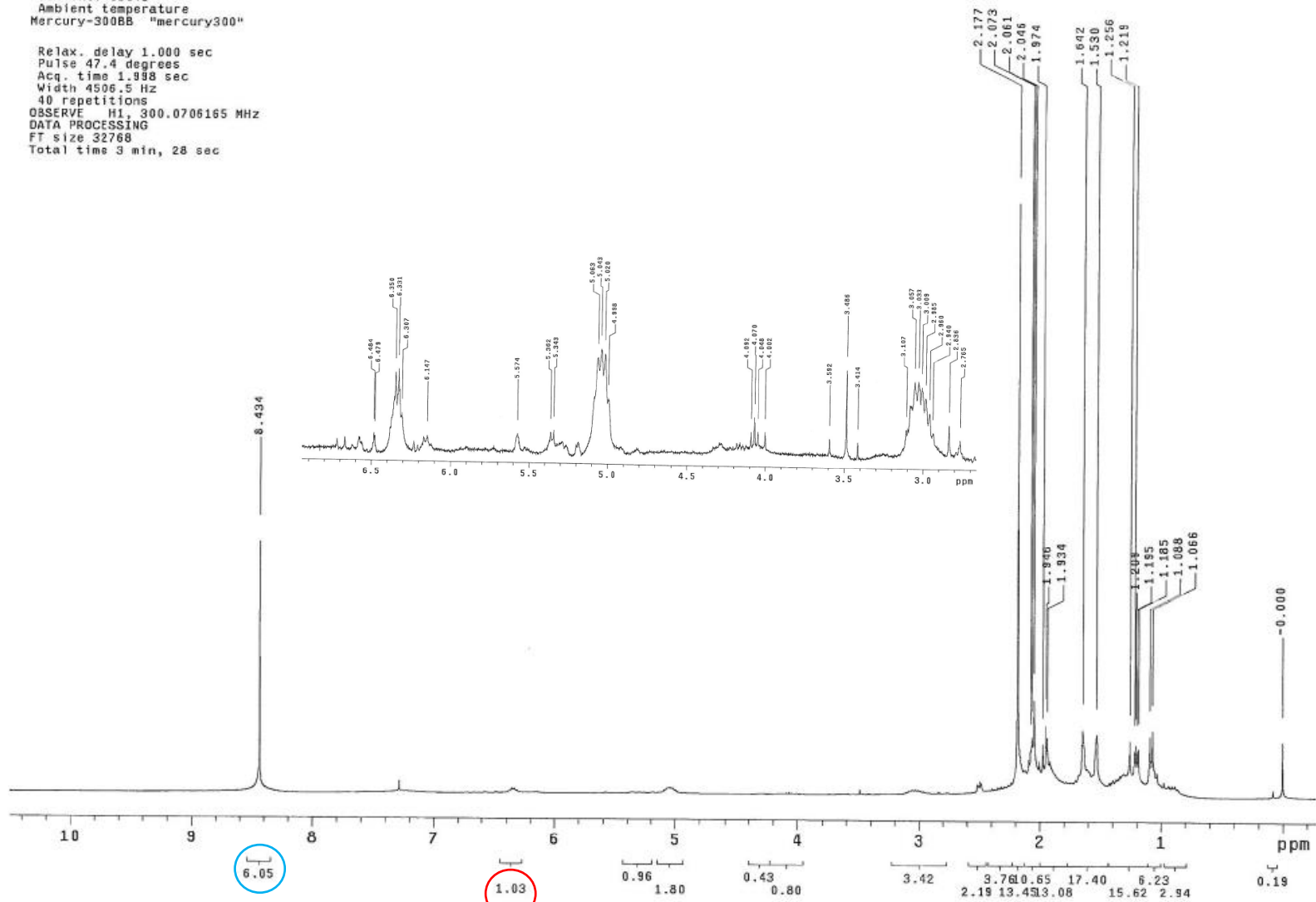
Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 47.4 degrees
 Acq. time 1.998 sec
 Width 4506.5 Hz
 68 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0706173 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 3 min, 48 sec



Espectro 7: RMN ^1H a 300 MHz del extracto de perezona con CO_2SC a 6 horas¹ en CDCl_3 y 1,4-dinitrobenzene como patrón interno.

Dr. R Miranda
 24Hrs2
 Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "mercury300"

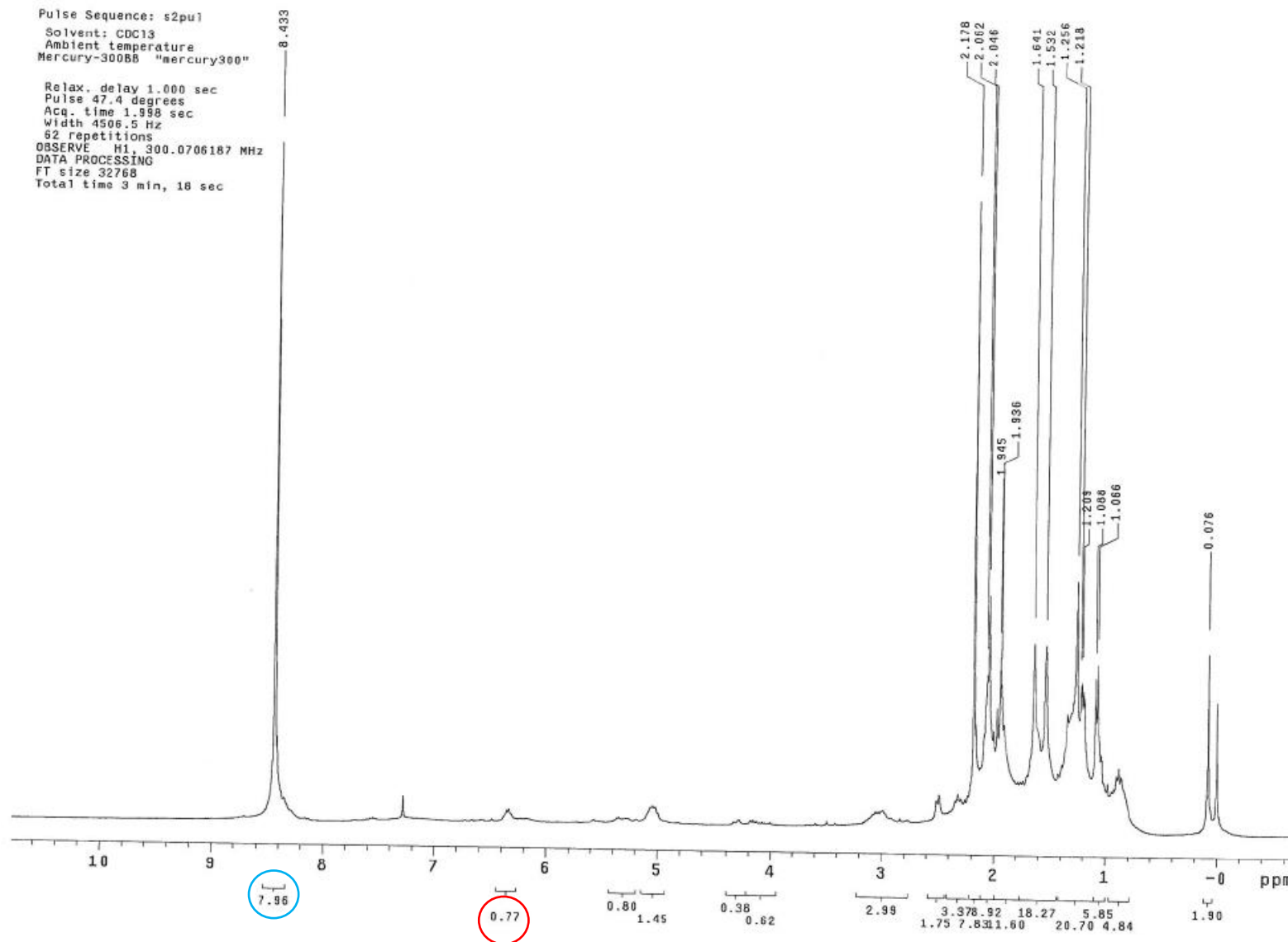
Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 47.4 degrees
 Acq. time 1.998 sec
 Width 4506.5 Hz
 40 repetitions
 OBSERVE H1, 300.0706165 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 3 min, 28 sec



Espectro 8: RMN ¹H a 300 MHz del extracto de perezona con CO₂SC a 6 horas² en CDCl₃ y 1,4-dinitrobenzono como patrón interno.

Dr. R Miranda
24Hrs3
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 47.4 degrees
Acq. time 1.998 sec
Width 4506.5 Hz
62 repetitions
OBSERVE H1, 300.0706187 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 3 min, 18 sec



Espectro 9: RMN ¹H a 300 MHz del extracto de perezona con CO₂SC a 6 horas³ en CDCl₃ y 1,4-dinitrobenceno como patrón interno.

6.2 Análisis estadístico por el método de Tukey y ANOVAS de los resultados comparativos del % de perezona obtenido en extracto y en la raíz de *A. cordata* mediante los procesos de EAI, EAM, EAU, CO₂SC y térmico.

6.2 Análisis estadístico por el método de Tukey y ANOVAS de los resultados comparativos de % de perezona obtenido en extracto y en la raíz de *A. cordata* mediante los procesos de EAI, EAM, EAU, CO₂SC y térmico.

A continuación se presenta el tratamiento estadístico efectuado a través del análisis de varianza (ANOVA) y del método de Tukey, correspondiente a la obtención del número de diferencias significativas, auxiliar en la comparación de los resultados del % de perezona extraída del extracto y en la raíz de *A. cordata* obtenidos por los procesos de EAI (IRSS, IRCS1, IRCS2), EAM (MO10050, MO3050, MO10060), EAU (US6030, US6060), CO₂SC (SC6H, SC12H, SC24H) y por el método térmico (T18060). Tal análisis se efectuó haciendo uso del programa REAL STATICS.

Figura 34. Análisis de varianza (ANOVA) correspondiente a la comparación del % de extracción de perezona en el extracto de *A. cordata* obtenido.

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION		Alpha 0.05						
Groups	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
T18060	3	28.13	9.37666667	1.47773333	2.95546667	4.27106685	0.56161794	18.1917154
IRSS	3	34.97	11.65666667	0.54903333	1.09806667	4.27106685	2.84161794	20.4717154
IRCS1	3	29.44	9.81333333	1.95823333	3.91646667	4.27106685	0.99828461	18.6283821
IRCS2	3	42.82	14.27333333	4.37303333	8.74606667	4.27106685	5.45828461	23.0883821
MO10050	3	24.09	8.03	0.8427	1.6854	4.27106685	0.78504873	16.8450487
MO3050	3	27.12	9.04	2.2971	4.5942	4.27106685	0.22495127	17.8550487
MO10060	3	26.73	8.91	3.3139	6.6278	4.27106685	0.09495127	17.7250487
US6030	3	35.65	11.88333333	1.35743333	2.71486667	4.27106685	3.06828461	20.6983821
US6060	3	44.09	14.69666667	0.22643333	0.45286667	4.27106685	5.88161794	23.5117154
SC6H	3	119.91	39.97	281.8881	563.7762	4.27106685	31.1549513	48.7850487
SC12H	3	139.66	46.55333333	179.790433	359.580867	4.27106685	37.7382846	55.3683821
SC24H	3	158.34	52.78	178.6383	357.2766	4.27106685	43.9649513	61.5950487

ANOVA

Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq
Between								
Groups	8931.22796	11	811.929815	14.8362621	3.8245E-08	2.21630865	2.22383019	0.808713
Within Groups	1313.42487	24	54.7260361					
Total	10244.6528	35	292.704367					

Figura 35. Análisis por el método de Tukey correspondiente a la comparación del % de extracción de perezona en el extracto de *A. cordata* obtenido.

TUKEY HSD/KRAMER			alpha	0.05		
Groups	mean	n	ss	df	q-crit	
T18060	9.37666667	3	2.95546667			
IRSS	11.65666667	3	1.09806667			
IRCS1	9.81333333	3	3.91646667			
IRCS2	14.27333333	3	8.74606667			
MO10050	8.03	3	1.6854			
MO3050	9.04	3	4.5942			
MO10060	8.91	3	6.6278			
US6030	11.88333333	3	2.71486667			
US6060	14.69666667	3	0.45286667			
SC6H	39.97	3	563.7762			
SC12H	46.55333333	3	359.580867			
SC24H	52.78	3	357.2766			
		36	1313.42487	24	5.099	

Q TEST									
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	x-crit	Cohen d
T18060	IRSS	2.28	4.27106685	0.53382447	19.4981699	24.0581699	0.99999972	21.7781699	0.3082037
T18060	IRCS1	0.43666667	4.27106685	0.10223831	21.3415032	22.2148365	1	21.7781699	0.05902732
T18060	IRCS2	4.89666667	4.27106685	1.1464739	16.8815032	26.6748365	0.99939912	21.7781699	0.66191701
T18060	MO10050	1.34666667	4.27106685	0.31529983	20.4315032	23.1248365	1	21.7781699	0.18203844
T18060	MO3050	0.33666667	4.27106685	0.07882496	21.4415032	22.1148365	1	21.7781699	0.04550961
T18060	MO10060	0.46666667	4.27106685	0.10926232	21.3115032	22.2448365	1	21.7781699	0.06308263
T18060	US6030	2.50666667	4.27106685	0.58689474	19.2715032	24.2848365	0.99999923	21.7781699	0.33884384
T18060	US6060	5.32	4.27106685	1.24559043	16.4581699	27.0981699	0.99872915	21.7781699	0.71914197
T18060	SC6H	30.59333333	4.27106685	7.16292543	8.81516347	52.3715032	0.00167918	21.7781699	4.13551692
T18060	SC12H	37.17666667	4.27106685	8.70430456	15.3984968	58.9548365	0.0001221	21.7781699	5.02543258
T18060	SC24H	43.40333333	4.27106685	10.1621761	21.6251635	65.1815032	1.1002E-05	21.7781699	5.86713509
IRSS	IRCS1	1.84333333	4.27106685	0.43158616	19.9348365	23.6215032	0.99999997	21.7781699	0.24917638
IRSS	IRCS2	2.61666667	4.27106685	0.61264943	19.1615032	24.3948365	0.99999988	21.7781699	0.35371331
IRSS	MO10050	3.62666667	4.27106685	0.8491243	18.1515032	25.4048365	0.99996627	21.7781699	0.49024215
IRSS	MO3050	2.61666667	4.27106685	0.61264943	19.1615032	24.3948365	0.99999988	21.7781699	0.35371331
IRSS	MO10060	2.74666667	4.27106685	0.64308679	19.0315032	24.5248365	0.99999801	21.7781699	0.37128633
IRSS	US6030	0.22666667	4.27106685	0.05307027	21.5515032	22.0048365	1	21.7781699	0.03064013
IRSS	US6060	3.04	4.27106685	0.71176596	18.7381699	24.8181699	0.99999433	21.7781699	0.41093827
IRSS	SC6H	28.31333333	4.27106685	6.62910095	6.53516347	50.0915032	0.00415903	21.7781699	3.82731322
IRSS	SC12H	34.89666667	4.27106685	8.17048009	13.1184968	56.6748365	0.00030122	21.7781699	4.71722888
IRSS	SC24H	41.12333333	4.27106685	9.6283516	19.3451635	62.9015032	2.6243E-05	21.7781699	5.55893139
IRCS1	IRCS2	4.46	4.27106685	1.04423559	17.3181699	26.2381699	0.99974838	21.7781699	0.6028897
IRCS1	MO10050	1.78333333	4.27106685	0.41753815	19.9948365	23.5615032	0.99999998	21.7781699	0.24106576
IRCS1	MO3050	0.77333333	4.27106685	0.18106327	21.0048365	22.5515032	1	21.7781699	0.10453693
IRCS1	MO10060	0.90333333	4.27106685	0.21150063	20.8748365	22.6815032	1	21.7781699	0.12210995
IRCS1	US6030	2.07	4.27106685	0.48465643	19.7081699	23.8481699	0.99999999	21.7781699	0.27981652
IRCS1	US6060	4.88333333	4.27106685	1.14335212	16.8948365	26.6615032	0.99941398	21.7781699	0.66011465

IRCS1	SC6H	30.1566667	4.27106685	7.06068711	8.3784968	51.9348365	0.00199884	21.7781699	4.07648961
IRCS1	SC12H	36.74	4.27106685	8.60206625	14.9618301	58.5181699	0.00014505	21.7781699	4.96640526
IRCS1	SC24H	42.9666667	4.27106685	10.0599378	21.1884968	64.7448365	1.298E-05	21.7781699	5.80810777
IRCS2	MO10050	6.24333333	4.27106685	1.46177373	15.5348365	28.0215032	0.99499345	21.7781699	0.84395546
IRCS2	MO3050	5.23333333	4.27106685	1.22529886	16.5448365	27.0115032	0.99890229	21.7781699	0.70742663
IRCS2	MO10060	5.36333333	4.27106685	1.25573622	16.4148365	27.1415032	0.99863431	21.7781699	0.72499964
IRCS2	US6030	2.39	4.27106685	0.55957916	19.3881699	24.1681699	0.99999953	21.7781699	0.32307318
IRCS2	US6060	0.42333333	4.27106685	0.09911653	21.3548365	22.2015032	1	21.7781699	0.05722496
IRCS2	SC6H	25.6966667	4.27106685	6.01645153	3.9184968	47.4748365	0.01158522	21.7781699	3.47359991
IRCS2	SC12H	32.28	4.27106685	7.55783066	10.5018301	54.0581699	0.00085575	21.7781699	4.36351557
IRCS2	SC24H	38.5066667	4.27106685	9.01570217	16.7284968	60.2848365	7.2427E-05	21.7781699	5.20521807
MO10050	MO3050	1.01	4.27106685	0.23647488	20.7681699	22.7881699	1	21.7781699	0.13652883
MO10050	MO10060	0.88	4.27106685	0.20603751	20.8981699	22.6581699	1	21.7781699	0.11895581
MO10050	US6030	3.85333333	4.27106685	0.90219457	17.9248365	25.6315032	0.99993859	21.7781699	0.52088228
MO10050	US6060	6.66666667	4.27106685	1.56089026	15.1115032	28.4448365	0.99150139	21.7781699	0.90118041
MO10050	SC6H	31.94	4.27106685	7.47822526	10.1618301	53.7181699	0.00098034	21.7781699	4.31755537
MO10050	SC12H	38.5233333	4.27106685	9.0196044	16.7451635	60.3015032	7.1956E-05	21.7781699	5.20747103
MO10050	SC24H	44.75	4.27106685	10.4774759	22.9718301	66.5281699	6.6327E-06	21.7781699	6.04917353
MO3050	MO10060	0.13	4.27106685	0.03043736	21.6481699	21.9081699	1	21.7781699	0.01757302
MO3050	US6030	2.84333333	4.27106685	0.6657197	18.9348365	24.6215032	0.99999715	21.7781699	0.38435345
MO3050	US6060	5.65666667	4.27106685	1.32441539	16.1215032	27.4348365	0.99782327	21.7781699	0.76465158
MO3050	SC6H	30.93	4.27106685	7.24175038	9.15183013	52.7081699	0.00146791	21.7781699	4.18102653
MO3050	SC12H	37.5133333	4.27106685	8.78312952	15.7351635	59.2915032	0.00010694	21.7781699	5.07094219
MO3050	SC24H	43.74	4.27106685	10.241001	21.9618301	65.5181699	9.6896E-06	21.7781699	5.9126447
MO10060	US6030	2.97333333	4.27106685	0.69615706	18.8048365	24.7515032	0.99999548	21.7781699	0.40192646
MO10060	US6060	5.78666667	4.27106685	1.35485275	15.9915032	27.5648365	0.99735333	21.7781699	0.7822246
MO10060	SC6H	31.06	4.27106685	7.27218774	9.28183013	52.8381699	0.00139361	21.7781699	4.19859955
MO10060	SC12H	37.6433333	4.27106685	8.81356688	15.8651635	59.4215032	0.00010161	21.7781699	5.08851521
MO10060	SC24H	43.87	4.27106685	10.2714384	22.0918301	65.6481699	9.2265E-06	21.7781699	5.93021772
US6030	US6060	2.81333333	4.27106685	0.65869569	18.9648365	24.5915032	0.99999745	21.7781699	0.38029813
US6030	SC6H	28.0866667	4.27106685	6.57603069	6.3084968	49.8648365	0.00454901	21.7781699	3.79667309
US6030	SC12H	34.67	4.27106685	8.11740982	12.8918301	56.4481699	0.00032965	21.7781699	4.68658875
US6030	SC24H	40.8966667	4.27106685	9.57528133	19.1184968	62.6748365	2.8635E-05	21.7781699	5.52829125
US6060	SC6H	25.2733333	4.27106685	5.91733499	3.49516347	47.0515032	0.01363673	21.7781699	3.41637495
US6060	SC12H	31.8566667	4.27106685	7.45871413	10.0784968	53.6348365	0.00101355	21.7781699	4.30629061
US6060	SC24H	38.0833333	4.27106685	8.91658564	16.3051635	59.8615032	8.5489E-05	21.7781699	5.14799312
SC6H	SC12H	6.58333333	4.27106685	1.54137914	15.1948365	28.3615032	0.99230882	21.7781699	0.88991566
SC6H	SC24H	12.81	4.27106685	2.99925064	8.96816987	34.5881699	0.61435699	21.7781699	1.73161817
SC12H	SC24H	6.22666667	4.27106685	1.45787151	15.5515032	28.0048365	0.99510236	21.7781699	0.84170251

Figura 36. Análisis de varianza (ANOVA) correspondiente a la comparación del % de extracción de perezona en la raíz de *A. cordata* obtenido.

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION		Alpha						
Groups	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
T18060	3	1.4	0.46666667	0.01333333	0.02666667	0.12656429	0.20545082	0.72788251
IRSS	3	1.5	0.5	0.01	0.02	0.12656429	0.23878415	0.76121585
IRCS1	3	1.5	0.5	0.01	0.02	0.12656429	0.23878415	0.76121585
IRCS2	3	2.5	0.83333333	0.02333333	0.04666667	0.12656429	0.57211749	1.09454918
MO10050	3	1	0.33333333	0.00333333	0.00666667	0.12656429	0.07211749	0.59454918
MO3050	3	1.1	0.36666667	0.00333333	0.00666667	0.12656429	0.10545082	0.62788251
MO10060	3	1.4	0.46666667	0.00333333	0.00666667	0.12656429	0.20545082	0.72788251
US6030	3	1.7	0.56666667	0.00333333	0.00666667	0.12656429	0.30545082	0.82788251
US6060	3	2.2	0.73333333	0.00333333	0.00666667	0.12656429	0.47211749	0.99454918
SC6H	3	2.5	0.83333333	0.12333333	0.24666667	0.12656429	0.57211749	1.09454918
SC12H	3	4.5	1.5	0.19	0.38	0.12656429	1.23878415	1.76121585
SC24H	3	5.7	1.9	0.19	0.38	0.12656429	1.63878415	2.16121585

ANOVA

Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq
Between								
Groups	7.61666667	11	0.69242424	14.4088282	5.1096E-08	2.21630865	2.19156171	0.80381162
Within Groups	1.15333333	24	0.04805556					
Total	8.77	35	0.25057143					

Figura 37. Análisis por el método de Tukey correspondiente a la comparación del % de extracción de perezona en la raíz de *A. cordata* obtenido.

TUKEY HSD/KRAMER		alpha			
Groups	mean	n	ss	df	q-crit
T18060	0.46666667	3	0.02666667		
IRSS	0.5	3	0.02		
IRCS1	0.5	3	0.02		
IRCS2	0.83333333	3	0.04666667		
MO10050	0.33333333	3	0.00666667		
MO3050	0.36666667	3	0.00666667		
MO10060	0.46666667	3	0.00666667		
US6030	0.56666667	3	0.00666667		
US6060	0.73333333	3	0.00666667		
SC6H	0.83333333	3	0.24666667		
SC12H	1.5	3	0.38		
SC24H	1.9	3	0.38		
		36	1.15333333	24	5.099

Q TEST

group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	x-crit	Cohen d
T18060	IRSS	0.03333333	0.12656429	0.26337077	0.61201796	0.67868463	1	0.64535129	0.15205718
T18060	IRCS1	0.03333333	0.12656429	0.26337077	0.61201796	0.67868463	1	0.64535129	0.15205718
T18060	IRCS2	0.36666667	0.12656429	2.89707846	0.27868463	1.01201796	0.65951536	0.64535129	1.67262903
T18060	MO10050	0.13333333	0.12656429	1.05348308	0.51201796	0.77868463	0.99972653	0.64535129	0.60822874
T18060	MO3050	0.1	0.12656429	0.79011231	0.54535129	0.74535129	0.99998361	0.64535129	0.45617155
T18060	MO10060	0	0.12656429	0	0.64535129	0.64535129	1	0.64535129	0
T18060	US6030	0.1	0.12656429	0.79011231	0.54535129	0.74535129	0.99998361	0.64535129	0.45617155
T18060	US6060	0.26666667	0.12656429	2.10696615	0.37868463	0.91201796	0.92947245	0.64535129	1.21645747
T18060	SC6H	0.36666667	0.12656429	2.89707846	0.27868463	1.01201796	0.65951536	0.64535129	1.67262903
T18060	SC12H	1.03333333	0.12656429	8.16449383	0.38798204	1.67868463	0.0003043	0.64535129	4.71377271
T18060	SC24H	1.43333333	0.12656429	11.3249431	0.78798204	2.07868463	1.7516E-06	0.64535129	6.53845892
IRSS	IRCS1	0	0.12656429	0	0.64535129	0.64535129	1	0.64535129	0
IRSS	IRCS2	0.33333333	0.12656429	2.63370769	0.31201796	0.97868463	0.76960915	0.64535129	1.52057184
IRSS	MO10050	0.16666667	0.12656429	1.31685384	0.47868463	0.81201796	0.99792858	0.64535129	0.76028592
IRSS	MO3050	0.13333333	0.12656429	1.05348308	0.51201796	0.77868463	0.99972653	0.64535129	0.60822874
IRSS	MO10060	0.03333333	0.12656429	0.26337077	0.61201796	0.67868463	1	0.64535129	0.15205718
IRSS	US6030	0.06666667	0.12656429	0.52674154	0.57868463	0.71201796	0.99999975	0.64535129	0.30411437
IRSS	US6060	0.23333333	0.12656429	1.84359538	0.41201796	0.87868463	0.97059949	0.64535129	1.06440029
IRSS	SC6H	0.33333333	0.12656429	2.63370769	0.31201796	0.97868463	0.76960915	0.64535129	1.52057184
IRSS	SC12H	1	0.12656429	7.90112306	0.35464871	1.64535129	0.0004764	0.64535129	4.56171553
IRSS	SC24H	1.4	0.12656429	11.0615723	0.75464871	2.04535129	2.6372E-06	0.64535129	6.38640174
IRCS1	IRCS2	0.33333333	0.12656429	2.63370769	0.31201796	0.97868463	0.76960915	0.64535129	1.52057184
IRCS1	MO10050	0.16666667	0.12656429	1.31685384	0.47868463	0.81201796	0.99792858	0.64535129	0.76028592
IRCS1	MO3050	0.13333333	0.12656429	1.05348308	0.51201796	0.77868463	0.99972653	0.64535129	0.60822874
IRCS1	MO10060	0.03333333	0.12656429	0.26337077	0.61201796	0.67868463	1	0.64535129	0.15205718
IRCS1	US6030	0.06666667	0.12656429	0.52674154	0.57868463	0.71201796	0.99999975	0.64535129	0.30411437
IRCS1	US6060	0.23333333	0.12656429	1.84359538	0.41201796	0.87868463	0.97059949	0.64535129	1.06440029
IRCS1	SC6H	0.33333333	0.12656429	2.63370769	0.31201796	0.97868463	0.76960915	0.64535129	1.52057184
IRCS1	SC12H	1	0.12656429	7.90112306	0.35464871	1.64535129	0.0004764	0.64535129	4.56171553
IRCS1	SC24H	1.4	0.12656429	11.0615723	0.75464871	2.04535129	2.6372E-06	0.64535129	6.38640174
IRCS2	MO10050	0.5	0.12656429	3.95056153	0.14535129	1.14535129	0.24331178	0.64535129	2.28085776
IRCS2	MO3050	0.46666667	0.12656429	3.68719076	0.17868463	1.11201796	0.3284217	0.64535129	2.12880058
IRCS2	MO10060	0.36666667	0.12656429	2.89707846	0.27868463	1.01201796	0.65951536	0.64535129	1.67262903
IRCS2	US6030	0.26666667	0.12656429	2.10696615	0.37868463	0.91201796	0.92947245	0.64535129	1.21645747
IRCS2	US6060	0.1	0.12656429	0.79011231	0.54535129	0.74535129	0.99998361	0.64535129	0.45617155
IRCS2	SC6H	0	0.12656429	0	0.64535129	0.64535129	1	0.64535129	0
IRCS2	SC12H	0.66666667	0.12656429	5.26741538	0.02131537	1.31201796	0.03859389	0.64535129	3.04114369
IRCS2	SC24H	1.06666667	0.12656429	8.4278646	0.42131537	1.71201796	0.00019468	0.64535129	4.8658299
MO10050	MO3050	0.03333333	0.12656429	0.26337077	0.61201796	0.67868463	1	0.64535129	0.15205718
MO10050	MO10060	0.13333333	0.12656429	1.05348308	0.51201796	0.77868463	0.99972653	0.64535129	0.60822874
MO10050	US6030	0.23333333	0.12656429	1.84359538	0.41201796	0.87868463	0.97059949	0.64535129	1.06440029
MO10050	US6060	0.4	0.12656429	3.16044923	0.24535129	1.04535129	0.54264155	0.64535129	1.82468621
MO10050	SC6H	0.5	0.12656429	3.95056153	0.14535129	1.14535129	0.24331178	0.64535129	2.28085776
MO10050	SC12H	1.16666667	0.12656429	9.21797691	0.52131537	1.81201796	5.1702E-05	0.64535129	5.32200145
MO10050	SC24H	1.56666667	0.12656429	12.3784261	0.92131537	2.21201796	3.5579E-07	0.64535129	7.14668766
MO3050	MO10060	0.1	0.12656429	0.79011231	0.54535129	0.74535129	0.99998361	0.64535129	0.45617155
MO3050	US6030	0.2	0.12656429	1.58022461	0.44535129	0.84535129	0.99063637	0.64535129	0.91234311

MO3050	US6060	0.36666667	0.12656429	2.89707846	0.27868463	1.01201796	0.65951536	0.64535129	1.67262903
MO3050	SC6H	0.46666667	0.12656429	3.68719076	0.17868463	1.11201796	0.3284217	0.64535129	2.12880058
MO3050	SC12H	1.13333333	0.12656429	8.95460614	0.48798204	1.77868463	8.0217E-05	0.64535129	5.16994426
MO3050	SC24H	1.53333333	0.12656429	12.1150554	0.88798204	2.17868463	5.2656E-07	0.64535129	6.99463048
MO10060	US6030	0.1	0.12656429	0.79011231	0.54535129	0.74535129	0.99998361	0.64535129	0.45617155
MO10060	US6060	0.26666667	0.12656429	2.10696615	0.37868463	0.91201796	0.92947245	0.64535129	1.21645747
MO10060	SC6H	0.36666667	0.12656429	2.89707846	0.27868463	1.01201796	0.65951536	0.64535129	1.67262903
MO10060	SC12H	1.03333333	0.12656429	8.16449383	0.38798204	1.67868463	0.0003043	0.64535129	4.71377271
MO10060	SC24H	1.43333333	0.12656429	11.3249431	0.78798204	2.07868463	1.7516E-06	0.64535129	6.53845892
US6030	US6060	0.16666667	0.12656429	1.31685384	0.47868463	0.81201796	0.99792858	0.64535129	0.76028592
US6030	SC6H	0.26666667	0.12656429	2.10696615	0.37868463	0.91201796	0.92947245	0.64535129	1.21645747
US6030	SC12H	0.93333333	0.12656429	7.37438153	0.28798204	1.57868463	0.00117053	0.64535129	4.25760116
US6030	SC24H	1.33333333	0.12656429	10.5348308	0.68798204	1.97868463	6.053E-06	0.64535129	6.08228737
US6060	SC6H	0.1	0.12656429	0.79011231	0.54535129	0.74535129	0.99998361	0.64535129	0.45617155
US6060	SC12H	0.76666667	0.12656429	6.05752768	0.12131537	1.41201796	0.01082543	0.64535129	3.49731524
US6060	SC24H	1.16666667	0.12656429	9.21797691	0.52131537	1.81201796	5.1702E-05	0.64535129	5.32200145
SC6H	SC12H	0.66666667	0.12656429	5.26741538	0.02131537	1.31201796	0.03859389	0.64535129	3.04114369
SC6H	SC24H	1.06666667	0.12656429	8.4278646	0.42131537	1.71201796	0.00019468	0.64535129	4.8658299
SC12H	SC24H	0.4	0.12656429	3.16044923	0.24535129	1.04535129	0.54264155	0.64535129	1.82468621

7. Referencias.

A.

1. Abu-Samra A., Morris J.S., Koirtiyohann S., R. (1975). *Wet ashing of some biological samples in a microwave oven*, *Anal. Chem.* 47 (8), 1475-1477.
2. Alfaro, M., J., Bélanger, J., Padilla F., C., Paré J., R. (2003). *Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes(MAPTM) extraction of ginger (Zingiber officinale)*, *Food Res. Int.* 36 (3), 499–504.
3. Alkio M., Gonzalez C., Jantti M, Aaltonen O. (2000). *Purification of polyunsaturated fatty acid esters from tuna oil with supercritical fluid chromatography*. *JAOCS.* 77 (3), 315-321.
4. Anastas, P. T. y Warner, J. C. (1998). *Green chemistry: theory and practice*. New York, Estados Unidos: Oxford University Press.
5. Anastas, P. T., Wasserscheid, P., Stark, A. (2014) *Handbook of green chemistry, green solvents, ionic liquids*. New York, Estados Unidos: Oxford University Press.
6. Anekpankul, T., Goto, M., Sasaki, M., P. Pavasant, A. (2007). *Extraction of anti-cancer damnacanthol from roots of Morinda citrifolia by subcritical water*. *Separation and Purification Technology.* 55 (3), 343–349.
7. Arreola A.G., Balaban M.O., Marshall M.R., Wei C.I., Peplow A.J. (1994) *Supercritical carbon dioxide processing of orange juice: Effects on pectinesterase, microbiology and quality attributes in supercritical fluid processing of food and biomaterials*. New York, Estados Unidos: Blackie Academic & Professional.
8. Ávalos G.A., Pérez-Urria C., E. (2009). “*Metabolismo secundario de plantas*”. *Serie Fisiología Vegetal.* 2 (3), 119-145.
9. Azcon Bieto, J., Talon, M. (1993). *Fisiología y bioquímica vegetal*. Madrid, España: Interamericana.

B.

10. Bacigalupi, R. (1931). “*A monograph of the genus perezia, section acourtia*”. *Contributions to the Gray Herbarium*, 97 (17), 1-81.

11. Bandoni, A., Czepak, M. (2008). “*Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Aspectos agronômicos da produção de espécies aromáticas*”. Brasil: Univ. Fed. de Espírito Santo.
12. Bandoni, A., Dellacasa, E., Ringuelet, J. (2006). “*Química y aplicaciones de los productos del bosque*”. Cochabamba, Bolivia: Biomasa Forestal: Agregar valor a los desechos.
13. Beturcco A., Canu P., Devetta L. Catalytic. (1997). *Hydrogenation in supercritical CO₂. Kinetic measurements in gradientess internal-reactor. Ind. Eng. Chem., 36 (26), 26-30.*
14. Bharath R., Inomata H., Adschiri T., Arai K. (1992). *Phase equilibrium study for the separation and fractionation of fatty oil components using supercritical carbon dioxide. Fluid phase equilibria, 81 (7), 307-320.*
15. Bolaño, T. (2010). *Inventario de emisiones biogénicas de monoterpenos en el Parque Nacional Natural Tayrona de Santa Marta (Colombia)*. (Tesis de maestría). Universidad de Huelva, Huelva, España.
16. Brahmachari, G. (2015). *Bioactive natural products*. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
17. Brriones, J.A., Mullins, J. (1987). *Thernary phase equilibria for acetic acid-water mixtures with supercritical carbón dioxide. 36 (12), 235-246.*
18. Brunner, G. (1994). *Gas extraction an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to the separation processes*. New York, Estados Unidos: Springer-Verlag.
19. Butler, M.S. (2004). *The role of natural product chemistry in drug discovery. Journal of Natural Products. 67 (12), 2141-2153.*

C.

20. Castañeda, D. M., Gallego, L. C. y Mora, V. (2004). *Diseño conceptual de un sistema de extracción supercrítica con CO₂. Ingeniería Química. 415 (11), 165-169.*
21. Chen F., Sun Y., Zhao G., Wang Z. (2007). *Optimization of ultrasoundassisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. Ultrason Sonochem. 14 (6), 767-778.*
22. Chordia L., Robey R. (Abril 2000). *Industrial applications of supercritical fluids*. 5th International Symposium on Supercritical Fluids. Congreso llevado a cabo en Atlanta, Estados Unidos.
23. Cragg, G. M., Kingston, D. G., Newman, D. J. (2005). *Anticancer agents from natural products*. Boca Ratón, Estados Unidos: Taylor & Francis.

24. Cruz Olivares, J., Ortiz, E. Pérez A. Chaparro M. (2011). *Solubility of mesquite gum in supercritical carbon dioxide*. *Chem. Eng.* 56 (5), 2449–2452.

D.

25. D'Addabbo, T., Leonetti, P., Carbonara, T. (Junio 2009). "Nematicidal activity of *Artemisia annua* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*". 8th Phytochemical Society of Europe Meeting on Biopesticides. Congreso llevado a cabo en La Palma, España.
26. Di Leo Lira, P., Retta, D., Tkacik, E. (2009). "Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina". *Ind. Crops Prod.* 30 (24), 259-264.
27. Domínguez, Xorge A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Limusa.

E.

28. Efeovbokhan, V. (2015). *Alternative solvents for Moringa oleifera seeds extraction*. *Journal of Applied Sciences.* 15 (8), 1073-1082.
29. Eggers, R., Jerry W. (1996). *Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry*. Champaign. Illinois: AOCS Press.
30. Enríquez, R., Ortega, J., y Lozoya, X. (1980). *Active components in perezia roots*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2 (4), 389-393.
31. Escobedo, R., Miranda, R. y Martínez J. (2016). *Infrared irradiation: Toward green chemistry, a review*. *International Journal of Molecular Sciences* (17), 453-479.
32. Espinosa, S., Díaz. S., Brignole E.A. (2001). *Thermodynamic modeling and process optimization of supercritical fluids fractionation of fish oil fatty acid ethyl esters*. *Ind. Eng. Chem.Res.* 41 (12), 1516-1517.
33. Everts, S. (2010). *Greener drugs: Benign-by-design strategies*. *Quim. & Eng. News.* 88 (17), 2016-215.

F.

34. Francis A.W. (1954). *Ternary systems of liquid carbon dioxide*. *J. Phys. Chem.* 58 (12), 1099-1114.

G.

35. Gabriel C., Gabriel S., Grant E.H. (1998). *Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. Chemical Society Reviews.* 27 (8), 213-223.
36. Gao M., Liu C. (2005). *Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of Saussurea medusa Maxim. World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 21 (8), 1461-1463.
37. García, G, J., Molina M., Rodríguez, F., Mirada, F. (2002). *Calculation of Fluid-Fluid and Solid-Fluid Phase Equilibria in Binary Mixtures at High Pressures. Fluid Phase Equilib.,* 200 (1), 31–39.
38. Georgantea, P., Loannou, E., Evain-Bana, E., Bagrel, D. (2016). *Sesquiterpenes with inhibitory activity against CDC25 phosphatases from the soft coral Pseudopterogorgia rigida. Tetrahedron,* 72 (23), 3262-3269.
39. Giddings, J. C. (1966). *Some aspectos of pressure-induced equilibrium shifts in chromatography. Separation Sci. I* (1), 73-80.

H.

40. Harbone, J. B. (1998). *Phytochemical Methods : a guide to modern techniques of plant analysis.* Londres, Inglaterra: Chapman and Hall.
41. Harborne, J. (1985). *Introducción a la Bioquímica Ecológica.* Madrid, España: Alhambra.
42. Hemwimol, S., Pavasant, P., Shotipruk, A. (2006). *Ultrasound assisted extraction of anthraquinones from roots of Morinda citrifolia. Ultrason. Sonochem.* 13 (6), 543-548.
43. Hintermair, U., Leitner, W., Jessop, P., Hintermair, U. (2010). *Handbook of Green Chemistry.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

J.

44. Jouyban, A., Chan, H., Foster, N. R. (2002). *Solubilities of the fat-soluble vitamins A, D, E, and K in supercritical carbon dioxide. J. ind. & Eng. Chem.* 24 (1), 19–35.

K.

45. Kang, E. (2010). *An industrial perspective on Green chemistry. Tetrahedron*. 66 (21) 1029-1030.
46. Knorr, D. (2003). *Impact of non-thermal processing on plant metabolites, J. Food Eng.* 56 131-134.
47. Kögl, F. y Boer, A. G. (1935). *Über der konstitution des perezons. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. 54 (10), 779-794.
48. Kurnik, R.T., Holla, S.J., Reid, R.C. (1981). *Solubility of supercritical carbon dioxide and ethylene. J. Chem.* 26 (1), 47-51.
49. Kurnik, R.T., Reid, R.C. (1982). *Solubility of solid mixtures in supercritical fluids. Fluid Phase Equilibria* 8 (1), 93-105.

L.

50. Larry T. Taylor. (1996). *Supercritical fluid extraction; Techniques in analytical chemistry*. Michigan, Estados Unidos: Wiley.
51. Latha C. (2006). *Microwave assisted extraction of embelin from Embelia ribes. Biotechnol.* 9243 (32), 105-129.
52. Letellier, M., Budzinski H. (1999). *Microwave assisted extraction of organic compounds. Analysis* 27 (1), 259-71.
53. Letellier, M., Budzinski H., Charrier L., S. Capes. (1999). *Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. J. Anal. Chem.* 364 (21), 228-37.
54. Li H., Chen B., Zhang Z., Yao S. (2004). *Focused microwave assisted solvent extraction and HPLC determination of effective constituents in Eucommia ulmoides Oliv. Talanta*. 63 (3), 659-65.
55. Lidström, P., Tierney J., Wathey B., Westman J. (2001). *Microwave assisted organic synthesis – review. Tetrahedron* 57 (45), 9225-9283.
56. Luckner, M. (1972). *Secondary metabolism in plants and animal*. Londres, Inglaterra: Chapman and Hall.

M.

57. Macías, F., Galindo, J. L., Galindo, J. C. (2007). "Evolution and current status of ecological phytochemistry". *Phytochemistry*, 68 (22), 2917-2936.
58. Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). *Microwave assisted extraction – An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacognosy Reviews* 1 (1), 7-18.
59. Mason, T.J. (1999) *Sonochemistry: current use and future prospects in the chemical and processing industries. Philosophical Transactions of The Royal Society A: Mathematical Physical and Engineering Sciences*. 357 (1751), 355-369.
60. Mendoza S. Pablo. (2017). *Estudio comparativo para la extracción de perezona de Acourtia cordata empleando fuentes alternativas de extracción*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Estado de México, México.
61. Miranda, R., Olivia, N., Velasco, B. (2009). *Irradiación infrarroja: una alternativa para la activación de reacciones y su contribución a la química verde. Educ. Quim.* 20 (4).
62. Morales, G., Marina, Martínez, Joel, Hernández O. (2011). *¿Que tan verde es un experimento?. Educ. Quim.* 22 (3).
63. Morcillo R.J. (1974). *Espectroscopia infrarroja*. Washington, Estados Unidos: Sec.Org. E.U.A.

N.

64. Nayori, R. (2010). *Green chemistry: the key to our future. Tethrahedron.* 66 (2), 1028.

P.

65. Paré J., R., Belanger J., M., Stafford S. (1994). *Microwave-assisted process (MAPTM): A new tool for the analytical laboratory. Trends in Analytical Chemistry.* 13 (4), 176-184.
66. Pasquel, A. (2002). *Extracción del aceite de la cáscara de bacris gasipaes HBK usando dióxido de carbono presurizado. Amazónica de Inv. Alimentaria.* 2 (1), 1-14.
67. Peter, S., King, M.,B. (1993). *Supercritical fractionation of lipids in extraction of natural products using near-critical solvents*. New York, Estados Unidos: Blackie Academic & Professional.
68. Prada, A, F. (2001). *Extracción con fluidos supercríticos: realidad o fantasía. Química e Industria. Vol.* 22 (1), 20- 23.

69. Prausntz, J.M., Lichtenthaler, R.N., Gomes de Azevedo, E. (1986). *Molecular thermodynamics of fluid-phase equilibria*. New Jersey, Estados Unidos: Prentice-Hall Inc.

R.

70. Robinson, T. (1980). *The organic constituents of higher plants*. Amherst, Massachusetts: Cordus Press.
71. Roldán Gutiérrez J., Ruiz J., Luque de Castro M. (2008). *Ultrasound - assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction*. *Talanta*. 75 (5), 1369-1375.
72. Romdhane, M., Gourdon C., Casamatta G. (1995). *Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor*. *Ultrasonics*, 33 (3), 221-227.
73. Rostagno, M., Palma M., Barroso C. (2003). *Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones*. *Journal of Chromatography*. 1012 (2), 119-128.
74. Rzedowski, G.C., Rzedowski J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. (2ª Edición). Michoacán, México: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad.

S.

75. Salisova, M., Toma S., Mason T.J. (1997). *Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from Salvia officinalis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4 (2), 131–134.
76. Sivik B., Gunnlaugsdottir H., Hammam H., Lukaszynski D. (Octubre 1994). *Supercritical extraccion of Polar lipids by carbon dioxide and a low concentartion of etanol*. 3th International Symposium on Supercritical Fluids. Congreso llevado a cabo en Strasbourg, Francia.
77. Sparks, D. L., Hernandez, R., Estévez, L. A. (2008). "Evaluation of density-base models for the solubility of solids in supercritical carbon dioxide and formulation of a new model". *Chem. Eng. Sci.* 63 (17), 4292–4301.
78. Sparr, E., Björklund C. (2000). *Analytical-scale microwave-assisted extraction*, *Journal of Chromatography*. 902 (17), 227-250.
79. Stecher, G., Huck, C.W., Stöggel, W.M., Bonn, G.K. (2003). "Phytoanalysis: a challenge in phytomics". *Trends in Analytical Chemistry*. 22 (1), 1-14.

80. Sun, Y.Y., Li, S.F. (2005). *Measurement and correlation of the solubility of Ligusticum Chuanxiong oil in supercritical CO₂*. *Chin. J. Chem. Eng.* 13 (6), 796-799.

T.

81. Talebi, M., Ghassempour A., Talebpour Z., Rassouli, A. (2004). *Optimization of the extraction of paclitaxel from Taxus baccata L. by the use of microwave energy*. *J. Sep.Sci.* 27 (13), 1130-36.
82. Tatke, P., Jaiswal Y. (2011). *An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug*. *Research Journal of Medicinal Plant.* 5 (1), 21-31.
83. Toma, M., Vinatoru M., Paniwnyk L., Mason T. (2001). *Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (2), 137-142.

V.

84. Valderrama M. (2002). *Procesos de separación mediante extracción supercrítica: modelado del equilibrio entre fases*. *Ingeniería Química.* 394 (34), 380-399.
85. Valverde G., A. (1995). *Extracción con fluidos supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas*. México: Universidad de Rioja.
86. Villeco, M., Muro, A., Catalán, J.; Catalán, C. (2005). "Síntesis de derivados de 1,8-cineol, cariofileno y cariolan-1-ol con utilidad en perfumería y farmacología". En: Fernández Barrero, A. (Ed.). *Plantas Iberoamericanas como fuente de terpenoides útiles en química fina* (pp 189-211). Madrid: CYTED.
87. Vinatoru, M. (2001). *An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs*, *Ultrason. Sonochem.* 8 (3), 303-313.
88. Vinatoru, M., Toma M., Mason T. (1999). *Ultrasound-assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents*. *Advances in Sonochemistry.* 5 (12), 209-247.

W.

89. Walls, F., Padilla, J., Giral, F., Romo, J. (1985). *Studies in perezone derivatives: Structures of the pipitzols and perezinone*. 22 (7), 2387.
90. Wang L., Weller C., L. (2006). *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. *Trends in Food Science & Technology* 17 (6), 300-312.

91. Wang, Y.J., Pan, M.H., Cheng, A.L., Lin, L.I. (1997). *Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. J. Pharm.Biomed.* 15 (12), 1867-1876.
92. Wang, Z., Wang, L., Li, T., Zhon, X. (2006). *Rapid analysis of the essential oils from dried Illicium verum Hook and Zingiber Officinale Rosc by improved solvent free extraction microwave with three types of microwave absorption medium. Bioanal. Chem.* 386 (6), 1863-68.
93. Warner, John., C. Kevin, S., M. (2004). *"Green chemistry" environment impact assessment review.* 24 (5).
94. Wong J.M., Johns K.P. (1986). *Solubilization of biomolecules in carbon dioxides based supercritical fluids. Biotech. Prog.* 1 (2), 29-39.

Z.

95. Zuloaga, O., Etxebarria N., Fernández, L.A., Madariaga, J.M. (1999). *Optimization and comparison of microwave assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach. Talanta.* 50 (2), 345-57.