



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

---

**DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN  
ACEITES VEGETALES A PARTIR DE EXTRACCIONES  
LÍQUIDO-LÍQUIDO CON MICROFLUÍDICA.**

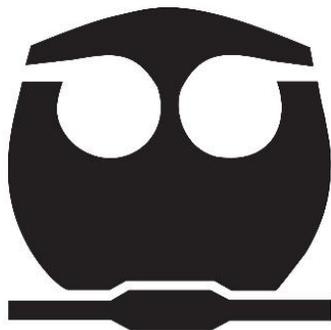
**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**ANA KAREN ORTEGA BECERRIL**

**TUTOR DE TESIS**

**DRA. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX**

**2020**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Dra. María Del Pilar Cañizares Macias

VOCAL: Dra. Iliana Elvira González Hernández

SECRETARIO: Patricia Díaz Arista

1er. SUPLENTE: Dra. Tania Gómez Sierra

2° SUPLENTE: Dra. Sofia Moran Ramos

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 228, “Métodos de Flujo Continuo” del edificio F perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. María del Pilar Cañizares Macías

## **SUSTENTANTE:**

---

Ana Karen Ortega Becerril

---

---

**Índice.**

<b>Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Marco teórico</b> .....	<b>6</b>
2.1. Aceites vegetales.....	6
2.2. Aceite de oliva.....	8
2.2.1. Características del fruto del olivo.....	9
2.2.2. Proceso de elaboración.....	9
2.2.3. Denominaciones.....	12
2.2.4. Composición de la fracción minoritaria del aceite de oliva.....	13
2.3. Aceite de aguacate.....	21
2.3.1. Características del aguacate.....	21
2.3.2. Proceso de elaboración del aceite de aguacate.....	22
2.3.3. Denominaciones.....	24
2.3.4. Composición de la fracción minoritaria.....	24
2.4. Aceite de ajonjolí.....	25
2.4.1. Características del ajonjolí.....	26
2.4.2. Proceso de elaboración.....	27
2.4.3. Denominaciones.....	28
2.4.4. Composición de la fracción minoritaria.....	28
2.5. Aceite de cacahuate.....	30
2.5.1. Características del cacahuate.....	30
2.5.2. Proceso de elaboración.....	31
2.5.3. Denominaciones.....	32
2.5.4. Composición de la fracción minoritaria.....	32
2.6. Aceite de pepita de uva.....	33
2.6.1. Características de la uva.....	33
2.6.2. Proceso de elaboración.....	34
2.6.3. Denominaciones.....	35
2.6.4. Composición de la fracción minoritaria.....	35
2.7. Aceite de linaza.....	36
2.7.1. Características de la linaza.....	36
2.7.2. Proceso de elaboración.....	37
2.7.3. Denominación.....	38
2.7.4. Composición de la fracción minoritaria.....	38
2.8. Compuestos antioxidantes.....	38
2.8.1. Capacidad antioxidante.....	40
2.9. Métodos para la extracción de compuestos fenólicos.....	41
2.9.1. Extracción líquido-líquido (LLE).....	41
2.9.2. Extracción asistida por ultrasonido.....	42
2.9.3. Microdispositivos.....	44

---

---

2.9.3.1. Métodos de fabricación.....	45
2.9.3.2. Materiales de fabricación: PDMS.....	47
2.10. Cuantificación de polifenoles: ensayo de Folin-Ciocalteu.....	48
2.11. Sistema de inyección en flujo (FIA).....	49
2.11.1. Instrumentación del FIA.....	51
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>52</b>
<b>4. Metodología.....</b>	<b>53</b>
4.1. Instrumentos, reactivos y material.....	53
4.2. Programas informáticos.....	55
4.3. Fabricación de los microdispositivos.....	55
4.3.1. Diseño de microdispositivos.....	55
4.3.2. Elaboración de microdispositivos: fotolitografía y litografía suave.....	56
4.3.3. Caracterización de los microdispositivos.....	58
4.4. Método de Folin-Ciocalteu por FIA.....	58
4.5. Evaluación de los métodos de extracción.....	60
4.5.1. Extracción en lote.....	60
4.5.2. Extracción asistida por ultrasonido.....	60
4.5.3. Extracción utilizando microfluídica.....	61
4.6. Optimización del acoplamiento de la extracción liquido-liquido y la reacción de F-C en el microdispositivo.....	62
4.6.1. Configuración experimental.....	63
4.6.2. Evaluación de la concentración del extractante: etanol:agua y metanol:agua.....	64
4.6.3. Evaluación de la influencia del pH de la solución amortiguadora de carbonatos y de la concentración del reactivo de Folin-Ciocalteu en la determinación de compuestos fenólicos en el microdispositivo.....	64
4.6.4. Construcción de las curvas de calibración para el acoplamiento de la extracción liquido-liquido y la reacción de F-C en el microdispositivo.....	65
4.7. Análisis de muestras de aceites vegetales.....	66
4.7.1. Extracción con microdispositivo.....	67
4.7.2. Extracción en lote.....	68
4.8. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de extractos obtenidos mediante extracción por lote.....	68
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>70</b>
5.1. Fabricación y caracterización de microdispositivos.....	70
5.2. Método de Folin-Ciocalteu acoplado a FIA.....	73
5.2.1. Análisis de la señal obtenida por F-C-FIA.....	73
5.2.2. Evaluación de la configuración FIA para determinar polifenoles para cada extractante: etanol:agua 30:70% V/V y metanol:agua 40:60% V/V.....	73
5.2.3. Curvas de calibración para determinar polifenoles por el sistema Folin-Ciocalteu-FIA.....	77
5.3. Optimización de la extracción asistida por ultrasonido.....	79

---

---



---

---

5.4. Análisis comparativo de la cuantificación con base en la metodología de extracción.....	83
5.5. Optimización del acoplamiento de la extracción liquido-liquido y la reacción de F-C en el microdispositivo.....	86
5.5.1. Evaluación de la concentración de los extractantes: etanol:agua y metanol:agua.....	86
5.5.2. Evaluación de la influencia del pH de la solución amortiguadora de carbonatos y de la concentración del reactivo de F-C en la determinación de compuestos fenólicos en el microdispositivo.....	88
5.5.3. Determinación del intervalo lineal, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) para la adaptación de la extracción-reacción dentro del microchip para etanol:agua y metanol:agua.....	93
5.5.4. Curva de calibración para la extracción-reacción en el microdispositivo.....	97
5.6. Análisis de muestras de aceites vegetales comerciales.....	98
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>110</b>
<b>7. Perspectivas.....</b>	<b>112</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>113</b>
Anexo 1: Diagramas.....	113
Anexo 2: Pruebas de t-student para la optimización de la extracción de polifenoles con etanol:agua en microchip.....	115
Anexo 3: Pruebas de t-student para la optimización del pH de la solución amortiguadora en la segunda parte del microchip para la formación del producto de reacción con la extracción con metanol:agua en microchip.....	117
Anexo 4: Prueba de t-student para la optimización de la concentración de reactivo de F-C para la extracción-reacción con metanol:agua en microchip.....	119
<b>9. Referencias.....</b>	<b>121</b>

---

---



---

---

**Símbolos y abreviaturas.**

° C	Grados centígrados
$\alpha$	Nivel de significancia
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro
$\mu\text{mol}$	Micromol
A	Absorbancia
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
a.C.	antes de Cristo
ANOVA	Análisis de varianza
$A_{\text{prom}}$	Absorbancia promedio
$A_{\text{prom prom}}$	Absorbancia promedio promedio
ÁT	Ácido tánico
$b_0$	Ordenada al origen de la curva de calibración
$b_1$	Pendiente de la curva de calibración
BJ	Bomba de jeringa
BP	Bomba peristáltica
C	Concentración
CF	Celda de Flujo
cm	Centímetro
CM	Cuadrado Medio
COI	Consejo Oleícola Internacional
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EtOH	Etanol
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
FIA	Análisis por inyección en flujo (Flow Injection Analysis)

---

---

g	Gramo
GL	Grados de Libertad
h	Hora
H <sub>0</sub>	Hipótesis nula
H <sub>1</sub>	Hipótesis alterna
ID	Diámetro interno (Internal Diameter)
in	Pulgadas
kg	Kilogramo
kHz	Kilohertz
L	Litro
LLE	Extracción líquido-líquido (Liquid-Liquid extraction)
LOC	Laboratorio en un chip (Lab-on-a-chip)
LD	Límite de detección (Limit of Detection)
LQ	Límite de cuantificación (Limit of Quantification)
LSE	Longitud serpentín de extracción
LSR	Longitud serpentín de reacción
LT	Longitud Total
M	Concentración Molar (mol/L)
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
NIR	Infrarrojo cercano
nm	Nanómetros
No. PDMS	Número Polidimetilsiloxano
ORAC	Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno
PDMS	Polidimetilsiloxano
PM-Acetato	Propilenglicol Monometil éter Acetato

## Símbolos y abreviaturas.

---

---

Reactivo F-C	Reactivo de Folin-Ciocalteu
rpm	Revolución por minuto
S	Desviación estándar
s	Segundo
$S_0$	Desviación estándar de la ordenada al origen
$S_1$	Desviación estándar de la pendiente
$S^2$	Varianza
SC	Suma de Cuadrados
t	Estadístico prueba t de Student
TAS	Sistema de Análisis Total
UV	Ultravioleta
% v/v	Proporción volumen/volumen expresada en porcentaje
V.I.	Válvula de Inyección
Vis	Visible

### 1. Introducción.

Debido a que los antioxidantes pueden ejercer efectos benéficos en la protección de los alimentos contra el deterioro oxidativo, así como en la prevención de enfermedades, este tipo de compuestos encuentran aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, etc. (Rojas, 2010). Como consecuencia, ha surgido un creciente interés en la búsqueda de fuentes naturales de antioxidantes, siendo los animales y las plantas uno de los blancos más importantes, de estas últimas los productos más importantes son los aceites vegetales.

Los aceites de vegetales son extraídos de las semillas mediante dos métodos: la extracción con disolventes y por acción mecánica mediante prensado, obteniendo como producto una mezcla heterogénea de componentes. Dicha mezcla contiene compuestos fenólicos (flavonoides, alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, lignanos), tocoferoles, tocotrienoles esteroides y carotenos, a los que se les atribuyen funciones diversas en beneficio de la salud humana debido a su capacidad antioxidante, razón por lo cual, se ha presentado un gran interés en la determinación y caracterización de estos compuestos en diversos tipos de aceites vegetales. Para llevar a cabo la determinación de los compuestos anteriormente mencionados es necesaria su previa extracción por lo que se han implementado diversas metodologías, siendo la más empleada la extracción líquido-líquido (LLE), en donde se utiliza una mezcla de disolventes inmiscibles, como n-hexano y metanol, y que dependiendo de la afinidad del compuesto antioxidante éste se repartirá entre ambas fases (García, Frutos, Pérez y Sevillano, 2010; Chávez, 2017). Sin embargo, han surgido nuevas técnicas en las que el tiempo de extracción y el uso de reactivos han disminuido, facilitando de esta manera el análisis; un ejemplo de lo anterior es la técnica de extracción en microdispositivos.

En el presente trabajo se determinó la cantidad de polifenoles de aceites vegetales comerciales a partir de extracciones líquido-líquido con microdispositivos, utilizando tres diferentes extractantes: etanol:agua, metanol:agua y solución amortiguadora de carbonatos 0.75 M, pH 10.6. Los compuestos fenólicos una vez extraídos, se cuantificaron mediante el método de Folin-Ciocalteu, por

espectrofotometría, a una longitud de onda de 730 nm, mediante el acoplamiento de una celda de flujo fuera del microchip.

Para ello se construyeron microdispositivos, con las técnicas de fotolitografía y litografía suave empleando como material el polímero polidimetilsiloxano (PDMS) y se sellaron los canales con descargas de plasma sobre vidrio. El resultado final fue un microdispositivo cuyo diseño estuvo formado por dos partes: (1) la zona de extracción, y (2) la zona de reacción. La optimización de la extracción se realizó mediante una serie de experimentos en los que se estudió la concentración de los extractantes, mientras que la optimización de la reacción de Folin-Ciocalteu se efectuó mediante la determinación de la influencia del pH de la solución amortiguadora y la concentración del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Una vez establecidas las condiciones óptimas, para cada extractante se construyó una curva de calibración con estándar ácido tánico en medio acuoso y posteriormente se realizó la extracción a diez muestras de aceites vegetales comerciales y se compararon los resultados con un método de extracción en lote (Chávez, 2017).

## 2. Marco Teórico.

### 2.1 Aceites vegetales.

De acuerdo con la FAO (CODEX STAN 210-1999), los aceites vegetales son aquellos productos alimenticios obtenidos mediante extracción con solventes o por presión mecánica mediante prensado de fuentes vegetales. Además, acorde con la NMX-F-223-SCFI-2011, los aceites vegetales pueden contener uno o más aceites comestibles siempre y cuando provengan de cualquiera de las siguientes plantas oleaginosas o de sus variedades biotecnológicas aprobadas para la alimentación humana: ajonjolí, algodón, cacahuate, canola, cártamo, girasol, maíz, olivo, palma, soya o de cualquier otra oleaginosa aprobada para consumo humano por la Secretaría de Salud.

La composición de los aceites vegetales es muy variada, ya que están constituidos por una mezcla heterogénea de componentes, entre los que se encuentran principalmente glicéridos de ácidos grasos, y en menor proporción, otros lípidos como fosfátidos, constituyentes insaponificables, ácidos grasos libres, compuestos fenólicos (flavonoides, alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos y lígnanos), tocoferoles, tocotrienoles, esteroides y carotenos (Chávez, 2017). Dicha composición depende de varios factores como lo es el tipo fruto o semilla a utilizar, la variedad y las condiciones agronómicas, entre otros. De manera general, su composición suele dividirse en dos fracciones: la mayoritaria y la minoritaria. A continuación, se describen ambas.

#### (A) Fracción mayoritaria.

Está compuesta principalmente (>95 %), por una mezcla de triacilglicerol. Sin embargo, también se encuentran presentes en una fracción mucho menor: diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres.

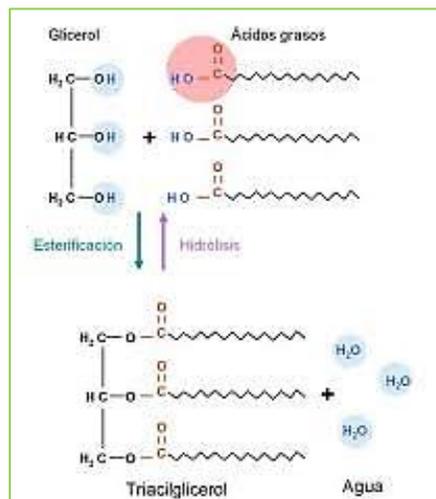
#### ➤ Ácidos grasos libres.

La presencia de ácidos grasos libres da al aceite su carácter ácido, dependiendo de su concentración. Sin embargo, estos compuestos se encuentran

libres en el aceite sólo en pequeñas concentraciones debido a que tienden a formar triglicéridos al combinarse con glicerol (Chávez, 2017). Los ácidos oleico, linoleico y palmítico son los que se encuentran en una mayor proporción (Pérez, Ramírez y Villanueva, 2005).

➤ Triacilgliceroles.

Son ésteres provenientes de la unión de glicerol con ácidos grasos (*Figura 1*) y pueden estar compuestos del mismo o de diferentes ácidos grasos. Los triacilgliceroles oleico-oleico-linoleico, oleico-oleico-oleico, oleico-linoleico-linoleico, palmítico-oleico-linoleico y palmítico-oleico-oleico, son los que se encuentran en todos los aceites vegetales (Gunstone y Sanders, 2002).



**Figura 1.** Representación esquemática de la formación de triglicéridos.

➤ Mono y diglicéridos.

La presencia de glicéridos parciales en los aceites vegetales se debe principalmente a la biosíntesis incompleta de triacilgliceroles (1,2-diacilglicerol) o a las reacciones hidrolíticas de los mismos (1,3-diacilglicerol). Es importante señalar que las condiciones de almacenamiento afectan la distribución de los ácidos grasos, donde los 1,2-diacilgliceroles presentes en el aceite fresco tienden a isomerizarse a los 1,3-diacilgliceroles más estables. Esta reorganización proporciona información sobre la antigüedad del aceite y las condiciones de almacenamiento (Boskou, 2006).

**(B) Fracción minoritaria.**

Corresponde a la fracción insaponificable y está compuesta principalmente por esteroides, alcoholes alifáticos, tocoferoles, pigmentos, compuestos fenólicos y volátiles. Dicha fracción varía en mayor medida entre cada tipo de aceite vegetal, por lo cual, su composición se abarcará más a detalle en los apartados de los aceites analizados.

Finalmente, es importante saber que algunos aceites, como el de oliva extra virgen, se usan sin tratamiento adicional, pero la mayoría sufre un proceso de refinación (química o física) en alguna medida antes de su uso. Los procesos de refinación eliminan compuestos indeseables como fosfolípidos, monoacilgliceroles, diacilgliceroles, ácidos libres, pigmentos, colorantes y metales traza, así como compuestos valiosos como lo son los antioxidantes y las vitaminas (Gunstone, 2002). Por lo cual, el diseño del proceso de obtención del aceite debe realizarse para maximizar la eliminación de compuestos indeseables y minimizar la de los compuestos valiosos.

**2.2 Aceite de oliva.**

De acuerdo con la FAO (CODEX STAN 33-1981), el aceite de oliva es el aceite obtenido únicamente del fruto del olivo (*Olea europea L.*), se excluyen los aceites obtenidos usando disolventes o procedimientos de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otro tipo.

El árbol de olivo (*Figura 2*) es uno de los árboles cultivados más antiguos en el mundo y su aceite ha sido utilizado por el hombre para diversas tareas desde la antigüedad. Tanta ha sido su importancia, que algunos historiadores actuales consideran al olivo como un marcador cultural y un parteaguas para explorar el desarrollo de las civilizaciones (Boskou, 2008). Sus orígenes se remontan a unos 4,000 años a.C., en la región geográfica que abarca desde el sur de Cáucaso hasta las altiplanicies de Irán, Palestina y la zona costera de Siria (Chávez, 2017). Con el paso del tiempo se extendió hasta poblar los países de Mediterráneo y ha tenido tanto auge que ahora se cultiva en muchos países.

El creciente entusiasmo se debe en gran parte a los estudios que indican que la dieta enfocada en el aceite de oliva desempeña un papel positivo en la prevención de ciertas enfermedades, especialmente las enfermedades cardiovasculares (Gunstone, 2002).

### **2.2.1 Características del fruto del olivo.**

El fruto del olivo, llamado oliva o aceituna (*Figura 2*), es un fruto pequeño de forma elipsoidal que mide 1 a 4 cm de longitud y de 0.6 a 2 cm de diámetro (Barranco, Fernández y Rallo, 2008). De acuerdo con su definición botánica, se trata de una drupa, es decir, un fruto con una sola semilla compuesta por tres tejidos principales:

- I. Endocarpio: cáscara leñosa que encierra la semilla y que posee pequeñas cantidades de aceite.
- II. Mesocarpio: también denominada pulpa, es la parte de la aceituna que contiene la mayor cantidad de aceite y representa de un 70 a 90% en relación con el peso total del fruto.
- III. Exocarpio: es una membrana externa y lisa, que cambia de color de verde a morado a medida que el fruto madura.



**Figura 2.** Árbol de olivo plantado en Jaén, España (izquierdo) y su fruto en diferentes estados de maduración (derecho).

### **2.2.2 Proceso de elaboración.**

El aceite de oliva se obtiene por medio de mecanismos u otros medios en donde las condiciones son establecidas para no causar ningún cambio en las

propiedades del aceite. Los pasos para la obtención del aceite se describen a continuación:

- Recolección de la aceituna.

Generalmente, las aceitunas deben recolectarse de los olivares a finales de otoño y comienzos de invierno, temporada en la que poseen su máximo nivel de aceite (20-30 % de aceite) y de ácidos grasos en la pulpa. Esto ocurre cuando la mayoría ha cambiado de verde a violáceo, termino conocido como envero (*Figura 2*); sin embargo, cada variedad tiene un tiempo de cosecha diferente, por lo cual se proporciona especial atención en la recolección de la aceituna ya que la maduración está vinculada con el rendimiento, el nivel de acidez, la composición y las características sensoriales del producto que se obtendrá.

La recolección se realiza tanto de forma manual como por medio de equipos mecanizados. Dentro de los sistemas de recolección manual, se encuentra el ordeño (recolección con mano y depósito en saco), el rastrillo (se “peinan” y las aceitunas se recolectan en una red) y el vareo (se golpean las ramas con varas); mientras que la recolección mecanizada se realiza mediante un vareador eléctrico que induce la caída de las aceitunas. Independientemente de la forma de recolección, se busca que el fruto no se maltrate.

- Limpieza.

Una vez recolectadas las aceitunas, son trasladadas a la almaraza, donde se limpian y se criban, esto se realiza con la finalidad de eliminar las impurezas que acompañan a las aceitunas. Para ello, los frutos se ventean en seco para excluir las hojas y luego se ingresan en una línea de lavado a fin de remover piedras, tierra y cualquier otra suciedad adherida.

- Molturación o molienda.

En las frutas, el aceite está distribuido en forma de gotitas alojadas en distintas partes de las células, por lo que, las aceitunas al ser sometidas a la

molienda por mortero o molino de rulo, sufren la ruptura de las células y la subsecuente liberación de gotas de aceite de la cavidad interna (vacuola).

- Amasado.

Debido a que el aceite está en forma de pequeñas gotas rodeadas por una pseudo-membrana anfótera que tiende a mantener al aceite en un estado de emulsión, es necesario realizar una acción mecánica que permita formar gotas de mayor tamaño que generen la inestabilidad de la emulsión y la consecuente liberación del aceite. En este caso, el amasado tiene el objetivo de romper la emulsión existente entre aceite y agua, mediante la fusión de gotas de aceite hasta la formación de gotas más grandes (“bolsillos”). Para ello, se somete la aceituna molida a la acción de un movimiento continuo a una temperatura mayor a la del ambiente. Generalmente las batidoras empleadas tienen palas, que mueven de manera lenta pero continua la pasta en un recipiente semicilíndrico, y una camisa exterior por donde circula agua caliente para facilitar la extracción del aceite (Chávez, 2017).

- Separación.

Una vez amasada la pasta de aceitunas es necesario separar el agua y el aceite. La separación puede realizarse por medio de dos técnicas, una conocida como *extracción por presión*, en la cual la pasta se somete a una presión en frío, y otra, la *centrifugación*, en la que la pasta es sometida a la acción de una fuerza centrífuga (centrífuga horizontal o Decanter) que separa los distintos componentes por diferencia de densidades.

- Almacenamiento.

Para conservar inalteradas las cualidades del aceite, se almacenan en depósitos de acero inoxidable, en oscuridad y reposo, a temperaturas bajas y constantes (entre 15 – 18 °C). Pero debido a que el aceite que sale de la separación aun contiene impurezas sólidas y agua, se lleva a cabo la decantación de dichas impurezas y el traspaso del aceite limpio a un nuevo tanque mediante bombeo.

---

---

### 2.2.3 Denominaciones.

El aceite de oliva se comercializa bajo diferentes denominaciones, dependiendo de su manera de obtención y el valor de acidez libre (expresada en ácido oleico), y se definen a continuación de acuerdo con las normativas: Norma Mexicana NMX-F-109-SCFI-2014, Consejo Oleícola Internacional y CODEX STAN 33-1981.

- a) Aceite de oliva virgen: son los aceites obtenidos del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. Posee una acidez libre de no más de 2 g por 100 g.

Dentro de los aceites vírgenes se encuentra la siguiente clasificación:

- ❖ Aceite de oliva extra virgen: aceite con una acidez libre de no más de 0.8 g por 100 g
  - ❖ Aceite de oliva virgen ordinario: aceite con una acidez libre de no más de 3.3 g por 100 g.
- b) Aceite de oliva refinado: aceite de oliva obtenido de aceites vírgenes de oliva por métodos de refinación que no llevan a alteraciones en la estructura glicérica inicial. Tiene una acidez libre de no más de 0.3 g por 100 g.
- c) Aceite de oliva: aceite que consiste en una mezcla de aceite de oliva refinado y aceites vírgenes de oliva adecuada para consumo humano. Tiene una acidez libre de no más de 1 g por 100 g.
- d) Aceite de orujo de olivo crudo: es el aceite obtenido por el tratamiento de la pasta del orujo del olivo con solventes u otros tratamientos físicos, con la exclusión de aceites obtenidos por procesos de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otro tipo.
- e) Aceite refinado de orujo de oliva: aceite obtenido del aceite crudo de orujo de oliva por métodos de refinación que no llevan a alteraciones de la

estructura glicérica inicial. Tiene una acidez libre de no más de 0.3 g por 100 g.

- f) Aceite de orujo de oliva: aceite que consiste en una mezcla de aceites refinados de orujo de oliva y aceites de oliva vírgenes. Tiene una acidez libre de no más de 1 g por 100 g.

#### **2.2.4 Composición de la fracción minoritaria del aceite de oliva.**

La composición del aceite de oliva varía en función de diversos factores como son: variedad de la aceituna, grado de maduración, condiciones agronómicas y características tecnológicas de producción (Chávez, 2017).

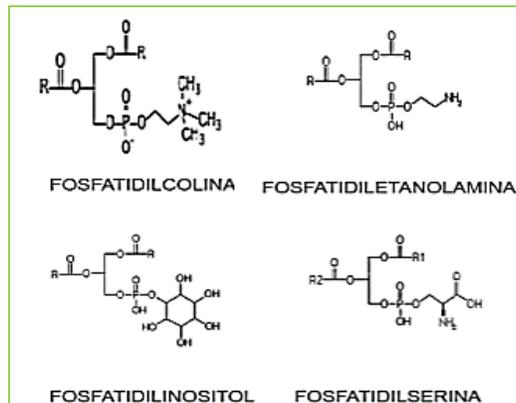
Aunque esta fracción representa sólo un pequeño porcentaje de toda la composición del aceite de oliva (0.5 a 1.5 %), incluye una gran variedad de compuestos químicos por lo que resulta extremadamente difícil determinar su composición por completo, debido a su naturaleza compleja y baja concentración. Además, algunos de estos constituyentes sólo son localizados en el aceite crudo, ya que el proceso de refinación elimina algunos de estos compuestos, como es el caso de los compuestos fenólicos y los fosfolípidos.

Las diversas clases de constituyentes menores se pueden dividir en dos grupos: (1) Derivados de ácidos grasos tales como fosfolípidos, ceras y ésteres de esteroides y (2) Compuestos no relacionados químicamente con los ácidos grasos: hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, clorofilas y compuestos fenólicos.

- Derivados de ácidos grasos.
  - Fosfolípidos.

Los principales fosfolípidos presentes en el aceite de oliva son: la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, el fosfatilinositol y la fosfatidilserina (*Figura 3*), los cuales se encuentran en una cantidad de 20-156 mg/kg de aceite. El nivel de fosfolípidos resulta importante porque estos compuestos presentan actividad antioxidante, de acuerdo con los estudios de Pokorny y Korczak (2001), estos

lípidos pueden actuar como sinergias (regeneración de antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol u otros fenoles) o como eliminadores de metales.



**Figura 3.** Estructura química de los principales fosfolípidos.

- Ceras.

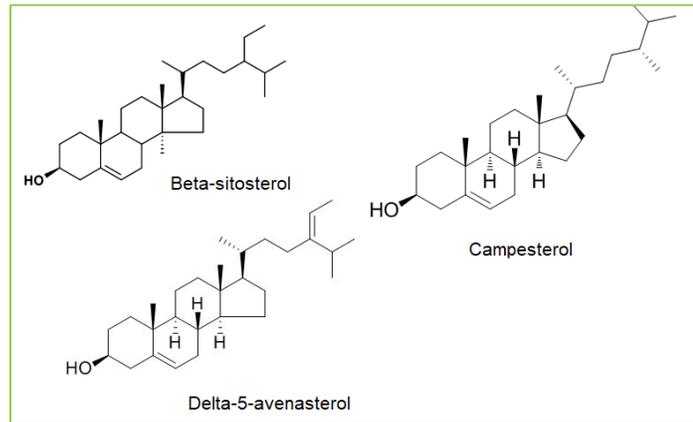
Las ceras son ésteres de alcoholes con ácidos grasos y generalmente están en una concentración muy baja, de 35 a 100 mg/kg. Las principales ceras identificadas en el aceite de oliva son los ésteres C<sub>36</sub>-C<sub>46</sub>, pero toda la fracción es muy compleja debido a la presencia de varios tipos de alcoholes y de ésteres (saturados e insaturados, de cadena recta, de números pares) (Reiter y Lorbeer 2001).

Sin embargo, la cantidad de ceras puede incrementar debido al incremento de la velocidad de esterificación proveniente del aumento en la concentración de ácidos grasos libres por la hidrólisis de los triglicéridos.

- Esteroles y sus ésteres.

Los esteroides son lípidos insaponificables relacionados con la calidad del aceite y se usan ampliamente para verificar su autenticidad. Los principales esteroides del aceite de oliva son (*Figura 4*):  $\beta$ -sitosterol,  $\delta$ -5-avenasterol y campesterol, con valores comprendidos entre los 1130 y los 2650 mg/kg de aceite, siendo el  $\beta$ -sitosterol el que se encuentra en mayor cantidad.

Los esteroides pueden estar presentes de forma libre o esterificada, representando esta última forma el 10-15 % de los esteroides totales.



**Figura 4.** Estructura química de los principales esteroides del aceite de oliva.

- Compuestos no relacionados con ácidos grasos.
  - Hidrocarburos.

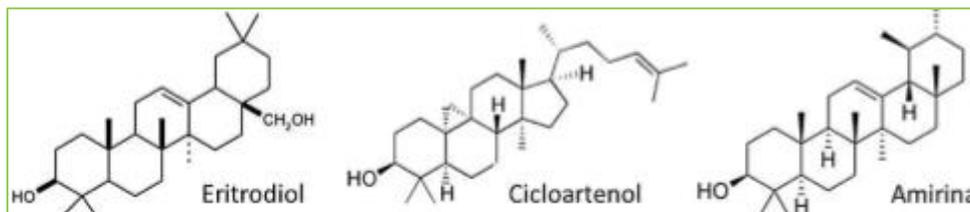
En el aceite de oliva están presentes dos hidrocarburos en cantidades considerables, que son el escualeno y el  $\beta$ -caroteno (este último se discute en la sección de pigmentos). La importancia de la presencia de escualeno se atribuye a que se considera parcialmente responsable de los efectos benéficos para la salud por consumo de aceite de oliva y por su acción quimiopreventiva contra ciertos cánceres (Rao, Newmark y Reddy, 1998; Smith, Yang, Seril, Liao y Kim, 1998; Boskuo, 2006).

El escualeno, se encuentra en el aceite de oliva virgen en concentraciones que oscilan entre 0.7 y 12 g/kg y representa más del 50% de la fracción insaponificable del aceite. Sin embargo, el contenido de escualeno se reduce drásticamente durante el proceso de refinación y puede variar con el tipo de cultivo y la tecnología de extracción aplicada.

- Alcoholes.

Entre los alcoholes presentes en el aceite de oliva se encuentran por un lado los alcoholes alifáticos, en una concentración aproximada de 200 mg/kg de aceite, estos consisten en alcoholes lineales saturados con más de 16 átomos de carbono, siendo los de mayor importancia: docosanol, tetracosanol, hexacosanol y octacosano.

Por otro lado, los alcoholes diterpénicos que han sido identificados son: fitol (a una concentración de 120-180 mg/kg) y geranilgeraniol (50 mg/kg). Finalmente, los principales alcoholes triterpénicos (350 a 1500 mg/kg) en el aceite de oliva son:  $\beta$ -amirina, cicloartenol y eritrodiol (*Figura 5*). Éste último tiene la característica de presentar actividad antioxidante y antiinflamatoria.



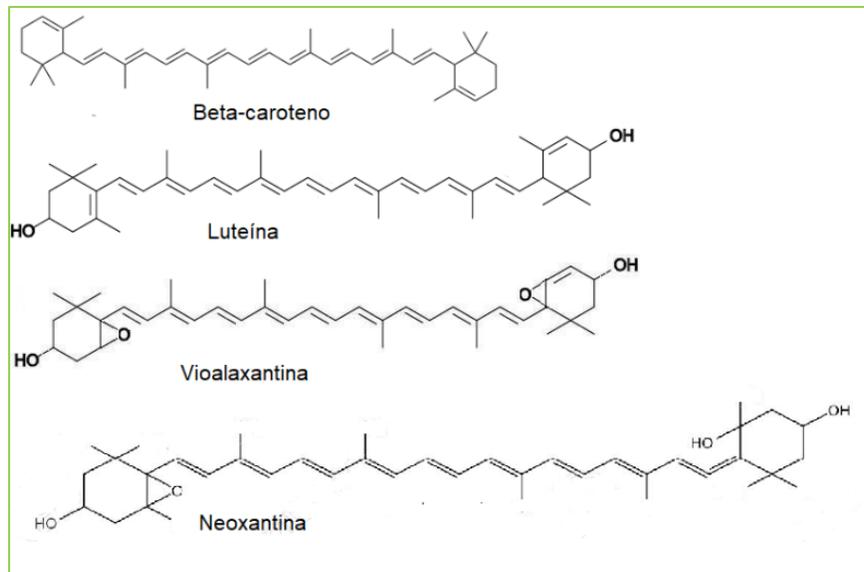
**Figura 5.** Estructura química de los alcoholes triterpénicos del aceite de oliva.

- Pigmentos.

El color del aceite de oliva puede variar desde verde (claro u oscuro) a amarillo debido a la presencia de diferentes cantidades de clorofila y carotenoides. Dicha variación está influenciada por el tipo y modo de cultivo, el índice de maduración, la zona de producción, el sistema de extracción y las condiciones de almacenamiento (Gunstone, 2002). Por lo tanto, se considera como un índice de calidad, aunque no exista un método estandarizado para su medición.

Los principales carotenoides presentes en el aceite de oliva son el  $\beta$ -caroteno y la luteína y en menor cantidad la violaxantina y la neoxantina (*Figura 6*). Su concentración total pueda oscilar entre 1-20 mg/kg, y además de proporcionar el color amarillo, los carotenoides funcionan como inhibidores del oxígeno singulete protegiendo al aceite de la fotooxidación.

Por otro lado, las clorofilas, son las responsables de los tonos verdosos y se encuentran en una concentración de 10 a 30 mg/kg, predominando la feofitina  $\alpha$ , la cual representa del 70 al 80 % del total de los pigmentos.

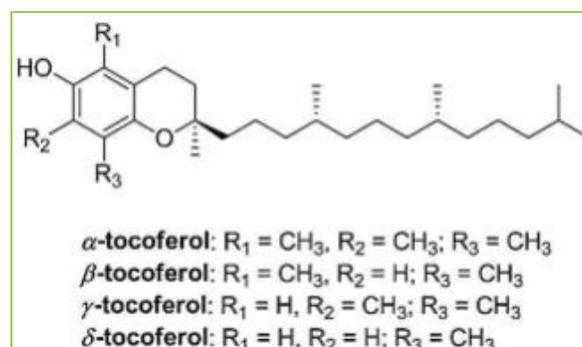


**Figura 6.** Estructura química de los principales carotenos del aceite de oliva.

- Tocoferoles.

Los tocoferoles (*Figura 7*) son vitaminas liposolubles que contribuyen a la estabilidad del aceite, ya que tienen un papel importante como inhibidores de los radicales libres. Las concentraciones pueden oscilar entre 5 y 300 mg/kg, presentando mayor acción antioxidante a concentraciones bajas y en ausencia de antioxidantes más efectivos como los fenoles.

El tocoferol que se encuentra en mayor proporción es el  $\alpha$ -tocoferol, que representa el 95 %, mientras que el 5 % restante corresponde a una mezcla de  $\beta$  y  $\gamma$ -tocoferol.



**Figura 7.** Estructura química de los tocoferoles.

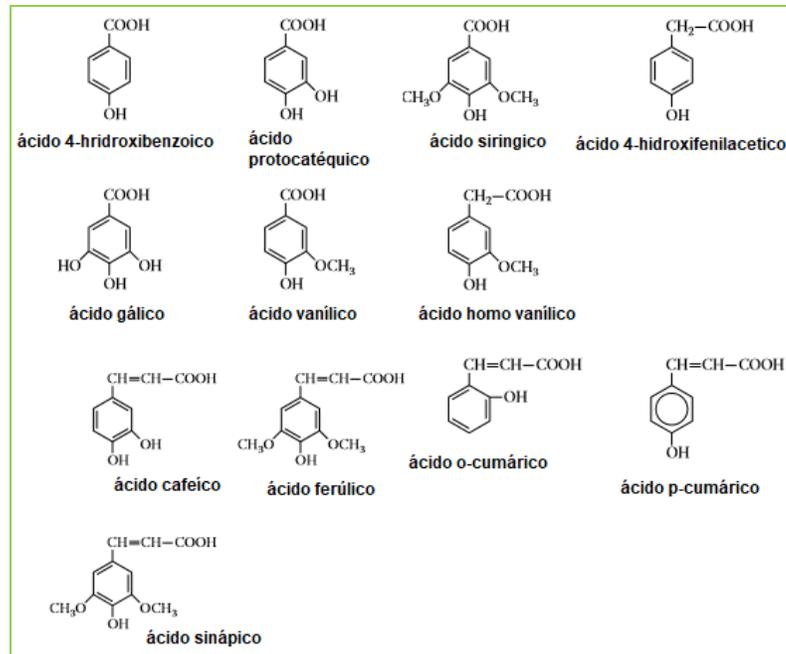
- Compuestos fenólicos.

El aceite de oliva tiene un lugar único entre los aceites vegetales debido a sus componentes minoritarios, ya que algunos estudios han asociado a estos constituyentes con beneficios en la salud humana. De estos, los compuestos fenólicos son los de mayor importancia, los cuales se denominan generalmente como “polifenoles” aunque no todos sean compuestos polihidroxilados.

Aunque la pulpa (mesocarpio) del fruto del olivo contiene cantidades elevadas de estos compuestos (20-50 g/kg), los aceites contienen concentraciones mucho menores debido a su naturaleza hidrofílica, ya que se pierden en la fase acuosa durante el proceso de extracción en la elaboración del aceite. El contenido de polifenoles difiere de un aceite a otro, y puede encontrarse entre 50-1000 mg/kg, ya que existen muchos factores que afectan su contenido, como son: el nivel de maduración del fruto, la variedad de aceituna y diferencias agronómicas del cultivo, el sistema de extracción empleado: tipo de maquinaria y tiempo de extracción, y los procesos de filtración y refinado.

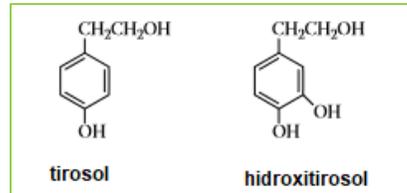
La fracción fenólica consiste en una mezcla heterogénea de componentes en donde se engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Dichos compuestos están vinculados tanto en el sabor y aroma del aceite, como con su capacidad de conservación, debido a que son considerados como un sistema químico de defensa del fruto por su acción antioxidante y antimicrobiana. Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva se dividen en las siguientes clases (Boskou, 2008):

- I. Ácidos fenólicos: 4-hidroxibenzoico, protocatéuico, gálico, vanílico, siríngico, homovanílico, 4-hidroxifenilacetico, o-cumárico, p-cumárico, cafeico, ferúlico y sináptico (*Figura 8*). Son metabolitos secundarios que se encuentran presentes en pequeñas cantidades, alrededor de 1 mg de analito/kg de aceite, y están asociados a cualidades sensoriales.



**Figura 8.** Estructura química de los principales ácidos fenólicos del aceite de oliva.

- II. Alcoholes fenólicos: tirosol [(p-hidroxifenil)etanol] e hidroxitirosol [(3,4-dihidroxifenil) etanol] (*Figura 9*).



**Figura 9.** Estructura química del tirosol y hidroxitirosol.

- III. Lignanos: (+)-1-acetoxipinoresinol, siringaresinol, (+)-pinoresinol y (+)-1-hidroxipinoresinol (*Figura 10*), y se encuentran en concentraciones de 100 mg/kg de aceite.

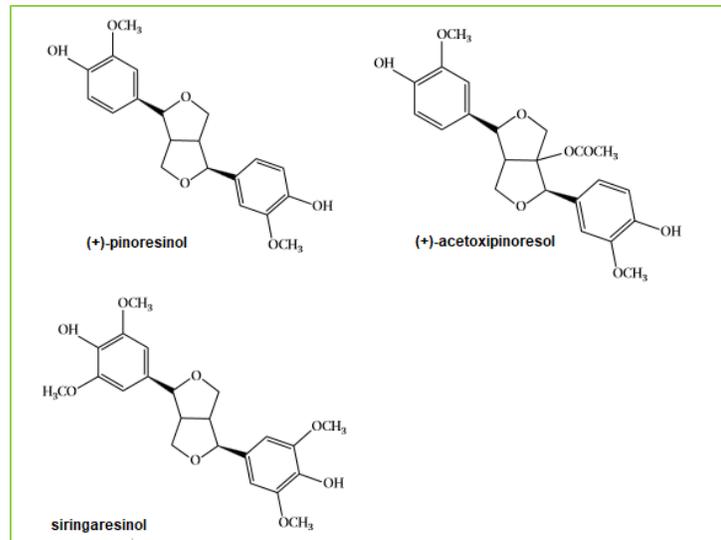


Figura 10. Estructura química de los principales lignanos del aceite de oliva.

IV. Flavonoides: apigenina, luteolina y taxifolina (Figura 11).

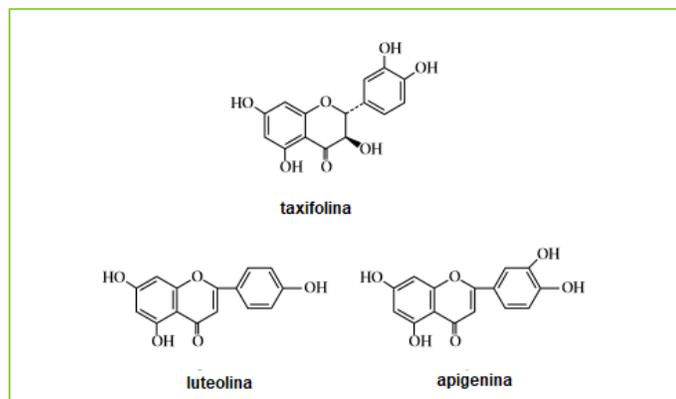


Figura 11. Estructura química de los flavonoides presentes en el aceite de oliva.

V. Otros fenoles: vainillina y 4-etilfenol (Figura 12).

VI. Compuestos no fenólicos: ácido cinámico, ácido elenólico, secoiridoides (ligustrósido y oleuropeína) (Figura 12).

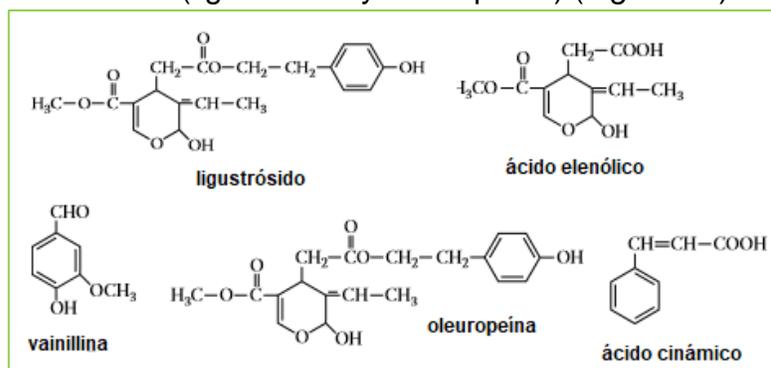


Figura 12. Otros compuestos fenólicos y no fenólicos presentes en el aceite de oliva.

### **2.3 Aceite de Aguacate.**

De acuerdo con la Norma mexicana NMX-F-052-SCFI-2008, el aceite de aguacate es aquel que se obtiene de la extracción física de la pulpa y la semilla del fruto del árbol del aguacate *Persea americana*. Actualmente se ha establecido un creciente consumo y producción de este fruto y su aceite debido a que ha sido reconocido como una buena fuente de energía, bajo en sodio, con alto contenido de ácidos grasos insaturados, vitamina E, ácido ascórbico, vitamina B<sub>6</sub>, β-caroteno, y potasio (Restrepo, Lodoño, González, Benavides y Cardona, 2012). Contiene más de 20 nutrientes esenciales, algunos de ellos relacionados con la inhibición de tumores cancerígenos. Además, se conoce que ayuda a reducir las lipoproteínas de baja densidad y el contenido de triglicéridos en la sangre, por lo tanto, disminuye el riesgo de desarrollar arterosclerosis (SAGARPA, 2011).

#### **2.3.1 Características del aguacate.**

El aguacate pertenece a la familia de las *lauráceas* que, a diferencia de muchas frutas, tiene un proceso de maduración que no se lleva a cabo en el árbol si no que toma lugar varios días después de que se haya cortado el fruto. Actualmente se reconocen tres razas o variedades botánicas: *auácatl* (de México), *quilauácatl* (de Guatemala), y *tlacozalauácatl* (de Centroamérica) que dan lugar a una gran cantidad de híbridos.

El cultivo y consumo del aguacate, data de los primeros grupos humanos provenientes de la cueva de Coxcatlán en Tehuacán, Puebla. Con el paso del tiempo se han dado a conocer sus propiedades benéficas en la salud humana por su alto contenido de calorías, proteínas, lípidos y vitaminas (particularmente A), así como de potasio, fósforo y calcio. Actualmente, además de los frutos frescos, se utiliza la pulpa congelada, deshidratada, y los extractos de aceite para la industria cosmética y alimentaria.

El aguacate es una baya monosperma, en forma de pera, que a grandes rasgos presenta tres partes:

- Exocarpio o cáscara: Representa de un 12 a 16% del peso del fruto. Generalmente es rugosa y pasa de color verde claro o verde oscuro a negro conforme va madurando (*Figura 13*).
- Mesocarpio o pulpa: es la porción comestible de la fruta y representa del 60-74% del peso de la fruta. Es de color verde amarillento, y consta de células que poseen gotas de aceite, dicha cantidad de aceite aumenta conforme las células se encuentran más cerca de la semilla.
- Semilla o hueso central muy grande, compuesto por una cubierta seminal y un embrión. Representa un 20 a 27% del peso del fruto y contiene una cantidad mínima de aceite.



**Figura 13.** Fruto de aguacate en diferentes estados de maduración.

### **2.3.2 Proceso de elaboración del aceite de aguacate.**

Para los procesos productivos del aceite de aguacate se necesita extraer la mayor porción de aceite del fruto, por lo que se utiliza la pulpa, que puede llegar a contener de un 15 a 30% de acuerdo con la variedad. Sin embargo, también se extrae el aceite de la semilla, aunque la cantidad de aceite presente sea mínima en comparación con la obtenida de la pulpa (1.87%); este aceite aporta una mayor cantidad de ácidos grasos poli-insaturados (46.73%) que el aceite de la pulpa (9.61%).

Para la extracción del aceite, los frutos deben de ser recolectados de los árboles que hayan sido sembrados hace cinco años (SAGARPA, 2011), y después de que hayan madurado son lavados y pelados. Existe una gran variedad de técnicas de extracción del aceite de aguacate, entre las que destacan (Rodríguez, 2014):

- Centrifugación: El proceso de centrifugado se realiza en equipos que utilizan la fuerza centrífuga y la diferencia de densidades entre el agua y el aceite. La obtención del aceite se realiza a temperaturas menores de 45°C, lo que permite que no se modifiquen las propiedades nutricionales del aceite. Para ello, se realizan varias extracciones para asegurar que se ha retirado la mayor cantidad de aceite de la pulpa.
- Uso de disolventes: permite separar los componentes de una solución debido a la distribución desigual de los mismos entre dos líquidos inmiscibles. En esta técnica se utilizan disolventes como éter de petróleo, hexano y la mezcla cloroformo-metanol.
- Procesamiento por prensado en frío: es el método más común para la obtención del aceite y se lleva a cabo bajo el mismo método que para la extracción del aceite de oliva. La diferencia entre ambos métodos consiste en que la pulpa es dirigida a la máquina mezcladora para ser batida a una temperatura entre 25°C y 45°C; de allí, los restos son transportados a la centrifugadora, la cual va a separar el aceite de la pulpa y posteriormente se somete dos procesos de filtrado.
- Procesamiento físico-mecánico con enzimas: la pulpa es pretratada con tres complejos enzimáticos (Pectinex, Olivex y la mezcla de ellos), a continuación, es sometida a una presión de 100 kg/cm<sup>2</sup> en una prensa hidráulica. Finalmente, la mezcla óleo-acuosa obtenida es centrifugada a 4750 rpm para separar el aceite crudo.

Para cada una de las metodologías anteriormente descritas, el estado de madurez de la fruta refleja el rendimiento de extracción del aceite debido a que en la maduración del fruto la cantidad de agua se reemplaza por aceite (SAGARPA, 2015). Por lo cual, estudios recomiendan el uso de aguacate sobremadurado (*Figura 13*) para la obtención de mayor cantidad y calidad de aceite.

### 2.3.3 Denominaciones.

El aceite de aguacate se comercializa bajo diferentes denominaciones dependiendo del proceso de obtención, estas se definen a continuación, de acuerdo con Norma Mexicana NMX-F-052-SCFI-2008.

- a) Aceite puro de aguacate: es obtenido directamente de su extracción sin proceso de refinación.
- b) Aceite de aguacate refinado: es el producto obtenido del aceite crudo de aguacate cuando éste es sometido a un proceso de refinación (física o química).
- c) Aceite puro comestible de aguacate: es el producto con el 98.5% como mínimo del aceite de aguacate refinado.

Sin embargo, solo el aceite puro comestible de aguacate es el que se establece como producto comercial para consumo humano, el cual se clasifica en dos grados de calidad según la Norma Mexicana NMX-F-052-SCFI-2008.

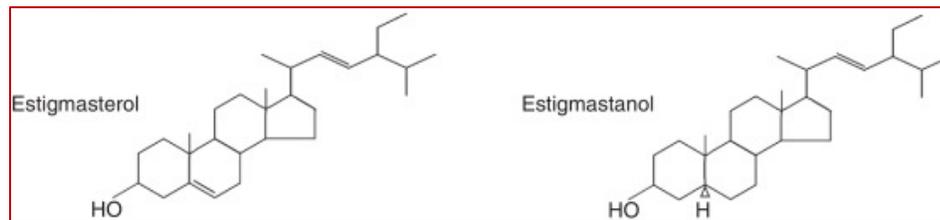
### 2.3.4 Composición de la fracción minoritaria.

El aceite de aguacate presenta una composición variada debido a las diferentes especies e híbridos que se cultivan (desde México hasta Nueva Zelanda), las condiciones agronómicas, así como el método de extracción empleado. Además, aunque no hay referencias de la composición específica del aceite, se sabe que posee una composición química muy similar al del aceite de oliva, aunque tiene niveles más altos de vitamina E, beta-sitosterol y clorofila, y niveles más bajos de escualeno y polifenoles (López, s/f). A continuación, se describen cada una de las fracciones con la información disponible en la literatura; sin embargo, es importante mencionar que aún muchos compuestos no han sido determinados.

- Derivados de ácidos grasos.
  - Esteroles

En el aceite puro se encuentran presentes los fitoesteroles y fitoestanoles: beta-sitosterol, avenasterol, campesterol (*Figura 4, pág. 14*), estigmasterol y estigmastanol (*Figura 14*), siendo el de mayor proporción el beta-sitosterol. Los

niveles típicos de beta-sitosterol encontrados son de 4500 a 10000 mg/kg (López, s/f).



**Figura 14.** Estructura química de algunos esteroides presentes en el aceite de aguacate.

➤ Compuestos no relacionados con ácidos grasos.

- Tocoferoles.

El aceite de aguacate presenta un contenido de tocoferoles superior a los 200 mg/kg, incluso alcanzando niveles de 300 mg/kg, siendo el principal compuesto el  $\alpha$ -tocoferol con concentraciones alrededor de 70 a 190 mg/kg. Los tocoferoles  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  solo están presentes en cantidades menores (<10 mg/kg de aceite). Las estructuras se muestran en la *Figura 7*(pág. 17).

- Pigmentos.

Los principales compuestos responsables del color del aceite de aguacate son las clorofilas, presentando un alto contenido (40-60 mg/kg), lo que puede generar efectos adversos en la estabilidad oxidativa del aceite cuando se almacena bajo la exposición de la luz (s/a, 2002). Sin embargo, su característico color verde esmeralda resulta atractivo y aceptable para los consumidores.

También se pueden encontrar carotenoides, pero en concentraciones muy bajas, de 1.0-3.5 mg/kg de aceite (Wong, Requejo y Woolf, 2010), y la luteína (*Figura 6, pág. 17*) es la que se encuentra en mayor proporción (0.5-3.3 mg/kg).

## 2.4 Aceite de ajonjolí.

De acuerdo con la Norma Mexicana NMX-002-SCFI-2012, el aceite de ajonjolí es aquel obtenido por extracción mecánica y/o por extracción por disolventes de la semilla de la planta *Sesamum indicum* y/o de sus variedades naturales o biotecnológicas que sean aptas para el consumo humano.

El aceite obtenido de las semillas de sésamo, llamado "Tila" en sánscrito o simplemente "Til" en estos días, se ha utilizado como medicina ayurvédica doméstica en la India (Kochhar, P., 2002). Actualmente su siembra, producción y distribución se ha esparcido a lo largo del planeta ya que tanto la semilla como su aceite tienen propiedades benéficas, por su composición de ácidos grasos (ácido linoleico y linolénico) y su antioxidante natural llamado sésamo que es responsable de gran parte de sus propiedades, principalmente en lo que se refiere a sus actividades antioxidantes y antihipertensivas (Carretano, A., s/f).

#### **2.4.1 Características del ajonjolí.**

El ajonjolí, que también se conoce como sésamo, es la semilla aceitosa de la planta oleaginosa de la especie *Sesamum indicum L*, perteneciente a la familia *Pedaliaceae*. Su cultivo se remonta desde hace dos siglos antes de Cristo y se considera que tuvo su origen en Etiopía (África); sin embargo, conforme al tiempo se ha diversificado a India, Japón y China. Después del descubrimiento de América, fue llevado a México, y luego finalmente a países de Centro América con climas cálidos de zonas tropicales (Cortez y Sánchez, 2017).

La planta del ajonjolí es una planta herbácea anual que puede alcanzar hasta 2 m de altura y que durante su desarrollo forma unas vainas que poseen entre 15 y 20 semillas ovales aplastadas, de tamaño pequeño y con uno de los extremos terminados en punta (*Figura 15*).

Las semillas de sésamo o ajonjolí proporcionan entre un 50 y un 60% de aceite que contiene más de un 40% de ácidos grasos poliinsaturados y aproximadamente un 40% de ácidos grasos monoinsaturados, esteroides y tocoferoles y, una concentración importante de lignanos (sesamina, episesamina y sesamolina) (Carretero, A., s/f).



Figura 15. Cultivo de ajonjolí (izquierdo) y, vaina con ajonjolí (derecho).

#### 2.4.2 Proceso de elaboración.

La mayor parte de las semillas de ajonjolí son utilizadas para su distribución directa, sin embargo, ante el creciente auge de los beneficios del consumo de su aceite se ha extendido su producción, para ello se realizan los siguientes pasos (Vaca y Vásquez, 2001):

- Recolección.

Al madurar la vaina, esta eclosiona dispersando las semillas (dehiscencia). Debido a esto, se recomienda hacer la cosecha antes de que lleguen a la madurez fisiológica; es decir, se corta la planta cuando tenga las siguientes características: tallo amarillo, hojas de color amarillo, el fruto comienza a abrirse y la floración ha llegado al final. Después del corte (manual o por maquinaria), las plantas son agrupadas en pequeños manojos y son colocadas al sol, para facilitar el secado, la caída de las hojas y la recolección de las semillas.

Finalmente, cuando los manojos están secos, se golpean para favorecer la caída o liberación de la semilla, para posteriormente ser limpiadas, seleccionadas y secadas. Este último secado se le hace a la semilla con el propósito de reducir la humedad y alargar la vida de esta en el almacén.

- Descascarillado.

La semilla limpia entra a un proceso de molienda donde es sometida a una disolución de sosa cáustica y altas temperaturas, con el fin de separarla de la cutícula, obteniéndose el ajonjolí descortezado. Después, es pasado a través de

unas zarandas desecadoras y un horno que proporciona calor para hacer más eficiente el secado del ajonjolí.

Para el aceite de ajonjolí tostado, se realiza el tostado a una temperatura de 160° C por 25 minutos. Este proceso facilita el escurrimiento del aceite a través de las paredes celulares de la semilla, en comparación con las semillas no tostadas.

- Extracción.

La extracción generalmente se lleva a cabo por prensado en frío, como el aceite de oliva, pero a diferencia de que sufre dos procesos de filtración y finalmente un proceso de refinación. El proceso de refinación beneficia la calidad y durabilidad del aceite de ajonjolí, pues la sesamina se transforma durante el refinado en lignanos fenólicos, sesamol y sesaminol que presentan actividad antioxidante.

#### **2.4.3 Denominaciones.**

El aceite de ajonjolí se comercializa bajo una sola denominación y un único tipo y grado de calidad que se define a continuación de acuerdo con la Norma Mexicana NMX-F-002-SCFI-2012, como:

*“Aceite comestible puro de ajonjolí: Es el producto con el 99 % como mínimo del aceite de ajonjolí refinado”*

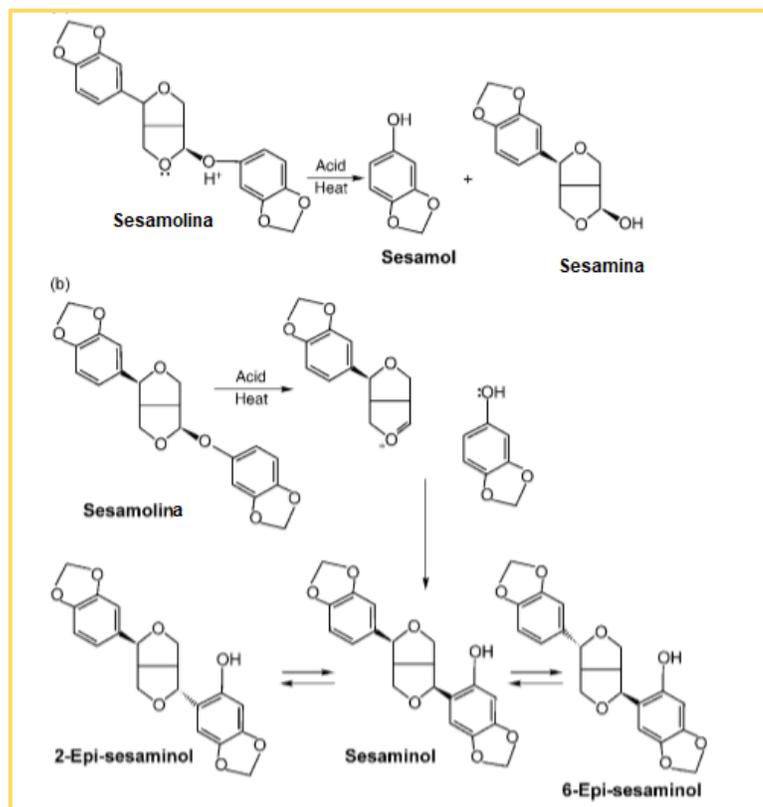
Siendo el ajonjolí refinado, aquel obtenido del aceite crudo de ajonjolí cuando éste es sometido a un proceso de refinación que puede ser por vía de refinación física o refinación química.

#### **2.4.4 Composición de la fracción minoritaria.**

Como en muchos aceites vegetales comunes, el aceite de ajonjolí consiste principalmente en triacilgliceroles (88.9%), que representan la fracción mayoritaria. Sin embargo, comparado con otros aceites vegetales, contiene un porcentaje relativamente alto de materia insaponificable (1–3%) que incluye esteroides (0.51 a 0.71 %), ésteres de esteroles, tocoferoles, fosfolípidos (2.8%) y compuestos únicos llamados ligninas de sésamo (Gunstone y Kochhar, 2002).

Dentro de los esteroides totales, se encuentran desmetil esteroides (85-89%), monometil esteroides (9-11%) y dimetil esteroides (2-4%); siendo, el  $\beta$ -sitosterol (62–67%), el campesterol (15–20%), el estigmasterol (5–8%) y el  $\Delta$ -avenasterol (7–10%), los esteroides en mayor proporción tanto en forma esterificada como libre. Los tocoferoles se encuentran en una concentración de 400 a 700 mg/kg, siendo el  $\gamma$ -tocoferol el más predominante (96-98%) y en menor proporción el  $\delta$ -tocoferol (2-3%).

Finalmente, la semilla de ajonjolí presenta lignanos denominados sesamolina (0.02-0.59%) y sesamina (0.02-1.13%), que se extraen en el proceso de obtención del aceite, sin embargo, parte de la sesamina se transforma durante el proceso de refinado a sesamol, sesaminol y sus isómeros (*Figura 16*), que presentan actividad antioxidante. Cabe mencionar que dicha composición se ve afectada por el genotipo, las condiciones agroclimáticas y las etapas de maduración.



**Figura 16.** Estructuras químicas de las diferentes ligninas de sésamo presentes en el aceite de ajonjolí.

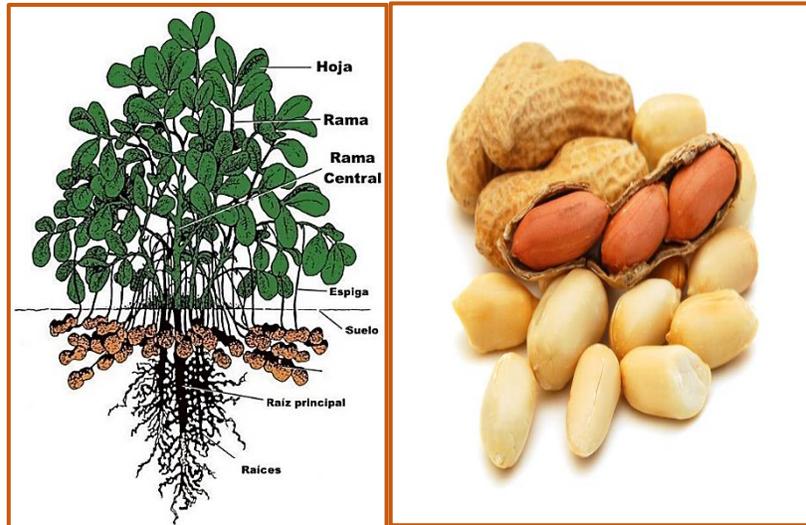
## 2.5 Aceite de cacahuete.

De acuerdo con la Noma Mexicana NMX-027-SCFI-2012, el aceite de cacahuete es aquel que se obtienen mediante extracción mecánica y/o por extracción por disolventes, de la semilla de cacahuete *Arachis hypogaea* L. y/o de sus variedades biotecnológicas que sean aptas para el consumo humano. Aunque creció durante muchos siglos, la importancia económica de los cacahuetes y el aceite de cacahuete ha aumentado rápidamente solo en el último siglo, debido a que un gran número de estudios epidemiológicos indican una asombrosa reducción de 30 a 50% en la enfermedad cardiovascular en personas que comían nueces, incluido el maní, de cuatro a cinco veces por semana (Gunstone y Sanders, 2002).

### 2.5.1 Características del cacahuete.

El cacahuete es una planta de la familia *Fabaceae* (leguminosas), originaria de las zonas cálidas de América, Brasil, las Antillas y México, y que se propagó cuando los exploradores descubrieron su gran versatilidad en la elaboración de varios productos (SAGARPA, 2002). Presenta un crecimiento de arbusto (de 30 a 80 cm), donde los frutos (vainas), crecen por debajo de la tierra y presentan una pared dura y rugosa color café crema, dentro de la que se desarrolla entre una y cuatro semillas (*Figura 17*). Son las semillas la parte comestible de la planta y a la que se le denomina cacahuete o maní.

Las semillas son ricas en proteínas, fibra, carbohidratos, vitaminas, nutrimentos inorgánicos y ácidos grasos no saturados; de esta forma, garantiza un buen aporte de energía y proteínas a sus consumidores. Por esta razón, en nuestro país el 12 % de la producción se destina a la elaboración de aceite y otros productos industrializados como: tintas, lápices labiales, colores, productos farmacéuticos, lubricantes especiales y jabones; el 88% restante de la producción se utiliza para consumo directo (SAGARPA, 2002).



**Figura 17.** Esquema de crecimiento de la planta de cacahuate (izquierda) y vaina de cacahuate con sus semillas.

### 2.5.2 Proceso de elaboración.

- Recolección.

Este proceso ocurre aproximadamente 4 meses después de la siembra, cuando la vaina presenta color café y la cutícula que envuelve la semilla ha adquirido un color rosa. Es importante arrancar las plantas en su punto óptimo de cosecha, ya que si se realiza antes, esto se traduce en una reducción del rendimiento; por otra parte, si la cosecha se hace después de tiempo, puede causar la germinación de las semillas o bien la dormancia de los frutos en la planta e incluso pudriciones del fruto que demeritan la calidad (SAGARPA, 2002).

La cosecha se realiza de manera mecánica con un arado, para que las plantas queden con los frutos expuestos en la superficie del suelo, posteriormente los frutos se desprenden de las plantas de forma mecánica o manual y finalmente se asolean durante tres o cuatro días para reducir la humedad hasta un 10 o 12%.

- Extracción.

Después del secado se retira la cáscara y la cutícula que recubre la semilla, para finalmente ser triturada en molinos y tamizada. Para la extracción del aceite se considera que la extracción con disolventes genera una mayor eficiencia al extraer cerca del 53.9% del aceite de la semilla (Cárdenas, Camacho y Mondragón, 2007).

En este proceso se aplica un sistema de extracción cíclica de los componentes que se encuentran en el grano con hexano, a continuación, se realiza la eliminación del disolvente por destilación continua. Posterior a la extracción, se realiza un proceso de filtración y de refinación.

### **2.5.3 Denominaciones.**

El aceite de cacahuete se comercializa bajo una sola denominación, y un único tipo y grado de calidad, que se define por la Norma Mexicana NMX-027-SCFI-2012, como:

*“Aceite comestible puro de cacahuete: Es el producto obtenido del aceite crudo de cacahuete cuando este es sometido a un proceso completo de refinación que se lleva a cabo por vía de refinación química y/o de refinación física”*

### **2.5.4 Composición de la fracción minoritaria.**

El aceite de cacahuete consiste principalmente en triacilgliceroles (95%), que representan la fracción mayoritaria, y en menor proporción la materia insaponificable (0.40%) que corresponde a la fracción minoritaria. Sin embargo, dicha relación depende de la maduración, el ambiente, la variedad y la exposición al sol.

La fracción minoritaria está conformada principalmente por esteroides, fosfolípidos, compuestos antioxidantes y pigmentos. Los fosfolípidos representan el 1%, siendo los principales los ácidos fosfatídicos, los fosfatidilgliceroles, las fosfatidiletanolaminas, los fosfatidilinositoides y las fosfatidilcolinas (*Figura 3*), los cuales presentan sinergia con los tocoferoles para retrasar el inicio de la oxidación de los lípidos.

Por otro lado, los esteroides presentes son  $\beta$ -sitosterol (2170 mg/kg), campesterol (490 mg/kg) y estigmasterol (360 mg/kg), sin embargo, estas cantidades disminuyen al llevar a cabo el proceso de refinación. En cuanto a los compuestos antioxidantes, los que se encuentran en mayor proporción son los tocoferoles, en una concentración de 100 a 650 mg/kg, la diferencia en este intervalo está dada por la variedad y el origen del cacahuete (Gunstone y Sanders, 2002).

## 2.6 Aceite de pepita de uva.

De acuerdo con el Proyecto de norma PROY-NOM-588-SCFI-2009, el aceite de pepita de uva es aquel que se obtiene mediante la extracción física y por disolventes de la semilla de la uva *Vitis vinifera*, contenida en los residuos del proceso de vinificación. La importancia del consumo del aceite de semilla de uva está dada por el alto contenido de ácidos grasos insaturados, principalmente ácido linoleico y oleico, además de la presencia de compuestos antioxidantes como los ácidos fenólicos, la flavan-3-oligomonómicos, ácidos fenólicos y proantocianidinas oligoméricas (Franco, Salomón, Morales, Castañeda y Rubí, 2015).

### 2.6.1 Características de la uva.

La vid es una planta con crecimiento en forma de enredadera, perteneciente a la familia de las *vitáceas*, cuyos frutos agrupados en forma de racimos (denominados uvas) poseen una morfología de baya redonda, pequeña y jugosa (*Figura 18*), y están compuestas de tres partes principales:

- Hollejo o piel: es la película exterior que corresponde al epicarpio y funciona como modo de protección de la fruta.
- Pulpa: es la fracción mayoritaria del fruto (75-85% del peso total) y donde se encuentran la mayoría de los nutrientes. Es la fracción que se utiliza para la fabricación del vino.
- Semilla: es la parte de la uva de donde se extrae el aceite (aproximadamente 9.25-14.7%), y es muy apreciada por la abundancia en compuestos polifenólicos, entre ellos flavonoides, catequinas, estilbenos y taninos, los cuales presentan alta actividad antioxidante, son cardioprotectores, antivirales, antibacterianos y brindan protección a rayos UV (Franco, et al., 2015). Están presentes hasta 4 semillas por fruto y se encuentran rodeadas por una membrana delgada.



Figura 18. Crecimiento y maduración de la uva.

### 2.6.2 Proceso de elaboración.

El proceso de obtención del aceite de pepita de uva consta de las siguientes etapas:

- Proceso de obtención de la pepita
  - Recolección de los racimos de uva: se realiza de 8 a 10 meses después de la salida de los primeros frutos, pues en dicho periodo la uva ha alcanzado la madurez. Esto es evidente por el cambio de color de verde por el amarillo o rojo-morado claro (*Figura 18*), según sea la variedad blanca o tinto.
  - Remoción de ramas
  - Prensado: se refiere a la obtención del mosto para la fabricación del vino, en el cual se tiene el residuo (orujos) que es de donde se obtiene el aceite
- Proceso de obtención del aceite
  - Extracción por disolventes:

El proceso comienza con el secado de los orujos, a más de 60°C. Luego se limpian las semillas y se procede a molerlas, donde se mezcla con dietil-éter o hexano y luego de un día de agitación se filtra la solución, quedando la molienda en los filtros y la disolución (disolvente-aceite) en los tanques de filtrado. Posteriormente, se procede a destilar la disolución en condiciones de alto vacío y temperatura cercana al punto de ebullición del disolvente que se use (Ricci, 2011).

- Refinación, blanqueo y deorizado.

### **2.6.3 Denominaciones.**

El aceite de pepita de uva se comercializa bajo una sola denominación, y único tipo y grado de calidad, que se define a continuación de acuerdo con el proyecto de norma PROY-NOM-588-SCFI-2009:

*“Aceite comestible puro de pepita de uva: producto obtenido del aceite crudo de uva cuando este es sometido a un proceso de refinación, blanqueado y deorizado”*

### **2.6.4 Composición de la fracción minoritaria.**

La capacidad de adaptación de la vid a diferentes entornos la ha convertido en una excelente opción para muchos climas y geografías, por lo que su cultivo se ha expandido en todo mundo, originando distintas variedades (Ricci, 2011). De esta manera, la composición tanto del vino como del aceite dependerá de la variedad y del lugar donde se haya cultivado la uva.

En términos generales, el aceite de semilla de uva es rico en ácidos grasos insaturados, que representan más del 89% de la composición total de aceite y la mayoría son ácidos grasos esenciales; además, es rico en antioxidantes como los polifenoles (59- 360 mg/kg), siendo las catequinas, epicatequina, *trans*-resveratrol y procyanidin B1 (*Figura 19*), los compuestos más representativos. También posee elevadas concentraciones de esteroides (2,000–7,000 mg/kg), siendo  $\beta$ -sitosterol el que se encuentra en mayor proporción (70% de los esteroides totales) y en menor cantidad también están presentes los tocoferoles (24 a 41 mg/kg) (Moya, 2017).

El aceite de pepita de uva presenta el inconveniente de ser fácilmente oxidable, lo que genera un aumento en su viscosidad y desarrollando olores y sabores extraños (Palacios, 1997).

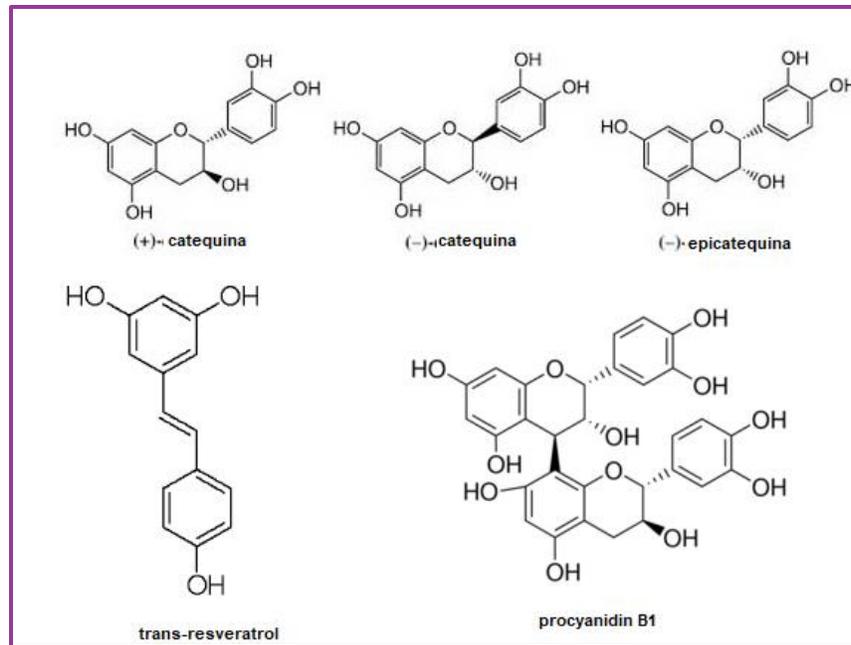


Figura 19. Compuestos fenólicos del aceite de pepita de uva.

## 2.7 Aceite de linaza.

De acuerdo con la Norma mexicana NMX-066-SCFI-2008, el aceite de linaza es aquel que se obtiene mediante extracción mecánica y/o por extracción por disolventes, de la semilla de linaza *Linum usitatissimum*. Aunque el cultivo de linaza es uno de los más antiguos, ya que se cultiva desde el comienzo de la civilización, fue en las últimas dos décadas cuando ha sido el foco de interés debido a los beneficios potenciales para la salud (reducción de enfermedades cardiovasculares, disminución de riesgo de cáncer, actividad antiinflamatoria y efecto calmante de síntomas menopáusicos y la osteoporosis) asociados con algunos de sus componentes biológicamente activos (Goyal, Sharma, Upadhyay, Gill y Sihag, 2014).

### 2.7.1 Características de la linaza.

La linaza pertenece a la familia de las *Lináceas*, es una planta anual cuyo crecimiento es en forma de hierba de tallo largo y liso, y que puede alcanzar hasta 70 cm con ramificaciones en la cima, en donde se presentan pequeñas flores de color azul y frutos en forma de una pequeña capsula globular que contiene hasta diez semillas de 4 a 6 mm de longitud (*Figura 20*).

Las semillas son la parte donde se extrae el aceite y están disponibles en dos variedades básicas: (1) marrón; y (2) amarillo o dorado. Ambas tienen características nutricionales similares, siendo su composición química un sistema multicomponente con sustancias vegetales bioactivas como aceite, proteína, fibra dietética, polisacáridos solubles, lignanos, compuestos fenólicos, vitaminas (A, C, F y E) y minerales como Mg, K, Na, Fe, Cu, Mn y Zn (Goyal, et al., 2014).

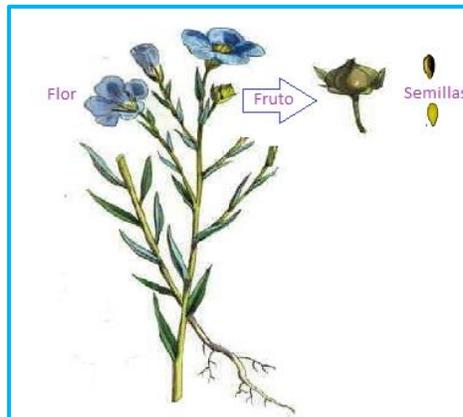


Figura 20. Esquema del crecimiento y desarrollo de la linaza.

### 2.7.2 Proceso de elaboración.

Se pueden encontrar varios tipos de extracción del aceite de linaza, los cuales dependen y se diferencian principalmente por el uso que se le dará al producto final, sea éste para consumo industrial o de consumo humano. El aceite de linaza para consumo humano se produce a través de las semillas molidas mediante rodillos, las cuales se prensan en frío (Silva, Gallardo y Pascual, 2013), obteniendo así un aceite de linaza crudo que es de color marrón / ámbar oscuro.

Una vez obtenido el aceite crudo, se filtra una o dos veces por un filtro prensa, con el fin de separar las sustancias en suspensión constituidas por restos de harina, tierra, etc. A continuación, se almacenan en tanques de decantación, para que se deposite parcialmente el mucilago que se encuentra en estado coloidal. Posteriormente se lleva a cabo un proceso de refinación y/o blanqueo cáustico para reducir el color; estos procesamientos también eliminan "gomas" o fosfolípidos presentes en el aceite (Gunstone y Kochhar, 2002).

### **2.7.3 Denominación.**

El aceite de linaza se comercializa bajo una sola denominación, y único tipo y grado de calidad, de acuerdo con la Norma mexicana NMX-066-SCFI-2008, como: *“Aceite de linaza: producto obtenido del aceite crudo de linaza cuando este es sometido a un proceso de refinación”*

### **2.7.4 Composición de la fracción minoritaria.**

El aceite de linaza consiste principalmente en triacilglicérols (98%), que representan la fracción mayoritaria, y en menor proporción la materia insaponificable (1.5% max.) que corresponde a la fracción minoritaria. Esta última está compuesta principalmente de esteroides, tocoferoles y ligninanos. En cuanto a los esteroides, estos representan el 0.45%, siendo  $\beta$ -sitosterol, campesterol,  $\Delta$ -avenasterol y estigmasterol los componentes principales al representar el 46%, 29%, 13% y 9%, respectivamente (Gunstone, Harwood y Padley, 1994). Por otro lado, el aceite de linaza contiene 440 a 588 mg/kg de tocoferol, siendo el predominante el  $\gamma$ -tocoferol, al estar presente en concentraciones de 430 a 575 mg/kg.

A pesar de la presencia de compuestos antioxidantes, el aceite de linaza tiende a oxidarse rápidamente debido al alto porcentaje de ácido  $\alpha$ -linoleico, por lo que el aceite debe de ser almacenado en condiciones frías, sin oxígeno, sin luz y protegido por la adición de una formulación antioxidante (Gunstone y Kochhar, 2002).

## **2.8 Compuestos antioxidantes.**

El papel fundamental de la dieta es suministrar nutrientes suficientes para cubrir los requerimientos metabólicos de un individuo y proporcionar bienestar. Sin embargo, en la actualidad existen suficientes evidencias científicas para sustentar la hipótesis de que la dieta no sólo ayuda a alcanzar una salud óptima, sino también a desempeñar una función importante reduciendo el riesgo de enfermedades, lo que se ha atribuido a la presencia de determinados compuestos bioactivos (CBA, *Figura 21*). La importancia de estos compuestos radica en su relación con:

- La calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal pues son responsables del color, aroma y sabor.
- Su contribución al mantenimiento de la salud humana en el tratamiento o prevención de enfermedades como obesidad, cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.
- Sus propiedades biológicas, entre las que destacan sus actividades antiinflamatorias, antioxidantes y la capacidad de quelar diferentes metales.

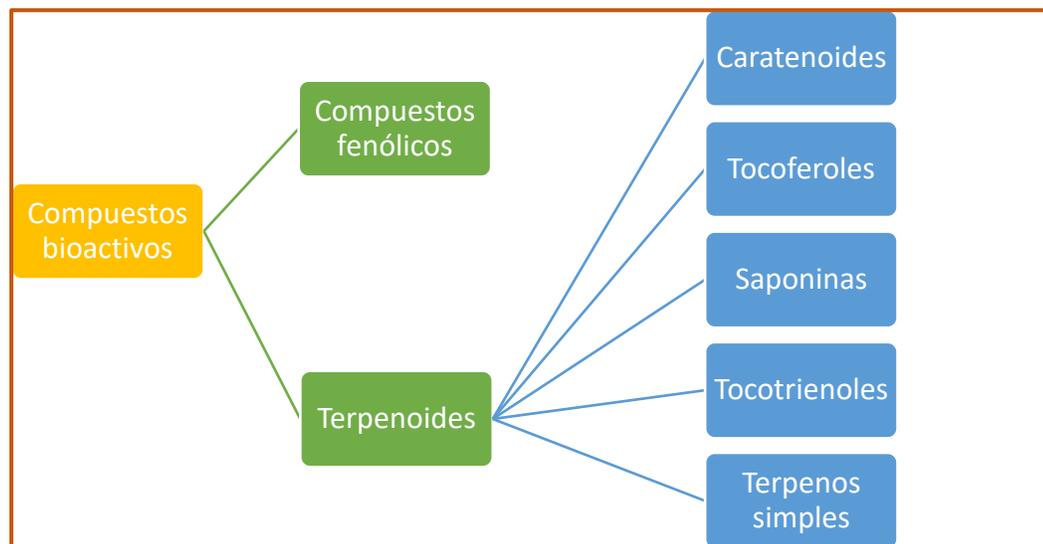
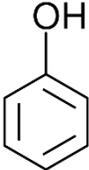


Figura 21. Principales compuestos bioactivos de origen vegetal.

Entre los compuestos antioxidantes más estudiados están los compuestos fenólicos; estos son metabolitos secundarios de las frutas y vegetales, y son esenciales para la fisiología y morfología de las plantas pues están involucrados en el crecimiento, reproducción y resistencia contra agentes patógenos. Dichos compuestos constituyen una de las familias más numerosas, con más de 8,000 diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas, teniendo en común un anillo aromático (C<sub>6</sub>) con uno o más grupos OH. Estos pueden ser divididos en varios grupos de acuerdo con su estructura química básica, como se observa en la *Tabla 1* (Gil, 2010; López y Porras, 2009).

**Tabla 1.** Clasificación de compuestos fenólicos.

Esqueleto	Clasificación	
$C_6$	Fenoles	Donde la estructura $C_6$ representa  Mientras que $C_n$ , representa el número de carbonos en cadena lineal.
$C_6-C_1$	Ácidos fenólicos	
$C_6-C_2$	Ácidos fenilacéticos	
$C_6-C_3$	Ácido hidroxicinámico, cumarina e isocumarina	
$C_6-C_4$	Naftoquinona	
$C_6-C_1-C_6$	Xantanos	
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos	
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides	
$(C_6-C_3)_2$	Lignanós	
$(C_6-C_3)_n$	Ligninas	
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos	

### 2.8.1 Capacidad antioxidante.

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) se forman continuamente debido a fuentes endógena como los procesos metabólicos aerobios o por fuentes exógenas como la contaminación o fumar (*Figura 22*), y pueden oxidar o dañar macromoléculas celulares guiando posiblemente al desarrollo de enfermedades degenerativas como arterosclerosis, Alzheimer, Parkinson, cáncer, diabetes, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias. No obstante, el organismo posee sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes, pero en determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse superadas por la excesiva generación de radicales libres procedentes del oxígeno. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, y es asociado al desarrollo de enfermedades mencionadas anteriormente y al proceso normal de envejecimiento. Sin embargo, el consumo de antioxidantes exógenos en la dieta incrementa la cantidad de agentes antioxidantes presentes en el organismo, cada uno de estos agentes actúa bajo diferentes mecanismos, siendo la forma principal la inhibición de radicales libres en la reacción de cadena (chain-breaking), y en

menor medida a través de iones metálicos (Chávez, 2007; Rojas, 2010). Dada la importancia de los compuestos fenólicos resulta importante su cuantificación en los alimentos.

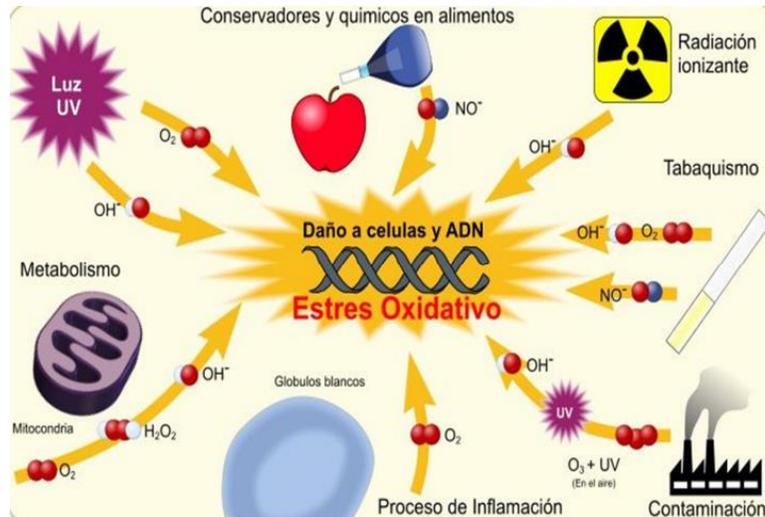


Figura 22. Fuentes endógenas y exógenas de especies reactivas de oxígeno. Tomado de s/n, 2016.

## 2.9 Métodos para la extracción de compuestos fenólicos.

En el análisis de productos naturales o alimentos, la extracción es un paso importante en el proceso de preparación de la muestra ya que permite aislar y purificar el componente químico que se desea cuantificar (Escutia, 2011). De esta manera, se ha generado un creciente interés en la búsqueda y desarrollo de nuevas formas eficientes de extracción en diferentes matrices alimentarias.

### 2.9.1 Extracción líquido-líquido (LLE).

Es el método de extracción de compuestos fenólicos más común para muestras de aceite, en especial el de aceite de oliva. La extracción, consiste típicamente en un proceso de separación en donde el analito de interés (polifenoles) es distribuido en dos fases inmiscibles, generalmente una fase acuosa y otra orgánica (Figura 23) (Chávez, 2017) y debe desarrollarse con un disolvente adecuado y bajo condiciones analíticas ideales (temperatura y pH).

Para ello, generalmente se emplea una mezcla metanol/agua 80:20% V/V que se pone en contacto con el aceite, enseguida se realiza una agitación vigorosa empleando un vórtex para después llevar a cabo un proceso de centrifugación,

donde ambas fases son separadas debido a diferencias de densidad. Actualmente, han surgido metodologías similares, pero con pequeñas diferencias como la proporción metanol/agua o el cambio de extractante, la adición de disolventes orgánicos como n-hexano, así como un mayor número de pasos de extracción.

Todas estas metodologías tienen en común el empleo de grandes cantidades de disolventes, tiempo de extracción prolongado y baja eficiencia (Escutia, 2011). Además de que se requieren de diversos pasos durante el desarrollo de la extracción, que puede generar posibles degradaciones de los polifenoles (causadas principalmente por factores externos como la luz, el aire y la temperatura), su pérdida o posibles contaminaciones.

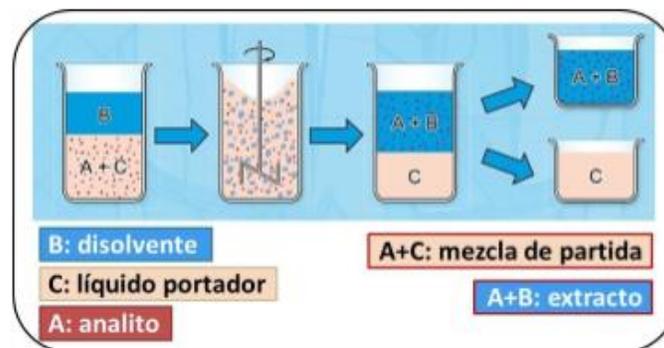


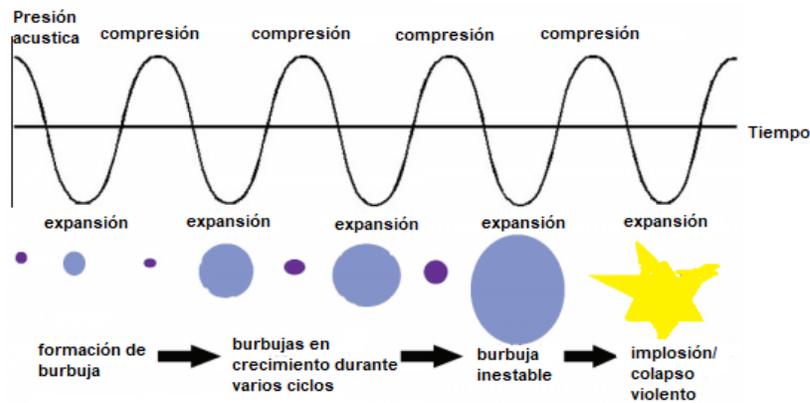
Figura 23. Esquema general del proceso de extracción líquido-líquido. Tomado de Chávez, 2017.

### 2.9.2 Extracción asistida por ultrasonido.

La extracción asistida por ultrasonido se basa en la aplicación de energía de ultrasonido en forma de ondas (que comprenden la región de frecuencias acústicas de 18 kHz a 1000 MHz), que son transmitidas a través de cualquier sustancia (líquida, sólida o gaseosa) que posea propiedades elásticas, induciendo movimientos vibracionales de compresión y expansión (*cavitación cáustica*, Figura 24) en las moléculas que forman parte de ésta (Escutia, 2011).

La importancia de la cavitación radica en lo que sucede cuando las burbujas colapsan, pues es en esta etapa donde la burbuja llega a un punto crítico en el que ya no puede absorber más energía e implosiona provocando un incremento local de temperatura que favorece la solubilidad donde se produce la explosión de la burbuja, y, por otra, un aumento de presión que provoca una mejor penetración del

disolvente al interior de la matriz (García, et al., 2010), así como alteraciones en la superficie de contacto. Son estas las razones que demuestran que la extracción de los compuestos puede mejorarse significativamente mediante la energía del ultrasonido, pues su aplicación facilita la transferencia de los analitos (Canosa, 2009) haciendo que la extracción sea más efectiva y en un tiempo menor en comparación con los métodos tradicionales.



**Figura 24.** Representación del proceso de cavitación. Adaptado de Salazar, Chávez, Turó y García, 2010.

Para la realización de la extracción por ultrasonido se pueden emplear diversos sonicadores, cuyo funcionamiento está basado en la aplicación de una polarización variable en un material piezoeléctrico, sin embargo, los dispositivos utilizados con mayor frecuencia para fines analíticos son:

- a) Baños de ultrasonido que constan de un transductor (componente electromecánico encargado de generar los ultrasonidos que opera de 30- 50 kHz) fijado a una base de baño lleno de agua (*Figura 25*). Aunque estos equipos son relativamente económicos, presentan varias desventajas: 1) es difícil mantener control de la temperatura, 2) la potencia no es suficientemente para realizar extracciones efectivas y 3) falta de uniformidad en la trasmisión (Escutia, 2011).



Figura 25. Baño de ultrasonido marca Branson.

- b) Sondeas de ultrasonido que permiten introducir la energía acústica directamente en el interior de la mezcla de reacción en lugar de depender de su transferencia a través del agua del baño de ultrasonidos y de las paredes del matraz, con lo cual se puede aumentar y controlar la cantidad de potencia ultrasónica disponible (Figura 26) (Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación, s/f), eliminar las pérdidas de energía y amplificar notablemente el fenómeno de cavitación.

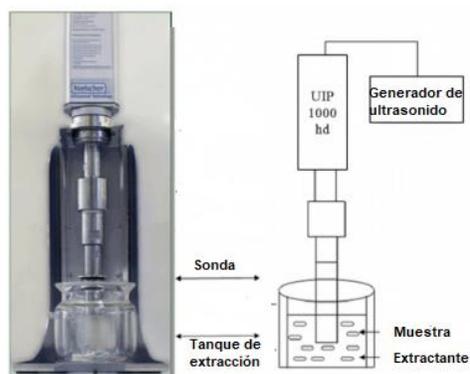


Figura 26. Sonda de ultrasonido UIP1000hd.

### 2.9.3 Microdispositivos.

La búsqueda de nuevas metodologías de extracción más rápidas y efectivas ha llevado a la aplicación y desarrollo de técnicas como la microextracción, la cual se lleva a cabo en dispositivos de microfluídica, en donde dos líquidos inmiscibles pasan a través de microcanales originando la extracción de los compuestos de interés. Sin embargo, la demanda por la realización de mediciones continuas y con respuesta rápida de los extractos, empleando volúmenes y concentraciones de muestra pequeños ha generado el desarrollo de sistemas de análisis total (Total Analysis System, TAS por sus siglas en inglés) (Chávez, 2017) acoplados en

sistemas miniaturizados, hoy en día mejor conocidos como Lab-on-a-chip (LOC). En dichos dispositivos se tiene la función integrada de pre-tratar la muestra, introducir y mezclar reactivos, analizar y separar productos, entre otros, en un mismo y pequeño dispositivo (Sandoval, 2015).

Las ventajas de estos sistemas de análisis de microfluídica son: mayor número de análisis realizados en función del tiempo, se reduce el número de errores que pueden ser cometidos al realizar un procedimiento multipasos, el impacto negativo al ambiente y a la salud se ve minimizado al disminuir la cantidad de disolventes orgánicos empleados durante el proceso de extracción, las reacciones dentro de ellos son más rápidas lo que conduce inevitablemente a un menor consumo de reactivos y muestra, baja generación de residuos y una disminución de costos.

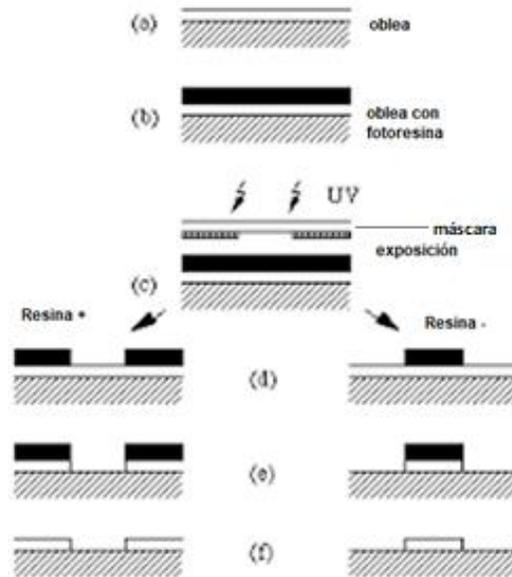
### **2.9.3.1 Métodos de fabricación.**

Dependiendo del material requerido y de las restricciones dadas por la aplicación final del microdispositivo, así como el costo, los equipos y las tecnologías disponibles, existen diferentes métodos de fabricación, entre los que se pueden destacar: estampado en caliente, moldeo por inyección, ablación con láser, poliéster termoestable, fotolitografía y litografía suave. A continuación, se explicarán a detalle las técnicas de fotolitografía y litografía suave, las cuáles se emplearon para la construcción de los microchips en el presente trabajo (Chávez, 2017; Sandoval, 2015).

#### **(A) Fotolitografía.**

La técnica de fotolitografía consiste en transferir un patrón deseado, contenido en una máscara óptica, a un polímero fotosensible (resina fotosensible o fotoresina) al ser expuesto a una fuente de luz UV. Los pasos principales para la fabricación de un molde por este método se resumen en la *Figura 27*: en la figura una oblea es recubierta por una capa de resina fotosensible, posteriormente se coloca la máscara sobre la superficie y se realiza el proceso de exposición a luz UV, después de la exposición, se realiza el revelado, en donde la oblea es sumergida

en un disolvente con la finalidad de remover la resina, en este punto se tiene dos casos, dependiendo si la resina es positiva o negativa, en la primera, la reacción fotoquímica provoca que la resina se debilite y sea retirada con facilidad con el uso de algún disolvente, por el contrario en la segunda la radiación fortalece al polímero y la fotoresina no expuesta es removida con facilidad.



**Figura 27.** Proceso general de fotolitografía. Tomado de Chávez, 2017.

**(B) Litografía suave.**

La litografía suave es una técnica que emplea un elastómero como molde para la generación de micropatrones. Para ello se adiciona un pre-polímero líquido sobre un molde (generalmente construido con los microcanales por la técnica de fotolitografía), que al polimerizarse toma su forma (*Figura 28*). Una vez teniendo el polímero con el patrón deseado, éste es retirado, cortado y sellado con descargas de plasma sobre una superficie, ya sea vidrio o el mismo polímero.

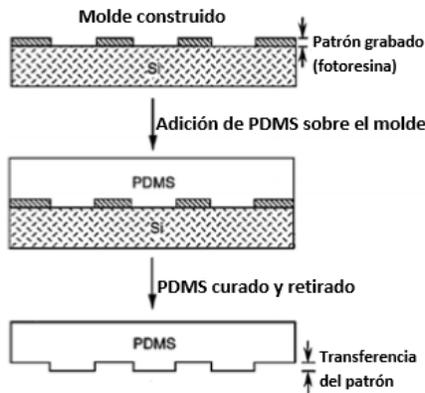


Figura 28. Esquema de pasos de litografía suave empleando polidimetilsiloxano (PDMS).

### 2.9.3.2 Materiales de fabricación: PDMS

Existen diversos materiales que pueden emplearse para la fabricación de microchips, entre los más típicos se encuentran el vidrio y polímeros como el polidimetilsiloxano, policarbonato, poliestireno, etc. El polidimetilsiloxano (PDMS) (Figura 29), es el material más ampliamente usado en la construcción de dispositivos de microfluidos, principalmente por la creación rápida de prototipos, además posee características tan esenciales como: ser un elastómero, es ópticamente transparente, químicamente inerte, permeable a los gases, económico y fácil de manejar al no requerir condiciones especiales. Sin embargo, a pesar de sus muchas ventajas, el PDMS es naturalmente hidrofóbico lo cual limita su compatibilidad con disolventes orgánicos, adsorbe pequeñas moléculas hidrofóbicas y se hincha al contacto con disolventes orgánicos, por lo que es inevitablemente importante el estudio de la compatibilidad del material con los disolventes y las condiciones de la experimentación.

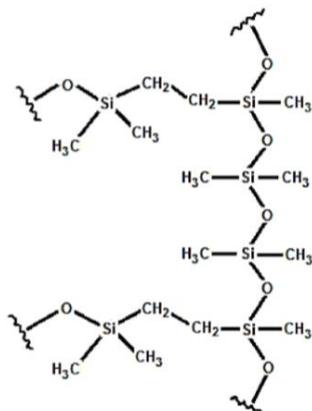


Figura 29. Semiestructura de PDMS.

---

---

## 2.10 Cuantificación de polifenoles: ensayo de Folin-Ciocalteu.

El método más empleado para la determinación de contenido total de compuestos fenólicos en matrices alimenticias es el ensayo de Folin-Ciocalteu (Chávez, 2017), debido a que es un método de cuantificación de polifenoles con sensibilidad y reproducibilidad mejoradas. Para dicho ensayo se utiliza un reactivo que lleva el mismo nombre, que consiste en una mezcla de iones complejos provenientes de los hetero-poliácidos fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) (Escutia, 2011), en donde el tungsteno y el molibdeno presentan estado de oxidación 6+, y son incoloro y amarillo respectivamente.

La reacción que se lleva a cabo en dicho ensayo consiste en una reacción basada en la transferencia de electrones entre el tungsteno y el molibdeno con los polifenoles en medio básico, ya que en condiciones alcalinas (pH ~ 10) ocurre la disociación del fenol (formación del anión fenolato), el que es capaz de reducir al tungsteno y el molibdeno a un estado de oxidación 5+ (*Figura 30*), y generar especies cromógenas, posiblemente de la forma  $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$  (Rojas., 2010). Este último se puede detectar espectrofotométricamente (a  $\lambda=730$  nm), ya que el oxotungstato y el oxomolibdato formados en esta reacción redox muestran una coloración azul que, mediante la relación de Lambert-Beer, resulta proporcional a la concentración de polifenoles.

Aunque la aplicación del ensayo de Folin-Ciocalteu resulta simple y conveniente para la determinación de compuestos fenólicos totales, presenta la desventaja de carecer de especificidad pues el reactivo F-C es susceptible a ser reducido por otros compuestos reductores como azúcares, ácido ascórbico, aminos aromáticas, sales de hierro (II), ciertos aminoácidos, dióxido de azufre, entre otros. (Chávez, 2017). A pesar de ello, los resultados del ensayo de Folin-Ciocalteu se correlacionan muy bien con los obtenidos con otros ensayos de antioxidantes utilizados en el análisis de alimentos, como ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno), ABTS (Ensayo de ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzoatotiazolín)-6-sulfónico) y DPPH (Ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo) (Resat, Capanoglu y Shahidi, 2018).

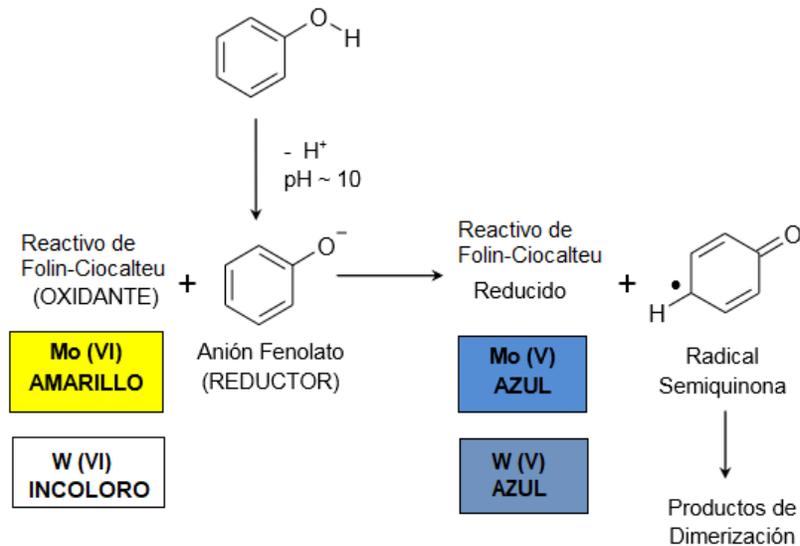
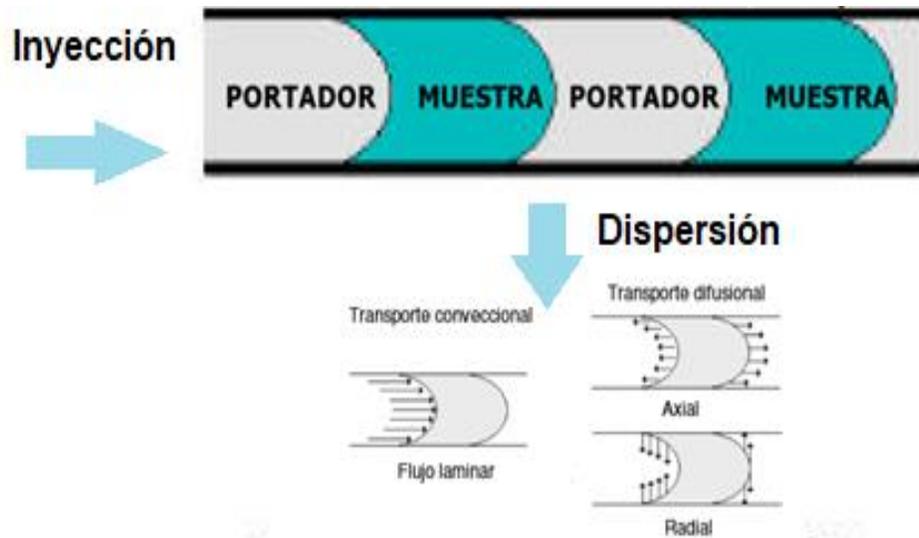


Figura 30. Esquema de mecanismo de reacción del ensayo de Folin-Ciocalteu.

### 2.11 Sistema de inyección en flujo (FIA).

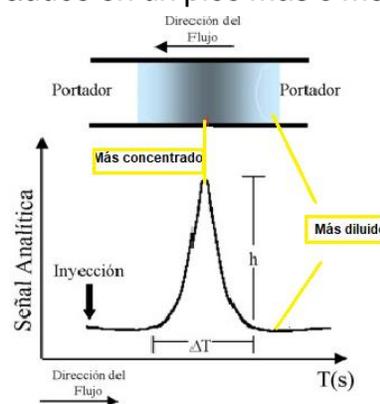
El ensayo de Folin-Ciocalteu ha encontrado múltiples aplicaciones, pues la determinación espectrofotométrica resulta ser simple y adaptable, a pesar de su lentitud y las posibles interferencias de algunas sustancias pertenecientes a las matrices de estudio. Sin embargo, estos inconvenientes han conducido a que dicho método sea adaptado a sistemas de flujo continuo, como el análisis por inyección en flujo (FIA), para mejorar su aplicabilidad, ya que genera un consumo pequeño de reactivos, una alta frecuencia de muestreo y la obtención de resultados de manera más rápida (Cañizares, 2002; Escutia, 2011, Rojas, 2010; Starzynsky, 2019).

El sistema de análisis por inyección en flujo (FIA, por sus siglas en inglés: Flow Injection Analysis) es un método automático de análisis cuyo concepto fue introducido por Ruzicka y Hansen en 1975. Dicho método consiste básicamente en la inyección de una muestra en una corriente continua (portador), donde a medida que la muestra se desplaza por el tubo, esta comienza a dispersarse formando un gradiente de concentración debido a que el transporte del portador y la muestra a través de la tubería se da bajo un régimen laminar, lo que permite que la zona de la muestra se encuentre bien definida (Figura 31).



**Figura 31.** Comportamiento del flujo en un sistema de flujo continuo.

En el caso de la adaptación del método de Folin a un sistema de flujo (FIA), los reactivos se agregan en un punto de confluencia para comenzar a formar el producto de reacción. Al llegar el producto de interés a la celda de flujo, se obtiene una señal analítica en forma de pico cuya altura está relacionada con la concentración del analito a determinar. En la *Figura 32*, se muestra una representación esquemática del pico, a la cual se le denomina fiagrama, dicha señal está determinada por la influencia de los parámetros geométricos e hidrodinámicos como el caudal, el volumen de inyección, longitud del reactor, etc., pues estos aumentarán o disminuirán el tiempo de residencia del bolo generando una mayor o menor dispersión, que se traduce en un pico más o menos ancho (Cañizares, 2002).



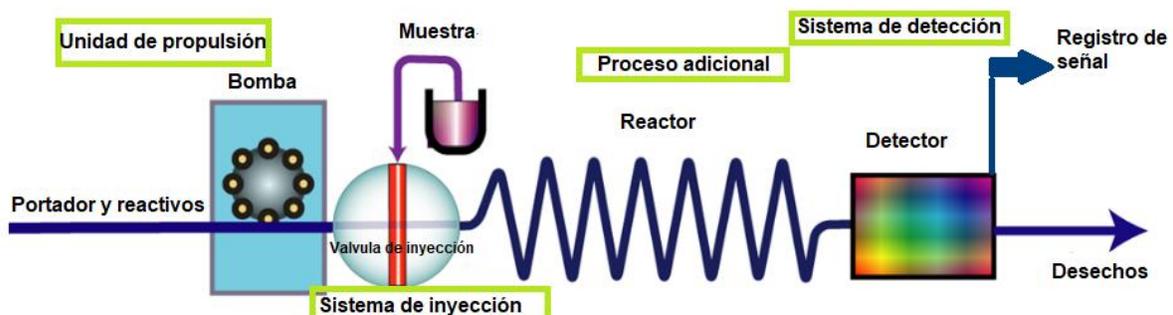
**Figura 32.** Señal obtenida en una configuración FIA. En la parte superior se muestra la dispersión que sufre el bolo al pasar a lo largo de la configuración, y como se ve en la señal analítica registrada; altura ( $h$ ), ancho del pico ( $\Delta T$ ).

### 2.11.1 Instrumentación del FIA.

Hay cuatro unidades básicas que componen un sistema FIA (*Figura 33*), a las que se les pueden hacer modificaciones para adaptar el sistema a las necesidades experimentales (Rojas, 2010):

- a) Unidad de propulsión: tiene la función de impulsar una o varias disoluciones a través del sistema a un caudal lo más constante posible y a baja presión. Estas disoluciones pueden llevar disuelto algún reactivo o sólo el portador simple.
- b) Sistema de inyección: introduce o inserta en el flujo un volumen exacto de muestra con gran reproducibilidad de operación y sin interrumpir el mismo. El sistema de inyección utilizado con mayor frecuencia es una válvula rotatoria de seis puntos.
- c) Sistema adicional (transporte y reacción): consta de un tubo recto, en forma de serpentín, relleno o no de bolas inertes, etc., en donde tiene a lugar el transporte o proceso adicional (reacción).
- d) Sistema de detección: el FIA puede utilizar una gran variedad de técnicas analíticas de detección. Consta principalmente de una celda de flujo incorporado a un sistema de medida que traduce la señal continua a un registrador o microprocesador.

Dado que en el momento de la detección la muestra no se encuentra en condiciones de equilibrio, es de suma importancia que el tiempo de operación del sistema sea muy reproducible.



**Figura 33.** Componentes básicos de un sistema de análisis por inyección en flujo.

---

---

### 3. Objetivos.

#### General:

Determinar la cantidad de polifenoles totales, mediante el método de Folin-Ciocalteu, en aceites vegetales comerciales a partir de extracciones líquido-líquido con microdispositivos.

#### Específicos:

- Aprender y utilizar las técnicas de fotolitografía y litografía suave para la fabricación de microdispositivos empleando como material el polímero PDMS.
- Fabricar y evaluar microdispositivos (lab-on-chip) de PDMS para la extracción líquido – líquido de compuestos fenólicos en diferentes aceites vegetales comerciales.
  - Determinar el efecto de diferentes extractantes: etanol:agua, metanol:agua y solución amortiguadora de carbonatos, en la extracción de polifenoles de aceites vegetales.
  - Optimizar la extracción en microchip para los extractes: etanol:agua y metanol:agua, al evaluar los parámetros: pH de solución amortiguadora, concentración de reactivo de Folin-Ciocalteu y concentración de extractante.
  - Realizar la cuantificación de los compuestos fenólicos mediante la determinación espectrofotométrica del producto de reacción obtenido por el método de Folin-Ciocalteu dentro del microdispositivo.
  - Con la metodología optimizada, construir la curva de calibración de ácido tánico y determinar sus parámetros estadísticos.
  - Analizar muestras de diferentes aceites vegetales comerciales, realizando la extracción-reacción de los compuestos fenólicos con el microdispositivo y comparar los resultados con los obtenidos en lote, para demostrar las ventajas del uso de dispositivos de microfluídica.

## 4. Metodología.

### 4.1 Instrumentos, reactivos y material.

De manera práctica, instrumentos y materiales empleados durante el desarrollo experimental se dividen en dos: (1) Metodologías de extracción y posterior cuantificación, y (2) Fabricación y caracterización de los microdispositivos, los cuales se muestran a continuación en las *Tablas 2 y 3*, respectivamente.

**Tabla 2.** Instrumentos y materiales para los diferentes métodos de extracción.

<b>Instrumento o material</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
<b>Balanza analítica</b>	Ohaus	E12140, con precisión de $\pm 0.1$ mg
<b>Potenciómetro</b>	OAKTON	105762
<b>Parrilla con agitación</b>	CIMAREC	SP131325
<b>Baño de ultrasonido</b>	Branson	2510R-MT
<b>Acrodisco 0.45 <math>\mu</math>m</b>	Whatman	NYL W /GMF
<b>Centrífuga</b>	Hettich-Zentrifugen	EBA20
<b>Micropipeta 20-200 <math>\mu</math>L</b>	-	-
<b>Extracción asistida con ultrasonido</b>		
<b>Sonda de ultrasonido</b>	Branson	250, con punta cilíndrica de titanio de 13 mm de diámetro y 450 W potencia total.
<b>Extracción y determinación con microdispositivos</b>		
<b>Bomba de jeringa</b>	New Era Pump Systems	NE-300
<b>Bomba peristáltica</b>	ISMATEC	RS-232
<b>Jeringa de vidrio 5 mL</b>	Hamilton	5900-45
<b>Tubería Tygon, ID 0.76 mm</b>	ISMATEC	-
<b>Jeringa de plástico de 3 mL</b>	BD	-
<b>Microscopio óptico</b>	LEICA	DMI3000B
<b>Cámara phantom</b>	AMETEX	MIRO M110
<b>Cuantificación de polifenoles</b>		
<b>Detector UV-Vis</b>	Ocean Optics	USB4000
<b>Espectrofotómetro UV-Vis-NIR</b>	Ocean Optics	DT-MINI-2-GS
<b>Bomba</b>	ISMATEC	ISM834C
<b>Válvula de inyección de seis canales</b>	Rheodyne	-
<b>Celda de flujo de cuarzo</b>	Hellman	Volumen interno de 18 $\mu$ L y 1 cm de paso óptico
<b>Fibras opticas 400 <math>\mu</math>m</b>	Ocean Optics	-

**Tabla 3.** Instrumentos y materiales para la fabricación de microdispositivos.

<b>Equipo o instrumento</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
<b>Spin-coater</b>	Laurell Technologies	WS-650MZ-23NPPB
<b>Generador de plasma</b>	Electro-Technic Products	BD-20AC
<b>Lámpara UV</b>	UVP	Black Ray B-100AP
<b>Oblea de silicio</b>	Silicon Valley Microelectronics	Diámetro 3in Espesor 381 ± 25 µm
<b>Estufa</b>	Heating Incubator Prolab	DHP-9032
<b>Parrilla</b>	CIMAREC	SP46925
<b>Balanza</b>	Scout Ohaus	SC2020

Mientras que los reactivos ocupados para cada una de las metodologías de extracción y posterior cuantificación, así como para la fabricación y caracterización de microdispositivos, se muestran a continuación (*Tabla 4*).

**Tabla 4.** Reactivos utilizados en los diferentes métodos de extracción y para la fabricación de los microdispositivos.

<b>Reactivos</b>	<b>Marca / Pureza</b>	<b>Disolución de trabajo</b>
<b>Bicarbonato de sodio</b>	J.T. Baker / 100%	Disolución amortiguadora pH 10.6 y 13.0, 0.75 M
<b>n-Hexano</b>	J.T. Baker / 85.0%	-
<b>Ácido clorhídrico</b>	J.T. Baker / 36.5–38%	-
<b>Ácido tánico</b>	Sigma-Aldrich	Disolución madre: 1444 µmol/mL (microchip) y 1435 µmol/mL (FIA)
<b>Reactivo de Folin-Ciocalteu</b>	Merck	1:10 para determinación en FIA 0.02 y 0.03 M para determinación en microchip
<b>Hidróxido de sodio</b>	Fermont / 98.0%	Disolución de hidróxido de sodio 0.5 F
<b>Etanol</b>	J.K Baker / 99.5%	Etanol:Agua 30:70% V/V
<b>Metanol</b>	J.K. Baker / 99.0%	Metanol:Agua 40:60% V/V
<b>Resina SU-8 3035</b>	MicroChem	-
<b>Kit elastómero de silicona</b>	SYLGARD 184	-
<b>Propilenglicol monometil éter-54-cetate (PM-Acetato)</b>	Sigma-Aldrich / 99.5%	-
<b>2-Propanol</b>	J.T. Baker / 99.8%	-

## 4.2 Programas informáticos.

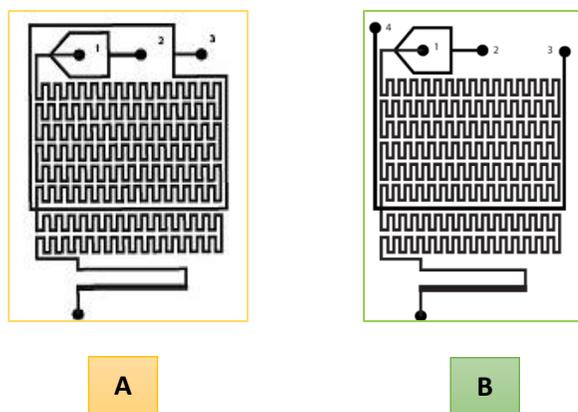
Los programas computacionales empleados durante y después del desarrollo experimental fueron: *Adobe Illustrator CC 2014*, para el diseño de los microcanales; *ImageJ* y *PCC v2.7.756.2*, para la caracterización de los microchips; *OceanView*, para el control de la medición y registro de las señales de absorbancia por detección espectrofotométrica; *Microsoft Excel 2010* y *Statgraphics Centurion XVI.I*, para el tratamiento estadístico de los datos registrados.

## 4.3 Fabricación de los microdispositivos.

Para la fabricación de los microdispositivos, se siguieron una serie de pasos fundamentales, y se dividen en tres bloques: a) Diseño de microchip b) Elaboración de microdispositivos: Fotolitografía y litografía suave y c) Caracterización de microdispositivos.

### 4.3.1 Diseño de microdispositivos.

La elección del diseño (*Figura 34 A*) se realizó considerando el trabajo previo de extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos en aceite de oliva, reportado por Chávez (2017). De esta manera el diseño fue construido y empleado para la determinación de compuestos fenólicos ocupando como extractante una solución amortiguadora de carbonatos 0.75 M, pH 10.6. Sin embargo, para la extracción con metanol o etanol (*Figura 34 B*), se hizo otro diseño utilizando también el software *Adobe Illustrator CC 2014*. Dicho diseño se colocó dentro de una circunferencia de 69 mm de diámetro, y para optimizar espacio se colocaron 6 microdispositivos dentro de dicha circunferencia. Posteriormente, los prototipos se imprimieron en negativos de acetato en la empresa de *Gráficos Digitales Denver*, con la intención de que cumplieran el papel de máscaras en la técnica de fotolitografía.



**Figura 34.** Diseño de los microcanales para la construcción de microchips: aprox. 200  $\mu\text{m}$  de ancho x 100  $\mu\text{m}$  de profundidad. A) Diseño para extracción con solución amortiguadora de carbonatos y B) Diseño para extracción con etanol y metanol.

#### 4.3.2 Elaboración de microdispositivos: fotolitografía y litografía suave.

El procedimiento seguido para la construcción del molde por fotolitografía se realizó de acuerdo con los reportados por MicroChem SU-8 3000 (s.f) y Chávez (2017), el cual se explica a continuación.

- 1- La oblea de silicio (Silicon Valley Microelectronics: diámetro 3 in y espesor  $381 \pm 25 \mu\text{m}$ ) se colocó en la parrilla a una temperatura de  $200^\circ\text{C}$  durante 10 min para deshidratar; posteriormente se introdujo en la estufa a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$  por 5 min para que la oblea alcanzara con más facilidad la temperatura ambiente.
- 2- Posteriormente, se colocó en el *spin-coater*, teniendo especial cuidado en centrarla para evitar movimientos erráticos, y se aplicó el siguiente programa:
  - 10 s a 500 rpm con aceleración de 100 rpm/min
  - 30 s a 3000 rpm con aceleración de 300 rpm/min

Transcurridos los primeros 10 s del programa se le adicionó 2-propanol con el propósito de limpiar la superficie de la oblea.

- 3- Una vez limpia, se adicionaron aproximadamente 6 mL de resina SU-8 3035 en el centro de la oblea y se aplicó el programa descrito en el punto 2, logrando una capa de resina de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de profundidad.
- 4- Se retiró la oblea del *spin-coater* para proseguir con el “cocinado suave”, con la finalidad evaporar los disolventes de la resina, a 105°C por 26 min.
- 5- Después de permitir a la oblea alcanzar la temperatura ambiente, se realizó la exposición colocando la máscara de negativo con los microcanales deseados sobre la oblea de silicio y haciendo una especie de “sándwich” con dos superficies de vidrio (aprox. 4 mm de espesor). Se hizo incidir la luz UV sobre cada diseño por separado a una distancia de 30 cm por 45 s.
- 6- Posteriormente, se retiró el negativo de la oblea y se realizó el “cocinado”; para ello, la oblea se colocó en la parrilla a 75°C por 1 min, enseguida se puso en otra parrilla a 105°C por 5 min y finalmente se pasó a una parrilla a 180°C por 4 min. Esto con la finalidad de unir la resina polimerizada a la superficie de oblea de silicio.
- 7- Una vez alcanzada la temperatura ambiente, la oblea se depositó en un recipiente de vidrio con revelador (PM-Acetato) y se movió en pequeños movimientos circulares para eliminar toda la resina que no fue polimerizada por la luz UV. Se comprobó su total eliminación al enjuagar con 2-propanol y no observar turbidez en el líquido recolectado.
- 8- Finalmente, se permitió el secado del molde dentro de una caja Petri.

Una vez construido el molde, se realizó la fabricación de réplicas del microchip por litografía suave, para lo que se realizaron los siguientes pasos:

- 1- En un vaso de plástico desechable se pesaron cerca de 30 g de una mezcla de PDMS y agente curante en una proporción 10:0.9, y se mezclaron perfectamente.
- 2- La mezcla se adicionó al molde dentro de la caja Petri y posteriormente el molde se introdujo al desecador conectado al vacío por aprox. 20 min, con el propósito de eliminar todas las burbujas.
- 3- Ya sin burbujas, el molde se colocó en el horno a 60°C durante aprox. 2 h.

- 4- Transcurrido este tiempo, se sacó el molde y se prosiguió a realizar el corte con un cúter.
- 5- Se perforaron las entradas y salidas de los microcanales con un horador de 1.0 mm (para entrada del reactivo de Folin-Ciocalteu, solución amortiguadora y extractantes) y 0.75 mm de diámetro (para la entrada de la muestra y la salida del producto de reacción).
- 6- Los microchips se limpiaron perfectamente con cinta adhesiva *Scotch* para eliminar cualquier partícula sobre la superficie y se les aplicó una descarga de plasma por 25 s. Posteriormente se pegaron sobre un portaobjetos, al que previamente se le aplicó una descarga de plasma por 1 min.
- 7- Los microdispositivos se presionaron contra el vidrio para asegurar el sellado de los canales y la eliminación de las burbujas. Finalmente, se dejaron reposar en la estufa a 60°C por 4 h para su posterior uso.

### **4.3.3 Caracterización de los microdispositivos.**

La caracterización de los microchips se efectuó en el microscopio óptico LEICA empleando un objetivo de 4x y la cámara Phantom, a través de la relación de la foto de la retícula microscópica (Pyser -SGL, 100x0.05=5.0 mm) y la imagen de los microcanales. Para ello, se hicieron cortes a 6 microchips (3 por diseño) antes de ser sellados sobre vidrio y se observó su sección transversal al microscopio, midiendo la profundidad y el ancho de los microcanales en varias secciones hasta obtener un total de 25 mediciones por cada microchip analizado.

Posteriormente se midió la longitud de los microcanales con el programa *Adobe Illustrator CC 2014*, para finalmente calcular el volumen total aproximado dentro de los microdispositivos.

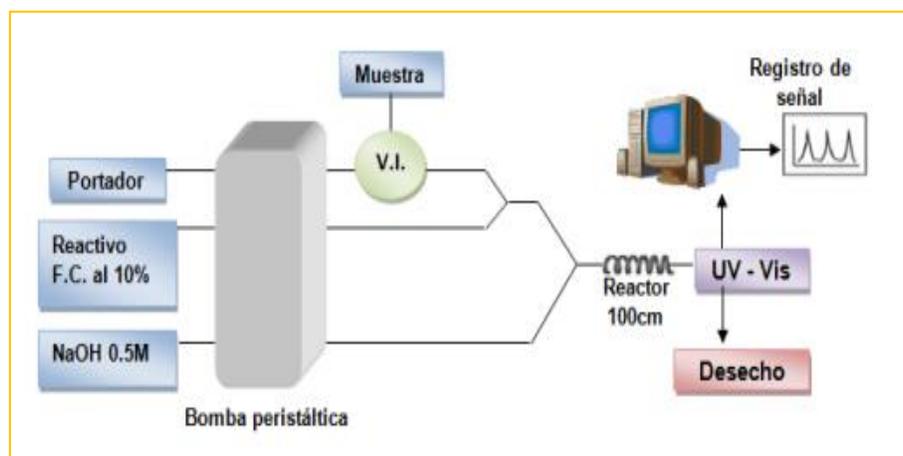
### **4.4 Método de Folin-Ciocalteu por FIA.**

La cuantificación de polifenoles totales de los extractos realizados por lote, ultrasonido y microchip con solución amortiguadora de carbonatos, que en la siguiente sección se abordaran, se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita en la adaptación de este método a un sistema de análisis por inyección de flujo reportado por Escutia (2011), donde, por medio de la válvula de inyección de

seis vías (Rheodyne) se introdujeron, bajo un caudal de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 100  $\mu\text{L}$  del extracto de aceite en un fluido portador (agua destilada) para confluir con el reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución 1:10) y después con una disolución de NaOH. (0.5 F) para imponer un pH básico en el medio de reacción (*Figura 35*). Los tres fluidos fueron acarreados hasta el reactor, que constó de un tubo de politetrafluoetileno de 100 cm de longitud y 0.5 mm de diámetro interno enrollado a manera de serpentín, en donde el reactivo de Folin-Ciocalteu reaccionó con los polifenoles dando como producto un complejo azul cuya absorbancia se midió en el detector UV-Vis (Ocean Optics Modelo USB4000) a una longitud de onda de 730 nm.

Sin embargo, para los extractos obtenidos con etanol o metanol fue necesario realizar una optimización del diseño anteriormente explicado. Para ello se inyectaron estándares de ácido tánico, llevados al aforo con etanol o metanol, a diferentes caudales y probando con diferentes portadores (agua:etanol o metanol), con la finalidad de obtener una señal donde el ruido no interfiera en la estimación de la concentración.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para cada portador, se utilizó para etanol una proporción etanol:agua 30:70% V/V y un caudal de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  y para metanol un portador metanol:agua 40:60% V/V y un caudal de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Bajo esas condiciones se hicieron las curvas de calibración utilizando como reactivo ácido tánico entre 2-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 35.** Configuración del FIA para la determinación de polifenoles totales. Válvula de inyección (V.I), Reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C). Adaptado de Escutia, 2011.

---

---

#### 4.5 Evaluación de los métodos de extracción.

Se realizó una serie de experimentos para determinar el efecto de los tres diferentes métodos de extracción: lote, ultrasonido y microchip, en la cantidad de compuestos fenólicos de dos aceites comerciales: oliva virgen extra (PONS / Lote 055/6685) y ajonjolí puro (DEL MORO / Lote B134), usando como extractante una solución amortiguadora de carbonatos (0.75 M pH 10.6) y cuantificando dichos compuestos mediante el método de Folin-Ciocalteu acoplado a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA).

##### 4.5.1 Extracción en lote.

La extracción se llevó a cabo por triplicado, utilizando como base la metodología reportada por Bonoli (2003) y por Chávez (2017), modificando algunas condiciones. Se pesaron 2 g de aceite de oliva o 4 g de aceite de ajonjolí, en un tubo de centrifuga y se adicionaron 1.0 mL de n-hexano y 2.0 mL de solución amortiguadora de carbonatos (0.75 M, pH 10.6). La mezcla se agitó durante 2 min de forma manual, posteriormente se acidificó agregando 6 gotas de HCl concentrado y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min.

Transcurrido este tiempo, se separaron las fases colocando la fracción orgánica (aceite) en un nuevo tubo de centrifuga y repitiendo la extracción dos veces más con solución amortiguadora de carbonatos. Los extractos acuosos se combinaron y filtraron por un acrodisco de 0.45  $\mu\text{m}$  y los polifenoles se determinaron mediante la metodología descrita en 4.4.

##### 4.5.2 Extracción asistida por ultrasonido.

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas para la extracción por la sonda de ultrasonido Branson 250 (450 W de potencia total), se estudió el efecto del tiempo de irradiación-no irradiación con las siguientes condiciones: 40 % potencia (160 Htz.), 2.0 mL de solución amortiguadora de carbonatos y 2 g de aceite de oliva, variando el número de ciclos de irradiación de 2-8. Para ello se hizo un diseño de 11 experimentos con el software *Statgraphics Centurion XVI.I*, que se muestran en la *Tabla 5*.

**Tabla 5.** Diseño experimental para la extracción asistida por ultrasonido.

<b>No. de experimento</b>	<b>Tiempo de irradiación (s)</b>	<b>Tiempo de no irradiación (s)</b>	<b>No. de ciclos</b>
1	5	5	2
2	5	5	8
3	8	8	5
4	5	10	8
5	10	10	2
6	8	8	5
7	10	5	8
8	5	10	2
9	10	10	8
10	10	5	2
11	8	8	2

Al término de cada ciclo de irradiación, la mezcla se acidificó con 18 gotas de HCl concentrado (aprox. 2.7 mL) y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min.

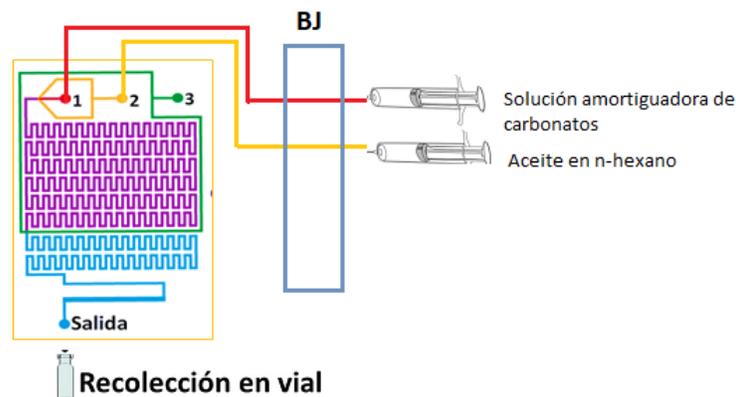
Transcurrido este tiempo, se separaron las fases colocando la fracción orgánica (aceite) en desecho y la fase acuosa se filtró con un acrodisco de 0.45  $\mu\text{m}$ , y se llevó al aforo de 5.0 mL con agua destilada y los polifenoles se cuantificaron mediante la metodología descrita en 4.4.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción (5 s irradiación / 10 s de no irradiación / 2 ciclos) se efectuó la extracción del aceite de ajonjolí en las mismas condiciones, con 4 g de aceite.

#### **4.5.3 Extracción utilizando microfluídica.**

Para llevar a cabo la extracción de polifenoles en el microchip, mediante tuberías de teflón se conectaron a las entradas 1 y 2 (*Figura 36*), el extractante (disolución amortiguadora de carbonatos 0.75 M, pH 10.6) y la muestra (aprox. 0.2 g de aceite llevados al aforo de 5.0 mL con n-hexano), que mediante una bomba de jeringas fueron inyectados al micropositivo a un caudal de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante

aproximadamente 90 min. Finalmente, a la salida del microdispositivo, el extracto obtenido se recolectó en un vial que contenía aprox. 7 gotas de HCl concentrado. Las fases se separaron colocando la fracción orgánica (aceite) en desecho y la fase acuosa se filtró con un acrodisco 0.45  $\mu\text{m}$ . El análisis de los polifenoles contenidos en los extractos obtenidos se realizó mediante la metodología descrita en 4.4.



**Figura 36.** Montaje experimental para la extracción de polifenoles en aceites vegetales. Bomba de jeringa (BJ).

Cabe mencionar que las jeringas utilizadas fueron: de 3 mL de plástico (BD, ID 8.585) para la solución amortiguadora y de vidrio de 5 mL (Hamilton, ID 10.3 mm) para la muestra.

#### **4.6 Optimización del acoplamiento de la extracción líquido-líquido y la reacción de F-C en el microdispositivo.**

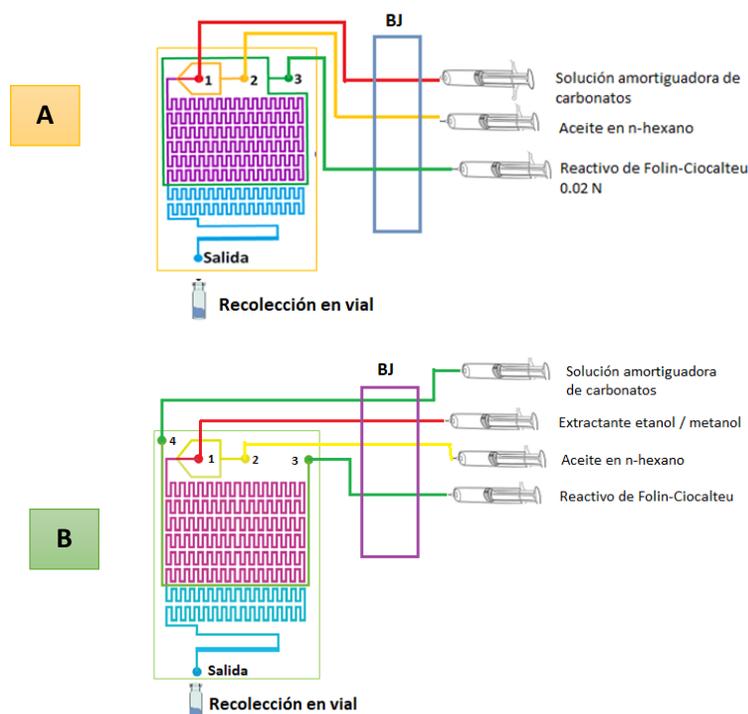
La optimización de la extracción se realizó con etanol:agua y metanol:agua, mediante una serie de experimentos en los que se estudió la influencia del pH de la solución amortiguadora, la concentración de extractante y la concentración del reactivo de Folin-Ciocalteu. Todas las pruebas de optimización se llevaron a cabo con la muestra de aceite de oliva extra virgen (PONS / Lote 055/6685).

En el caso de la extracción-reacción con solución amortiguadora de carbonatos en el microchip, se realizó bajo las condiciones óptimas establecidas por Chávez (2017): solución amortiguadora pH 10.6, 0.75 M y reactivo de Folin-Ciocalteu 0.02 M.

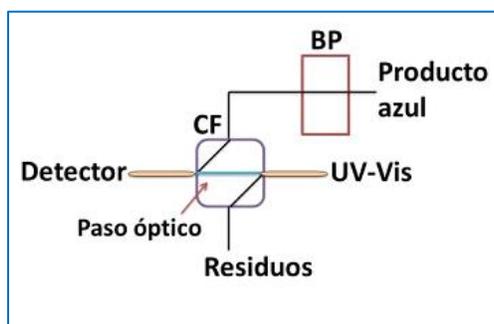
#### 4.6.1 Configuración experimental.

Para la extracción líquido-líquido y la formación del producto de reacción color azul, se emplearon cuatro bombas de jeringa para la extracción con etanol o metanol y tres para la extracción con solución amortiguadora de carbonatos, programadas a un caudal de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  y unidas con tubería de teflón al microdispositivo (*Figura 37*). El producto de reacción se recolectó en un vial durante 5 min y con un cuentagotas se separó la fase superior correspondiente al aceite en n-hexano.

La detección se realizó fuera del microdispositivo en una celda de flujo en forma de Z (longitud de paso óptico de 1 cm), empleando como blanco agua destilada. La celda se llenó por 22 s a un caudal de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  con el producto colorido contenido en la fase acuosa, una vez llena se detuvo el flujo y se registró la absorbancia durante 4 min a  $\lambda = 730 \text{ nm}$ , empleando fibras ópticas (*Figura 38*). Para el tratamiento de los datos de absorbancia se consideró el valor promedio de los últimos 20 valores registrados ( $A_{\text{prom}}$ ), así, al realizarlo por triplicado se obtuvo  $A_{\text{prom-prom}}$ .



**Figura 37.** Configuración para la extracción de compuestos fenólicos en aceites vegetales y desarrollo del producto de reacción en el microdispositivo. A) Extracción con solución amortiguadora. B) Extracción con etanol/metanol. Bomba de jeringa (BJ)



**Figura 38.** Configuración para la detección espectrofotométrica a través de fibras ópticas del producto de reacción fuera del microdispositivo. Bomba peristáltica (BP), Celda de flujo (CF).

Cabe mencionar que las jeringas utilizadas fueron de 3 mL de plástico (BD, ID 8.585) para los reactivos y de vidrio de 5 mL (Hamilton, ID 10.3 mm) para la muestra.

#### **4.6.2 Evaluación de la concentración del extractante: etanol:agua y metanol:agua.**

Se evaluaron diferentes proporciones de etanol:agua y metanol:agua, con la finalidad de seleccionar aquella que permitiera extraer la mayor cantidad de polifenoles y a su vez no causara turbidez. Las proporciones analizadas para ambas mezclas fueron 60:40, 50:50, 40:60, 30:70 y 20:80% V/V. Como muestra se utilizó aprox. 0.2 g de aceite de oliva extra virgen llevando al aforado de 5.0 mL con n-hexano, y para la determinación de polifenoles se utilizaron una solución amortiguadora de carbonatos (0.75 M, pH 10.6) y el reactivo de Folin-Ciocalteu a 0.02 M

#### **4.6.3 Evaluación de la influencia del pH de la solución amortiguadora de carbonatos y de la concentración del reactivo de Folin-Ciocalteu en la determinación de compuestos fenólicos en el microdispositivo.**

Una vez establecidas las proporciones de extractante de etanol:agua (30:70% V/V) o metanol:agua (40:60% V/V, se procedió a establecer el pH de la solución amortiguadora de carbonatos, que daría la condición básica para que se lleve a cabo la reacción, así como la concentración de Folin-Ciocalteu. Para ello,

---

---

se realizaron varias extracciones con soluciones de carbonatos 0.75 M a pH's 10.6, 11 y 13 y 14, y concentraciones de Folin-Ciocalteu de 0.01 a 0.04 M.

Las absorbancias ( $A_{\text{prom-prom}}$ ) registradas se analizaron mediante la prueba de t-student, para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en las respuestas obtenidas.

#### **4.6.4 Construcción de curvas de calibración para el acoplamiento de la extracción líquido-líquido y la reacción de F-C en el microdispositivo.**

Previo a la construcción de la curva de calibración para la extracción, se estimó el intervalo lineal, así como los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ); para ello se prepararon estándares de ácido tánico (ÁT) en el intervalo de concentraciones de 0.05 a 25.41  $\mu\text{g/mL}$  a partir de una disolución madre de 1444  $\mu\text{g/mL}$ .

Cada estándar fue tratado bajo las condiciones óptimas establecidas para la extracción-reacción en el microdispositivo de compuestos fenólicos con etanol:agua (30:70% V/V, solución de carbonatos 0.75 M pH 13.0 y F-C 0.03 M) y metanol:agua (40:60% V/V, solución de carbonatos 0.75 M pH 13.0 y F-C 0.03 M). Las determinaciones se hicieron por triplicado, bajo el montaje experimental descrito en la sección 4.6.1.

Las absorbancias ( $A_{\text{prom-prom}}$ ) registradas se analizaron de acuerdo con la prueba de intervalo lineal (Huber, 2010), donde se construyó un gráfico de  $A_{\text{prom prom}} / |\text{AT}|$  vs  $\log |\text{AT}|$ , en el que se ubicó el cociente de la respuesta registrada entre la concentración  $\pm 5\%$ . Las concentraciones cuya relación Abs / concentración están dentro del intervalo delimitado, correspondieron al intervalo lineal de la curva de calibración.

En cuanto a los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ), se estimaron considerando la respuesta analítica y la señal del ruido basal. Para el caso de LD, se seleccionó la concentración del estándar de ácido tánico que generó una

respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos 3:1, mientras que para el LQ la proporción seleccionada fue 10:1.

Una vez conocidos el LD, LQ e intervalo lineal, se realizó la curva por triplicado para cada extractante: etanol:agua y metanol:agua. Para ello se prepararon estándares de ácido tánico en agua destilada de 4.04 a 20.21 µg/mL para etanol y 8.08 a 18.19 21 µg/mL para metanol; mientras que para la extracción con solución amortiguadora se utilizaron estándares de 2.11 a 19.08 µg/mL, de acuerdo con las condiciones establecidas por Chávez (2017). Las absorbancias fueron recopiladas y tratadas en *Microsoft Excel 2010* para la construcción de cada curva de calibración.

### 4.7 Análisis de muestras de aceites vegetales.

Empleando dos metodologías diferentes: por lote y en microdispositivo, se realizó la extracción y cuantificación de compuestos fenólicos en 10 muestras de aceites vegetales (*Figura 39*).

- Aceite vegetal comestible, *Golden Hills* (México, Lote: 19037031)
- Aguacate, *Ahuacatlán 100% natural* (México, Lote: 35418MB1341)
- Oliva extra virgen, *Pons Ecológico* (México, Lote: 055/6685)
- Ajonjolí tostado, *Del Moro* (México, Lote: C119)
- Ajonjolí puro extra virgen, *Del Moro* (México, Lote:3135)
- Linaza extra virgen, *Inés Aceites Naturales* (México, Lote: 1037)
- Linaza extra virgen, *Enature 100% natural* (México, Lote: AL170531)
- Pepita de uva refinado, *Inés Aceites Naturales* (México, Lote:0967)
- Pepita de uva puro, *Del Moro* (Chile, Lote: E105)
- Cacahuete tostado, *Inés Aceites Naturales* (México, Lote: 1034)



Figura 39. Muestras de aceite vegetal comerciales.

#### 4.7.1 Extracción con microdispositivo.

Para llevar a cabo la extracción y la determinación de compuestos fenólicos en cada uno de los aceites, se prepararon 3 disoluciones por muestra para cada extractante. Cada muestra (cantidades mostradas en la *Tabla 6*) fue llevada al aforo con n-hexano y tratada bajo la configuración experimental y condiciones óptimas establecidas en las secciones 4.6.1 y 4.6.4, respectivamente.

**Tabla 6.** Masa de muestras expresada en gramos de la cantidad de aceite necesaria para la extracción de polifenoles usando el microchip.

Muestra	Extractante		
	Etanol:Agua 30:70% V/V	Metanol:Agua 40:60% V/V	Solución amortiguadora 0.75 M, pH 10.6
Aceite vegetal comestible, <i>Golden Hills</i>	0.2	0.2	0.2
Aguacate, <i>Ahuacatlán</i>	2	3	2
Oliva extra virgen, <i>Pons Ecológico</i>	0.15	0.2	0.2
Ajonjolí tostado, <i>Del Moro</i>	0.15	0.2	0.2
Ajonjolí puro extra virgen, <i>Del Moro</i>	0.2	1	0.2
Linaza extra virgen, <i>Inés</i>	0.2	1	0.2
Linaza extra virgen, <i>Enature</i>	1	2	1
Pepita de uva refinado, <i>Inés</i>	0.2	1	0.2
Pepita de uva puro, <i>Del Moro</i>	1	2	1
Cacahuete tostado, <i>Inés</i>	0.2	0.3	0.2

#### 4.7.2 Extracción en lote

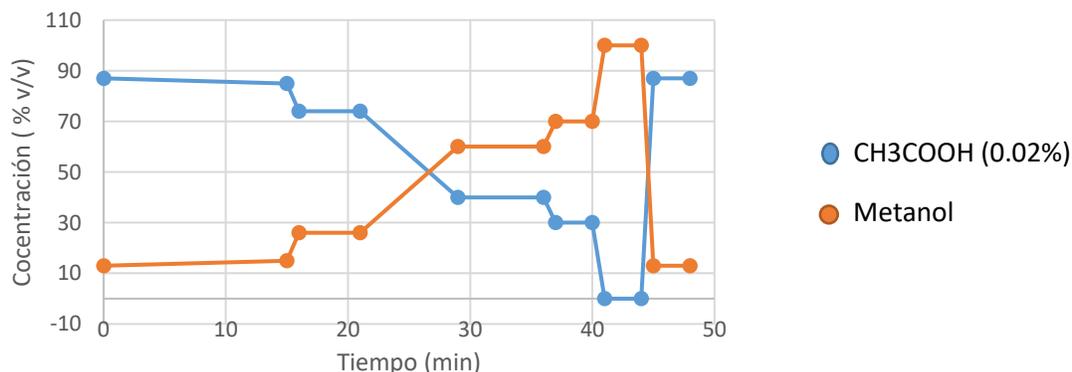
La extracción por lote se llevó a cabo, con cada extractante, por triplicado, para cada una de las muestras, de acuerdo con la metodología descrita en la sección 4.5.1. Para las muestras de aceite vegetal comestible, ajonjolí puro extra virgen y cacahuete tostado se pesó 4 g, mientras que, para los aceites de linaza extra virgen, pepita de uva y aguacate se pesó 8 g. La determinación de los compuestos fenólicos se realizó a través del método de Folin-Ciocalteu acoplado al Sistema de análisis por inyección de flujo descrito en la sección 4.4.

#### 4.8 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de extractos obtenidos mediante extracción por lote.

Para poder comparar las diferencias entre las fracciones fenólicas extraídas de cada una de las muestras de aceite con los diferentes extractantes, se realizó una cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) de los extractos obtenidos por lote con los extractantes: metanol:agua 40:60% V/V, etanol:agua 30:70% V/V y solución amortiguadora de carbonatos 0.75 M, pH 10.6. Dicho análisis se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) por el Dr. Víctor Javier Zaldívar.

Para ello, se empleó una columna Pursuit C18 (150 x 4.6 mm, marca Varian) de 5  $\mu\text{m}$  y una fase móvil  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0.02%):Metanol, bajo un flujo de 1 mL/min y una presión de 500 bar, variando la composición de la fase móvil como se observa en la *Gráfica 1*.

**Gráfica 1.** Variación de la composición de la fase móvil durante el análisis.



Las determinaciones se realizaron a cinco longitudes de onda: 250, 260, 280, 290 y 320 nm, para la identificación de los estándares mostrados en la *Tabla 7*.

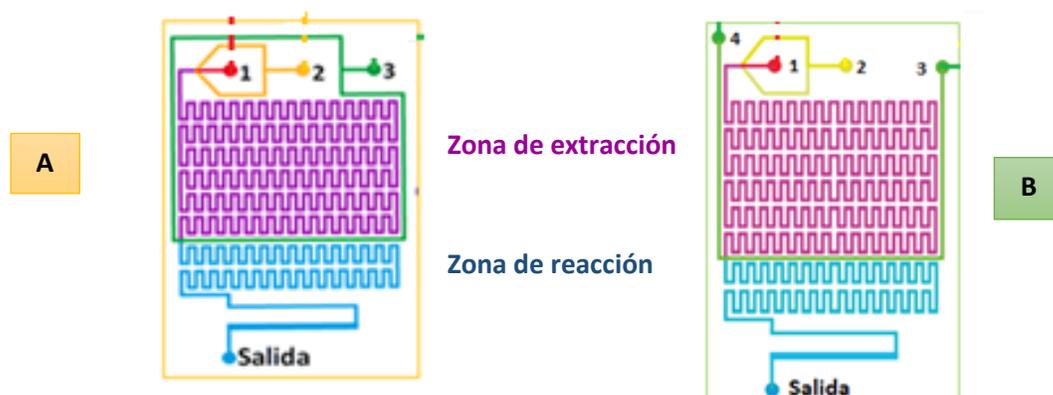
**Tabla 7.** Estándares de compuestos fenólicos determinados mediante HPLC.

<b>Estándar</b>	<b>Longitud de onda máxima (nm)</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
<b>3,4-ácido dihidroxibenzoico</b>	260	6.34
<b>1,2-dihidroxibenzeno</b>	280	7.53
<b>4-ácido hidroxibenzoico</b>	260	11.23
<b>Ácido clorogénico</b>	320	14.04
<b>4-hidroxibenzaldehido</b>	280	14.22
<b>Ácido vanílico</b>	260	16
<b>Ácido cafeico</b>	320	18
<b>Vainillina</b>	280	19.4
<b>Ácido p-cumárico</b>	290	23.7
<b>Ácido trans-ferúlico</b>	320	25.8
<b>Ácido sinápico</b>	320	26.4
<b>Naringenina</b>	290	31.9
<b>Bisfenol A</b>	280	34.8

## 5. Resultados y discusión.

### 5.1 Fabricación y caracterización de microdispositivos.

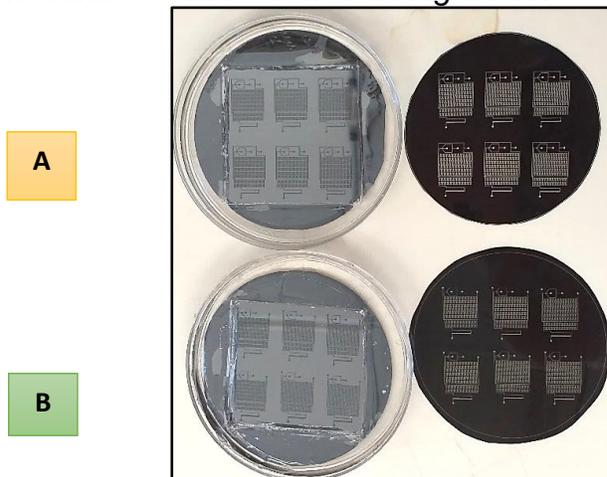
El diseño del microchip, tanto para la extracción con etanol, metanol o con solución amortiguadora de carbonatos, consistió en tres partes principales (*Figura 40*): (1) Zona de extracción, donde se introdujeron la muestra junto con el extractante, y que abarcó desde su mezclado hasta antes de la entrada del reactivo de Folin-Ciocalteu. La finalidad de esta etapa fue lograr que los polifenoles al exponerse al extractante fueran extraídos de acuerdo con su afinidad con el mismo. (2) Zona de reacción, donde se incorpora el reactivo de Folin-Ciocalteu, y el medio básico en caso de la extracción con etanol o metanol, para la formación del producto de reacción. (3) Salida de los reactivos y el producto de la reacción del microdispositivo, para la posterior recolección en el vial.



**Figura 40.** Diseño de los microdispositivos fabricados para la extracción líquido-líquido de polifenoles en aceites comerciales. Se aprecian tres entradas en el microchip *A*, que corresponden a: (1) solución amortiguadora de carbonatos, color rojo; (2) muestra, color naranja y (3) reactivo de Folin-Ciocalteu, color verde; mientras que para el microchip *B*, se aprecian cuatro entradas: (1) solución de etanol o metanol, color rojo, (2) muestra, color amarillo, (3) reactivo de Folin-Ciocalteu, color verde y (4) solución amortiguadora de carbonatos, color verde. En ambos casos hay un orificio extra para la salida y recolección del producto de reacción. Asimismo, se identifican dos zonas: la zona color morado corresponde a la zona de extracción mientras que los canales de color azul a la zona de reacción.

En cuanto a la observación de los diseños impresos en negativo, para su posterior uso como máscara durante el proceso fotolitográfico, no se distinguieron

ningún tipo de imperfecciones que pudieran ser transferidas al molde, por lo que los microcanales de los microchips fabricados estuvieron bien definidos y sin irregularidades. Las imágenes de la comparación entre las máscaras de acetato y los moldes construidos se muestran en la *Figura 41*.



**Figura 41.** Máscara de acetato (derecha) y molde con PDMS construido (izquierda). (A) Diseño para la extracción con solución amortiguadora de carbonatos y (B) Diseño para la extracción con solución de etanol o metanol.

Los resultados de la caracterización de los microchips se muestran en la *Tabla 8*, es importante recalcar que la longitud del serpentín de extracción (LSE) se midió desde la mezcla de la muestra con el extractante hasta la entrada del reactivo de Folin-Ciocalteu, mientras que la longitud del serpentín de reacción (LSR) correspondió desde la entrada del reactivo Folin-Ciocalteu hasta la salida del microchip; la longitud total de los microcanales (LT) es la suma de las longitudes anteriores más las entradas de los reactivos y muestra antes de ser mezclados y el volumen total (VT) es el producto de la profundidad, anchura y longitud total.

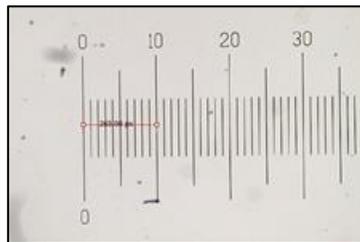
**Tabla 8.** Caracterización de los microdispositivos de los diseños de la Figura 40.

Diseño	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Profundidad ( $\mu\text{m}$ )	LSE (cm)	LSR (cm)	LT (cm)	VT ( $\mu\text{L}$ )
Extracción con solución amortiguadora de Carbonatos	166.21 $\pm$ 4.74	106.72 $\pm$ 5.67	32.37	12.86	45.23	8.02
Extracción con metanol/etanol	144.16 $\pm$ 7.57	139.96 $\pm$ 8.93	32.37	12.86	45.23	9.12

En la *Figura 42*, se muestra un ejemplo de las fotos tomadas de la sección transversal de un microchip para la medición de la profundidad y el ancho de los microcanales, en la que se aprecia de manera más notoria la forma de los microcanales. En la *Figura 43* se muestra un ejemplo de las fotos tomadas de la retícula utilizada para las mediciones y en la *Figura 44* se localiza la imagen de los microdispositivos una vez pegados sobre la superficie de vidrio.



**Figura 42.** Fotografía del corte transversal de los microcanales del microchip para la extracción con etanol o metanol.



**Figura 43.** Fotografía de la retícula ocupada para las mediciones de anchura y profundidad, donde cada 500  $\mu\text{m}$  corresponden a 264.44 píxeles.

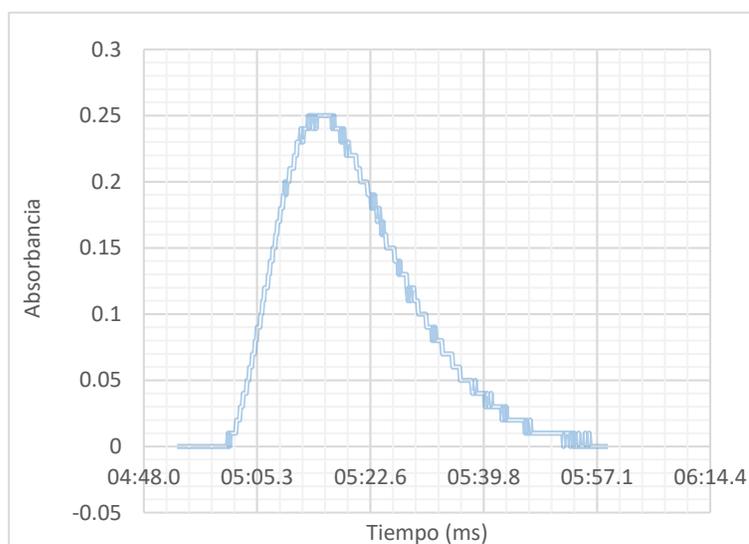


**Figura 44.** Micordispositivos de PDMS pegados en portaobjetos para la extracción con solución amortiguadora de carbonatos.

## 5.2 Método de Folin-Ciocalteu acoplado a FIA.

### 5.2.1 Análisis de la señal obtenida por F-C-FIA.

La señal obtenida para determinar el contenido de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu acoplado a FIA, consistió en un solo pico (*Figura 45*), donde la altura máxima de la señal es proporcional a la concentración de polifenoles presentes en la muestra. Esta configuración se utilizó para los extractos obtenidos por lote o ultrasonido ya que para la extracción con microchips la reacción de F-C ocurre dentro del mismo dispositivo y posteriormente se mide la absorbancia del producto fuera de línea.

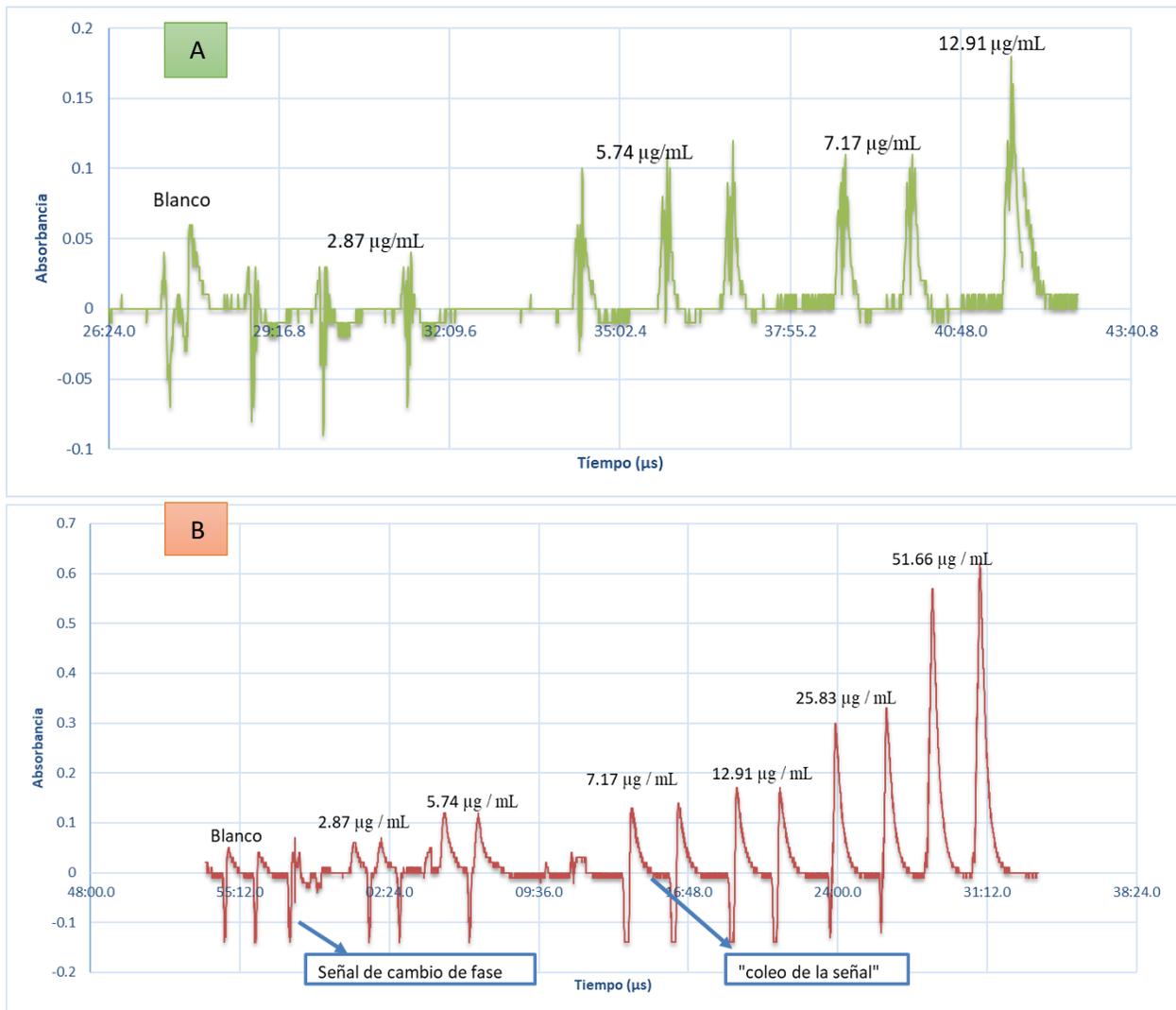


**Figura 45.** Ejemplo de señal obtenida mediante FIA para la determinación de polifenoles en un extracto de aceite de oliva.

### 5.2.2 Evaluación de la configuración FIA para determinar polifenoles para cada extractante: etanol:agua 30:70% V/V y metanol:agua 40:60% V/V.

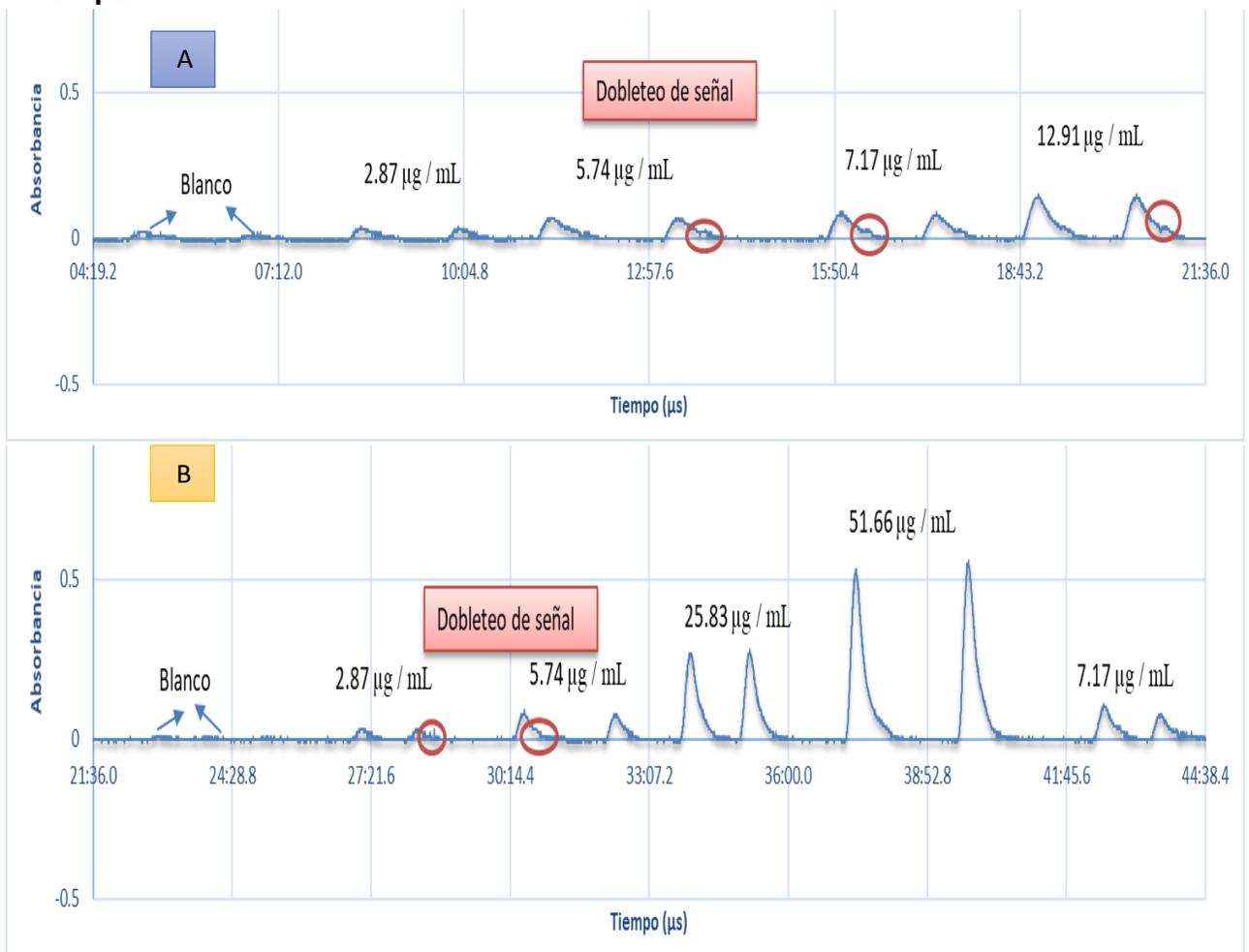
Debido a que las señales obtenidas con los extractos producidos mediante extracción con etanol:agua 30:70% V/V y metanol:agua 40:60% V/V no estaban bien definidas, se decidió optimizar el sistema FIA para obtener señales donde el extractante no interfiriera, evitando la sub o sobreestimación de la absorbancia registrada y por consecuencia de la concentración de polifenoles totales.

Los primeros experimentos consistieron en optimizar el sistema FIA para los estándares de ácido tánico en etanol:agua a dos caudales 15 y 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  y utilizando como portador agua. En la *Figura 46 A*, se observa que las señales registradas a un caudal de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  mostraron mucho ruido por lo que era difícil establecer la absorbancia máxima, mientras que a un caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  (*Figura 46 B*) las señales registradas presentaron un alargamiento en la línea base ("coleo") y ruido en el pico de dichas señales. Además, para ambos caudales se obtuvieron señales negativas debido al cambio de fase de agua a etanol.



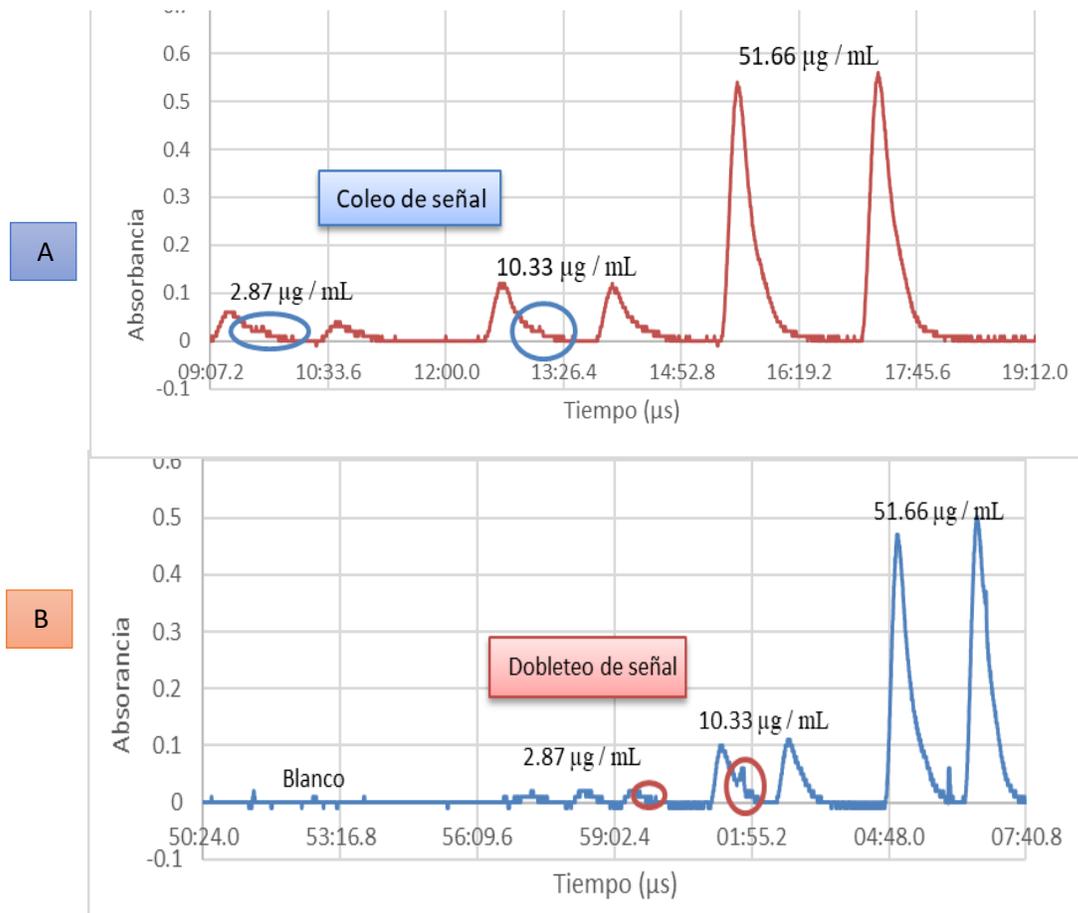
**Figura 46.** Señales registradas para estándares de ácido tánico en la configuración FIA utilizando como portador agua. (A) Caudal 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  y (B) Caudal 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Para evitar el ruido y lograr la disminución de la señal al inicio del pico, se cambió el portador por una disolución de etanol:agua 30:70% V/V y se realizaron las pruebas a tres caudales 15, 20 y 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ . En la *Figura 47 A*, se observa que las señales registradas a un caudal de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  presentaron un dobleteo en la parte final de la señal, mientras que las señales a 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  (*Figura 47 B*) mostraron un dobleteo solo en concentraciones muy pequeñas (2.87 y 5.74  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Finalmente, se realizó una lectura para el estándar 2.82  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a un caudal de 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ , observándose una señal con ruido similar a la presentada a un caudal de 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  cuando el portador era agua (*Figura 46 A*). Por lo tanto, las condiciones más favorables para cuantificar polifenoles en aceites cuando la extracción se hace con etanol:agua 30:70% V/V son: **portador etanol:agua 30:70% V/V y un caudal de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ .**



**Figura 47.** Señales registradas para estándares de ácido tánico en la configuración FIA utilizando como portador etanol:agua 30:70% V/V. (A) Caudal 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  y (B) Caudal 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Por otro lado, la optimización del sistema para metanol:agua, se realizó a partir del uso de metanol:agua 40:60% V/V como portador, debido a que en la optimización con etanol:agua las señales mejor definidas se establecieron al cambiar el portador. Para ello, se realizaron pruebas a tres diferentes caudales 15, 20 y 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Como resultado se obtuvo que a 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  las señales se “coleaban”, mientras que a un caudal de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  se presentaba un doblete de las señales cuando la concentración de los estándares era pequeña (2.87 a 10.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Finalmente, a un caudal de 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ , las señales no presentaban un perfil parabólico si no que consistían en señales sin un máximo definido. Por lo tanto, las condiciones más favorables para extracciones con metanol:agua 40:60% V/V son: **portador metanol:agua 40:60% V/V y un caudal de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ .**



**Figura 48.** Señales registradas para estándares de ácido tánico en la configuración FIA utilizando como portador metanol:agua 40:60% V/V. (A) Caudal 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  y (B) Caudal 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

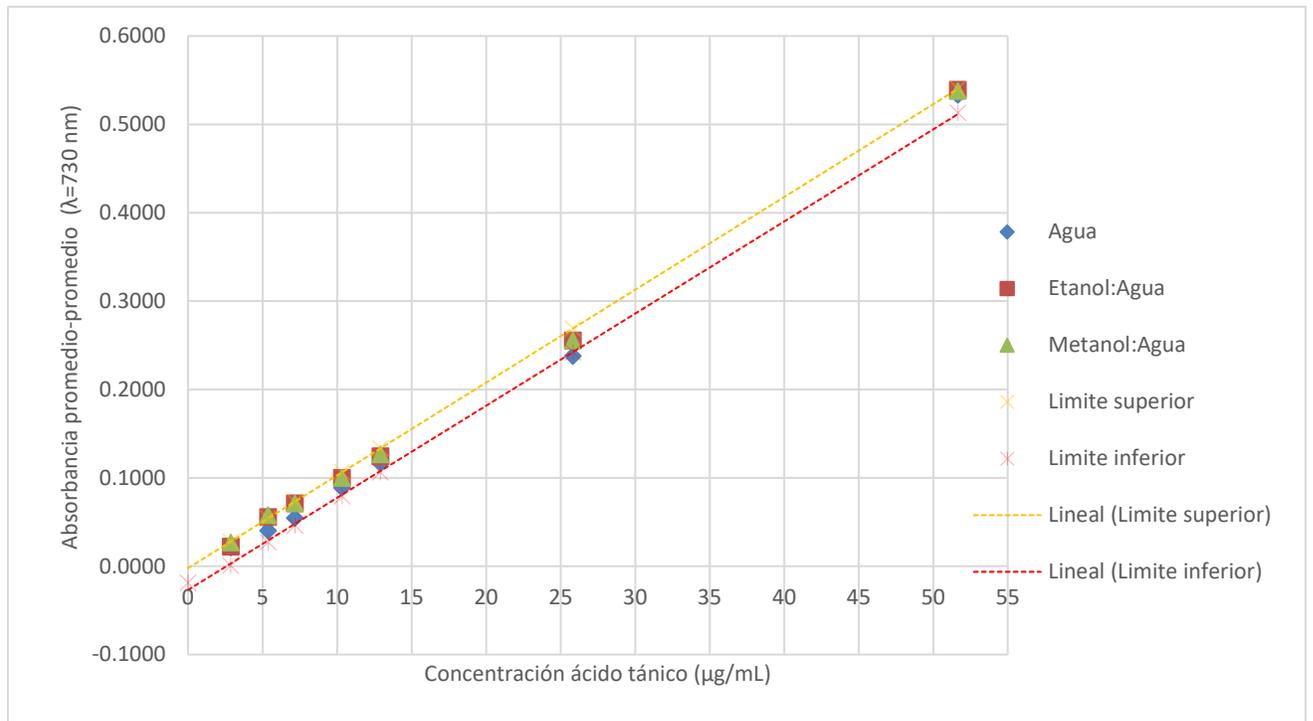
### 5.2.3 Curvas de calibración para determinar polifenoles por el sistema Folin-Ciocalteu-FIA.

Para la elaboración de las curvas de calibración se prepararon disoluciones estándar de 2.87 a 51.66 µg/mL, a partir de una disolución de ácido tánico de 1435 µg/mL, las cuales se inyectaron por triplicado en un sistema de inyección en flujo. Para corroborar que no hubiera diferencias estadísticamente significativas en la preparación de las curvas de calibración, se decidió construir por triplicado cada curva. En la *Tabla 9* se muestran las absorbancias promedio registradas para cada estándar (*Anexo 1*, diagramas), mientras su representación gráfica se muestra en la *Gráfica 2* y en la *Tabla 10* los respectivos parámetros estadísticos de cada curva.

**Tabla 9.** Absorbancias promedio-promedio para cada estándar de ácido tánico (ÁT) en cada uno de los sistemas FIA.

Concentración µg ÁT/mL	A prom-prom ± S (n=3)		
	Agua	Etanol: Agua	Metanol: Agua
2.87	0.0211 ± 0.0019	0.0222 ± 0.0019	0.02665 ± 0.0051
5.374	0.0400 ± 0.00	0.0555 ± 0.0069	0.0578 ± 0.0019
7.175	0.0544 ± 0.0020	0.0711 ± 0.0019	0.0711 ± 0.0019
10.332	0.0892 ± 0.0101	0.1000 ± 0.0033	0.1000 ± 0.0033
12.915	0.1168 ± 0.0100	0.1245 ± 0.0038	0.1267 ± 0.0088
25.83	0.2378 ± 0.0203	0.2556 ± 0.0083	0.2556 ± 0.0138
51.66	0.5333 ± 0.0152	0.5393 ± 0.0109	0.5378 ± 0.0101

**Gráfica 2.** Curvas de calibración de ácido tánico para cada uno de los sistemas FIA.



**Tabla 10.** Parámetros estadísticos de las curvas de calibración.

Curva	Pendiente (μg ÁT/mL)	Ordenada al origen	R <sup>2</sup>
Agua	0.0105 ± 0.0005	-0.0188 ± 0.0099	0.9979
Etanol:Agua	0.0105 ± 0.00063	-0.0073 ± 0.014	0.9992
Metanol:Agua	0.0104 ± 0.00069	-0.0049 ± 0.015	0.9992

Como se puede observar en la *Tabla 10*, las curvas elaboradas para cada una de las adaptaciones del sistema FIA a los diferentes portadores son indistintas, pues las curvas para etanol:agua y metanol:agua se encuentran dentro del intervalo de confianza del 95 % de la curva de calibración elaborada con estándares en medio acuoso (*Gráfica 2*). Por lo cual se decidió utilizar la curva de calibración en medio acuoso para la cuantificación de polifenoles totales de las diferentes muestras, siempre respetando las condiciones óptimas de análisis del extractante a utilizar: medio acuoso (portador agua y un caudal de 15 μl/min), metanol:agua (portador metanol:agua 40:60 % V/V y un caudal de 15 μl/min) o etanol:agua (portador etanol:agua 30:70% V/V y un caudal de 20 μl/min).

### 5.3 Optimización de la extracción asistida por ultrasonido.

En esta parte de la investigación, se buscó mejorar el proceso de extracción de polifenoles en aceite de ajonjolí puro y aceite de oliva extra virgen mediante el uso de la sonda de ultrasonido. Para ello fue necesario realizar la optimización de las variables: tiempo de irradiación, tiempo de no irradiación y número de ciclos, utilizando como extractante una solución amortiguadora de carbonatos pH 10.6, 0.75 M.

Los primeros experimentos tuvieron como finalidad ver como influía el tiempo total de irradiación en la cantidad de compuestos fenólicos extraídos (determinada mediante el sistema Folin-Ciocalteu-FIA). En la *Tabla 11* se muestran los resultados obtenidos para la optimización del tiempo total de irradiación, donde se utilizaron las siguientes condiciones: 5 s irradiación / 5 s no irradiación / 40% potencia (160 Htz.) / 20 mL de solución amortiguadora de carbonatos y 2 g de aceite, variando el número de ciclos de irradiación de 2, 3, 4 y 5.

**Tabla 11.** Evaluación del tiempo total de irradiación para la extracción de compuestos antioxidantes en el aceite de oliva usando ultrasonido (ciclos 5 s de irradiación y 5 s de no irradiación).

No. de ciclos	Concentración ( $\mu\text{g ÁT} / \text{g muestra}$ ) $\pm S$ (n=3)
2	< L.D.
3	43.29 $\pm$ 5.49
4	56.03 $\pm$ 0.00
5	65.17 $\pm$ 0.30

Como se observa en la *Tabla 11*, entre mayor es el tiempo de irradiación, mayor es la cantidad de polifenoles que son extraídos del aceite, ya que permanecen en contacto por más tiempo el extractante y la muestra, aumentando la superficie de contacto y con ello la transferencia de masa, permitiendo, de esta manera, que la fracción fenólica se desprotone en mayor proporción y forme los iones fenóxido que presentan mayor afinidad a la fase acuosa (extractante). En este caso no se llegó a completar la experimentación hasta un máximo de irradiación,

sin embargo, en una experimentación previa se observó que a 4 ciclos de irradiación (10 s irradiación /5 s de no irradiación / 40% potencia) se presentó un decaimiento en el contenido de polifenoles y se atribuyó al efecto que tiene el tiempo de radiación-no irradiación sobre la estabilidad de dichos compuestos.

Como siguiente paso, se realizó la optimización de los ciclos de irradiación y no irradiación, para la cual se utilizó el programa Statgraphics para hacer un diseño de experimentos factorial  $2^3$  en el que los factores de entrada fueron: el tiempo de irradiación, tiempo de no irradiación y número de ciclos, siendo el factor de respuesta en este caso la concentración de polifenoles expresada en mg de ácido tánico/kg muestra. Dicho programa generó una serie de 11 experimentos aleatorios, donde con ocho de ellos se estudió los puntos máximos y mínimos, mientras que con los otros tres (puntos centrales) se calculó la precisión. Para llevar a cabo dicha experimentación se utilizaron las siguientes condiciones: 2 mL de solución amortiguadora de carbonatos, 2 g de aceite y 40% de potencia. Los resultados se muestran a continuación (*Tabla 12*).

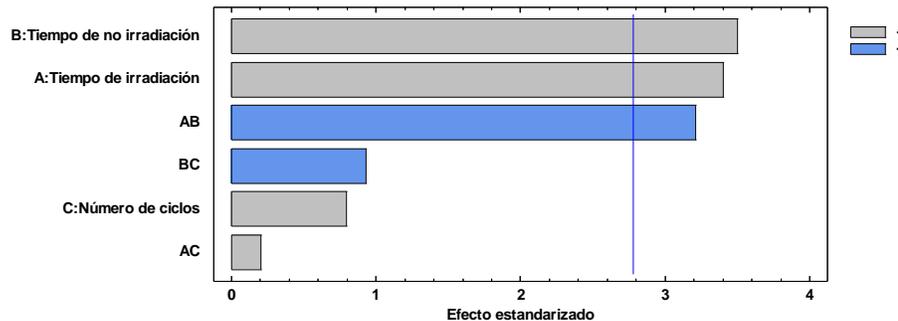
**Tabla 12.** Diseño de experimentos para la optimización de los ciclos de radiación-no irradiación de la extracción de los polifenoles por ultrasonido.

Condiciones de experimentación	Concentración ( $\mu\text{g}$ ácido tánico/g muestra)	Promedio $\pm$ S (n=3)
5 s irradiación / 5 s de no irradiación / 2 ciclos	42.0210	42.02 $\pm$ 0.00
	42.0210	
	42.0210	
5 s irradiación / 5 s de no irradiación / 8 ciclos	51.3760	49.81 $\pm$ 1.36
	49.0279	
	49.0279	
8 s irradiación / 8 s de no irradiación / 5 ciclos	58.1193	56.56 $\pm$ 1.35
	55.7833	
	55.7833	
5 s irradiación / 10 s de no irradiación / 8 ciclos	60.9185	60.92 $\pm$ 0.00
	60.9185	
	60.9185	
10 s irradiación / 10 s de no irradiación / 2 ciclos	62.5611	61.78 $\pm$ 1.34
	60.2337	
	62.5611	
8 s irradiación / 8 s de no irradiación / 5 ciclos	56.3612	56.36 $\pm$ 0.00
	56.3612	
	56.3612	
10 s irradiación / 5 s de no irradiación / 8 ciclos	63.6534	63.65 $\pm$ 0.00
	63.6534	
	63.6534	
5 s irradiación / 10 s de no irradiación / 2 ciclos	65.6263	65.62 $\pm$ 0.00
	65.6263	
	65.6263	
10 s irradiación / 10 s de no irradiación / 8 ciclos	65.7758	65.77 $\pm$ 0.00
	65.7758	
	65.7758	
10 s irradiación / 5 s de no irradiación / 2 ciclos	63.2286	62.44 $\pm$ 1.36
	60.8764	
	63.2286	
8 s irradiación / 8 s de no irradiación / 2 ciclos	52.9563	54.49 $\pm$ 1.34
	55.2709	
	55.2709	

Con base en los resultados obtenidos anteriormente, se realizó un tratamiento estadístico para visualizar cuál de los factores tiene un impacto sobre el

resultado de la extracción. Dicho tratamiento consistió en la construcción del gráfico de Pareto (*Gráfica 3*) y un análisis de varianza (*Tabla 13*).

**Gráfica 3.** Diagrama de Pareto estandarizado de las variables tiempo de irradiación-no irradiación y número de ciclos en la determinación de contenido de polifenoles totales.



En el diagrama de Pareto se puede observar que los factores de tiempo de irradiación y tiempo de no irradiación, así como su interacción, traspasan la línea vertical que representa el test de 95% de significancia, es decir, que dichos factores tienen un efecto considerable en la extracción. En este caso, el tiempo de irradiación y no irradiación influye positivamente en la extracción, por lo cual entre más tiempo de irradiación o no irradiación se haga incidir en la muestra mayor será la concentración de polifenoles obtenida; sin embargo, si el tiempo de irradiación es mayor al tiempo de no irradiación, la extracción no se ve favorecida debido al proceso oxidativo que genera las ondas ultrasónicas de la sonda sobre los polifenoles, causando su inestabilidad y descomposición.

Esto también se comprueba con los valores-P obtenidos mediante el análisis de varianza que se muestran en la *Tabla 13*, donde tres efectos (tiempo de irradiación /tiempo de no irradiación y su interacción) tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

**Tabla 13.** Análisis de varianza en la determinación de la concentración de polifenoles totales.

<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Tiempo de irradiación	144.018	1	144.018	11.58	0.0272
B: Tiempo de no irradiación	152.086	1	152.086	12.23	0.0250
C: Número de ciclos	7.91324	1	7.91324	0.64	0.4697
AB	128.062	1	128.062	10.30	0.0326
AC	0.510707	1	0.510707	0.04	0.8493
BC	10.8217	1	10.8217	0.87	0.4037
Error total	49.7347	4	12.4337		
Total (corr.)	49.147	10			

En la *Tabla 12*, se observa que las condiciones en las que se obtiene mayor concentración son: 10 s irradiación / 5 s de no irradiación / 8 ciclos; 5 s irradiación / 10 s de no irradiación / 2 ciclos y 10 s irradiación / 10 s de no irradiación / 8 ciclos.

Debido a que las condiciones de extracción llevadas a cabo con 8 ciclos de irradiación generaban un calentamiento en la muestra, se optó en establecer como condiciones óptimas de extracción: **5 s irradiación / 10 s de no irradiación / 2 ciclos.**

#### **5.4 Análisis comparativo de la cuantificación con base en la metodología de extracción.**

En la *Tabla 14* se muestran los resultados de la concentración y contenido de polifenoles totales para aceite de ajonjolí puro y de oliva extra-virgen obtenidos por lote, ultrasonido y microchip. En el caso del microchip, se hizo la extracción solamente en el dispositivo recolectándose en un vial ambas fases, para posteriormente separar la fase acuosa y determinar los polifenoles por FIA. De igual forma las extracciones realizadas por lote o por ultrasonido también se efectuaron por FIA.

**Tabla 14.** Contenido de polifenoles en extractos de aceite de ajonjolí y de oliva extra-virgen obtenidos por tres métodos diferentes.

Extracción	Polifenoles totales µg ácido tánico / g muestra ± S (n=3)	
	Aceite de ajonjolí puro	Aceite de oliva extra virgen
<b>Lote</b>	8.74 ± 0.35	98.16 ± 5.09
<b>Ultrasonido</b>	4.50 ± 0.59	63.98 ± 1.47
<b>Microdispositivo</b>	40.92 ± 4.47	90.25 ± 9.87

Como se aprecia en la *Tabla 14*, la concentración de compuestos fenólicos varía en función del método de extracción empleado. Por una parte, al comparar los resultados obtenidos con extracción en lote y con ultrasonido, es evidente que la extracción mediante ultrasonido no es un buen recurso si se busca extraer la mayor cantidad de compuestos antioxidantes, ya que la concentración de polifenoles totales obtenida a través de la extracción por lote del aceite de oliva es 1.5 veces mayor que la que se obtiene por ultrasonido, por lo que el método de extracción por ultrasonido no es favorable para obtener mayor cantidad de compuestos fenólicos. Esto también se puede apreciar en el aceite de ajonjolí, donde el contenido de polifenoles sufre una disminución del 50 % de la concentración de dichos compuestos al aplicar la extracción por ultrasonido.

La disminución en la extracción al usar el ultrasonido se asocia principalmente a que:

- La sonda genera un proceso oxidativo que promueve la oxidación de los lípidos del aceite, por lo que, la muestra se ve afectada de sobremanera. Además, la sonda, genera calor, provocando de esta manera que la temperatura del extracto aumente y con ello parte de los compuestos se descompongan al ser inestables, debido a que varios estudios han establecido que a temperaturas mayores de 50 °C los polifenoles tienden a descomponer o unirse a macro y micronutrientes los cuales los hacen menos disponibles (Escutia, 2011; Reyes, 2014).
- Al realizar la extracción con ultrasonido se observó la formación de una capa “lechosa” entre las dos fases (acuosa-aceite), que impedía llevar a

cabo la recolección de la fase acuosa de manera adecuada. Dicha capa, se presentaba en mayor grado en el aceite de ajonjolí, eso debido a que la concentración de la fracción saponificable es de 187-195 mg/kg, que es mayor a la que presenta el aceite de oliva (40 – 135 mg/kg).

- El uso de ultrasonido generaba un número mayor de pasos, pues al terminó del tiempo de irradiación era necesario transferir la muestra a un tubo de centrifuga, generando una pérdida del analito en el transvaso.

Por otro lado, al comparar la extracción en lote y por microdispositivo, se observa que al realizar la extracción en microdispositivo y su determinación fuera de línea mediante FIA, no se presenta un aumento considerable, ya que al comparar el contenido de polifenoles totales se obtiene una concentración igual o ligeramente mayor (aprox. 4 veces en el caso del aceite de ajonjolí), que la extracción por lote. Esto puede deberse, como se mencionó anteriormente, a que los polifenoles son inestables al pH básico y debido a que el tiempo de extracción por el microdispositivo es de alrededor de 90 min, estos se ven afectados de mayor manera que por la extracción por lote, donde el tiempo de extracción es de 2 min, esto a pesar de que en ambos casos se añadió ácido clorhídrico de manera proporcional (6 gotas de ácido por cada 2 mL de solución amortiguadora de carbonatos).

No obstante, en nuestro grupo de trabajo se ha hecho la extracción con buffer de carbonatos, 0.75 M, pH 10.6, donde la formación del producto de reacción se ha realizado dentro del mismo microdispositivo (Lab-on-a-chip), obteniendo una concentración de polifenoles en el aceite de oliva PONS, de 264.19 mg/kg de muestra (Chávez, 2017). La diferencia, entre la concentración obtenida al llevar a cabo solo la extracción en el microchip y la detección fuera de línea, comparada con el acoplamiento de la extracción-reacción en el microchip, se debe principalmente a que al realizar la extracción-reacción en el dispositivo se desplaza el equilibrio químico a la formación del complejo colorido generando que se favorezca la obtención de los compuestos fenólicos. Así, cuando solo se lleva a cabo la extracción en el microchip sin la reacción de derivatización, la eficiencia de

extracción es menor. Por lo tanto, en el presente trabajo de la investigación se continuó con el acoplamiento de la reacción con la extracción para más aceites vegetales, así como el diseño e implementación para la extracción-reacción con etanol o metanol como extractante.

Finalmente, la diferencia del contenido de polifenoles totales entre el aceite de oliva y el de ajonjolí se debe principalmente a la identidad química de dichos compuestos. En el aceite de oliva se pueden encontrar diversidad de compuestos constituyentes de la fracción fenólica, que son ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides, lignanos y secoiridoides, mientras que en el aceite de ajonjolí se encuentran compuestos totalmente diferentes, que son sesaminol, sesamol, pinosinol, sesamol, ácido ferúlico y ácido siríngico.

### **5.5 Optimización del acoplamiento de la extracción líquido-líquido y la reacción de F-C en el microdispositivo.**

#### **5.5.1 Evaluación de la concentración de los extractantes: etanol:agua y metanol:agua.**

Para llevar a cabo la extracción de polifenoles en el microchip con extractantes orgánicos, fue necesario realizar una serie de experimentos que consistieron en variar las proporciones de etanol:agua y metanol:agua, con la finalidad de establecer la proporción de extractante que permitiera extraer la mayor cantidad de polifenoles de los aceites (*Tabla 15*). Para dichos experimentos se utilizaron las condiciones óptimas para la extracción acuosa de polifenoles en aceite de oliva, establecidas por Chávez (2017): solución amortiguadora de carbonatos (0.75 M, pH 10.6) y reactivo de Folin-Ciocalteu 0.02 M.

**Tabla 15.** Experimentos realizados para la optimización de la proporción etanol:agua y metanol:agua para la extracción-reacción de polifenoles en el microdispositivo, utilizando aproximadamente 0.2 g de aceite de oliva extra virgen.

Proporción etanol:agua (% V/V)	A <sub>prom-prom</sub>	Proporción metanol:agua (% V/V)	A <sub>prom-prom</sub>
60:40	Turbidez	60:40	Turbidez
50:50	Turbidez	50:50	Turbidez
40:60	Turbidez	40:60	0.0933
30:70	0.079	30:70	0.0803
20:80	0.065	20:80	0.0811

Al realizar las extracciones con proporciones de etanol 60, 50 y 40, así como proporciones de metanol 60 y 50, se obtuvieron productos de reacción con turbidez (*Figura 49*), que al ser ingresados a la celda de flujo presentaron una señal que aún después de 4 min no se mantenía estable (*Figura 50*). La sobreestimación ocurrida por la turbidez, con las proporciones más altas de etanol y metanol se atribuye en su totalidad al desprendimiento de oligómeros del microdispositivo, debido a la implementación del n-hexano como diluyente de la muestra de aceite, ya que una vez que entra en contacto con el PDMS cierta fracción queda alojada en las paredes del microchip, lo que provoca que el PDMS se hinche y desprenda dichos oligómeros que son fácilmente arrastrados por el etanol y el metanol. Las condiciones en las que la extracción con etanol y metanol en las que no se presentó turbidez y se presentó coloración, fueron (1) **Extracción con etanol:agua 30:70% V/V** y (2) **Extracción con metanol:agua 40:60% V/V**. Por lo tanto, se optó por establecer dichas condiciones como las concentraciones de los extractantes más adecuadas para llevar a cabo la extracción-reacción en el microchip.



**Figura 49.** Resultado cualitativo para la evaluación del porcentaje metanol:agua en la extracción-reacción de la fracción fenólica del aceite de oliva en el microdispositivo.

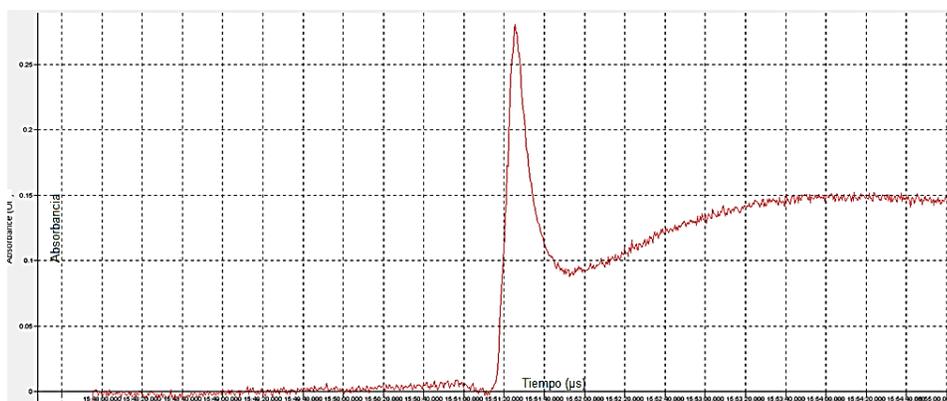


Figura 50. Representación de la señal obtenida de la extracción con presencia de turbidez.

### 5.5.2 Evaluación de la influencia del pH de la solución amortiguadora de carbonatos y de la concentración del reactivo de F-C en la determinación de compuestos fenólicos en el microdispositivo.

Para la optimización de la reacción en el microdispositivo de los extractos con etanol:agua y metanol:agua, se realizó una serie de experimentos con la finalidad de establecer la concentración del reactivo de F-C y del pH de la solución amortiguadora, pues ambos factores juegan un papel importante en la cuantificación de los compuestos fenólicos. Para ello, se tomaron en cuenta dos factores de respuesta: (1) una mayor absorbancia y (2) ausencia de turbidez en el producto de reacción. En el caso de la solución amortiguadora de carbonatos, se decidió dejar estable la concentración de 0.75 M, ya que, a dicha concentración Chávez (2017) señala que se obtuvo una mayor respuesta (absorbancia), por lo cual únicamente se fue variando el pH de la solución.

Los primeros experimentos consistieron en establecer las condiciones óptimas para la extracción con etanol:agua 30:70% V/V; para ello se realizaron determinaciones para establecer los límites máximos y mínimos del pH y de la concentración de Folin-Ciocalteu, para posteriormente realizar un diseño de experimentos. En la *Tabla 16*, se muestran las absorbancias promedio registradas para cada variación del pH y [F-C].

**Tabla 16.** Estudio del comportamiento del pH y [F-C] en la extracción-reacción de compuestos fenólicos de aceite de oliva.

<b>pH de solución amortiguadora</b>	<b>Concentración de Folin-Ciocalteu (mol / L)</b>	<b>A<sub>prom</sub></b>
<b>10.6</b>	0.02	0.082
		0.085
		0.086
<b>10.6</b>	0.04	0.07
		0.089
		0.08
<b>13.0</b>	0.01	0.035
		0.049
		0.048
<b>13.0</b>	0.02	0.08
		0.07
		0.08
<b>13.0</b>	0.04	0.101
		0.111
		0.112
<b>13.0</b>	0.06	0.116
		0.117
		0.118

Como se puede observar en la *Tabla 16*, existe una relación proporcional entre el pH y de la concentración del reactivo F-C, pues al aumentar ambas variables, las absorbancias (así como la coloración del producto de reacción), tienden a ser más altas en comparación con las registradas a concentraciones y pH más bajos. Por ejemplo, al establecer un pH más alto, como lo es a pH 13.0, y variar la concentración de Folin-Ciocalteu se observa que a concentraciones tan bajas como 0.01 M se disminuye la absorbancia de manera significativa, mientras que a concentraciones de 0.04 y 0.06 M se obtienen señales mayores. Para establecer los límites de las variables a fin de efectuar el diseño de experimentos se realizó una prueba de t-student (*Anexo 2*) para establecer si había diferencia entre el uso

de F-C 0.04 y 0.06 M a un pH 13.0, y resultó ser indistinto pues las absorbancias registradas fueron estadísticamente iguales. Por lo tanto, se decidió establecer como mínimo una concentración de Folin-Ciocalteu de 0.02 M y pH 10.6 y como máximos, una concentración de Folin-Ciocalteu 0.04 M y pH 13.0, para el diseño de experimentos.

Como siguiente paso, se realizó un diseño de experimentos factorial  $2^2$ , en donde los factores de respuesta fueron la concentración del reactivo de F-C y el pH de la solución amortiguadora, y el factor de respuesta es la absorbancia. El programa generó una serie de 7 experimentos aleatorios, los cuales se muestran en la *Tabla 17* junto con las absorbancias registradas.

**Tabla 17.** Diseño de experimentos para optimización de la reacción de polifenoles dentro del microdispositivo de extractos obtenidos con etanol:agua 30:70% V/V.

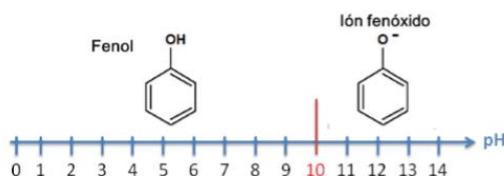
Concentración de Folin mol / L	pH de la solución amortiguadora	A <sub>prom-prom</sub>
0.02	13.0	0.097
0.03	11.8	Turbidez
0.04	13.0	0.1
0.04	10.6	0.055
0.03	11.8	Turbidez
0.02	10.6	0.057
0.03	11.8	Turbidez

Como se aprecia en la *Tabla 17*, las absorbancias más altas se obtuvieron al utilizar la solución amortiguadora con pH 13, en comparación con pH 10.6 y 11.8, siendo esta última una condición no favorable pues propiciaba la formación de cierta turbidez en la fase acuosa recolectada, posiblemente debido al proceso de saponificación de los ácidos grasos contenidos en el aceite de oliva, ya que a pH 11.8 se favorece dicha reacción. En cambio, a pH 13, la solución alcalina impone un pH más alto generando posiblemente la transesterificación en lugar de la saponificación (Torres, Ben-Youseff, Alcocer y De la Rosa, 2017).

La diferencia entre las absorbancias registradas a pH 10.6, 11.8 y 13.0, se debe al nivel de deprotonación que sufren los polifenoles en cada uno de estos pH's, pues al trabajar a un pH por encima del valor de pKa, en este caso arriba de 10.0 (*Figura 51*), se propicia a la formación de iones fenóxido que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para la formación del producto colorido (Chávez, 2017). No obstante, el valor de pKa de los polifenoles varía en función de los grupos funcionales adicionales en la molécula, disminuyendo o incrementando la acidez de los protones y por consiguiente su valor de pKa. Por lo tanto, al imponer un pH 13.0 se obtiene una mayor formación de iones, y por ende una mayor absorbancia.

Por otro lado, al comparar la concentración del reactivo de F-C a pH 13.0, se observa que entre las concentraciones 0.02 y 0.04 M las absorbancias registradas eran muy similares. Por lo cual, se decidió probar con una concentración de 0.03 M, y se obtuvo una  $A_{\text{prom-prom}}$  de 0.14, razón por la que se decidió establecer dicha concentración como la óptima.

Así, el mejor resultado para llevar a cabo la reacción de polifenoles extraídos con el reactivo de F-C en los extractos con etanol:agua 30:70% V/V óptima fue: una **solución de carbonato 0.75 mol/L, pH 13** y una concentración de **reactivo de Folin Ciocalteu 0.03 mol/L**.



**Figura 51.** Escala lineal de zonas de predominio para el fenol.

Por otro lado, para la optimización de la reacción de derivatización dentro del microchip en el caso de los extractos con metanol:agua 40:60% V/V se decidió iniciar las experimentaciones con la concentración del reactivo F-C óptima para etanol, es decir 0.03 M, y únicamente variar el pH de 10.6, 11.8, 13 y 14. Los resultados se muestran en la *Tabla 18*.

**Tabla 18.** Resultados del estudio del efecto del pH en la determinación de los compuestos fenólicos de extractos obtenidos metanol:agua en el microdispositivo.

<b>pH de la solución amortiguadora</b>	<b>A<sub>prom</sub></b>
<b>10.6</b>	0.020
	0.035
	0.029
<b>11.8</b>	0.057
	0.045
	0.050
<b>13</b>	0.09
	0.08
	0.082
<b>14</b>	0.091
	0.08
	0.093

Como se observa en la *Tabla 18*, a pH 13 y 14 se obtienen mejores absorbancias y coloración adecuada del producto de reacción, en comparación con las absorbancias registradas a pH 10.6 y 11.8 cuyos productos de reacción presentaron una coloración amarillenta y no azulada como se esperaba. Para seleccionar el pH de trabajo se decidió realizar una prueba de t-student (*Anexo 3*) a los resultados obtenidos a pH 13 y 14 para evaluar si existe diferencia significativa entre ambas condiciones. El resultando es que las absorbancias registradas de las soluciones de carbonatos a pH 13 y 14 son estadísticamente iguales, por lo que se optó por dejar como condición optima el uso de la solución amortiguadora con pH 13, pues resulta más fácil llevar a cabo su preparación.

Una vez establecido el pH de la solución amortiguadora, se procedió a variar la concentración del reactivo F-C, y se consideraron las concentraciones de 0.01 a 0.04 M, las absorbancias registradas se muestran en la *Tabla 19*.

**Tabla 19.** Estudio del comportamiento de la concentración del reactivo F-C en la determinación de los compuestos fenólicos de los extractos obtenidos empleando metanol:agua en el microdispositivo.

Concentración del reactivo F-C (mol / L)	A <sub>prom</sub>
0.01	0.048
	0.05
	0.05
0.02	0.043
	0.046
	0.054
0.03	0.087
	0.08
	0.082
0.04	0.071
	0.067
	0.07

Como se observa en la *Tabla 19*, a concentraciones de 0.03 y 0.04 M se obtuvieron las mejores absorbancias, por lo que se realizó una prueba de t-student (*Anexo 4*) para establecer si existía diferencia significativa entre dichas concentraciones, dando como resultado que las absorbancias registradas entre las concentraciones de F-C 0.03 y 0.04 M son estadísticamente diferentes. Por lo cual, se decidió establecer la concentración de F-C 0.03 M como la óptima.

Así, el mejor resultado para los extractos con metanol:agua 40:60% V/V se obtiene al realizar la reacción en el microchip utilizando la **solución de carbonato 0.75 mol/L, pH 13** y la concentración de **reactivo de Folin-Ciocalteu 0.03 mol/L**.

### 5.5.3 Determinación del intervalo lineal, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) para la adaptación de la extracción-reacción dentro del microchip para etanol:agua y metanol:agua.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para llevar a cabo la extracción y posterior reacción dentro del microdispositivo ocupando como extractantes

etanol:agua o metanol:agua, se procedió a construir la curva de calibración de cada uno de los extractantes mencionados, y con ello establecer el intervalo lineal, el LC y el LQ.

- Intervalo lineal.

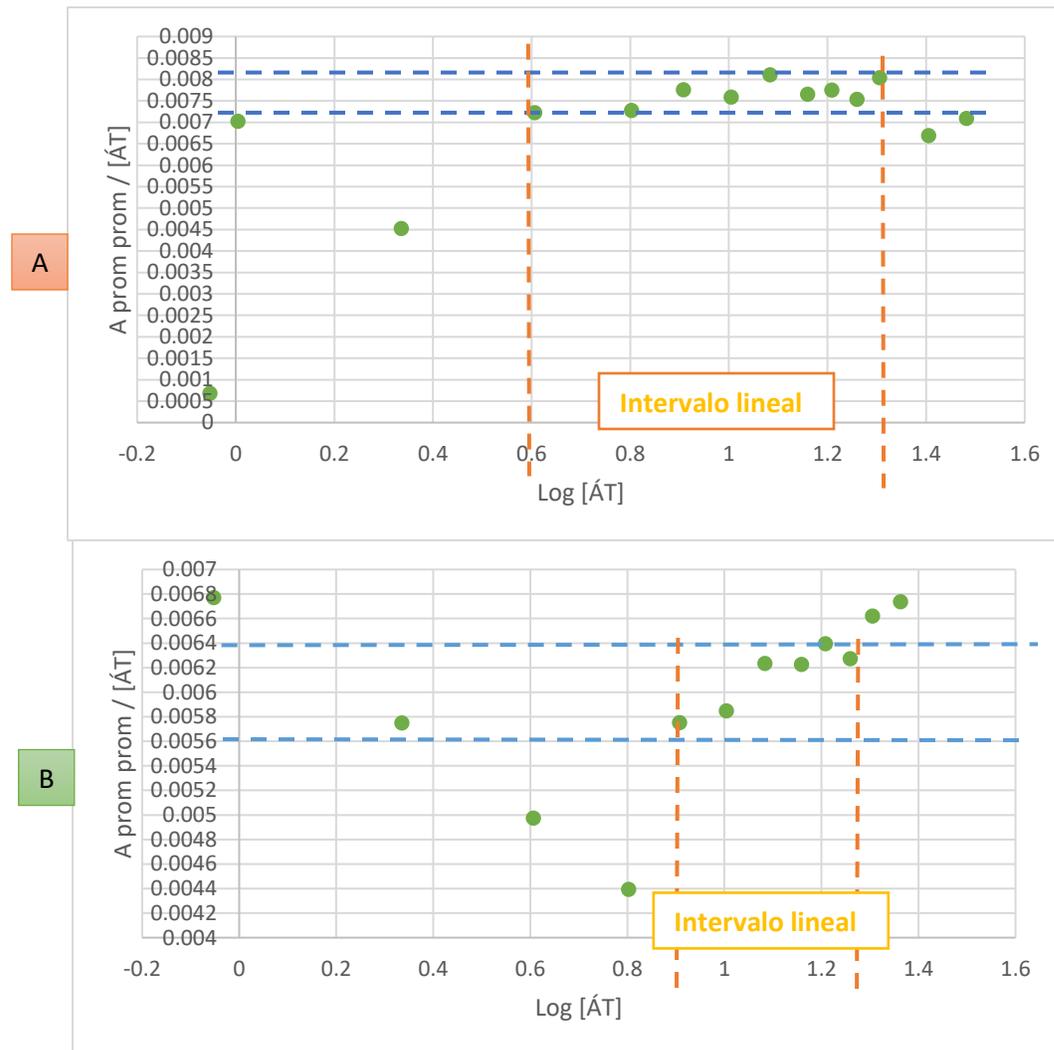
El intervalo lineal de un procedimiento analítico se define como el intervalo donde la concentración del analito produce resultados directamente proporcionales a dicha concentración. La linealidad se corroboró directamente a través de la medición de diluciones a diferentes concentraciones de una solución madre de ácido tánico; los estándares de ácido tánico de 0.057 hasta 0.722  $\mu\text{g/mL}$  no dieron señales capaces de ser diferenciadas de la señal basal en ambos extractantes (etanol o metanol), por lo que para la determinación del intervalo lineal se consideraron las respuestas obtenidas de las concentraciones de 0.86 a 25.41  $\mu\text{g/mL}$ .

En la *Tabla 20* se muestran los promedios de las absorbancias registradas para cada concentración y cada extractante, a las que se les realizó la prueba de intervalo lineal (Huber, 2010), mediante la construcción gráfica de la correlación entre respuesta/concentración (absorbancia/concentración del estándar) y el logaritmo de la concentración. Se obtuvo un intervalo lineal de 4.04 a 20.22  $\mu\text{g/mL}$  para etanol:agua y de 8.08 a 18.19  $\mu\text{g/mL}$  para metanol:agua (*Gráfica 4*), los cuales se encuentran delimitados por líneas punteadas de color azul, correspondiente al promedio de la correlación respuesta/concentración  $\pm 5\%$ .

**Tabla 20.** Resultados para el cálculo del intervalo lineal de las curvas de calibración con ácido tánico (ÁT) en etanol:agua y metanol:agua como extractantes.

	[ÁT] µg/mL	A <sub>prom-prom</sub>	A <sub>prom-prom</sub> / [ÁT]	Log [ÁT]
Etanol:Agua	0.86	0.0006	0.0007	-0.0524
	1.01	0.0071	0.0070	0.0047
	2.17	0.0098	0.0045	0.3357
	4.04	0.0292	0.0072	0.6067
	6.35	0.0462	0.0073	0.803
	8.09	0.0627	0.0078	0.9078
	10.11	0.0767	0.0076	1.0047
	12.13	0.0983	0.0081	1.0838
	14.44	0.1105	0.0077	1.1596
	16.17	0.1253	0.0077	1.2088
	18.19	0.1370	0.0075	1.2599
	20.22	0.1625	0.0080	1.3057
	25.41	0.1700	0.0067	1.4051
	Metanol:Agua	0.86	0.0060	0.0068
1.01		0.0111	0.0110	0.0047
2.17		0.0125	0.0057	0.3357
4.04		0.0201	0.0050	0.6067
6.35		0.0279	0.0044	0.8030
8.09		0.0465	0.0058	0.9078
10.11		0.0591	0.0058	1.0047
12.13		0.0756	0.0062	1.0838
14.44		0.0899	0.0062	1.1596
16.17		0.1034	0.0064	1.2088
18.19		0.1141	0.0063	1.2599
20.22		0.1338	0.0066	1.3057
25.41		0.1556	0.0067	1.3637

**Gráfica 4.** Determinación del intervalo lineal de la curva de calibración de ácido tánico para etanol:agua (A) y metanol:agua (B)



- Límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ).

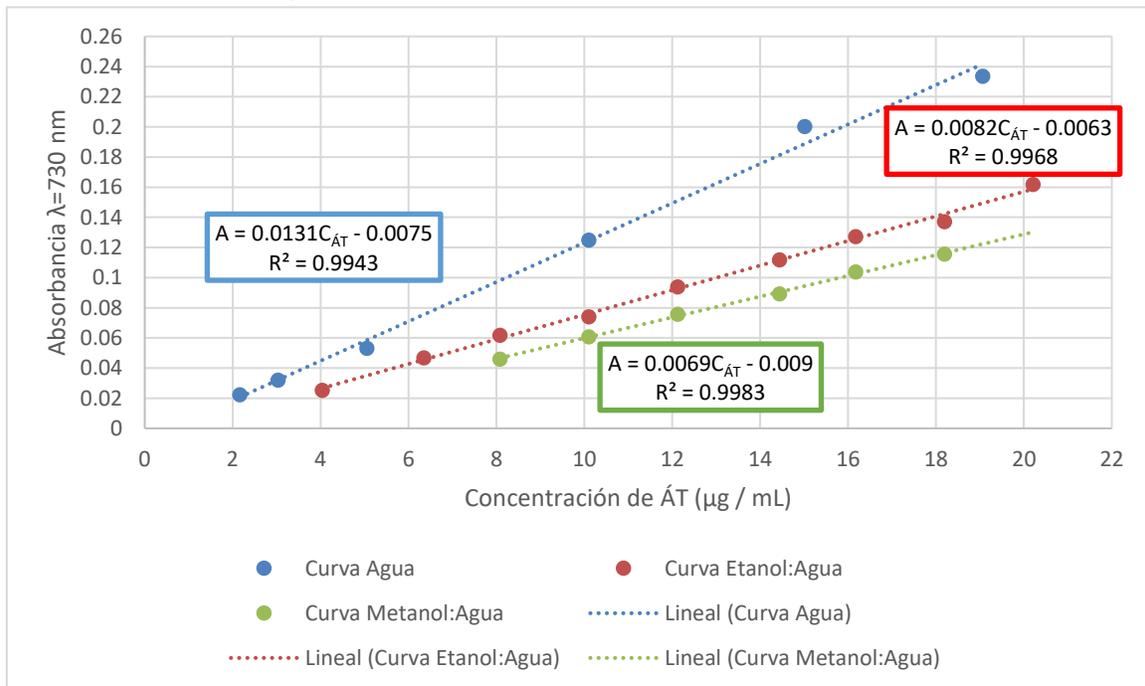
Para una metodología analítica, el LD se define como la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, mientras que el LQ es la cantidad más pequeña de analito que puede ser determinada cuantitativamente. Ambos parámetros de validación son calculados por diferentes procedimientos, en este caso se seleccionó la consideración de la señal del ruido basal el cual presentaba absorbancias de 0.002, por lo que el LD= 3 (ruido basal) y el LQ= 10 (ruido basal).

Por lo tanto, al comparar las señales registradas para los estándares de ácido tánico y el ruido, se encontró un LD= 1.01 µg/mL para etanol:agua y 0.86 µg/mL para metanol:agua, y un LQ= 4.04 µg/mL para ambos extractantes.

### 5.5.4 Curva de calibración para la extracción-reacción en el microdispositivo.

Para la elaboración de las curvas de calibración se prepararon disoluciones estándar de 4.04 a 20.21 µg/mL para etanol:agua, de 8.08 a 18.19 µg/mL para metanol:agua, y de 2.16 a 19.06 µg/mL para la solución amortiguadora (establecido por Chávez, 2017), a partir de una disolución de ácido tánico 1444 µg/mL, donde cada uno de los estándares fueron llevados al aforados con agua destilada. Para corroborar que no hubiera diferencias estadísticamente significativas en la preparación de las curvas de calibración, se decidió construir por triplicado cada curva. Su representación gráfica se muestra en la *Gráfica 5* y en la *Tabla 21* los respectivos parámetros estadísticos de cada curva.

**Gráfica 5.** Curvas de ácido tánico para cada una de las adaptaciones de la extracción-reacción en el microchip.



**Tabla 21.** Parámetros estadísticos para las curvas de calibración para las adaptaciones de la extracción-reacción en el microchip.

Curva	Pendiente ( $\mu\text{g } \text{ÁT}/\text{mL}$ )	Ordenada al origen	R <sup>2</sup>
Agua	0.0131 $\pm$ 0.0005	-0.0075 $\pm$ 0.0078	0.9943
Etanol:Agua	0.0082 $\pm$ 0.0004	-0.0063 $\pm$ 0.0087	0.9968
Metanol:Agua	0.0069 $\pm$ 0.00008	-0.009 $\pm$ 0.0013	0.9983

Como se observa en la *Gráfica 5*, en las curvas de calibración obtenidas en etanol:agua y metanol:agua el intervalo lineal es más corto, además de presentar una pendiente más pequeña, esto indica que la sensibilidad o la capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito es baja, pues a las mismas concentraciones de ácido tánico las absorbancias registradas para el acoplamiento con etanol:agua y metanol:agua fueron menores que las registradas para el acoplamiento con la solución amortiguadora de carbonatos pH 10.6, 0.75 M.

### **5.6 Análisis de las muestras de aceites vegetales comerciales.**

El contenido de polifenoles totales en las muestras de aceites vegetales (*sección 4.8*) se reporta en microgramos de ácido tánico por gramo de aceite ( $\mu\text{g } \text{ÁT}/\text{g}$  de aceite)  $\pm$  la desviación estándar (S). Dado que el método de cuantificación (reacción de Folin-Ciocalteu) es el mismo para la extracción de la fracción fenólica en el microdispositivo y en la extracción líquido-líquido en lote, los resultados obtenidos permitieron realizar la evaluación de la eficiencia de la extracción en el microdispositivo, así como conocer sus ventajas y desventajas frente a una metodología convencional. Además, también fue posible conocer cuál de los tres extractantes fue más eficiente en la extracción de compuestos fenólicos, y de establecer la relación entre el tipo de aceite analizado con la cantidad de fenoles totales determinados.

Los resultados de la cuantificación de polifenoles totales de las diez muestras de aceite vegetal se comparan en la *Tabla 22*.

**Tabla 22.** Concentración de polifenoles totales expresada como microgramos de ácido tánico ( $\mu\text{g}$  ÁT) por gramo de aceite en función de la metodología de extracción.

Aceites	Polifenoles totales ( $\mu\text{g}$ ácido tánico/mL) $\pm$ S (n=3)					
	Metanol:Agua		Solución amortiguadora		Etanol:Agua	
	Lote	Microchip	Lote	Microchip	Lote	Microchip
Ajonjolí tostado <i>Del Moro</i> (México)	51.95 $\pm$ 2.02	275.94 $\pm$ 14.66	50.02 $\pm$ 2.13	295.02 $\pm$ 8.13	48.58 $\pm$ 2.01	385.56 $\pm$ 25.35
Ajonjolí puro extra virgen <i>Del Moro</i> (México)	13.05 $\pm$ 1.70	56.53 $\pm$ 2.43	13.08 $\pm$ 0.49	94.61 $\pm$ 7.21	18.46 $\pm$ 1.79	178.73 $\pm$ 12.16
Aguacate <i>Ahuacatlan</i> 100% natural (México)	< L.D	14.94 $\pm$ 1.12	< L.D	15.07 $\pm$ 2.35	< L.D	17.91 $\pm$ 1.79
Linaza extra virgen <i>Inés Aceites Naturales</i> (México)	< L.D	47.75 $\pm$ 2.61	< L.D	87.35 $\pm$ 5.01	< L.D	213.45 $\pm$ 20.00
Linaza extra virgen <i>Enature</i> 100% natural (México)	< L.D	22.80 $\pm$ 1.98	< L.D	31.80 $\pm$ 1.68	< L.D	30.80 $\pm$ 3.94
Pepita de uva refinado <i>Inés Aceites Naturales</i> (Chile)	< L.D	24.61 $\pm$ 2.61	< L.D	89.47 $\pm$ 1.78	< L.D	244.17 $\pm$ 19.64
Pepita de uva puro <i>Del Moro</i> (Chile)	< L.D	15.76 $\pm$ 0.28	< L.D	16.13 $\pm$ 1.56	< L.D	15.48 $\pm$ 2.39
Cacahuete tostado <i>Inés Aceites Naturales</i> (México)	17.68 $\pm$ 1.81	162.44 $\pm$ 11.25	16.77 $\pm$ 1.37	168.30 $\pm$ 8.92	25.81 $\pm$ 0.58	233.29 $\pm$ 11.93
Oliva virgen extra <i>Pons Ecológico Natural</i> (España)	93.61 $\pm$ 4.52	273.16 $\pm$ 13.42	94.22 $\pm$ 6.13	294.36 $\pm$ 10.2	91.74 $\pm$ 2.64	353.78 $\pm$ 26.75
Vegetal comestible <i>Golden Hills</i> (México)	23.10 $\pm$ 1.09	221.56 $\pm$ 16.23	12.09 $\pm$ 1.25	140.14 $\pm$ 9.90	10.24 $\pm$ 0.73	148.22 $\pm$ 13.15

Para llevar a cabo el análisis de los resultados mostrados en la *Tabla 22*, se decidió abordar tres puntos comparativos de acuerdo con el contenido de polifenoles totales: (1) Efecto de la extracción: lote y microdispositivo, (2) Efecto del extractante y (3) Diferencia entre los aceites, con la finalidad de facilitar dicho análisis. A continuación, se discuten cada uno de estos puntos.

(1) Efecto del proceso de extracción en el contenido de polifenoles totales.

Como se aprecia en la *Tabla 22*, la concentración de compuestos fenólicos varía en función del método de extracción empleado, registrándose la mayor concentración cuando se usó el microdispositivo para la separación de la fracción fenólica, en comparación con la metodología por lote. Al realizar la extracción-reacción dentro del microdispositivo se tuvo una concentración de polifenoles de 33.50 a 98.89% más alta que por la extracción por lote, dicho intervalo tan amplio

se debe a que las muestras de aceite provienen de diferentes matrices y por el efecto que tiene el extractante sobre la fracción fenólica.

En relación al caso del efecto del extractante en la diferencia de la extracción por lote y por microdispositivo, se observa que la extracción con metanol:agua 40:60% V/V por lote presentó un menor porcentaje de eficiencia en la extracción ya que la cantidad de polifenoles totales extraídos con microdispositivo fue mayor en un promedio de 78.34%. Mientras que la extracción-reacción en microchip con etanol:agua 30:70% V/V y con solución amortiguadora presentaron un contenido de polifenoles promedio de 85.85% y 83.57% más que por la extracción por lote, respectivamente. Lo anterior indica que la identidad del extractante aumenta o disminuye la eficiencia de la extracción-reacción en el microdispositivo, siendo la mezcla metanol:agua 60:40% V/V la menos eficiente si se usa en el microdispositivo, lo cual se discutirá más detalladamente en el punto 2.

A pesar de ello, se tiene en claro que el uso de los microdispositivos aumenta la cantidad de compuestos fenólicos a determinar en casi todos los aceites. De esta manera se puede decir que las ventajas que representa el uso del microchip son:

- El aumento de la relación superficie/volumen, es decir, el área de contacto entre la muestra y el extractante se amplifica y con ello la transferencia de masa (Chávez, 2017).
- El uso de microdispositivos presenta las ventajas de requerir menor cantidad de muestra y de reactivos, lo que se traduce en una menor generación de residuos.

Otro aspecto para considerar es la secuencia y número de pasos al realizar la extracción, para la extracción en lote se repitió por triplicado la agitación y la separación de fases, lo que pudo provocar pérdidas inminentes cada vez que se aisló el extracto, mientras que, en el microdispositivo se presenta la ventaja de no requerir de una extracción en multipasos, lo que implica la disminución de la pérdida de analito. Cabe mencionar que en los aceites de pepita de uva, linaza y aguacate no se pudo llevar a cabo su determinación en lote, pues a pesar de aumentar la

cantidad de muestra, las absorbancias registradas no se distinguían de la línea o del ruido de la línea basal.

### (2) Efecto del extractante en la cantidad de polifenoles totales.

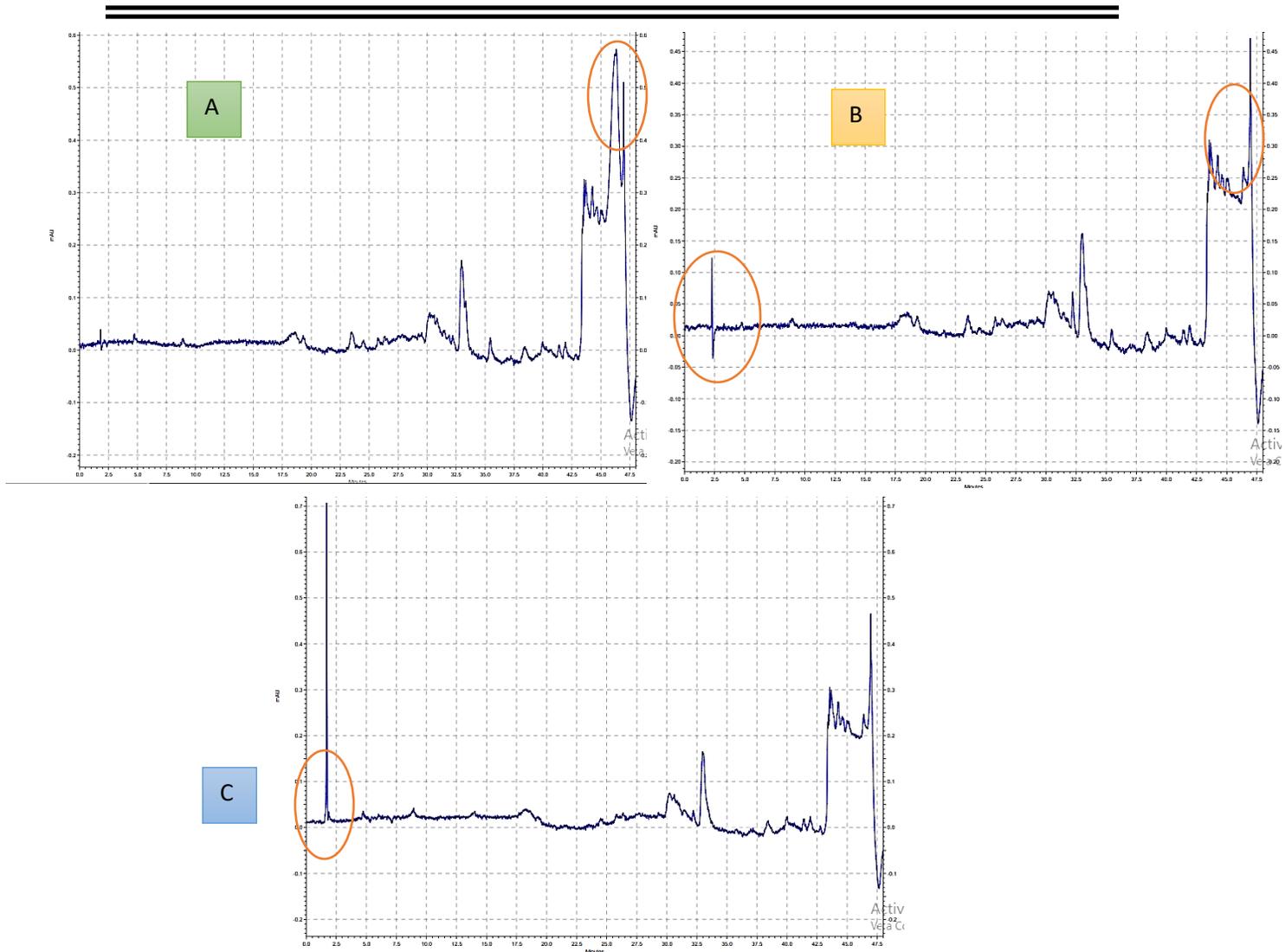
Como se sabe, la extracción es uno de los pasos más importantes para el tratamiento de las muestras, debido a su influencia directa en la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos. Por lo cual, siempre se debe tener en cuenta los factores que pueden aumentar o disminuir la eficiencia de dicha extracción, pues variables como pH, presión, temperatura e identidad del extractante serán en muchos casos factores que modificarán las constantes de reparto afectando o beneficiando la extracción del analito de interés.

En este caso, se trabajó con tres extractantes: metanol:agua 40:60% V/V, etanol:agua 30:70% V/V y solución amortiguadora de carbonatos 0.75 M, pH 10.6. La diferencia entre la cantidad de polifenoles extraídos entre los extractantes es más apreciable al comparar los resultados obtenidos en la extracción-reacción con microdispositivo, pues en la extracción por lote la diferencia entre la cantidad obtenida de polifenoles totales con los diferentes extractantes no es significativamente diferente, excepto en:

- a) El aceite de ajonjolí puro; en el que el procedimiento de extracción con etanol:agua se obtuvo una concentración 30% más alta que por los otros dos extractantes.
- b) El aceite vegetal, donde la extracción con metanol:agua se obtuvo una concentración 50% más alta que con los otros dos extractantes, lo cual puede ser atribuido a que el aceite vegetal está adicionado con TBHQ (antioxidante artificial) que presenta mayor solubilidad en metanol que en agua o etanol.

La similitud en el contenido de polifenoles de los extractos obtenidos por lote, con respecto a los extractantes ocupados se puede apreciar al comparar los cromatogramas de los extractos de un mismo aceite, en este caso, de oliva. Como

se observa en la *Figura 52*, a una misma longitud de onda se tienen señales similares para cada uno de los extractos, por lo cual es coherente que los resultados obtenidos mediante la extracción por lote se comporten de la misma manera. En dicha figura, se señalan con rojo las diferencias más significativas entre los tres extractos, en el caso del extracto elaborado con solución amortiguadora, los picos de las señales se ven ligeramente afectadas debido a que el tiempo para realizar el análisis fue largo, lo que provocó una ligera disminución de los polifenoles debido a la inestabilidad de dichos compuestos a pH básicos aun cuando fueron acidificados, así como a tiempos de almacenamiento prolongados (Reyes, 2014).



**Figura 52.** Análisis de señales de extractos elaborados por lote de aceite de oliva extra virgen mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Condiciones: columna Pursuit C18 150 x 4.6 mm (Varían), fase móvil CH<sub>3</sub>COOH (0.02%):Metanol, flujo de 1 mL/min y un detector de arreglo de diodos. A) Extracto elaborado con metanol:agua 40:60% V/V, B) Extracto elaborado con etanol:agua 30:70% V/V y C) Extracto elaborado con solución amortiguadora de carbonatos.

En cuanto a los resultados cuantitativos obtenidos por HPLC (*Tabla 23*), se observa que algunos compuestos detectados concuerdan con algunos reportados en la literatura; sin embargo, no todos los polifenoles que presenta el aceite de oliva fueron cuantificados mediante cromatografía, pues solo se cuenta con 11 estándares. Razón por la cual, para el análisis de la diferencia en el contenido de polifenoles entre las muestras de aceites, se optó por realizar las comparaciones únicamente de las señales obtenidas.

**Tabla 23.** Concentración de los polifenoles detectados en extractos obtenidos por lote del aceite de oliva.

Estándar	Extractante Metanol:Agua	Extractante Etanol:Agua	Extractante Solución amortiguadora
	mg/kg muestra		
3,4-ácido dihidroxibenzoico			
1,2-dihidroxibenzeno	3.67		
4-ácido hidroxibenzoico	4.21	4.16	
Ácido clorogénico			
4-hidroxibenzaldehido			7.04
Ácido vanílico		7.36	
Ácido cafeico	0.009	0.027	
Vainillina	13.12	12.46	17.13
Ácido p-cumárico	6.69	7.57	7.11
Ácido trans-ferúlico	7.28		8.01
Ácido sinápico	2.22		1.14
Naringenina		15.39	
Bisfenol A	13.18	8.21	18.43
<b>Suma</b>	<b>50.40</b>	<b>55.21</b>	<b>58.88</b>

Al solo considerar la diferencia en el contenido de polifenoles en los resultados de la extracción-reacción en el microdispositivo se tiene que la diferencia establecida entre el uso de extractantes se debe a varios factores:

- a) Primero hay que considerar la diversidad de compuestos constituyentes de la fracción fenólica de los aceites, es decir, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides, lignanos, secoiridoides, etc, que debido a su estructura química, podrán presentar una extracción incompleta, quedando cierta cantidad de compuestos fenólicos retenidos en la fase orgánica debido a que algunos se unen a estructuras más complejas mediante enlaces glicosídicos (polifenoles hidrolizables), que al ser retenidos en el residuo de la extracción (fase orgánica), no son

cuantificados produciendo una subestimación del contenido total de polifenoles.

- b) La extracción con solución amortiguadora de carbonatos 0.75 M, pH 10.6, se basa en la deprotonación de los polifenoles en medio básico al sobrepasar su valor de pKa (*Figura 51*) para formar iones, que al encontrarse cargados negativamente, presentan una mayor afinidad hacia la fase acuosa. Además, bajo estas condiciones se lleva a cabo la hidrólisis de los polifenoles unidos a glucósidos, siendo por ello que se obtiene un contenido de polifenoles de 6.78 a 72.49% más alto que en la extracción con metanol:agua.

Sin embargo, el efecto que tiene el pH en la cantidad de polifenoles extraídos con la solución amortiguadora en comparación con los extraídos con etanol:agua, depende del tipo de aceite y no tanto del extractante.

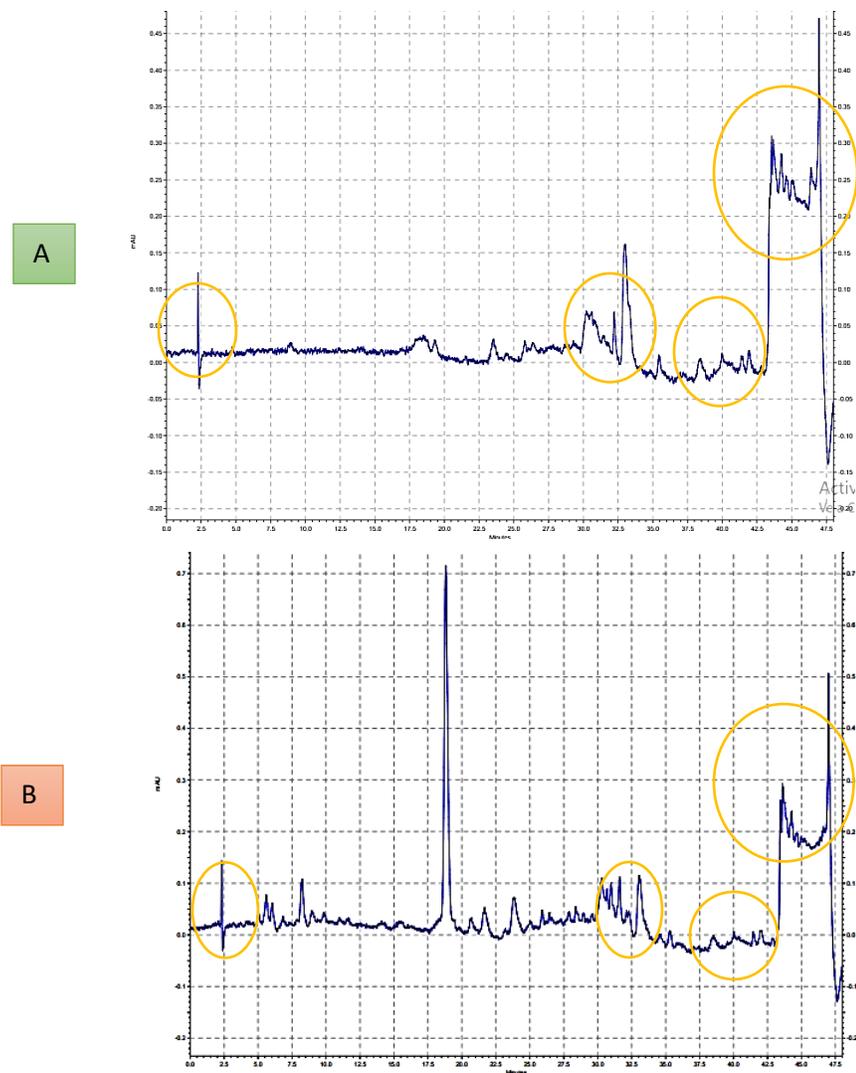
- c) La extracción con etanol y metanol se da únicamente por la afinidad de los compuestos fenólicos al extractante, es decir, por la polaridad, siendo el metanol más polar que el etanol. Sin embargo, se obtuvo una mayor cantidad de polifenoles al realizar la extracción con etanol:agua, esto se debe a que existe una variedad de compuestos fenólicos que son más solubles en esta mezcla como son los compuestos difenoles y ácidos fenólicos (Muñoz, Chávez, Pabón, Rendón, Chaparro y Otálvaro, 2015). Además, al utilizar mayor proporción de agua (70%) se incrementa la constante dieléctrica de la mezcla, lo que ayuda al factor de hidratación o solubilidad de los ácidos fenólicos y en consecuencia aumenta su extracción.

De esta manera los mejores resultados se obtuvieron mediante la extracción-reacción en el microdispositivo con etanol:agua o solución amortiguadora (dependiendo del aceite), siendo la extracción menos eficaz con metanol:agua, a pesar de que es uno de los disolventes más empleados y recomendados para la extracción de compuestos fenólicos; tal es el caso de la metodología propuesta por el Consejo Oleícola Internacional. Los resultados obtenidos son comparables con varios estudios donde se ha demostrado que al realizar la extracción únicamente

con una mezcla de metanol:agua sólo son recuperados entre 8 y 9% de los polifenoles extraíbles, lo que implica que poco más del 90% de los polifenoles hidrolizables como secoiridoides o ácidos fenólicos ligados a glucosa son retenidos en el aceite (Kyung-Hee, Rong, Raymond y Steve, 2006), y las extracciones con etanol:agua o acetona presentaron mejores resultados (Andreatta, Guntero, Longo, Ciparicci y Martini, 2015).

(3) Diferencia en el contenido de polifenoles totales entre las muestras analizadas.

Finalmente, al comparar la cantidad de polifenoles totales entre las muestras estudiadas, se observa que la cantidad determinada depende de la identidad de dichos compuestos, pues cada aceite proviene de un matriz diferente. Por ejemplo, al comparar los cromatogramas del aceite de oliva con el aceite de cacahuete tostado (*Figura 53*) se observa que poseen señales muy parecidas en un sector (color amarillo) correspondiente probablemente a los tocoferoles o los esteroides que se encuentran en todos los aceites. Sin embargo, el resto de las señales son muy diferentes.



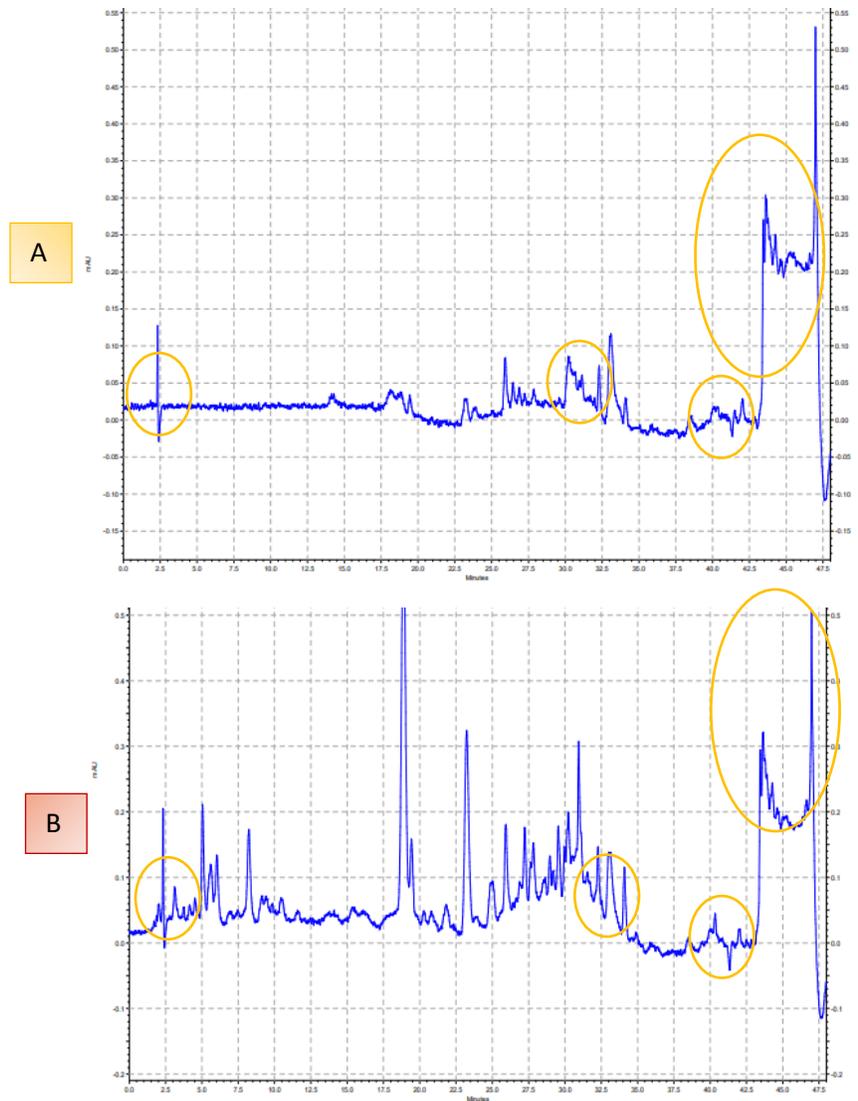
**Figura 53.** Análisis de señales de extractos elaborados con etanol:agua 30:70% V/V por lote de aceite de oliva extra virgen y aceite de cacahuate mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Condiciones: columna Pursuit C18 150 x 4.6 mm (Varian), fase móvil  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0.02%):Metanol, flujo de 1 mL/min y un detector de arreglo de diodos. A) Aceite de oliva y B) Aceite de cacahuate.

De acuerdo con los resultados, los aceites que poseen la mayor cantidad de polifenoles son el aceite de oliva y el aceite de ajonjolí tostado al presentar una concentración de 353.78 ppm y 385.56 ppm, respectivamente. El hecho de que el aceite de oliva contenga una mayor cantidad de polifenoles se debe a que este es el único aceite que es posible consumir sin necesidad de un proceso de refinación, pues, aunque los otros aceites tengan dentro de su etiquetado “aceite x puro” dentro de las normas que los regulan se indica que cada uno de ellos recibe dicha

denominación pero que necesariamente para ser consumidos deben ser sometidos a un proceso de refinación y/o blanqueo (en el caso del aceite de pepita de uva y linaza), en el que se llegan a perder los polifenoles.

Por otro lado, al comparar un mismo aceite, pero de diferente marca se observa que el contenido de polifenoles es muy diferente. Por ejemplo, el aceite de pepita de uva *Inés* tiene un contenido de polifenoles entre un 35 a 93% más que el aceite de pepita *Del Moro*, mientras que el aceite de linaza *Inés*, presenta un contenido de 50 a 85% más que el aceite de linaza *Enature*. Dichas diferencias se pueden deber a las condiciones agronómicas del cultivo, pues eso cambia la composición de la semilla y por lo tanto del aceite; además, el proceso de extracción y el uso o no del proceso de blanqueado modificarán de igual manera la fracción fenólica.

Ahora, al comparar el aceite de ajonjolí tostado con el aceite de ajonjolí puro, se observa que el aceite de ajonjolí tostado posee un contenido de polifenoles de 67% más alto que el aceite puro. Esto se debe a que durante el tostado, se obtiene un mayor porcentaje de aceite extraído, además de que la temperatura incrementa la reacción que sufre la sesamina a sesamol, sesaminol y sus isómeros (*Figura 16, pág. 29*), y como resultado aumenta la actividad antioxidante del aceite. La diferencia entre ajonjolí tostado y el puro se puede ver claramente en el cromatograma obtenido (*Figura 54*), donde se observa que en el ajonjolí tostado se encuentra un mayor número de picos, en comparación con los picos obtenidos en el extracto de ajonjolí puro. Sin embargo, ambos muestran señales similares (marcadas en amarillo) únicamente variando la altura de los picos.



**Figura 54.** Análisis de señales de extractos elaborados con etanol:agua 30:70% V/V por lote de aceite de ajonjolí puro y tostado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Condiciones: columna Persuit C18 150 x 4.6 mm (Varian), fase móvil  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0.02%):Metanol, flujo de 1 mL/min y un detector de arreglo de diodos. A) Aceite de ajonjolí puro y B) Aceite de ajonjolí tostado.

---

---

## 6. Conclusiones

- Se desarrolló y optimizó la extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos a partir de aceites vegetales comerciales utilizando tres extractantes: etanol:agua, metanol:agua y solución amortiguadora, así como su cuantificación dentro del microdispositivo mediante la reacción de Folin-Ciocalteu.
- Se diseñó y fabricaron microdispositivos mediante las técnicas de fotolitografía y litografía suave, resultando ser técnicas de utilidad para la construcción rápida y en masa de este tipo de dispositivos.
- La metodología propuesta de extracción-reacción en el microdispositivo produjo señales analíticas repetibles y reproducibles.
- La concentración de compuestos fenólicos varió en función del método de extracción empleado, registrándose la mayor concentración cuando se realizó la extracción-reacción dentro del microdispositivo en comparación con a extracción en lote.
- En cuanto al extractante, los mejores resultados se obtuvieron mediante la extracción-reacción en el microdispositivo con etanol:agua o la solución amortiguadora (dependiendo del aceite), siendo la extracción con metanol:agua la menos eficaz.
- El uso de la metodología propuesta con el microdispositivo presenta ventajas importantes en comparación con la metodología por lote, pues se requiere de una menor cantidad de muestra y de reactivos, lo que se traduce en menos generación de residuos. Asimismo, hay una manipulación mínima por parte del usuario y un tiempo de análisis corto, por lo que se pueden realizar hasta 10 extracciones con cuantificación por hora (aproximadamente tres muestras diferentes de aceite por triplicado en una hora).
- Al comparar la cantidad de polifenoles totales entre las muestras analizadas, se observó que la cantidad e identidad química de agentes antioxidantes está determinada por el tipo de vegetal o semilla del que procedan, siendo el aceite de oliva y de ajonjolí tostado los que poseen mayor cantidad de

## Conclusiones.

---

---

compuestos fenólicos (353.78 y 385.56  $\mu\text{g}$  ÁT/g muestra, respectivamente). Esto debido a que el aceite de oliva es el único aceite que se puede comercializar sin proceso de refinación, mientras que el aceite de ajonjolí tostado sí es refinado, pero este proceso y el de tostado de la semilla aumenta la formación de compuestos con actividad antioxidante.

## 7. Perspectivas.

Con el diseño de los microcanales, la configuración propuesta y las condiciones óptimas encontradas para la extracción líquido-líquido de los compuestos fenólicos en aceites vegetales se obtuvieron resultados satisfactorios en la cuantificación de polifenoles totales. Sin embargo, al saber que la cantidad de polifenoles totales está directamente relacionada con la capacidad antioxidante, se espera que se pueda implementar alguna metodología de determinación de capacidad antioxidante, como ORAC, en el microdispositivo, lo que tendría una enorme ventaja y aplicabilidad.

De esta manera los resultados obtenidos por la metodología propuesta serán comparables con la actividad antioxidante y así se obtendría un análisis más completo del beneficio de los aceites vegetales como fuentes de antioxidantes.

De igual forma, se espera que se pueda realizar un análisis por cromatografía de gases de los extractos de los diferentes aceites estudiados para conocer la identidad química de los compuestos responsables de las señales obtenidas por HPLC que resultaron comunes entre todos los aceites, las cuales son atribuidas a los tocoferoles y esteroides.

## 8. Anexos

### ANEXO 1. FIAGRAMAS.

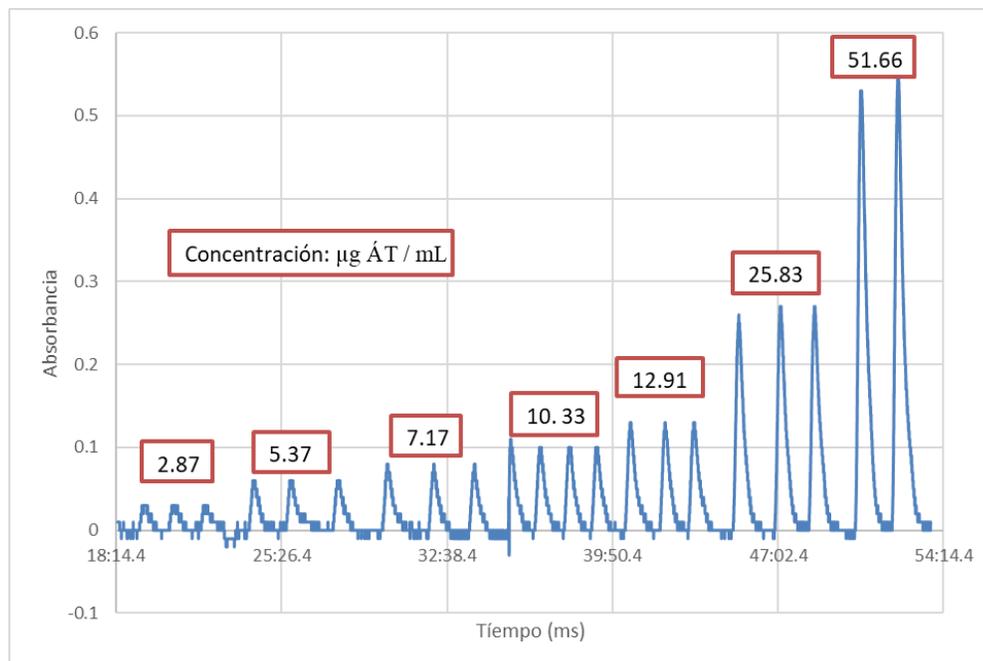


Figura 55. Fiagrama de estándares de ácido tánico en medio acuoso.

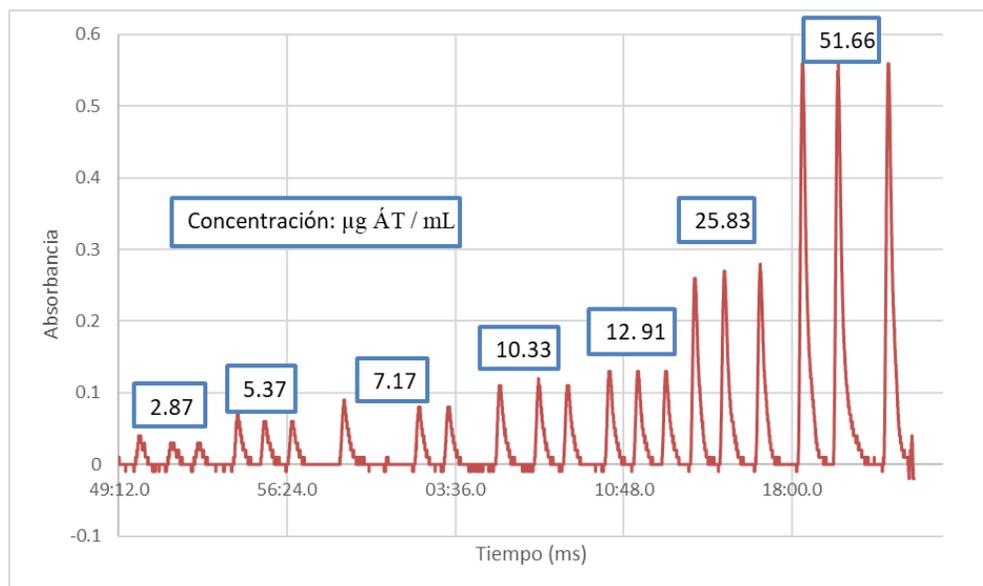
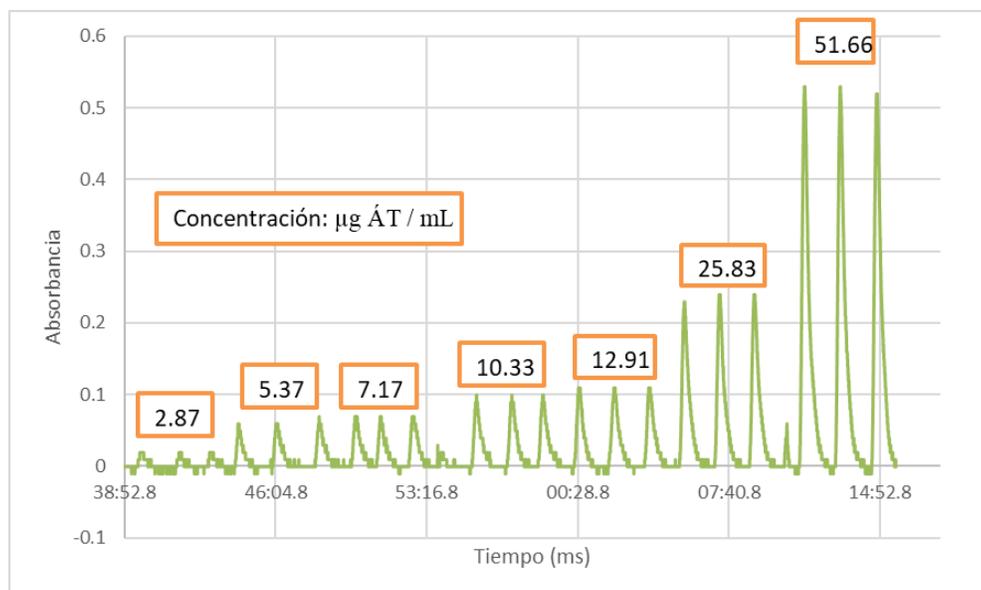


Figura 56. Fiagrama de estándares de ácido tánico en medio etanol:agua 30:70% V/V.



**Figura 57.** Diagrama de estándares de ácido tánico en medio metanol:agua 40:60% V/V.

## ANEXO 2. PRUEBAS DE T-STUDENT PARA OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES CON ETANOL:AGUA EN MICROCHIP.

**Tabla 24.** Valores de absorbancia para el contraste de medias (prueba t-student) para el establecimiento del límite máximo del diseño de experimentos para la optimización de la extracción-reacción dentro del microchip.

	Concentración de F-C 0.04 M			Concentración de F-C 0.06 M		
	1	2	3	1	2	3
	0.1	0.11	0.11	0.11	0.11	0.12
	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.11	0.12
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.12	0.11
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.12	0.12
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.11	0.12
	0.1	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.12	0.12
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.12	0.11
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.12	0.12
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.11	0.12
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.11	0.12
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.11	0.12
	0.1	0.11	0.11	0.11	0.12	0.12
	0.1	0.11	0.12	0.12	0.11	0.12
	0.1	0.11	0.12	0.11	0.12	0.11
	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.12
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.12	0.12
	0.1	0.11	0.11	0.12	0.12	0.11
	0.1	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12
A <sub>prom</sub>	0.101	0.11	0.112	0.117	0.116	0.118
A <sub>prom prom</sub>	0.108			0.117		
S	0.0056			0.0048		
S <sup>2</sup>	3.1751 x 10 <sup>-5</sup>			2.2599 x 10 <sup>-5</sup>		

Para realizar la prueba t de comparación de medias se determinó una varianza conjunta ( $S^2_{con}$ ) a partir de las varianzas individuales ( $S^2_{0.04 M}$  y  $S^2_{0.06 M}$ ) (Ecuación 1).

$$S^2_{com} = \frac{(n_a - 1)S_a^2 + (n_b - 1)S_b^2}{n_a + n_b - 2}$$

Ecuación 1

La hipótesis nula ( $H_0$ ) adoptada es que las medias de las absorbancias dadas del producto de reacción obtenido bajo una concentración de F-C 0.04 M y 0.06 M son las mismas; para aceptar o rechazar la hipótesis se calculó el estadístico  $|t|$  empleando la varianza conjunta, véase *Ecuación 2*, cuyo resultado fue comparado con el valor t crítico  $|t_c|$  consultado directamente de tablas para una prueba bilateral o de dos colas con  $\alpha=0.05$  y considerando los grados de libertad como  $n_{0.04\text{ M}} + n_{0.06\text{ M}} - 2$ , en este caso 4 grados de libertad. Bajo estas condiciones  $|t_c|= 2.1318$ .

$$|t| = \frac{A_{prom\ prom}^a - A_{prom\ prom}^b}{\sqrt{S_{con}^2 \left(\frac{1}{a} + \frac{1}{b}\right)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Se aceptará la hipótesis nula cuando  $|t| < |t_c|$  lo que implica que las medias son iguales, mientras que, si se cumple lo contrario, las medias serán diferentes y la señal analítica se verá afectada de manera significativa por la concentración del reactivo de F-C.

A continuación, se presentan los cálculos de la comparación de las medias de absorbancia obtenidas con reactivo de F-C 0.04 y 0.06 M:

$$H_0: A_{prom\ prom}^{0.04\text{ M}} = A_{prom\ prom}^{0.06\text{ M}}$$

$$H_1: A_{prom\ prom}^{0.04\text{ M}} \neq A_{prom\ prom}^{0.06\text{ M}}$$

$$S_{com}^2 = \frac{(3-1)(3.1751 \times 10^{-5}) + (3-1)(2.2599 \times 10^{-5})}{3+3-2} = 2.7175 \times 10^{-5}$$

$$|t| = \frac{0.108 - 0.117}{\sqrt{2.7175 \times 10^{-5} \left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3}\right)}} = |-2.11| = 2.11$$

Se cumple que  $|t| < |t_c|$  ( $2.11 < 2.1318$ ), aceptándose la hipótesis nula, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha=5\%$ ) entre las señales registradas del producto de reacción obtenido con una concentración de reactivo de F-C 0.04 M y 0.06 M.

**ANEXO 3. PRUEBAS DE T-STUDENT PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL pH DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA EN LA SEGUNDA PARTE DEL MICROCHIP PARA LA FORMACIÓN DEL PRODUCTO DE REACCIÓN CON LA EXTRACCIÓN CON METANOL:AGUA EN MICROCHIP.**

**Tabla 25.** Valores de absorbancia para el contraste de medias (prueba t-student) para el establecimiento del pH de la solución amortiguadora que contiene carbonatos para la optimización de la extracción-reacción dentro del microchip.

	pH 13.0			pH 14.0		
	1	2	3	1	2	3
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.09	0.09	0.08	0.1
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.08	0.1	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.1
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.1
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.1
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.09	0.09	0.08	0.1
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.1
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.09
$A_{prom}$	0.08	0.09	0.0825	0.0905	0.08	0.093
$A_{prom\ prom}$	0.084			0.088		
S	0.0049			0.0064		
$S^2$	$2.47 \times 10^{-5}$			$4.10 \times 10^{-5}$		

Para realizar la prueba t de comparación de medias se determinó una varianza conjunta ( $S^2_{con}$ ) a partir de las varianzas individuales ( $S^2_{pH\ 13}$  y  $S^2_{pH\ 14}$ ), Los cálculos se presentan a continuación:

$$H_0: A_{prom\ prom}^{pH\ 13} = A_{prom\ prom}^{pH\ 14}$$

$$H_0: A_{prom\ prom}^{pH\ 13} \neq A_{prom\ prom}^{pH\ 14}$$

$$S^2_{com} = \frac{(3-1)2.47 \times 10^{-5} + (3-1)4.01 \times 10^{-5}}{3+3-2} = 3.24 \times 10^{-5}$$

$$|t| = \frac{0.084 - 0.088}{\sqrt{3.24 \times 10^{-5} \left( \frac{1}{3} + \frac{1}{3} \right)}} = |-0.86| = 0.86$$

Se cumple que  $|t| < |tc|$  ( $0.86 < 2.1318$ ), y por lo tanto se acepta la hipótesis nula, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha=5\%$ ) entre las señales registradas del producto de reacción obtenido con una solución amortiguadora de pH 13 y de 14.

**ANEXO 4. PRUEBAS DE T-STUDENT PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE REACTIVO DE F-C PARA LA EXTRACCIÓN-REACCIÓN CON METANOL:AGUA EN MICROCHIP.**

**Tabla 26.** Valores de absorbancia para el contraste de medias (prueba t-student) para el establecimiento de la concentración de F-C para la optimización de la extracción-reacción dentro del microchip.

	Concentración F-C 0.03 M			Concentración F-C 0.04 M		
	1	2	3	1	2	3
	0.09	0.08	0.09	0.07	0.07	0.07
	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07
	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07
	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07
	0.09	0.08	0.09	0.07	0.06	0.07
	0.08	0.08	0.09	0.08	0.07	0.07
	0.08	0.08	0.09	0.07	0.06	0.07
	0.09	0.08	0.09	0.07	0.07	0.07
	0.08	0.08	0.09	0.07	0.06	0.07
	0.09	0.08	0.09	0.08	0.07	0.07
	0.08	0.08	0.09	0.07	0.06	0.07
	0.08	0.08	0.09	0.07	0.07	0.07
	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07
	0.09	0.08	0.09	0.07	0.06	0.07
	0.08	0.08	0.09	0.07	0.07	0.07
	0.08	0.08	0.09	0.07	0.06	0.07
	0.08	0.08	0.09	0.07	0.07	0.07
	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07
	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07
	0.08	0.07	0.09	0.07	0.07	0.07
A <sub>prom</sub>	0.0825	0.0795	0.087	0.071	0.067	0.07
A <sub>prom-prom</sub>	0.083			0.069		
S	0.0050			0.0036		
S <sup>2</sup>	2.47x10 <sup>-5</sup>			1.31x10 <sup>-5</sup>		

Para realizar la prueba t de comparación de medias se determinó una varianza conjunta ( $S^2_{con}$ ) a partir de las varianzas individuales ( $S^2_{0.03 M}$  y  $S^2_{0.02 M}$ ), A

continuación, se presentan los cálculos para la comparación de las medias de absorbancia obtenidas con reactivo de F-C 0.04 y 0.06 M:

$$H_0: A_{\text{prom-prom}^{0.03 \text{ M}}} = A_{\text{prom-prom}^{0.04 \text{ M}}}$$

$$H_0: A_{\text{prom-prom}^{0.03 \text{ M}}} \neq A_{\text{prom-prom}^{0.04 \text{ M}}}$$

$$S_{com}^2 = \frac{(3-1)2.47 \times 10^{-5} + (3-1)1.31 \times 10^{-5}}{3+3-2} = 1.89 \times 10^{-5}$$

$$|t| = \frac{0.083 - 0.069}{\sqrt{0.135 \left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3}\right)}} = |3.99| = 3.99$$

Se cumple que  $|t| > |tc|$  ( $3.99 > 2.1318$ ), y por tanto se rechaza la hipótesis nula, lo que indica que si hay diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha=5\%$ ) entre las señales registradas del producto de reacción obtenido con una concentración de reactivo de F-C 0.03 M y 0.04 M.

---

---

## 9. Referencias.

Andreatta, A., Guntero, V., Longo, M., Ciparicci, S. y Martini, R. (2015). *Comparación de los métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola*. Asociación Argentina de Ingenieros Químicos (AAIQ). Recuperado el 20 de septiembre de 2019 de <http://www.aaiq.org.ar>

Barrientos, P., Gracia, E. y Avitia, E. (1996). *Anatomía del fruto del aguacate, ¿drupa o baya?* Revista Chapingo, Serie Horticultura, 2(2), 189-198.

Barranco, D., Fernandez, E. y Rallo, L. (2008). *El cultivo del olivo*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.

Boskou, D. (2006). *Olive Oil: Chemistry and Technology*. Illinois, E.U.A.: AOCS PRESS.

Boskou, D. (2008). *Olive Oil: Minor constituents and health*. New York, E.U.A.: CRC PRESS.

Bressani, R. (2009). *La composición química, capacidad oxidativa y valor nutritivo de la semilla de variedades de aguacate* (Informe final). Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.

Canosa, R. (2009). *Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales*. Galicia, España: Universidad de Santiago de Compostela.

Cañizares, M. (2002). *Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica*. Revista de la Sociedad Química de México, 46(2), pp. 167-174.

Cárdenas, A., Camacho, L. y Mondragón, E. (2007). *Extracción de aceite de cacahuete* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Metropolitana, México.

---

---

Carretero, A. (s/f). *Aceites vegetales con actividad terapéutica II*. Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos. Recuperado el 10 de julio de 2019 de <https://botplusweb.portalfarma.com/>

Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación (s/f). Activación de reacciones químicas mediante ultrasonido. Universidad de Barcelona, España. Recuperado el 19 de agosto de 2019 de <http://www.ub.edu/talq/es/node/251>

Chávez, K. (2017). *Evaluación de microdispositivos para la extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos en aceite de oliva* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Cinfuentes, M., Sierra, A. y Álvarez, V. (2016). *Plan de exportación de aceite de aguacate extra virgen con destino a Francia* (Informe Final). Universidad Sergio Arboleda, Colombia.

Consejo Oleícola Internacional COI/T.15/NC n°3/Rev. 7. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. Mayo de 2013.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (s/f). *Aguacate*. Recuperado el 4 de junio de 2019 de <https://www.biodiversidad.gob.mx/usos/alimentacion/aguacate.html>

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (s/f). *Cacahuete*. Recuperado el 4 de junio de 2019 de <https://www.biodiversidad.gob.mx/usos/alimentacion/cacahuete.html>

Cortez, C. y Sánchez, C. (2017). *Evaluación de la estabilidad oxidativa de la mezcla de aceites de chía y ajonjolí* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional del Santa, Perú.

Escutia, G. (2011). *Extracción asistida por ultrasonido de polifenoles de uva* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Franco, M., Salomón, J., Morales, A., Castañeda, A. y Rubí, M. (2015). *Ácidos grasos y parámetros de calidad del aceite de semilla de uva silvestre (Vitis spp.)*. Scientia Agropecuaria, 2(4), 271- 278.

García, S., Frutos, G., Pérez, P. y Sevillano, C. (2010). *Método optimizado de extracción por ultrasonidos para la determinación de PAHs seleccionados en un suelo contaminado con fuel tipo II* (Informe Técnico Cimart). Universidad de Barcelona, España.

Gil, H. (2010). *Tratados de Nutrición, Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Madrid, España: Medica Paranaamericana.

Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S. y Sihag, M. (2014). *Flax and flaxseed oil: an ancient medicine and modern functional food*. J Food Sci Technol, 51 (9), 1633-1653.

Gunstone, D., Harwood, J. y Padley, F. (1994). *The lipid Handbook*. Cambridge, Gran Bretaña: Champman y Hall London.

Gunstone, D. (2002). *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*. Oxford, E.U.A.: Blackwell Publishing.

Gunstone, D. y Kochhar, P. (2002). *Sesame, rice-bran and flaxseed oils*. En Gunstone, D, *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses* (pp. 297-308). Oxford, E.U.A.: Blackwell Publishing.

Gunstone, D. y Sanders, A. (2002). *Groundnut (peanut) oil*. En Gunstone, D, *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses* (pp. 231-243). Oxford, E.U.A.: Blackwell Publishing.

Huber, L. (2010). *Validation of Analytical Methods*. Alemania: Agilent Technologies.

Kyung-Hee, K., Rong, T., Raymond, Y. y Steve W. C. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. Food Chemistry, 95(3), 466-473.

López, M. y Porras, L. (2009). *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 3(1), 121-134.

López, O. (s/f). *Beneficios para la salud del aceite de palta*. Aconcagua Oil & Extract. Recuperado el 10 de julio de 2019 de [http://paltita.com/pdf/salud\\_es.pdf](http://paltita.com/pdf/salud_es.pdf)

---

---

MicroChem SU-8 3000 (s.f.) Recuperado el 13 de febrero de 2019 de <http://www.microchem.com/pdf/SU8%203000%20Data%20Sheet.pdf>

Moya, G. (2017). *Extracción y caracterización de aceite vegetal de las semillas de uva borgoña (Vitis vinífera) utilizando enzimas*. Tesis de licenciatura, Universidad Agraria la Molina.

Muñoz, W., Chávez, W., Pabón, L., Rendón, F., Chaparro, M. y Otálvaro, A. (2015). *Extracción de compuestos con actividad antioxidante a partir de champa*. Revista CENIC Ciencias Químicas, 46(s/n), pp. 38-46.

Norma comercial CODEX STAN 33-1981, aplicable para aceites de oliva y aceites de orujo de oliva. Food and Agriculture Organization, 2013.

Norma comercial CODEX STAN 210-1999, aplicable para aceites vegetales especificados. Food and Agriculture Organization, 2017.

Norma mexicana NMX-F-002-SCFI-2012. Alimentos-Aceite comestible puro de ajonjolí-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 22 de abril de 2012.

Norma mexicana NMX-F-027-SCFI-2012 Aceites y grasas-Aceite de cacahuate-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 22 de abril de 2013.

Norma mexicana NMX-F-052-SCFI-2008. Aceites y grasas-Aceite de aguacate-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 18 de junio de 2008.

Norma mexicana NMX-F-066-SCFI-2008. Aceites y grasas-Aceite de linaza-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 18 de junio de 2008

Norma mexicana NMX-F-109-SCFI-2014. Alimentos- Aceite de Oliva-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 11 de agosto de 2014.

Norma mexicana NMX-F-223-SCFI-2011. Alimentos- Aceite vegetal comestible-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 24 de julio de 2009.

Palacios, M. (1997). *Aplicación de análisis estadísticos multivariantes al estudio de proceso de maduración de la uva en el marco del jerez*. Cádiz, España: Servicio Publicaciones UCA.

---

---

Pérez, R., (2005). El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales. e-Gnosis, 3(10). Recuperado el 23 de junio de 2019 de <http://www.e-gnosis.udg.mx/vol3/art10>

Pokorny, J. y Korezak, J. (2001). *Preparation of natural antioxidant, in Antioxidants in Food: Practical Applications*. Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited.

Proyecto de Norma PROY-NOM-F-588-SCFI-2009. Aceites y grasas – Aceite comestible puro de pepita de uva – Especificaciones. Diario Oficial de la Federación.

Rao, C., Newmark, H. y Reddy, B. (1998). *Chemopreventive effect of squalene on colon cancer*. Carcinogenesis, 19(2), 287-290.

Reiter B. y Lorbeer, E. (2001) *Analysis of the Wax Ester Fraction of Olive Oil and Sunflower Oil by Gas Chromatography and Gas Chromatography-mass Spectrometry*. Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS), 78(9), 881-888.

Resat, A., Capanoglu, E. y Shahidi, F. (2018). *Measurement of antioxidant activity y capacity: recent trends and applications*. Nueva Jersey, E.U.A.: John Wiley & Sons.

Restrepo, D., Lodoño, J., González, D., Benavides, Y. y Cardona, B. (2012). *Comparación del aceite de aguacate variedad Hass cultivado en Colombia, obtenido por fluidos supercríticos y métodos convencionales: una perspectiva desde la calidad*. Revisa Lasallista de Investigación, 9(2), 151-161.

Reyes, L. (2014). *Efecto del procesamiento sobre la estabilidad de polifenoles en extracto de mango (Mangifera indica L.)* (Tesis de Licenciatura). Escuela Agrícola Panamericana, Honduras.

Ricci, F. (2011). *Producción de aceite de pepita de uva, una herramienta de creación de valor agregado para un producto residual* (Tesis de Licenciatura). Instituto Tecnológico de Buenos Aires, Argentina.

Rodríguez, R. (2014). *Estudio de la pre-factibilidad para la producción y exportación de aceite de palta* (Tesis de Licenciatura). Universidad Católica Pontificia de Perú, Perú.

---

---

Rojas, L. (2010). *Determinación de la capacidad antioxidante de extractos de vainilla* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Sandoval, V. (2015). *Evaluación de dispositivos de microfluídica para la determinación de polifenoles totales* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca (2012). *Aceite de oliva virgen, Radiografía de su proceso*. Alimentos Argentinos, 55(s/n), 22-26.

s/a, (2002). *El aceite de aguacate en México*. ANIAME, 8 (37). Recuperado el 25 de junio de 2019 de <http://www.mundialsiglo21.com>

s/a, (2016). *Estrés oxidativo y enfermedades digestivas* [Mensaje en un blog]. Recuperado el 17 de agosto de 2019 de [estresoxidativo.bioquimica.blogspot.com](http://estresoxidativo.bioquimica.blogspot.com).

Silva, M., Gallardo, G. y Pascual, G. (2013). *Caracterización fisicoquímica del Aceite de Linaza (Linum usitatissimum L.)*. Infinitum, 3(2), 45-57.

SAGARPA (2002). *Producción del cultivo de cacahuete (Arachis hypogaea L.) en el estado de Morelos*. México, Morelos.

SAGARPA (2011). *Monografía de Cultivos: Aguacate*. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios, México CDMX.

SAGARPA (2015). *Estudio multidimensional del aceite de aguacate (hueso y piel) para los mercados de alto valor de los países orientales*. México, Zacatecas.

Smith, J., Yang, G., Seril, D., Liao, J. y Kim, S. (1998). *Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene*. Carcinogenesis, 19(4), 703-706.

Starzynski, A. (2019). *Flow Injetion análisis: tutorial a new on Flow Based micro Analytical Techniques*. Recuperado el 9 de agosto de 2019 de <https://www.flowinjectiontutorial.com/index.html>

Torres, A., Ben-Youseff, C., Alcocer, B. y De la Rosa, D. (2017). *Efecto de la temperatura y el tiempo de reacción sobre la esterificación y la transesterificación*

*de aceites comestibles usados*. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias, 4(13), 19-35.

Vaca, M., Vázquez, J., Vázquez, V. y Vázquez, J. (2001). *Manual de manejo del cultivo de ajonjolí*. Universidad Zamorano, Honduras. Recuperado el 10 de junio de 2019 de <https://bdigital.zamorano.edu/>

Werman, M. y Neeman, I. (1987). *Avocado oil production and chemical characteristics*. Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS), vol. 64, pp. 229-232.

Wong, M., Raquejo, C. y Woolf, A. (2010). *What is unrefined, extra virgin cold-pressed avocado oil?* The American Oil Chemists' Society (AOCS). Recuperado el 25 de junio de 2019 de <https://www.aocs.org>.